



DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CIVIL. INSTITUTO DEL AGUA.

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA
DESNITRIFICACIÓN DE AGUAS SUBTERRÁNEAS
CONTAMINADAS MEDIANTE FILTROS SUMERGIDOS

Almudena de la Rúa Ruiz
Tesis Doctoral
Granada, 2007

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CIVIL. INSTITUTO DEL AGUA.

“INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA DESNITRIFICACIÓN DE AGUAS SUBTERRÁNEAS CONTAMINADAS MEDIANTE FILTROS SUMERGIDOS”

MEMORIA PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE DOCTOR EUROPEO

Fdo. Dña. Almudena de la Rúa Ruiz

Directores:

Fdo: D. Miguel Ángel Gómez Nieto
Profesor Titular
Departamento de Ingeniería Civil
Universidad de Granada

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

Este trabajo ha sido financiado por fondos de la Unión Europea y el Ministerio de Educación y Ciencia (FIT-050000-2001-30, FIT-050000-2002-32, FIT-310200-2004-3), con la colaboración de la Empresa Municipal de Abastecimiento y Saneamiento de Granada (EMASAGRA).

ÍNDICE

INDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Problemática actual de la contaminación de las aguas subterráneas por nitrato.....	1
1.2	Tecnología actual para la eliminación del nitrógeno del agua.....	4
1.3	Biopelículas.....	9
1.3.1	Concepto de biopelícula.....	9
1.3.2	Fases de formación de las biopelículas.....	10
1.3.3	Estructura de las biopelículas.....	13
1.3.4	Componentes de la biopelícula.....	14
1.3.4.1	Agua.....	14
1.3.4.2	Biomasa celular.....	14
1.3.4.3	Sustancias poliméricas extracelulares (EPS)	14
1.3.4.4	Productos de hidrólisis y de lisis celular.....	15
1.3.5	Importancia del Material Polimérico Extracelular.....	15
1.4	Descripción de los sistemas de filtros sumergidos.....	16
1.4.1	Filtros sumergidos.....	19
1.4.1.1	Diseño del filtro sumergido.....	21
1.4.1.2	Aplicaciones de los filtros sumergidos.....	23
1.5	Ciclo del Nitrógeno.....	25
1.5.1	Fijación de Nitrógeno Molecular.....	25
1.5.2	Asimilación de nitrógeno.....	26
1.5.3	Amonificación.....	27
1.5.4	Nitrificación.....	27
1.5.5	Procesos desasimilatorios.....	28

1.5.6	Oxidación anaeróbica de amonio.....	29
1.6	Desnitrificación.....	29
1.6.1	Reducción desasimilatoria de NO_3^- a NO_2^-	30
1.6.2	Reducción desasimilatoria de NO_2^- a NO	33
1.6.3	Reducción desasimilatoria de NO a N_2O	34
1.6.4	Reducción desasimilatoria de N_2O a N_2	35
1.7	Factores que afectan a la desnitrificación biológica.....	36
1.7.1	Presencia de un microorganismo desnitrificante.....	36
1.7.2	Presencia de un donador de electrones.....	37
1.7.3	Ausencia de oxígeno.....	39
1.7.4	Presencia de aceptores de electrones.....	40
1.7.5	Existencia de un pH óptimo.....	41
1.7.6	Existencia de una temperatura óptima.....	42
1.8	Microorganismos desnitrificantes psicrótrofos.....	49
2	OBJETIVOS	53
3	MATERIALES Y MÉTODOS	55
3.1	Cronología del estudio.....	55
3.2	Selección de los microorganismos desnitrificantes.....	56
3.2.1	Recuperación de microorganismos conservados mediante liofilización.....	57
3.2.2	Comprobación de la generación de gas en medio desnitrificante semisólido.....	58
3.2.3	Estudio del crecimiento del microorganismo a diferentes temperaturas.....	60
3.2.4	Cuantificación de la actividad desnitrificante.....	60
3.2.5	Identificación taxonómica de las cepas bacterianas.....	63
3.2.5.1	Extracción de ADN de las células bacterianas.....	63

3.2.5.2	Amplificación de fragmentos del gen codificante del ADNr 16s mediante PCR.....	64
3.2.5.3	Separación del ADN de las muestras mediante electroforesis.....	66
3.2.5.4	Extracción del ADN del gel de agarosa.....	67
3.2.6	Conservación de los inoculantes seleccionados e identificados.....	68
3.3	Descripción del filtro sumergido a escala de laboratorio.....	69
3.3.1	Diseño del filtro sumergido y ubicación del mismo.....	69
3.3.2	Características del agua a tratar.....	72
3.3.3	Lavado del sistema.....	73
3.4	Inoculación del sistema para la formación de la biopelícula.....	73
3.4.1	Formación de la biopelícula a partir de la microbiota natural del agua subterránea.....	74
3.4.2	Inoculación con fango activo procedente del reactor biológico de la Estación Depuradora “Los Vados” (Granada).....	74
3.4.3	Inoculación con microorganismos previamente seleccionados.....	75
3.5	Estudios de microscopía electrónica de barrido de superficie.....	77
3.6	Caracterización de influentes y efluentes.....	79
3.6.1	Determinación del pH.....	79
3.6.2	Determinación de nitrato y nitrito.....	80
3.6.3	Determinación de la turbidez.....	82
3.6.4	Determinación de microorganismos aerobios totales.....	84
3.7	Cuantificación y caracterización de la biomasa.....	84
3.8	Estudio de las comunidades bacterianas presentes en las biopelículas.....	85
3.8.1	Extracción del ADN bacteriano de las biopelículas.....	86

3.8.2	Amplificación de fragmentos del gen codificante del ARNr 16S.....	89
3.8.3	Concentración del producto de la PCR anidada.....	91
3.8.4	Separación de las muestras mediante electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE).....	92
3.8.5	Reamplificación de las bandas separadas mediante TGGE	93
3.8.6	Purificación y secuenciación de los fragmentos de ADN reamplificados.....	94
3.8.7	Análisis informático de las secuencias.....	94
3.9	Análisis estadístico.....	95
4	RESULTADOS	97
4.1	Resultados de la selección de cepas desnitrificantes.....	97
4.1.1	Comprobación de la generación de gas en medio desnitrificante.....	97
4.1.2	Crecimiento de los microorganismos a diferentes temperaturas.....	98
4.1.3	Actividad desnitrificante.....	99
4.1.4	Identificación de las cepas seleccionadas.....	102
4.1.5	Selección definitiva de las cepas desnitrificantes.....	103
4.2	Descripción de las cepas seleccionadas.....	105
4.2.1	Descripción de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	105
4.2.2	Descripción de <i>Pseudomonas mandelii</i>	105
4.2.3	Descripción de <i>Pseudomonas brassicacearum</i>	106
4.3	Colonización del soporte del filtro sumergido para la formación de la biopelícula desnitrificante.....	107
4.3.1	Colonización del soporte por parte de la microbiota autóctona del agua subterránea.....	107
4.3.2	Colonización del soporte por los microorganismos presentes en el fango activo procedente del reactor biológico de una estación depuradora de aguas residuales urbanas.....	110

4.3.3	Colonización del soporte mediante la inoculación selectiva con <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24.....	113
4.3.4	Colonización del soporte mediante la inoculación selectiva con <i>Pseudomonas mandelii</i> cepa A103.....	116
4.3.5	Colonización del soporte mediante la inoculación selectiva con <i>Pseudomonas brassicacearum</i> cepa A343....	120
4.4	Resultados de la capacidad de eliminación de nitrógeno por el sistema.....	123
4.4.1	Resultados de la evolución de los valores de N_t en el efluente.....	123
4.4.1.1	Evolución de la capacidad de eliminación de N_t del filtro sumergido sin inoculación previa.....	124
4.4.1.2	Evolución de la capacidad de eliminación de N_t del filtro sumergido inoculado con fango activo..	125
4.4.1.3	Evolución de la capacidad de eliminación de N_t del filtro sumergido inoculado con <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24.....	127
4.4.1.4	Evolución de la capacidad de eliminación de N_t del filtro sumergido inoculado con <i>Pseudomonas mandelii</i> cepa A103.....	128
4.4.1.5	Evolución de la capacidad de eliminación de N_t del filtro sumergido inoculado con <i>Pseudomonas brassicacearum</i> cepa A343.....	130
4.4.2	Resultados de rendimiento en eliminación de N_t en condiciones estacionarias.....	131
4.4.3	Evolución temporal de la concentración de nitrito en el efluente.....	138
4.4.3.1	Evolución de la concentración de nitrito en el efluente para los ensayos realizados sin inoculación previa del filtro sumergido.....	139
4.4.3.2	Evolución de la concentración de nitrito en el efluente para los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con fango activo.....	139
4.4.3.3	Evolución de la concentración de nitrito en el efluente para los ensayos con inoculación previa	

	del filtro sumergido con <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24.....	141
4.4.3.4	Evolución de la concentración de nitrito en el efluente para los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con <i>Pseudomonas mandelii</i> cepa A103.....	142
4.4.3.5	Evolución de la concentración de nitrito en el efluente para los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con <i>Pseudomonas brassicacearum</i> cepa A343.....	143
4.5	Resultados de turbidez y recuentos de bacterias aerobias totales en el efluente.....	144
4.5.1	Valores de turbidez y recuentos de bacterias aerobias totales en el efluente para los ensayos sin inoculación previa del filtro sumergido.....	144
4.5.2	Valores de turbidez y recuentos de bacterias aerobias para los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con fango activo.....	146
4.5.3	Valores de turbidez y recuentos de bacterias aerobias totales en el efluente para los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24.....	148
4.5.4	Valores de turbidez y recuentos de bacterias aerobias totales en el efluente para los ensayos realizados con inoculación previa del filtro sumergido con <i>Pseudomonas mandelii</i> cepa A103.....	149
4.5.5	Valores de turbidez y recuentos de bacterias aerobias totales en el efluente para los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con <i>Pseudomonas brassicacearum</i> cepa A343.....	152
4.5.6	Análisis comparativo entre ensayos para los valores de turbidez y microorganismos.....	154
4.6	Resultados de los valores de pH durante el funcionamiento del filtro sumergido.....	155
4.7	Resultados obtenidos en los ensayos realizados con inoculación previa de <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24: análisis de biomasa y biodiversidad.....	158

4.7.1	Resultados de rendimiento de eliminación de nitrógeno y análisis de la biopelícula obtenidos en el experimento a 10°C.....	159
4.7.2	Resultados de rendimiento de eliminación de nitrógeno y análisis de la biopelícula obtenidos en el experimento a 30°C.....	161
4.7.3	Resultados de biodiversidad: estudio de la composición de la comunidad bacteriana del filtro sumergido mediante electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE), basada en la amplificación de fragmentos del gen codificante del ARN ribosómico 16S.....	163
5	DISCUSIÓN.....	173
6	CONCLUSIONES.....	197
7	BIBLIOGRAFÍA.....	201
ANEXO I: FIGURAS		
ANEXO II: TABLAS		
ANEXO III: ENGLISH SUMMARY		

1. INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 PROBLEMÁTICA ACTUAL DE LA CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS SUBTERRÁNEAS POR NITRATO

Durante los últimos años, se ha producido un notable incremento de la calidad de vida de los países desarrollados. Este incremento viene acompañado por un aumento desorbitado de la población y por un fuerte desarrollo de la actividad industrial y agrícola. Especialmente en las últimas décadas, las distintas actividades asociadas al sector agropecuario han sufrido una importante transformación, intensificándose las actividades agrícolas y ganaderas. Los grandes logros socioeconómicos que se han alcanzado mediante los cambios en los sistemas de producción agropecuaria tienen sin embargo un lado negativo, materializado en los grandes problemas de carácter medioambiental que han generado. La aplicación de continuadas y cada vez más crecientes dosis de fertilizantes inorgánicos nitrogenados y de pesticidas ha llevado consigo en numerosas regiones la aparición de conflictos entre la agricultura y el uso del agua de bebida. Los intereses económicos presentes en la agricultura se enfrentan a unas consecuencias ecológicas que en numerosas ocasiones se dejan de lado.

La contaminación de aguas subterráneas por nitratos es un hecho cada vez más frecuente. Aunque el origen de esta contaminación es muy diverso, hay que destacar (I.T.G.E., 1998) la que ocasionan los residuos sólidos urbanos, las actividades ganaderas e industriales, las aguas residuales y, sobre todo, la producida por la actividad agrícola, ya que el uso intensivo de fertilizantes químicos nitrogenados determina, por lixiviación, el enriquecimiento progresivo de los acuíferos.

Esta contaminación representa por tanto una amenaza de carácter sanitario, por su incidencia en la salud humana así como una amenaza de tipo social y público. La OMS (WHO, 1985) reconoce dos principales afecciones relacionadas con el consumo de nitrato: la metahemoglobinemia y el cáncer de estómago causado por nitrosoaminas. Además, el nitrato es, junto con el fósforo, uno de los principales agentes responsables de las alteraciones que puede sufrir el entorno medioambiental, al modificar el equilibrio nutricional de los sistemas acuáticos causando eutrofización.

1.- INTRODUCCIÓN

La contaminación de las aguas subterráneas por nitrato afecta a numerosos puntos de España. En nuestro país el consumo de fertilizantes nitrogenados tiene una tendencia ascendente desde finales de los años noventa y es significativamente mayor que en los años ochenta, debido a dicha actividad agrícola intensiva (Ministerio de Medio Ambiente, 2006). En cuanto al estado de contaminación por nitratos de los recursos hidrogeológicos, un 18,76% del total de la superficie de unidades hidrogeológicas se encontraba contaminada en 2003 por nitratos (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de superficie de unidades hidrogeológicas contaminada por nitratos en 2003 (Ministerio de Medio Ambiente, 2006)

CONFEDERACIÓN	%	CONFEDERACIÓN	%
Norte	SD	Sur	17,31
Duero	9,26	Segura	17,28
Tajo	14,09	Júcar	31,54
Guadiana	32,51	Ebro	15,12
Guadalquivir	12,60	Total	18,76

Esta contaminación se manifiesta de manera importante en el litoral mediterráneo, como en la zona del Maresme, donde se llega a superar los 500 mg/l, debido principalmente al uso de fertilizantes en agricultura (Guimerà y Candela 1994). En regiones del Norte de España como el País Vasco, los residuos de fertilizantes nitrogenados no usados por las plantas también han causado problemas de contaminación de acuíferos, como en el de Victoria-Gasteiz donde los valores de nitratos fueron máximas en los primeros años de la década de los 90, alcanzando los 200 mg/l. En la actualidad, aparentan una estabilidad en torno a 50-70 mg/l. (Sánchez Pérez *et al.*, 2003).

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 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 (Ministerio de Medio Ambiente, 1998).

Los nitratos suponen un problema nada desdeñable en algunas partes de Europa, especialmente en regiones con una producción ganadera intensiva. En el Reino Unido, donde la mayoría de la población rural se abastece de agua potable de fuentes que incluyen los pozos privados de agua subterránea, la media de concentración de nitratos de las muestras de agua para usos no comerciales es de 32 mg/l (Reid *et al.*, 2003). En los Países Bajos, la agricultura y ganadería son las principales fuentes de nitrógeno, especialmente en suelos arenosos del Este y el Sur. En un 30% de estos suelos, el agua subterránea excedía en 1998 su concentración de nitratos de 50mg/l. (Oenema *et al.*, 1998).

Otros muchos casos de contaminación por nitratos han sido descritos en todo el mundo: en los Estados Unidos (Aelion *et al.*, 1997; Harter *et al.*, 2002; Hudak, 2000; Kraft and Stites, 2003), Australia (Thorburn *et al.*, 2003; Ridley *et al.*, 2004), Israel (Oren *et al.*, 2004), China (Zhang *et al.*, 1999) o Corea (Jeong, 2001).

La incidencia que esta contaminación ha tenido sobre la disponibilidad y calidad de fuentes de agua para consumo y sobre el medio ambiente hace que la prevención de la contaminación de las aguas subterráneas tenga fundamental importancia. El coste asociado al uso de las tecnologías necesarias para la eliminación de nitrato de las aguas contaminadas podría evitarse en gran medida mediante la reducción de los aportes de nitrato a las fuentes de agua. Este esfuerzo en el aspecto preventivo queda patente en la redacción de la diferente normativa aplicable a la contaminación por nitrato de las fuentes de agua.

El Anexo I de la Directiva 91/676/CEE relativa a la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos utilizados en la agricultura, considera como aguas afectadas *las aguas dulces superficiales, en particular las que se utilicen o vayan a utilizarse para la extracción de agua potable y todas las aguas subterráneas que presenten o pueden llegar a presentar una concentración de nitratos superior a 50 mg/l.* Esta Directiva impone a los estados miembros la obligación de identificar las aguas que se hallen afectadas por la contaminación de nitratos de esta procedencia, poner en funcionamiento programas de actuación y emitir periódicamente informes de situación sobre este tipo de contaminación. Asimismo, el Real Decreto 261/1996 de 16 de febrero sobre protección de las aguas contra la contaminación producida por los nitratos

procedentes de las fuentes agrarias incorpora al ordenamiento español esta Directiva, con el objeto de establecer las medidas necesarias para prevenir y corregir la contaminación de las aguas, continentales y litorales, casada por los nitratos de origen agrario.

La Directiva 2000/60/CE marco del agua establece nuevas medidas para evitar y reducir la contaminación del agua subterránea, y aborda el problema de la contaminación por nitratos en las aguas subterráneas, incluyendo las zonas vulnerables dentro del registro de zonas protegidas, y recalcando la obligación de cumplir con la Directiva 91/676/CEE. De igual modo, en la Directiva de Aguas Subterráneas, que se aprobará previsiblemente en los próximos meses se establecen disposiciones complementarias con objeto de que las masas de agua subterránea alcancen el buen estado químico y se inviertan las tendencias al aumento de la contaminación, incluyendo la contaminación por nitratos.

Sin embargo, hasta ahora los resultados de la aplicación de dichas normas para la prevención de la contaminación por nitrato parecen tener escaso éxito: el porcentaje de superficie de unidades hidrogeológicas contaminadas por nitratos en 2003 aumentó en cuatro de las ocho Confederaciones Hidrográficas en el año siguiente (Ministerio de Medio Ambiente, 2006), manteniéndose en niveles parecidos desde el año 1995. Se hace necesario por ello contar con medidas de recuperación de las masas de agua contaminadas con nitrato, evitando así la consiguiente pérdida del valor económico de dichas masas de agua y las incidencias medioambientales y en la salud humana de la presencia de nitrato en dichos recursos.

Para lograr tan necesaria reducción de los valores de nitrato en las masas de agua se cuenta en la actualidad con numerosa y variada tecnología descontaminante, basada en distintos procesos de naturaleza física, química o biológica.

1.2 TECNOLOGÍA ACTUAL PARA LA ELIMINACIÓN DEL NITRÓGENO DEL AGUA

Los procesos convencionales para lograr la potabilidad de agua (coagulación-floculación, decantación, filtración, cloración, desinfección con luz ultravioleta, tratamiento con ozono) no son eficaces para la eliminación del nitrato de las aguas para

abastecimiento. Por lo tanto, es necesaria la aplicación de otros métodos para lograr que las concentraciones de los iones nitrato y nitrito se mantengan bajo los límites establecidos por la legislación (R.D. 140/2003). El tratamiento del agua o bien su dilución con otros recursos hídricos son en ocasiones las únicas opciones para poder obtener agua potable en numerosas zonas del planeta. Sin embargo, la dificultad técnica y económica que en muchos casos va asociada a la implantación de dichas medidas obliga a las poblaciones a no poder disponer de un recurso que cuente con las mínimas exigencias de salubridad. Es por ello que cobra una gran importancia el establecimiento de una tecnología viable que permita solucionar este problema de abastecimiento de agua con unas condiciones de potabilidad que permitan a una población abastecerse de agua sin que esto suponga un alto coste económico.

Los métodos que pueden emplearse para la eliminación de nitrato del agua destinada a abastecimiento son los siguientes:

Intercambio iónico: El intercambio iónico con resinas sintéticas es un tratamiento del agua en el que un ión presente en la fase sólida, el adsorbente, es cambiado por un ión no deseado en el agua a tratar. Para que esta reacción se produzca, el agua se hace pasar de manera continua a través del intercambiador iónico sólido hasta que el adsorbente es agotado (AWWA, 1999). Como resultado de este método se produce una salmuera contaminada con nitrato que no puede ser vertida a ríos o lagos, por su alto poder eutrofizante, ni usada como fertilizante por el alto contenido en sodio que en ocasiones presenta. Esta salmuera es por tanto un residuo de difícil gestión.

Electrodiálisis: El principio de la electrodiálisis se basa en la eliminación de componentes iónicos de soluciones acuosas a través de membranas de intercambio iónico usando un campo eléctrico como fuerza impulsora (Hell *et al*, 1998). El agua a tratar se hace pasar a través de una pila de membranas selectivas aniónicas y catiónicas colocadas alternativamente. Estas membranas están fijadas entre dos placas, que contienen los electrodos que producen el campo eléctrico. Los iones, según su carga se dirigen hacia el electrodo positivo o negativo, a través de las correspondientes membranas selectivas, produciéndose el paso de la corriente a través de toda la pila de membranas. Así se obtiene

el efluente tratado, que es el agua desalada, y una salmuera, altamente concentrada en sales.

En general, la electrodiálisis es un método viable para la eliminación de nitratos, pero posee una serie de inconvenientes que dificultan su aplicación, como son la generación de una salmuera de difícil gestión cargada de iones, y la falta de selectividad del método, eliminando el nitrato pero también otros iones presentes en el agua.

Ósmosis inversa: El proceso de ósmosis inversa hace uso de las propiedades de las membranas semi-permeables que permiten el paso el agua mientras que los solutos son retenidos (Veza, 2002). En condiciones normales, el proceso de ósmosis inversa puede alcanzar una eliminación de nitrógeno en forma de nitrato por encima del 90% (Shoeman and Steyn, 2003; Kim *et al*, 2007). Es posible señalar algunos aspectos problemáticos de esta técnica, como que se hace necesario el uso de reactivos químicos para evitar incrustaciones en las membranas; además, se suelen realizar pretratamientos imprescindibles para evitar problemas en las membranas, como una desinfección efectiva. Es necesaria además la aplicación de una alta energía para superar la presión osmótica. También hay que destacar el problema anteriormente mencionado de la generación de una salmuera de difícil gestión y otro de falta de selectividad del método, eliminando otros iones aparte del nitrato.

Reducción catalítica de nitrato: Los metales de valencia cero debido a su tendencia a donar electrones pueden degradar diversas sustancias, incluidos los aniones, mediante reducción química. Al igual que ocurre con la adsorción sobre distintos soportes, la reducción catalítica del nitrato se ha estudiado a pequeña escala, pero pocas aplicaciones industriales han sido descritas hasta el momento (Reddy and Lin, 1999; Pintar and Batista, 1999; Luk and Au-yeung, 2002).

Reddy y Lin (1999) estudiaron el proceso de reducción catalítica para eliminar selectivamente el nitrato del agua subterránea asociada a comunidades agrícolas. De los tres catalizadores probados, paladio, platino y rodio, éste último resultó el más efectivo viéndose afectado por el tiempo de retención y el potencial redox. Al aplicar además una

pequeña corriente eléctrica al proceso de reducción catalítica, las tasas de reducción de nitrato aumentaron considerablemente.

Pintar y Batista (1999) establecen que cuando el agua a tratar contiene iones disueltos, la selectividad de la reacción de catálisis así como la eliminación de nitratos disminuye considerablemente. Estas observaciones indican que el uso de catalizadores bimetalicos comunes en la actualidad para el tratamiento directo del agua de bebida contaminada con un nivel elevado de dureza temporal no permite una eliminación selectiva del nitrato. Otros sistemas de reducción catalítica indirecta de los nitratos, en los que el agua subterránea a tratar no está en contacto directo con el proceso de desnitrificación, mejoran estos aspectos, ya que se reduce el riesgo de aparición de nitrito y de amonio. Esta eliminación se consigue mediante la combinación del proceso de catálisis con un proceso de intercambio iónico de cloruro. La resina de intercambio iónico es completamente regenerada mediante estos catalizadores (Pintar *et al.*, 2001).

Otros experimentos realizados acerca de la reducción de nitrato por medio de catalizadores fueron los llevados a cabo por Luk y Au-yeung (2002), que están basados en el uso de aluminio fino en polvo como catalizador, obteniendo un máximo rendimiento de eliminación de nitrato del 62% a escala de laboratorio. El aluminio es un fuerte agente reductor efectivo cuando el pH está por encima de 8, para evitar la aparición de óxidos protectores sobre la superficie de las partículas de aluminio y por tanto, impidiendo que reaccionen con los nitratos del agua. Sin embargo, como resultado del tratamiento aparecen residuos de aluminio en el agua tratada.

Tratamientos biológicos: Frente a estos sistemas aparecen los procesos biológicos basados en biodesnitrificación, que suponen una importante alternativa para eliminar el nitrato del agua. Este proceso reduce el nitrato a nitrógeno gas, ventaja frente a otros sistemas que realizan esta reducción a amonio, que supone un impacto adverso importante en la calidad del agua de bebida mediante su combinación con cloro para formar cloraminas (White, 1999). Existen otras ventajas en el uso de los microorganismos para la eliminación de nitratos de aguas contaminadas, ya que no se genera una salmuera de difícil gestión.

La desnitrificación biológica es el único proceso que dirige directamente su acción sobre los iones nitrato y no se afecta por la presencia de otros iones en el agua a tratar. Por lo tanto, es uno de los métodos de más alto rendimiento y el único método selectivo para la completa eliminación de nitrato.

Bajo condiciones anóxicas, las bacterias desnitrificantes son capaces de usar el nitrato como aceptor final de electrones, el cual se transforma mediante reducción desasimilatoria en diferentes compuestos más reducidos (NO_2^- , que puede pasar a NO , N_2O y finalmente a N_2). La desnitrificación puede ser autotrófica o heterotrófica, y por tanto la actividad biológica necesaria para la descontaminación puede ser realizada por:

- a) microorganismos desnitrificantes autótrofos, donde el donador de electrones empleado suele ser el hidrógeno molecular. Este hidrógeno puede aplicarse al medio mediante electrolisis (Islam and Suidan, 1998, Chang *et al*, 1999), o introduciéndolo directamente en el biorreactor (Lee and Rittman, 2002). El uso de hidrógeno gas como donador de electrones tiene una serie de ventajas (Mansell and Schroeder, 2002): no se trata de un compuesto orgánico, cualquier hidrógeno residual puede ser eliminado fácilmente debido a su baja solubilidad en agua, el metabolismo autótrofo genera menos exceso de biomasa que el metabolismo heterotrófico, y además el hidrógeno es más barato que los compuestos orgánicos. Sin embargo, la principal limitación del uso de este reactivo se encuentra en la peligrosidad que conlleva una mala disolución del gas en el agua, y las posibles acumulaciones en espacios confinados, creando así una atmósfera potencialmente explosiva. Los compuestos reducidos de sulfuro también pueden actuar como substratos en este tipo de desnitrificación. Distintas unidades de proceso han sido estudiadas y usadas en la desnitrificación autotrófica.
- b) microorganismos desnitrificantes heterótrofos, que requieren una fuente de carbono orgánica para desarrollar energía y para el crecimiento celular. Dado que la mayoría de las bacterias desnitrificantes en el medio son heterótrofas, los sistemas más desarrollados hoy día para la desnitrificación

son los que emplean una fuente orgánica (Kesseru *et al*, 2003, Sauthier *et al*, 1998)

Este proceso también presenta algunas desventajas. La desnitrificación heterotrófica es el más eficaz, pero necesita de la adición de una fuente orgánica de carbono para su realización. Además, la desnitrificación produce un crecimiento de biomasa que se libera al agua además del remanente de la adición de carbono, que deberá ser retirado del agua (Shrimali and Singh, 2001). Todo esto requiere un post-tratamiento del efluente que podría incluir una serie de filtraciones y posteriores desinfecciones, además de diferentes medidas a tomar en el desarrollo de dichas tecnologías para eliminar el exceso de biomasa.

1.3 BIOPELÍCULAS

1.3.1 Concepto de biopelícula

Es posible hablar de biopelícula como una estructura compleja formada por agregados celulares (grupos de células densamente empaquetados), embebidas en una matriz polimérica de origen microbiano, adherida a un material o interfase que puede ser de naturaleza abiótica (rocas, metales, vidrios, plásticos, etc.) o biótica (mucosa intestinal, plantas, etc.). Esta acumulación de células no tiene por qué ser uniforme en el espacio ni en el tiempo, y puede estar compuesta por una fracción importante de sustancias inorgánicas unidas por la matriz biótica (Characklis y Marshall, 1990). Su estructura es morfológica y fisiológicamente distinta a la de bacterias libres, utilizándose incluso mediadores químicos intercelulares para desarrollar la película.

La colonización de una superficie constituye una ventaja para las bacterias que viven en ambientes oligotróficos, ya que las biopelículas sobre estas superficies tienden a concentrar los escasos nutrientes, haciendo muy ventajoso nutricionalmente el crecimiento adherido a una superficie (Lappin-Scott y Costerton, 1995). Sin embargo, esta ventaja no existe en sistemas eutróficos, por lo que las ventajas se basan en otras cuestiones, como la resistencia al arrastre, protección frente a depredadores, relaciones heterotróficas, co-metabolismo de compuestos recalcitrantes y otros.

1.3.2 Fases de formación de las biopelículas

Mediante microscopía óptica y electrónica se ha podido estudiar la formación de la biopelícula observándose la complejidad tanto microbiológica como física de estas colectividades. Las fases que determinan la formación de una biopelícula madura son diversas y complejas (figura 1). Es posible establecer las siguientes fases (Percival *et al.*, 2000):

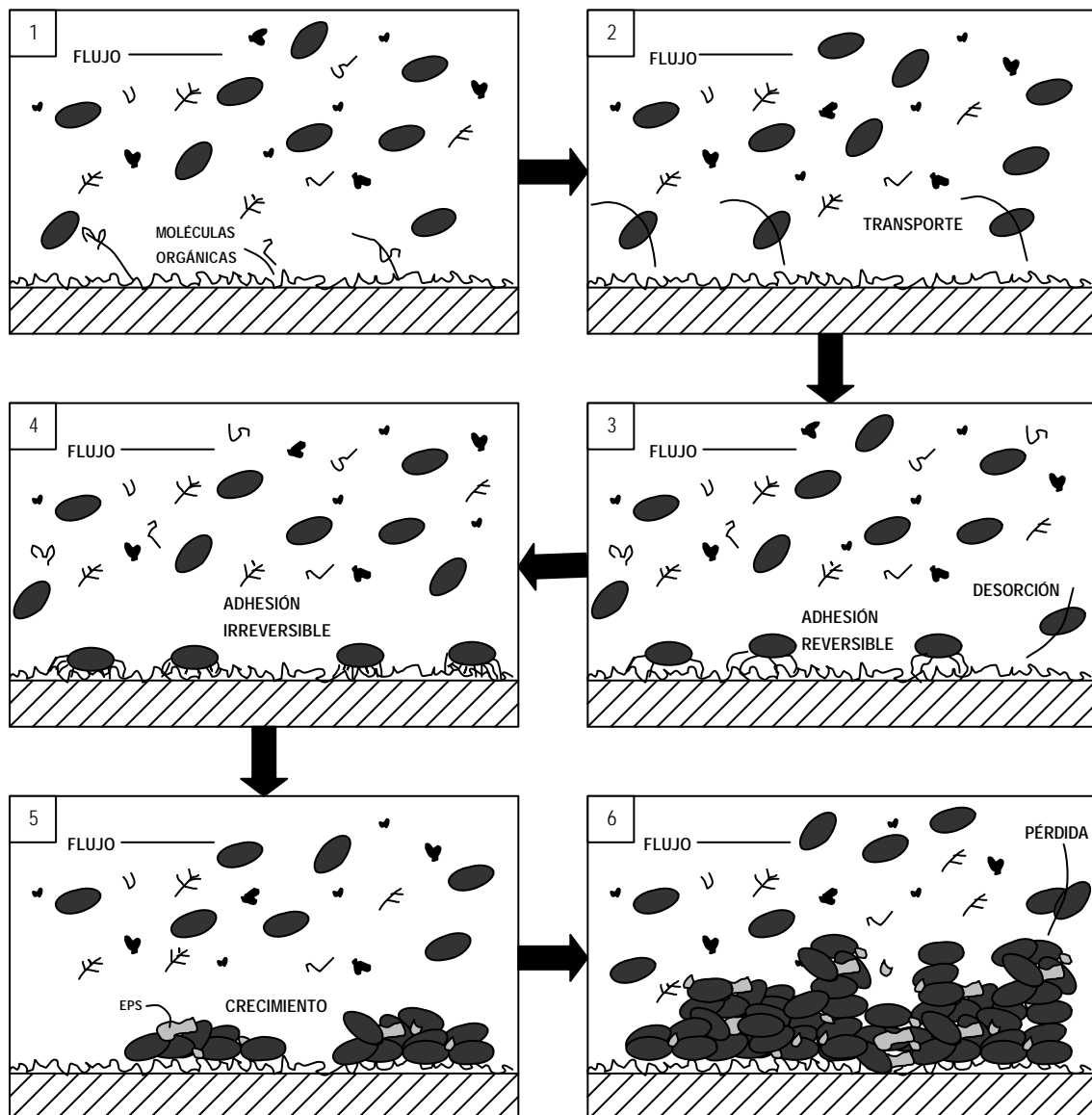


Figura 1. Fases de formación de la biopelícula: (1) Acondicionamiento de la superficie, (2) transporte, (3) adhesión reversible, (4) adhesión irreversible, (5) crecimiento de la biopelícula y (6) pérdida o desadsorción.

1. Desarrollo de una película acondicionadora de la superficie. Las bacterias se van a unir a una superficie u otra en función de que el medio donde se encuentran sea rico o no en nutrientes. El primer paso en la formación de una biopelícula es el acondicionamiento físico de la superficie con la deposición de sustancias nutritivas (macromoléculas orgánicas) que atraen a las bacterias y permiten su adherencia y crecimiento. La película acondicionadora que se crea en una primera etapa tiene una serie de funciones:
 - Modificar las propiedades físico-químicas del sustrato
 - Actuar como una fuente concentrada de nutrientes
 - Suprimir la liberación de iones metálicos tóxicos
 - Absorción y detoxificación de sustancias inhibitoras disueltas
 - Suministrar los elementos metálicos traza requeridos

2. Mecanismos de transporte implicados en la adhesión de los microorganismos. Estos mecanismos facilitarán a los organismos aproximarse a la superficie de adhesión. Éstos incluyen:
 - Transporte de masas, fuertemente influenciado por la mezcla en el seno del fluido y muy relacionado con el flujo del agua (laminar o turbulento)
 - Efectos térmicos (difusión molecular, movimiento browniano)
 - Efectos gravitacionales (sedimentación)

3. Fase de adhesión reversible de los microorganismos a la superficie acondicionada. Una vez que se ha producido el transporte hasta la superficie se produce la retención celular basándose en interacciones físico-químicas. Parte de las células que llegan a la superficie se adhieren a ella por un tiempo limitado separándose después. La desorción se puede producir por la

fuerza cortante del fluido incluyendo también otros factores físicos, químicos y biológicos.

4. Fase de adhesión irreversible: la adhesión irreversible implica fuerzas de corto alcance como interacciones dipolo-dipolo, puentes de hidrógeno, uniones poliméricas y fenómenos de hidrofobicidad creándose una interfase superficie-bacteria-sustrato donde pueden mediar diferentes estructuras bacterianas tales como pilis, fimbrias o flagelos y estructuras poliméricas menos estructuradas (EPS).

Existe evidencia de que las propiedades físico químicas de la biopelícula pueden provocar cambios fisiológicos en algunos organismos de vida libre, que les llevan a adsorberse a la superficie. En *Vibrio parahemolyticus*, por ejemplo, el cambio de un estado planctónico a otro adsorbido sobre una superficie parece ser provocado por cambios en la viscosidad cercana a la interfase (Characklis y Wilderer, 1989)

5. Fase de crecimiento y división de los organismos con la colonización de la superficie, formación de las microcolonias y formación de la biopelícula. Tras la adsorción irreversible se produce un incremento en el número de células de la biopelícula a expensas del sustrato sin descartar que a su vez las células puedan también producir o formar cantidades importantes de productos, excretando algunos de ellos, como por ejemplo el EPS que queda constituyendo parte de la biopelícula, formando la matriz polimérica hidratada en la que quedan embebidas las células. En esta fase, la biopelícula capta o atrapa moléculas presentes en el medio acuoso, incorporándolas a la matriz. A su vez, nuevas células libres en el medio pueden seguir adhiriéndose a la biopelícula en formación.
6. Fase de pérdida o desadsorción. Las biopelículas maduras sufren pérdidas de partes de ella que vuelven al agua, estas células vuelven a su estado libre quizás para formar otros agregados. Esto puede ser debido a:

- esfuerzo constante del fluido (erosión)
- acción mecánica de otras partículas que chocan contra la biopelícula (abrasión)
- desprendimiento de capas de biopelículas (desprendimiento masivo) debido a la pérdida de cohesión o de adherencia de la biopelícula.
- Intervención humana
- Depredación

1.3.3 Estructura de las biopelículas

Tres modelos distintos de estructuras de biopelículas han sido descritos:

Modelo del mosaico heterogéneo. Consiste en microcolonias formando tallos unidos al soporte por la base pero generalmente bien separados de sus vecinos. La diferencia con el modelo de canales es que en este caso debido a la separación entre las torres microbianas no se llegan a formar los canales (Figura 2). Esta estructura es la más común en los sistemas de distribución de agua.

Modelo del canal de agua. Después de colonizar la superficie, las células sufren cambios fenotípicos y producen, entre otras moléculas estructurales, exopolisacáridos (EPS). Esta fusión microorganismo-EPS deja una red de canales de agua que llega hasta la base de la biopelícula (Figura 3). La importancia de estos canales se ha llegado a comparar al sistema circulatorio de un organismo superior, por su estructura, grado de homeostasis, relación espacial óptima con los organismos que conviven y el intercambio de nutrientes y metabolitos entre la comunidad y la fase fluida. Esta estructura es la típica en los sistemas con una alta concentración de nutrientes en el medio.

Modelo de película densa. Este es el modelo que toma la placa dental y catéteres médicos. Su estructura no tiene canales de agua o porosidad alguna. Si hay, sin embargo, alguna organización estructural. (Figura 4). La estructura de película densa se encuentra también en aquellos sistemas con una alta concentración de nutrientes.

1.3.4 Componentes de la biopelícula

Es posible describir los componentes de una biopelícula microbiana, detallándose a continuación:

1.3.4.1 Agua

El fluido en el que crezca la biopelícula afectará al desarrollo de la misma principalmente como resultado de la mezcla y los patrones de flujo característicos del entorno o del reactor y su geometría. La transferencia de masas desde el agua a la biopelícula depende del régimen dinámico de la primera. En condiciones laminares, la transferencia de masas es mucho más lenta comparada con aquella en condiciones de flujo turbulento (Characklis and Wilderer, 1989).

1.3.4.2 Biomasa celular

El contenido de biomasa celular de las biopelículas es muy variable pudiendo oscilar entre el 10 y el 90% de la materia orgánica. El tipo de microorganismo que forma parte de las biopelículas es extremadamente diverso y suelen ser un reflejo del hábitat donde se desarrollan. Puede contener una gran diversidad de microorganismos: bacterias, hongos, algas y protozoos e incluso larvas, amebas etc. Las bacterias son las primeras en aparecer en una biopelícula en formación, luego lo harán los protozoos seguidos de las algas y finalmente los metazoos. La mayoría de la biomasa esta constituida por bacterias, conformando ellas la biopelícula.

1.3.4.3 Sustancias poliméricas extracelulares (EPS)

Los microorganismos que componen la biopelícula están unidos por una matriz de polímeros extracelulares formada por polímeros orgánicos que son producidos y excretados por los microorganismos que la componen y que se denominan sustancias poliméricas extracelulares (EPS). El EPS está compuesto por una gran diversidad de sustancias orgánicas (manano, glucano, ácidos urónicos, manosa, galactosa, xilosa, glicoproteínas, etc.) en una concentración variable (Grady *et al.*, 1999). El EPS también

está formado por ADN, proteínas, enzimas, etc. (Zhang *et al.*, 1999), el cual procede de la lisis celular.

1.3.4.4 Productos de hidrólisis y de lisis celular

La tasa de crecimiento en una biopelícula tiene un gradiente en función de la profundidad en respuesta a una limitación de sustratos. Además los largos periodos de residencia de los componentes de las biopelículas la lisis celular y la hidrólisis del EPS hacen que la composición de la biopelícula varíe en función de la formación y degradación de sus componentes. Por todo ello durante la formación y maduración de la biopelícula algunas bacterias pierden su viabilidad y se lisan, siendo un aporte de macromoléculas a la matriz.

1.3.5 Importancia del Material Polimérico Extracelular

El EPS representa el material constructivo de las biopelículas. Tienen un papel fundamental en las interacciones entre los microorganismos y forman la matriz en la cual los microorganismos son inmovilizados y mantenidos en un sistema tridimensional. En general, la proporción del EPS en las biopelículas varía entre un 50 y un 90% de la materia orgánica total (Evans, 2000). Es necesario señalar que los polisacáridos no son necesariamente el principal componente del EPS, aunque es poco lo que se conoce acerca de esta mezcla sinérgica entre polisacáridos, proteínas y sustancias húmicas.

Las interacciones implicadas en el mantenimiento de la estabilidad de la biopelícula incluyen débiles interacciones intermoleculares de naturaleza físico química. Este tipo de interacciones deben ser consideradas como fuerzas de cohesión entre los componentes con la matriz del EPS, interacciones electrostáticas, y enlaces de hidrógeno. La composición química del EPS determina en gran medida las propiedades físicas de la biopelícula, y, más aún, su morfología (Evans, 2000).

Es muy importante 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, sino también en cuanto a su crecimiento, factor relacionado con los fenómenos de atasco, principal problema de los filtros biológicos.

1.4 DESCRIPCIÓN DE LOS SISTEMAS DE FILTROS SUMERGIDOS

La aplicación de dicho proceso biológico de desnitrificación puede llevarse a cabo mediante dos sistemas generales:

Sistemas de cultivo en suspensión: el fluido a tratar está en contacto directo con los microorganismos responsables de dicha descontaminación, que se encuentran en suspensión en un medio acuoso. Es necesario aportar microorganismos continuamente para mantener un equilibrio entre estos y los compuestos contaminantes, por lo que se cuenta con un sistema de separación como la decantación que permite devolver la biomasa nuevamente al reactor biológico.

Sistemas de cultivo inmovilizado consisten en una formación biológica de origen bacteriano denominada biopelícula que se formará sobre una superficie o material soporte. Este sistema no necesita un continuo aporte de microorganismos, pero sí un lavado frecuente del denominado filtro biológico debido a problemas de pérdida de carga por la generación de biomasa.

Algunas ventajas del uso de sistemas de biopelícula fija para la descontaminación de aguas son (Characklis and Marshall, 1990):

- Permiten incrementar la concentración de biomasa en el reactor
- Gracias a esto, permiten un incremento en las tasas de conversión de sustrato
- Se reducen los volúmenes del reactor
- Se reduce el tiempo de retención del agua en la planta
- Se reduce la susceptibilidad a desequilibrios en la biomasa por acción de agentes contaminantes o inhibidores
- Posibilidad de eliminación de las etapas de clarificación/separación

- Permite una explotación fácil y segura
- Son más adecuados para el tratamiento de aguas para consumo humano ya que el aporte de microorganismos al agua es mucho menor.

Los sistemas de biopelícula fija más empleados son los filtros percoladores, los contactores biológicos rotativos, los lechos fluidificados, y los filtros sumergidos, aunque el proceso de desnitrificación no pueda realizarse en todos por ser necesarias unas determinadas condiciones sólo posibles en algunos, como es la ausencia de oxígeno. Tanto los lechos fluidificados como los filtros sumergidos son los más adecuados para realizar la desnitrificación biológica de aguas destinadas al consumo humano.

Los **lechos fluidificados** consisten en un lecho de pequeñas partículas (0,2 a 2 mm de diámetro) suspendidas libremente en un flujo ascendente de agua y gas. En el punto de mínima fluidificación, el gradiente de presión a través del lecho iguala al peso total de las partículas. Un aumento del flujo causa expansión del lecho. Estos reactores experimentan una expansión del lecho como consecuencia del cambio que sufren en la densidad de la partícula a medida que la biopelícula se desarrolla sobre su superficie. Esta tecnología ha sido utilizada en tratamientos aeróbicos (eliminación de carbono, (nitrificación), anóxicos (desnitrificación) y anaeróbicos (metanogénesis) de aguas residuales.

En cuanto a los **filtros sumergidos**, estos sistemas consisten en material de relleno que actúa como soporte de la biopelícula, pero a diferencia de los anteriores, el relleno está inmóvil y completamente sumergido en el agua. La biopelícula será la encargada de la depuración, pero además el relleno actuará como un filtro. Son sistemas aplicados en el tratamiento de aguas residuales, y de todos los sistemas de biopelículas es el más adecuado para realizar la desnitrificación de aguas subterráneas contaminadas, ya que permite también la anoxia, y la calidad microbiológica del agua de salida es la más adecuada.

En los últimos años se han ido desarrollando nuevos sistemas de biopelícula para el tratamiento de las aguas contaminadas, aunque por ahora su uso se restringe a sistemas de pequeña escala en el tratamiento de aguas residuales domésticas para evaluar su posible aplicación a escala industrial. En los **sistemas de biopelícula de flujo horizontal** (Rodgers

et al, 2006) la biopelícula crece sobre láminas colocadas de manera horizontal, y ensambladas cada una sobre la anterior. Se asegura un espacio entre láminas por la presencia de estructuras cónicas en cada lámina, añadidas durante el proceso de fabricación de las mismas. El agua a tratar fluye a lo largo de la lámina, descargándose en la lámina inferior, y así sucesivamente. Hasta el momento, este sistema ha proporcionado buenos resultados en cuanto a la eliminación de materia orgánica y a la nitrificación de dichos efluentes domésticos. Otros estudios han logrado la desnitrificación de dicho efluente mediante la combinación de este sistema y un reactor de cultivo en suspensión desnitrificante (Xiao *et al*, 2007). En los **sistemas de biopelícula de movimiento vertical** la biopelícula crece sobre un módulo de polipropileno que se mueve verticalmente, sumergiéndose y emergiendo del reactor donde se encuentra el agua a tratar. La oxigenación necesaria para la eliminación de la materia orgánica y la nitrificación del amonio se consigue mediante estos movimientos verticales de la biopelícula (Rodgers *et al*, 2003; Rodgers *et al*, 2006).

Como se verá más adelante, los sistemas de biopelícula fija tienen una desventaja centrada en la necesidad de algún post-tratamiento del agua para eliminar los contaminantes que hayan aparecido como consecuencia del proceso. Recientes estudios en las tecnologías de membrana han lanzado el uso de los procesos de membrana como una alternativa a estos post-tratamientos (Nuhoglu *et al*, 2002). La principal función de estas nuevas técnicas es la de separar los microorganismos del fluido a tratar mediante el uso de membranas, que permitirán a los sustratos penetrar la zona de los microorganismos, pero evitará que éstos últimos se mezclen con el agua a tratar (Cohen, 2001). Un sistema de este tipo es capaz de eliminar sólidos suspendidos que pudieran pasar al fluido como consecuencia del tratamiento con biopelículas fijas, sino también otros contaminantes del agua como los residuos de la utilización de una fuente de carbono en exceso.

Así en sistemas de desnitrificación de aguas subterráneas, la membrana permite al nitrato en el agua a tratar permear al otro lado donde será consumido biológicamente por la biopelícula desnitrificante. Diferentes estudios se han llevado a cabo sobre dicha tecnología con excelentes resultados (Mansell and Schroeder, 1998; Mansell and Schroeder, 2002, Nuhoglu *et al*, 2002).

1.4.1 Filtros sumergidos

Este sistema de depuración de aguas residuales fue introducido en Francia y en Japón hacia los años ochenta, como sistemas de pretratamiento para aguas contaminadas, útiles para eliminar NH_4^+ , carbono orgánico, fitoplancton, olor o sabor del agua.

El origen del uso de los sistemas de biopelícula fija, sin embargo, se remonta mucho más atrás en el tiempo, en el inicio del uso de tecnologías de tratamiento de aguas residuales. De hecho, estos sistemas dominaron dichas tecnologías durante mucho tiempo antes de que los sistemas de cultivo en suspensión tomaran el relevo (Peters and Alleman, 1982).

Como ya se ha visto con anterioridad, aunque es posible hacer una clasificación general de los procesos biológicos de película fija, la configuración, el funcionamiento y el rango de usos de dichos sistemas es extremadamente diverso. De manera general, los biorreactores que basan su actividad en el uso de biopelículas fijas son denominados biorreactores de lecho fijo. En dichos biorreactores se utiliza un sistema de retención que en este caso se trata de la adhesión de los microorganismos a un soporte sólido. Esto permite aumentar notablemente la concentración enzimática o celular en el sistema, y al operar éste en continuo, se evita el lavado de los microorganismos. Estos sistemas, basados en el fenómeno de la adhesión, poseen una serie de ventajas frente a otros sistemas que usen un tipo de retención distinto (como es el de inclusión, en el que los microorganismos se retienen en el interior de una membrana o matriz, permitiendo operar con una elevada concentración celular desde el principio de la operación). Los biorreactores de adhesión permiten inocular el sistema donde se encuentra el soporte, lográndose así una colonización progresiva del mismo. Para lograr una puesta en marcha más rápida, es deseable utilizar un material de relleno con una relación superficie/volumen elevada y con suficientes espacios intersticiales (es decir, con alta porosidad) que favorezcan la adhesión celular (Lema Rodicio y Roca Bordello, 1998).

De este modo, podemos definir un filtro sumergido como un sistema de tratamiento que puede descontaminar agua mediante la puesta en contacto de ésta con una película microbiana que ha crecido sobre la superficie de algunos sólidos, medios de contacto,

medios filtrantes, etc., que se encuentran sumergidos en el agua a tratar (Iwai and Kitao, 1994). Aplicando las condiciones apropiadas, y con la presencia de una biopelícula desnitrificante sobre el material soporte, es posible conseguir la desnitrificación del agua contaminada (Fig.2).

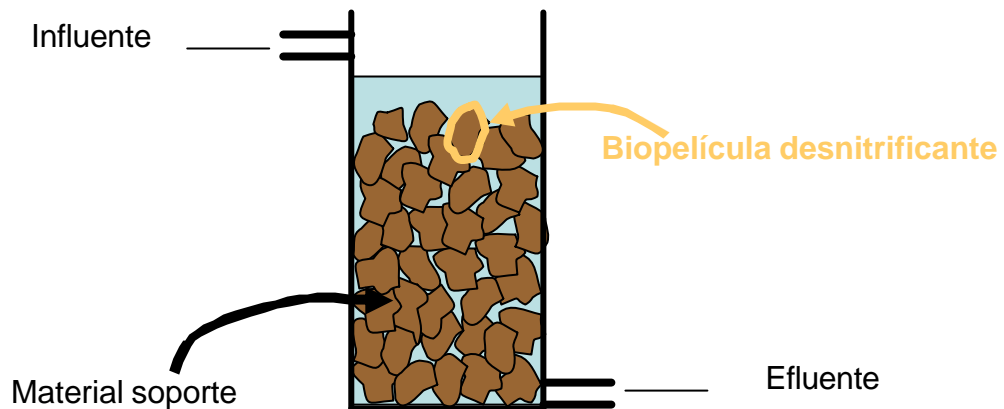


Figura 2. Esquema general de un Filtro Sumergido.

La aplicación de las condiciones idóneas para potenciar el desarrollo de los microorganismos desnitrificantes presentes en la biopelícula, facilitando así su acción sobre el nitrato, ofrece una alternativa de tratamiento a las aguas subterráneas contaminadas con este anión. Los **filtros sumergidos** son los sistemas que mejores resultados han ofrecido en la eliminación de nutrientes para obtener aguas de consumo humano (Lacamp *et al.*, 1993).

La biopelícula se encarga, mediante desnitrificación, de eliminar selectivamente el nitrato 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 (Gómez *et al.*, 2000b), presentándose como una alternativa útil y económica a la descontaminación de aguas subterráneas contaminadas con nitrato.

Es posible enumerar algunas de las ventajas del uso de los filtros sumergidos frente a otros sistemas (Gómez, 1998):

- Se requiere una pequeña superficie para su instalación
- Son procesos de fácil automatización
- Son plantas modulares, de construcción rápida
- Su coste es razonable frente a otros tratamientos destinados a eliminar NO_3^- de aguas subterráneas

Sin embargo, existen algunos inconvenientes al uso de esta tecnología:

- Se produce una colmatación del filtro con una determinada frecuencia
- Existe una mala influencia de la baja temperatura
- Se requiere agua de lavado

1.4.1.1 Diseño del filtro sumergido

Existen numerosas investigaciones tanto teóricas como empíricas acerca del diseño de los filtros sumergidos, pero por ahora ha sido imposible proponer un diseño general de los mismos. En la mayoría de los casos, sin embargo, el diseño de un filtro sumergido se realiza a partir de los resultados de estudios experimentales usando plantas piloto, información existente o ejemplos similares. La razón de dichas dificultades reside en (Iwai and Kitao, 1994):

En el diseño del proceso no sólo se debe incluir la capacidad de descontaminación, sino también factores no cuantificables como el mantenimiento de dicho proceso.

El mecanismo de descontaminación del agua en un filtro sumergido es mucho más complicado que los procesos que usan biomasa suspendida. De igual modo, el diseño teórico tiene sus mismas limitaciones.

Aunque existen muchas configuraciones de los procesos de biopelículas, el historial de investigación y desarrollo es mucho más corto que el de los procesos de fangos activos.

Por tanto, el diseño de un filtro sumergido basándose en la teoría está limitado, pero existen una serie de factores que deben ser tenidos en cuenta, factores asociados al diseño de estos sistemas, y muchos de ellos son comunes al diseño de procesos biológicos de tratamiento, como son:

- La calidad del influente: teniendo en cuenta aquí la carga contaminante, la presencia de sólidos suspendidos o de sustancias inhibidoras de la actividad microbiana, el pH y la temperatura en la misma. En todos estos casos, el uso de un sistema de tratamiento del agua basado en las biopelículas reduce el efecto negativo de los mismos frente a los de cultivo en suspensión.
- Las propiedades del material soporte. Se pueden establecer unos requisitos generales para los medios de relleno de los filtros sumergidos (Iwai and Kitao, 1994). Algunos de ellos son contrapuestos entre sí debiendo buscar un equilibrio entre ellos:
 - Grado apropiado de adherencia para la biopelícula.
 - Gran superficie específica.
 - Elevada porosidad por sí solos y en conjunto.
 - Escasa resistencia al flujo de agua.
 - Estabilidad química y biológica, y elevada resistencia a los cambios de calidad.
 - Suficiente resistencia mecánica al pandeo, destrucción y abrasión, y suficiente durabilidad.
 - Uniformidad del flujo a través del lecho.
 - Que no desprendan sustancias tóxicas como metales pesados, etc.
 - Gravedad específica muy poco diferente a la del agua, que no provoque una pérdida de carga sobre las estructuras sumergidas o sobre el fondo del tanque.
 - Bajo coste y suministro estable.
 - Fácil de transportar, fabricar y construir.

- Instalaciones para el lavado del filtro y para el tratamiento del agua de lavado. En el funcionamiento normal de un filtro sumergido, es complicado controlar el incremento en el grosor de la biopelícula. Si se produce un excesivo crecimiento de la misma, puede llevar a una saturación del material soporte, produciendo pérdidas de carga en el sistema por atascamiento del filtro. Por ello, un contralavado del filtro es necesario, el cual se realizará con agua influente o efluente, así como aire.

1.4.1.2 Aplicaciones de los filtros sumergidos

Tradicionalmente el uso de los filtros sumergidos está ampliamente extendido para el tratamiento de aguas residuales. Los llamados **lechos sumergidos aireados** se usan en el tratamiento de aguas residuales para eliminar los contaminantes típicos como la materia orgánica y los compuestos nitrogenados. La descomposición de la materia orgánica se realiza por el contacto del agua residual con la biopelícula que crece sobre el material soporte. Ya que se trata de un proceso aerobio, debe asegurarse un suministro de oxígeno a las bacterias de forma que sea posible oxidar la materia orgánica y los compuestos nitrogenados.

La velocidad de atascamiento de estos filtros es elevada, por lo que existen límites a la carga orgánica que entra al sistema. Además, la colmatación del filtro debida a la presencia de sólidos en suspensión y al crecimiento excesivo de biomasa obliga a la realización de contralavados con agua y aire con cierta frecuencia. Durante dicho lavado, es necesario detener la operación del filtro, lo que supone una desventaja del mismo.

Estos sistemas son ampliamente utilizados en plantas de tratamiento de aguas residuales de pequeña escala, ya que poseen una elevada tolerancia a fluctuaciones en la calidad y cantidad del efluente a tratar, son de fácil mantenimiento y producen una baja cantidad de lodos. En Japón, cerca del 99% de las EDARs con caudales de tratamiento menores de 50 m³/d y alrededor del 70% de las que tratan caudales algo mayores emplean este proceso (Tejero, 2002).

Su capacidad para eliminar nutrientes como el nitrógeno además de materia orgánica presente en efluentes domésticos ha quedado demostrada en diversos estudios (Gálvez *et al.*, 2003). Además, los sistemas de filtros sumergidos han demostrado su posible aplicabilidad para la descontaminación de aguas residuales procedentes de la industria farmacéutica con un alto contenido en fenol, nitrógeno, y alta salinidad (Gómez *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2007). Sin necesidad de una inoculación previa del relleno, el sistema de filtros sumergidos muestra una alta capacidad de eliminación de fenol; la eliminación de nitrógeno, que se realiza a través de un proceso de pre-desnitrificación¹ usando una columna desnitrificante y otra nitrificante, también alcanza valores aceptables, por encima de un 80% de eliminación. Las biopelículas formadas en este sistema presentan una alta variabilidad relacionada con la disponibilidad variable de oxígeno a lo largo del sistema, y la mayoría de las cepas identificadas estaban relacionadas con especies principalmente colonizadoras de ambientes costeros, debido a la alta salinidad del efluente residual que es diluido con agua marina previamente a su tratamiento (Cortés-Lorenzo *et al.*, 2006).

Otra de las aplicaciones de los filtros sumergidos a sido la de eliminar el nitrato presente en aguas salinas utilizadas en la acuicultura (Sauthier *et al.*, 1998).

En los últimos años, los sistemas de filtros sumergidos han sido sometidos a numerosos estudios para evaluar su aplicación en la desnitrificación de aguas subterráneas contaminadas para la obtención de agua con unas características aceptables para ser utilizada para consumo humano. Se han realizado diversos estudios acerca de su funcionamiento (Gómez *et al.*, 2000a), la elección de una apropiada fuente de carbono (Gómez *et al.*, 2000b) o la influencia de la presencia de oxígeno en su rendimiento (Gómez *et al.*, 2002). Del mismo modo, también se han realizado estudios acerca de la influencia de la concentración de etanol como fuente de carbono sobre la composición de la biopelícula (Gómez *et al.*, 2003). Además, se han llevado a cabo otras investigaciones que

¹ La eliminación de nitrógeno de un agua residual por **post-desnitrificación** implica que el influente entrará en el sistema por la columna óxica de nitrificación donde el amonio se transforma en nitrato, consumiéndose la materia orgánica y siendo necesaria la adición de una fuente de carbono en la columna de desnitrificación, donde este nitrato pasará a nitrógeno gas. La **pre-desnitrificación** implica que en un primer lugar el influente pasará por la columna anóxica, entrando posteriormente a la nitrificante. No es necesaria en este caso la adición de una fuente de carbono para la desnitrificación pero sí será imprescindible la recirculación de una parte del efluente a la columna desnitrificante.

presentan la inoculación selectiva de dicho filtro con cepas seleccionadas como una mejora por los mejores rendimientos obtenidos, además de las ventajas que dicha inoculación selectiva posee para el correcto funcionamiento del filtro sumergido con el fin de descontaminar aguas subterráneas con nitrato (Moreno *et al.*, 2005a, b).

1.5 CICLO DEL NITRÓGENO

El ciclo del nitrógeno juega un papel crucial en la productividad primaria y de hecho es el nutriente vegetal requerido en mayor cantidad. En la materia viva, constituye entre un 8 y un 10% formando parte de los compuestos orgánicos imprescindibles para la vida como son los ácidos nucleicos, las proteínas (destacando las enzimas) o las lipoproteínas (Martínez-Toledo, 1992). Además de esas formas orgánicas, el nitrógeno se encuentra presente en forma inorgánica como N_2 , NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^- . Se encuentra, por tanto, en muchos estados de oxidación, que van desde -3 en el NH_4^+ a +5, en el NO_3^- . El porcentaje en que se encuentra cada uno de ellos varía por una serie de transformaciones biológicas, físicas o químicas, encontrándose en un equilibrio en la naturaleza que conforma este ciclo del nitrógeno.

1.5.1 Fijación de Nitrógeno Molecular

El N_2 es la molécula diatómica más estable conocida, precisando para su disociación 225 Kcal/mol que sólo pueden proporcionarse por fuertes descargas eléctricas o altas presiones y temperaturas o bien por reacciones catalizadas enzimáticamente. Los rayos de tormentas o la luz U.V. sólo representan un 0.5% de la fijación total (Stainer et al, 1988), siendo el resto fijación biológica (unas 180 millones de toneladas al año) (Martínez-Toledo, 1992). Esta fijación biológica se realiza gracias a un complejo enzimático denominado nitrogenasa. Esta fijación de nitrógeno, además de la presencia de ATP, necesita una ferredoxina reducida que actuará como donador de electrones (Bedmar, 1992) y quizás otros citocromos o coenzimas. El amonio es el primer producto que se observa en la fijación, liberando hidrógeno molecular.

La fijación biológica del nitrógeno molecular la pueden llevar a cabo diversos géneros de bacterias de vida libre, algunas de las cuales están asociadas a la rizosfera, y

géneros de bacterias que forman asociaciones mutualísticas con plantas. Los genes que regulan la fijación de nitrógeno, como los genes *nif*, que codifican la nitrogenasa, están sometidos a una rigurosa regulación genética. La fijación de nitrógeno se produce como respuesta a concentraciones de amoníaco bajas o limitantes.

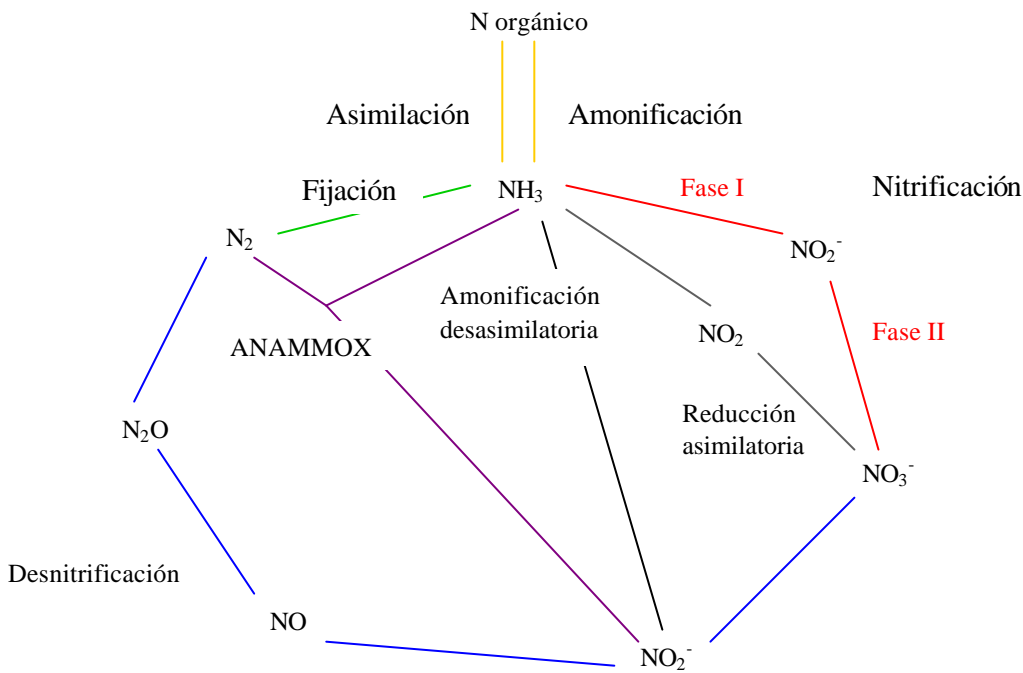


Figura 3. Ciclo del Nitrógeno

1.5.2 Asimilación de nitrógeno

Una vez fijado el nitrógeno, éste ya puede ser asimilado por los organismos vivos en los que el nitrógeno asimilable inorgánico (NH_4^+ y NO_3^-) se transforma en nitrógeno orgánico, bien por la acción de microorganismos fijadores o bien por productores primarios (plantas o algas) u otros microorganismos que lo incorporan a moléculas orgánicas. El empleo de nitrato como tal supone una reducción asimilatoria a NO_2^- y de éste a NH_4^+ , esto es realizado por enzimas como la nitrato y nitrito reductasa asimilatorias que aparecen en todas las plantas y en la gran mayoría de microorganismos. Una vez que este nitrógeno forma parte de las moléculas complejas, puede pasar al resto de la cadena trófica.

1.5.3 Amonificación

La amonificación es el proceso de conversión del nitrógeno orgánico en amonio o amoniaco, y la mayoría de los animales plantas y microorganismos pueden realizar este proceso. La mayoría de este nitrógeno orgánico permanece en la biomasa hasta que es liberado tras la muerte del organismo, aunque los animales excretan cantidades considerables de NH_3 y compuestos nitrogenados orgánicos simples. Estos compuestos se transforman en dióxido de carbono y amonio mediante la actividad microbiana. El nitrógeno tisular es extraído de las proteínas y polinucleótidos por una gran variedad de microorganismos mediante hidrólisis, que originan primero aminoácidos y bases nitrogenadas, seguido del aprovechamiento fermentativo u oxidativo, eliminando NH_3 . En condiciones anóxicas pueden producirse aminas en grandes cantidades, para ser posteriormente asimiladas en aerobiosis, liberando asimismo NH_3 .

1.5.4 Nitrificación

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 es realizado por bacterias nitrificantes y evita la acumulación en el medio de NH_4^+ , permitiendo la formación de NO_3^- que es la forma más soluble. Una gama de microorganismos del suelo podría ser nitrificantes organotrofos, incluyendo hongos como *Aspergillus* (Eylor and Schidt, 1959) y actinomicetes (Remocle, 1977). Sin embargo, el proceso de nitrificación parece estar limitado en su mayor parte a un número restringido de bacterias autótrofas diferenciándose dos grupos: los **Nitrificantes de fase I**, que son capaces de oxidar el NH_4^+ hasta NO_2^- , con cepas pertenecientes a los géneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosovibrio* o *Nitrosolobus*, y los **Nitrificantes de fase II**, que son capaces de oxidar el NO_2^- hasta NO_3^- , destacando a su vez dentro de dicho grupo los géneros *Nitrobacter* y *Nitrococcus*.

En el proceso de nitrificación, el principal factor limitante es el oxígeno. Además de esta inhibición, un pH de 6 también afecta a esta transformación (Bitton, 1994). La nitrificación es especialmente importante en el suelo, ya que la transformación de iones amonio a nitrito y nitrato provoca un cambio en la carga de la molécula, que de positiva pasa a ser negativa, por lo que se facilita la movilización del nitrógeno.

El proceso de **nitrificación parcial** consiste en la oxidación de amonio hasta nitrito, pero no a nitrato, siendo necesario para ello inhibir la actividad de las bacterias oxidantes del nitrito. El amonio y bajas concentraciones de oxígeno se presentan como los elementos inhibidores más importantes, así como la diferencia existente entre el crecimiento de las bacterias oxidadoras de amonio y las oxidadoras de nitrito (Schmidt *et al*, 2003).

1.5.5 Procesos desasimilatorios

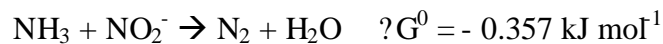
Dichos procesos conllevan la conversión de nitrato en nitrógeno gas (desnitrificación) o en amonio (amonificación desasimilatoria).

Muchos microorganismos tienen la capacidad de reducir los óxidos de nitrógeno (NO_3^- , NO_2^-) en condiciones anóxicas cuando dichos compuestos sustituyen al oxígeno como aceptor terminal de electrones en la cadena respiratoria. Si la reducción continúa hasta la generación de los gases N_2 y N_2O , que se pierden a la atmósfera, el proceso es conocido como desnitrificación. Por tanto, como este proceso es llevado a cabo por microorganismos consiste, según Payne (1981) en la reducción desasimilatoria de NO_3^- y NO_2^- a los gases N_2O y N_2 , y se denomina **desnitrificación biológica**. Dicho proceso constituye la pieza fundamental de nuestro estudio y por ello merece un tratamiento más amplio en el siguiente apartado, donde se describen las distintas fases del proceso así como los distintos complejos enzimáticos implicados.

El proceso de **amonificación desasimilatoria** comienza igualmente con la reducción de nitrato a nitrito, pero a partir de entonces dicho nitrito sigue su proceso de reducción hasta amonio. Dicha amonificación juega un papel muy importante en la detoxificación celular (González *et al*. 2006), al eliminar los acúmulos de nitrito en células que utilizan el nitrato como aceptor de electrones. Aunque dicho amonio generado puede ser asimilado por la célula, el proceso es también denominado desasimilación de nitrito, ya que su principal finalidad es detoxificar el nitrito acumulado y a regenerar NAD^+ .

1.5.6 Oxidación anaeróbica de amonio

Este proceso, conocido como ANAMMOX, incluye reacciones tanto oxidantes como reductoras, y es una de las reacciones incluidas en el ciclo del nitrógeno descritas más recientemente. Las bacterias capaces de catalizar dicho proceso pueden crecer bajo condiciones quimioautolitótrofas, usando amonio como donador de electrones y nitrito como aceptor final (Jetten *et al*, 1998), produciendo nitrógeno gas.



La primera confirmación experimental de la existencia de este proceso fue descrita por Mulder *et al* (1995). Este proceso es altamente exotérmico, y realizado únicamente por bacterias del orden *Planctomycete* (Ahn, 2006).

El descubrimiento de esta nueva vía en el ciclo del nitrógeno abre caminos para novedosas posibilidades de eliminación de nitrógeno de aguas residuales. El paradigma que establecía que la única manera de transformar de manera biológica el amonio presente en las aguas residuales a nitrógeno gas era a través de su oxidación completa a nitrato seguida por una desnitrificación heterotrófica ha quedado en el pasado. La combinación de los procesos de nitrificación parcial y ANAMMOX supone reducciones substanciales de los costes operacionales en los tratamientos de eliminación de nitrógeno en aguas residuales (Jetten *et al*. 2002).

1.6 DESNITRIFICACIÓN

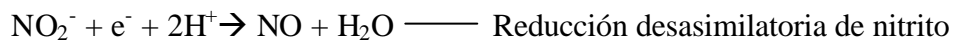
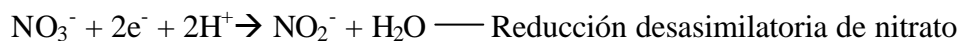
La desnitrificación constituye una de las principales vías del ciclo global del nitrógeno llevadas a cabo por las bacterias. Su expresión se desencadena en la célula por parámetros medioambientales como baja tensión de oxígeno y disponibilidad de un óxido de nitrógeno. La desnitrificación es parte del aparato bioenergético de la célula bacteriana, donde los aniones nitrato y nitrito y los óxidos de nitrógeno gaseosos óxido nítrico y óxido nitroso actúan en el lugar del oxígeno diatómico como aceptores terminales del transporte de electrones. Durante esta reducción desasimilatoria, el nitrato se transforma en diferentes productos reducidos, y simultáneamente se produce la oxidación del donador de electrones.

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

De manera global, el proceso de desnitrificación puede ser descrito como una reacción redox:



Esta reacción global es realizada en cuatro secuencias enzimáticas:



Para cada una de estas fases varía el equipo enzimático implicado y supone un proceso de transferencia de electrones con la consiguiente producción de energía. Hay que destacar que no todos los pasos enzimáticos se dan en todos los microorganismos desnitrificantes los cuales podrán emplear diferentes sustratos y dar diferentes productos.

1.6.1 Reducción desasimilatoria de NO_3^- a NO_2^- :

La reducción de NO_3^- a NO_2^- es un proceso catalizado por unas enzimas denominadas nitrato reductasas. Estas enzimas pueden estar implicadas en varias acciones, como la asimilación de nitrógeno, la reducción desasimilatoria de nitrato, o en el mantenimiento de un potencial de óxido-reducción celular favorable (Stolz and Basu, 2002).

Las enzimas nitrato reductasas son claves en el ciclo del nitrógeno. Dichas enzimas han sido clasificadas en cuatro grupos, atendiendo al origen, su localización dentro de la célula, propiedades moleculares del centro de reacción y función.

Un primer grupo de dichas enzimas llamadas enzimas **nitrato reductasas eucarióticas** pertenecen a la familia de las sulfito oxidasas, contienen molibdeno en su centro activo y se localizan en el citoplasma de los organismos eucarióticos: plantas, hongos y algas. Dichas enzimas están implicadas en la reducción asimilatoria de nitrato, para transformarlo en amonio e incorporarlo a las estructuras moleculares; de este modo ninguna de estas enzimas nitrato reductasas contribuye directamente al proceso de desnitrificación.

El resto de enzimas nitrato reductasas son enzimas mononucleares pertenecientes a la familia de las dimetil sulfóxido (DMSO) reductasas que también contienen Molibdeno en su grupo prostético. Dichas enzimas, exclusivas de los organismos procariotas, pueden ser clasificadas en otros subgrupos. Las **nitrato reductasas asimilatorias** (Nas) se localizan en el citoplasma de las células y están implicadas en el proceso de asimilación de nitrógeno por dichos microorganismos, siendo la primera de las enzimas implicadas en dicho proceso anabólico (González *et al.*, 2006). Aunque con la misma función, esta enzima es estructuralmente distinta a la nitrato reductasa eucariótica (Berks *et al.*, 1995). Existen al menos 3 tipos diferentes de Nas (Stolz and Basu, 2002), aunque al igual que ocurre con la nitrato reductasa eucariótica, su contribución al proceso de desnitrificación es nula. La expresión de esta enzima es regulada por una falta de NH_4^+ disponible y la presencia de NO_3^- .

La reducción desasimilatoria de nitrato comienza con la actuación de un grupo de enzimas **nitrato reductasas desasimilatorias** (Nar). Dichas enzimas catalizan el primer paso de un proceso respiratorio catabólico en ausencia de oxígeno. La reducción desasimilatoria de nitrato es una forma de generar energía para la célula bajo condiciones anóxicas, y por ello, no se encuentra directamente regulada por un requerimiento nutricional de nitrógeno. Por tanto, esta reducción desasimilatoria podría resultar en el consumo total de nitrato en ausencia de otras limitaciones como puede ser, como ya se verá más adelante, la fuente de carbono utilizada o el donador de electrones. Una vez que el

nitrate is reduced to nitrite, this can follow the process of reduction to gaseous compounds (denitrification), a process that is carried out through the action of additional enzymes. On the other hand, nitrite can be reduced directly to ammonium by nitrite reductases that contain the heme group (reduction dissimilatory to ammonium). Although the following steps are, for that matter, processes that imply the action of very different enzymes, the first steps in the processes of denitrification and reduction dissimilatory of nitrate to ammonium are identical and can be carried out by the same enzyme. These nitrate reductase dissimilatory, attached to the cytoplasmic membrane, are for that matter widely distributed, not only among denitrifying bacteria, such as *Paracoccus denitrificans*, or *Pseudomonas stutzeri* but also in numerous enteric bacteria such as *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae*. It has been characterized in numerous species of a very wide taxonomic range, but the enzyme nitrate reductase has in all of them very similar characteristics. The general model of this enzyme is composed of 3 subunits. The largest of them (118-150 kDa) is the active catalytic site and contains the molybdenum cofactor; a smaller protein subunit (55-64 kDa) and a cytochrome *b* associated (19-21 kDa) (Stolz and Basu, 2006). This enzyme nitrate reductase dissimilatory has been studied in numerous bacterial species, and its temperature range is wide. In *Pseudomonas stutzeri*, for example, this enzyme can act in the temperature range that goes from 4 to 76°C. As the temperature increases 10°C, the activity of the enzyme doubles. Its optimum is found at 76°C, with a loss of activity in the temperature range between 78 and 96°C (Borcherding *et al.*, 2000).

There is a last type of enzyme nitrate reductase dissimilatory, called **nitrate reductase periplasmic** (Nap) for its location in the periplasm of the prokaryotic cells. This nitrate reductase has been purified from various types of bacteria including enterobacteria, denitrifiers and photosynthetic non-sulfur bacteria. Thus, the Nap can be synthesized in numerous microorganisms, although its function has not yet been well defined. It has been proposed that this enzyme could be involved in the maintenance of a redox equilibrium in the cell, in the adaptation to the change from aerobic to anaerobic growth, or in aerobic denitrification (Philippot and Hojberg, 1999).

1.6.2 Reducción desasimilatoria de NO_2^- a NO:

La reducción de nitrito a óxido nítrico (NO) es catalizada por la enzima nitrito reductasa (NiR). Se han descrito muchas hipótesis hasta llegar a la conclusión de que el NO es un intermediario de la desnitrificación, pero no se aceptó hasta 1973 cuando Payne lo confirmó tras recopilar múltiples investigaciones. Para llegar a esta conclusión, se precisó aislar e identificar las enzimas implicadas en el proceso, así como el gen del que son originarias. Hoy en día se sabe que la presencia del gen *nir* en una cepa bacteriana puede ser determinativa de su capacidad como desnitrificante.

La NiR es la enzima clave de todas las enzimas implicadas en la desnitrificación, ya que es en este proceso en el que cantidades significativas del nitrógeno fijado en el paso inicial del ciclo del nitrógeno se pierde desde el suelo a la atmósfera. El NO difunde fuera de la célula bacteriana en casi un 70% del total producido. Es muy reactivo y muy tóxico para la célula al reaccionar con grupos hemo o proteínas de Cu o Fe, dando complejos metal-nitrosil. Es por ello preciso para la célula eliminar rápidamente el NO, realizándolo gracias a la alta velocidad de acción de la óxido-nítrico reductasa.

En las bacterias desnitrificantes existen dos tipos completamente distintos de NiR, que son diferenciables por sus grupos prostéticos. Uno de ellas es un citocromo *cd₁* y la otra es una enzima que contiene cobre. Los dos tipos parecen ser mutuamente exclusivas, pero ambas están presentes en distintas cepas del género *Pseudomonas* y *Alcaligenes* (Tavares *et al.*, 2006) La mayoría de las cepas desnitrificantes estudiadas contienen hemo nitrito reductasas, pero las nitrito reductasas que contienen cobre en su grupo prostético están presentes en un mayor número de géneros bacterianos. Estas nitrito reductasas pueden distinguirse fácilmente por el patrón de inhibición que presentan. La CuNiR se inhibe por el agente quelante de cobre dietildiocarbamato (DDC), por cianida y por monóxido de carbono, mientras que la citocromo *cd₁* nitrito reductasa se inhibe por la presencia de cianida, pero no por monóxido de carbono (Zumft, 1997). Ambas enzimas se encuentran en el periplasma celular, aunque nunca una misma cepa expresará más de una de ellas.

1.6.3 Reducción desasimilatoria de NO a N₂O:

La reducción del óxido nítrico se realiza por la acción de las enzimas óxido nítrico reductasas. Dicha enzima cataliza la reducción del NO en la que están implicados dos electrones, obteniendo óxido nitroso N₂O. Dicha reacción conlleva la formación de un enlace N-N, y la enzima responsable es más sensible que las vistas hasta ahora y se encuentra unida a la membrana citoplasmática. La estructura tridimensional de dicha enzima NOR no ha podido ser descrita hasta la fecha, y los datos que se poseen del centro activo han sido obtenidos a través de estudios espectroscópicos.

Existen tres clases de enzimas NOR identificadas en bacterias: cNOR, qNOR y qCuNOR, aunque se deduce que la estructura del centro activo en todas ellas es muy parecida, diferenciándose en el donador de electrones y en el número y tipo de centros de transferencia de electrones presente (Tavares *et al.*, 2006). La enzima cNOR usa un citocromo *c* o una cupredoxina como donador de electrones, y está compuesta por dos subunidades: una mayor llamada NorB (con un peso molecular de 56 kDa) que contiene dos hemos de tipo *b* además de Fe no hémico, y una subunidad más pequeña, llamada NorC (de 17kDa) que contiene un hemo tipo *c*. El tipo qNOR posee una estructura primaria similar a la anterior, con sólo una subunidad que acepta electrones de los quinoles. La mayoría de estas enzimas se expresan en ausencia del resto de enzimas desnitrificantes, principalmente en microorganismos patógenos. El tercer tipo de NOR, La qCuNOR, también está formada por dos subunidades. Mientras que la mayor, es similar a la subunidad NorB, la menor no posee un hemo *c*, sino que usa un centro activo de cobre A para lograr la transferencia de electrones a la subunidad catalítica.

La reducción de NO₂⁻ y NO no es un proceso independiente, sino que son procesos que están interrelacionados tanto a nivel genético como funcional. De este modo la reducción de NO₂⁻ hasta N₂O parece realizarse por solo una unidad funcional. Además, la síntesis y expresión de estas enzimas parece influirse por el oxígeno (Körner, 1993). Los efectos sobre la nitrito reductasa no solo afectarán a la reducción del NO₂⁻, sino también a la reducción del NO y viceversa.

Es necesario reseñar que existen otras enzimas capaces de catalizar la reducción de NO, como la P450_{nor} o la citocromo *c*₅₅₄, (Tavares *et al.*, 2006) que aunque no están directamente implicadas en el proceso de desnitrificación, tienen un importante papel en la detoxificación celular actuando como eliminadores de NO y protegiendo al organismo frente a una acumulación de NO intracelular o una exposición anaeróbica a NO.

1.6.4 Reducción desasimilatoria de N₂O a N₂:

El último paso de un proceso completo de desnitrificación es la reducción de N₂O a N₂ gas, reacción catalizada por la enzima óxido nitroso reductasa (N₂OR), una proteína multicúprica. Dichas enzimas son periplásmicas y solubles, compuestas por dos subunidades idénticas de alrededor de 65 kDa, conteniendo un centro de cobre binuclear, Cu_A similar al observado en la citocromo *c* oxidasa al cual se le supone un papel en el transporte intramolecular de electrones, y un centro multinuclear de cobre, donde tiene lugar la catálisis (Zumft, 1997). La información genética de este proceso aparece en el denominado gen “*nos*” a partir de la cual se forma una apo-proteína inactiva, que tras situarse en el periplasma celular e incorporar como cromóforo al Cu, es capaz de catalizar el proceso (Körner and Mayer, 1992). La síntesis de esta enzima se ve inducida por la presencia de NO₃⁻, NO₂⁻ o N₂O y se inhibe por la presencia de oxígeno.

Muchas bacterias desnitrificantes pueden crecer a expensas del N₂O como único aceptor de electrones para la oxidación de compuestos orgánicos. Una versión “truncada” del proceso de desnitrificación tiene lugar cuando la reducción de N₂O no se presenta, terminando el proceso con dicho compuesto. Es muy probable que en estos casos la información genética para la N₂OR se encuentre ausente. Sin embargo, la ausencia de esta última reducción no afecta los pasos del proceso de desnitrificación desde el nitrato hasta aquí. Del mismo modo, al igual que existen reductores de nitrato que no realizan la desnitrificación, existen bacterias que utilizan el N₂O como aceptor de electrones sin ser desnitrificantes.

El acetileno inhibe la reducción de N₂O, circunstancia muy conveniente para el estudio del procesos de desnitrificación, (Yoshinari and Knowles, 1976, Probanza *et al.*, 1996) convirtiéndose en una técnica muy útil para determinar el potencial de

desnitrificación. Aunque la inhibición por acetileno no es específica para esta enzima, el acetileno es más selectivo que otros inhibidores de la desnitrificación, además del hecho que esta inhibición es no competitiva (Zumft, 1997) Además de esto, Knowles (1982) indicó que la actividad de esta enzima se podía afectar por el valor del pH, la presencia de oxígeno y la de sulfuros. Otro efecto inhibitor lo realizan sustancias como cianuro, azida, dinitrofenol (Payne, 1981), monoyodoacetato, monóxido de carbono (Matsubara and Mori, 1968) o los metales pesados e hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Existen estudios que evidencian la inhibición de la actividad de la N_2OR a bajas temperaturas. Holtan-Hartwig *et al.* (2002) detectaron posibles anomalías en la actividad enzimática de la N_2OR a bajas temperaturas en suelos, inhibiéndose dicha enzima a 0°C. Resultados similares se obtuvieron en ensayos realizados por Öquist *et al.* (2004), donde se demostró que las bajas temperaturas suprimen la actividad de la N_2OR .

1.7 FACTORES QUE AFECTAN A LA DESNITRIFICACIÓN BIOLÓGICA

Hay una serie de factores que pueden influir en este proceso y deben conocerse y controlarse. El efecto de cada uno de ellos puede afectar a todo el proceso o a alguna etapa del mismo. Es importante conocer cómo afectarán estas variables a los procesos enzimáticos implicados en la desnitrificación. Entre ellos destacan:

1.7.1 Presencia de un microorganismo desnitrificante

Para que se lleve a cabo la desnitrificación biológica es necesario que en el medio se encuentre presente un microorganismo desnitrificante. De los microorganismos heterótrofos, un 5% son desnitrificantes (Tiedje *et al.*, 1982), perteneciendo dichas bacterias desnitrificantes heterótrofas a distintos grupos taxonómicos, aunque el mayor contribuyente al proceso de desnitrificación difiere según el autor. Tiedje *et al.*, (1984) establece que el género que más contribuye a la desnitrificación en ambientes naturales es el género *Pseudomonas*, mientras que otros estudios señalan el género *Clostridium* (Gamble *et al.*, 1977). Existen otros géneros en los cuales aparecen bacterias

desnitrificantes, como *Thiosphaera* o *Alcaligenes*, aunque cuantitativamente, su representatividad es menor en comparación con los anteriores.

1.7.2 Presencia de un donador de electrones

Como hemos comentado anteriormente, el grupo más abundante de los desnitrificantes es el de los heterótrofos, que necesitan de una fuente de carbono orgánica para su metabolismo. La presencia de esta fuente de carbono es fundamental para que tenga lugar la desnitrificación por este tipo de microorganismos. Sin embargo, otros factores como el tipo de fuente de carbono o la concentración de ésta, influirán en la mayor o menor eliminación desasimilatoria de NO_3^- . El rendimiento de desnitrificación está influenciado no sólo por la cantidad de fuente de carbono, sino también por la calidad de este donador de electrones (Gómez *et al.*, 2000a).

Existe una gran variedad de fuentes de carbono para ser utilizados por los microorganismos heterótrofos. Las más usuales son evidentemente, las moléculas más fácilmente metabolizables. Los alcoholes (Kesseru *et al.*, 2003; Gómez *et al.*, 2003; Welander *et al.*, 1998, Oh *et al.*, 2001, Sauthier *et al.* 1998), ácidos orgánicos (Kesseru *et al.*, 2002) y los carbohidratos (Gómez *et al.*, 2000b, Volokita *et al.*, 1996) son las sustancias más empleadas como donadores de electrones. Sin embargo, este grupo de microorganismos es capaz de emplear una amplia gama de fuentes de carbono que pueden ir desde la materia orgánica que se encuentra en el estiércol y el fango hidrolizado (Petersen *et al.*, 1996, AesØy *et al.*, 1998), hasta emplear xenobióticos como la anilina (Alexandra *et al.*, 1994). El uso del polivinil alcohol, un polímero sintético poco biodegradable, se ha mostrado también capaz de actuar como único donador de electrones en la desnitrificación (Bang *et al.*, 1995)

Se han realizado numerosos estudios comparativos de la influencia de las diferentes fuentes de carbono en los rendimientos de desnitrificación. Constantin y Fick (1997) destacaron una mayor actividad desnitrificante al emplear ácido acético en lugar de etanol. Esto se debe a un empleo directo del ácido acético por parte de la bacteria, sin necesidad de otras transformaciones metabólicas que sí se precisarían al emplear otras fuentes de carbono, suponiendo un gasto energético al microorganismo. Resultados similares fueron

obtenidos por AesØy *et al*, (1998) y Kesseru *et al*, (2002), éste último establece además que, aunque con comportamientos bastante parecidos entre ambos donadores de electrones. En dicha investigación, se estudió también la eficiencia del ácido succínico, encontrándose ésta inferior a las de las otras dos fuentes de carbono. Un estudio de Gómez *et al* (2000b) comparó la efectividad de tres fuentes de carbono seleccionadas: sacarosa, etanol y metanol, en condiciones experimentales en el sistema de filtros sumergidos. Los estudios concluyeron que el uso de la sacarosa como donador de electrones provocaba una mayor acumulación de nitrito en el efluente, así como un mayor crecimiento de biomasa que causaba el atasco del filtro. Además, los rendimientos del proceso eran menores con esta fuente de carbono que con el etanol y el metanol. Con los alcoholes, no se producían los efectos anteriormente descritos. Debido a la toxicidad del metanol, además de otros factores como su economía y fácil manejo, se concluyó que el etanol era la fuente de carbono más apropiada para dicho proceso.

Dentro del grupo de los heterótrofos, hay microorganismos que en ausencia de fuente de carbono orgánica pueden usar el CO₂ como fuente de carbono a partir del cual sintetizan las estructuras moleculares. Este CO₂ no se comporta como un donador de electrones por lo que emplean el H₂ como tal. Algunos heterótrofos que pueden realizar esta desnitrificación quimioautótrofa son *Paracoccus denitrificans* o *Alcaligenes eutrophus*.

Otros compuestos químicos como los derivados de azufre tiosulfato, sulfuros o sulfitos, pueden oxidarse por microorganismos, cediendo así sus electrones a la cadena respiratoria de la desnitrificación. Este proceso es realizado por algunos quimiolitótrofos con capacidad desnitrificante como *Thiobacillus denitrificans* o *Thiomicrospira denitrificans*.

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

Del mismo modo, la concentración de esta fuente de carbono también influye en el rendimiento de la desnitrificación. Gómez *et al* (2003), estudiando la influencia de la

concentración de etanol en la composición de una biopelícula desnitrificante, establece que las bacterias manifiestan un incremento de la actividad desnitrificante a medida que la concentración de etanol aumenta, al igual que el número de células por gramo de peso seco de biopelícula.

1.7.3 Ausencia de oxígeno

El oxígeno puede afectar a la desnitrificación de tres modos diferentes, dependiendo a su vez de la cepa bacteriana:

Efecto competitivo: descendiendo 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 inhibidor a nivel enzimático: descendiendo la actividad de ciertas enzimas (Davies, 1989). El oxígeno afecta de forma diferencial a las distintas enzimas implicadas en la desnitrificación (Kornaros and Lyberatos, 1998). Según Cole (1994) es la enzima nitrato reductasa la más sensible de todas, aunque otros estudios realizados en relación a la actividad desnitrificante de *Pseudomonas denitrificans* establecen que la enzima nitrito reductasa se ve inhibida casi por completo en presencia de oxígeno, mientras que la enzima nitrato reductasa mantiene aún algo de su actividad lo que conlleva a la acumulación de nitrito en el medio (Kornaros and Lyberatos, 1998). Esta mayor sensibilidad al oxígeno de la nitrito reductasa es corroborada por las investigaciones realizadas por Drury *et al.* (1991)

Efecto inhibidor a nivel genético: al no permitir la síntesis de determinadas enzimas en función de su concentración (Braun y Zumft, 1992). Por ejemplo, la síntesis de la nitrato reductasa es inhibida por la presencia de oxígeno (Cole, 1994).

Estos efectos no se detectan por igual en todos los microorganismos desnitrificantes, destacando unos más que otros en función de la cepa bacteriana. La afirmación que Payne (1981) daba sobre el efecto negativo que el oxígeno tenía sobre la desnitrificación, ha sido corroborada por muchos autores, desnitrificación realizada tanto en aguas residuales o subterráneas (Hagedorn-Olsen *et al.*, 1993). Sin embargo, no afecta

por igual a todas las bacterias desnitrificantes. *Thiosphaera pantotropha*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas nautica* o *Comamonas* se han descrito como microorganismos que son capaces de desnitrificar en presencia de oxígeno (Robertson *et al* 1988; Bonin and Gilewick, 1991; Patureau *et al*, 1994). En estos casos, tanto el oxígeno como el NO_3^- se emplean como aceptores de electrones, disponiendo la bacteria de los dos mecanismos enzimáticos.

En términos generales, se puede afirmar que la presencia de oxígeno disminuye el rendimiento de desnitrificación. La desnitrificación produce menos energía que la respiración por oxígeno, por lo tanto, una célula bacteriana creciendo en condiciones aeróbicas escogerá el oxígeno como aceptor final de electrones. La influencia de la concentración de oxígeno disuelto sobre las biopelículas fue estudiada por Gómez *et al* (2002), afirmando que la presencia de oxígeno en el agua disminuye la eliminación de nitrógeno inorgánico, e incrementa la concentración de nitrito en el efluente. Estos efectos negativos se incrementan con un aumento en la concentración de oxígeno disuelto y varía dependiendo de la naturaleza del donador de electrones.

Se ha demostrado que, en biorreactores abiertos a la atmósfera, el oxígeno que entra en éste a través de la superficie del líquido afecta a la desnitrificación no sólo metabólicamente (con la consecuente utilización del oxígeno como aceptor de electrones) sino también cinéticamente, cuando la concentración de oxígeno disuelto se incrementa hasta niveles que pueden tener un efecto inhibitor en el rendimiento de desnitrificación. (Plósz *et al.*, 2003)

1.7.4 Presencia de aceptores de electrones

Para que la desnitrificación tenga lugar es precisa la presencia de aceptores de electrones, los óxidos de nitrógeno, que son a su vez los responsables de la síntesis de las enzimas desnitrificantes. Körner y Zumft (1989) observaron que cepas de *Pseudomonas stutzeri* eran incapaces de sintetizar enzimas desnitrificantes en ausencia de oxígeno si en el medio no aparecen óxidos de nitrógeno. Así, la presencia de un óxido de nitrógeno determinado potencia la síntesis de su propia reductasa, por lo que el N_2O favorece la síntesis de la óxido nitroso reductasa y el NO_2^- de la nitrito reductasa.

Aparte de esta activación enzimática producida por la presencia de los óxidos de nitrógeno, hay que destacar un efecto inhibitorio que el nitrato produce en el proceso. Este anión en grandes concentraciones inactiva la nitrito reductasa o incluso puede inhibir su síntesis (Unden *et al.*, 1980), por lo que se produce una acumulación de NO_2^- en el caso de *Ps. stutzeri* que puede llegar a ser tóxico para la bacteria (Körner y Zumft, 1989).

1.7.5 Existencia de un pH óptimo

La influencia del pH sobre la desnitrificación se ha estudiado por numerosos investigadores en diferentes hábitats. En todos los casos coinciden que el pH óptimo para la desnitrificación está próximo a la neutralidad, ligeramente básico, aunque el valor óptimo varía con la especie (Thomas *et al.*, 1994).

Tanto un incremento como un descenso del pH provocan un descenso en la actividad desnitrificante. Glass y Silverstein (1998) establecen que existe una relación estadísticamente significativa de signo positivo en la tasa específica de reducción de nitrato en cultivos aclimatados a medida que el pH se incrementa de 8.5 a 9.

El efecto del pH parece residir en su actividad frente a las enzimas responsables de la desnitrificación. La óxido nitroso reductasa no sólo es sensible al oxígeno, sino también al pH. Éste puede 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).

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

1.7.6 Existencia de una temperatura óptima

La temperatura ambiental afecta intensamente a los microorganismos, siendo especialmente susceptibles al ser generalmente unicelulares y poiquiloterms. Por tanto, su temperatura varía con el cambio de temperatura ambiental de forma que la temperatura de la célula microbiana refleja directamente la de su ambiente (Prescott, 1999). Todos los microorganismos poseen una temperatura óptima de crecimiento que los caracteriza, en dicha temperatura se dan las tasas más elevadas de crecimiento y actividad (Atlas y Bartha, 2002). Igualmente, existe una temperatura mínima de crecimiento, por debajo de la cual son metabólicamente inactivos.

El efecto de la temperatura en el crecimiento de los microorganismos viene determinado fundamentalmente por la sensibilidad que presentan las reacciones catalizadas por enzimas a determinadas temperaturas.

En condiciones de baja temperatura, un aumento eleva la velocidad de crecimiento, ya que la velocidad de una reacción catalizada por enzimas casi se duplica por cada incremento de temperatura de 10°C. Como la velocidad de cada reacción aumenta, el metabolismo en general es más activo a temperaturas altas y el microorganismo crece más rápidamente. A partir de cierto punto, un mayor incremento disminuye la velocidad de crecimiento y temperaturas suficientemente elevadas son letales. Las altas temperaturas ocasionan daños a los microorganismos al desnaturalizar las enzimas, proteínas transportadoras y otras proteínas. Las enzimas tienen temperaturas óptimas para una actividad máxima. Si la temperatura se eleva demasiado por encima del valor óptimo, la estructura de la enzima se altera y ésta pierde su actividad al producirse la desnaturalización. El calor también deteriora las membranas microbianas y la doble capa lipídica se funde y desintegra. Por ello, a pesar de que las enzimas funcionales actúan más rápidamente a temperaturas elevadas el microorganismo puede alterarse hasta el punto de inhibirse su crecimiento, porque el daño no puede repararse adecuadamente.

Debido a estos efectos opuestos de la temperatura, el crecimiento microbiano y la actividad enzimática tienen una dependencia bastante característica de la temperatura, existiendo temperaturas cardinales distintivas: temperatura mínima, óptima y máxima

(Prescott, 1999). La representación de la actividad enzimática en función de la temperatura del ensayo conduce a una curva en forma de campana, con un máximo correspondiente a la temperatura de máxima actividad catalítica. Una vez alcanzado este valor, la actividad disminuye como consecuencia de la desnaturalización térmica de la enzima.

La forma de la gráfica se representa en la figura 2. Aunque la forma de la curva de dependencia puede variar, la óptima está siempre más próxima a la máxima que la mínima. Las temperaturas cardinales de una especie en particular no son invariables, sino que dependen hasta cierto punto de otros factores ambientales como el pH y los nutrientes disponibles. Las temperaturas cardinales varían ampliamente entre microorganismos (Prescott, 1999).

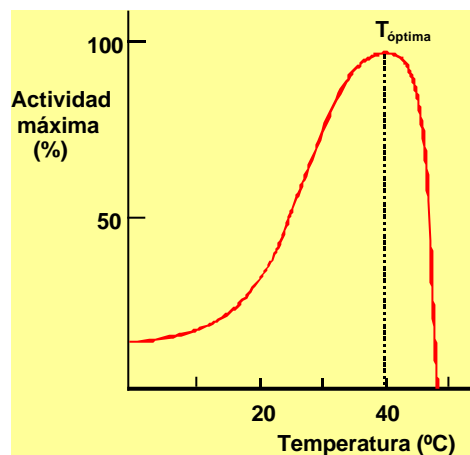


Figura 4- Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

El efecto que la temperatura tiene sobre las actividades enzimáticas se describe de manera usual por la ecuación de Arrhenius:

$$k = A \cdot e^{-E/RT}$$

Donde:

k = constante de velocidad de reacción

E = energía de activación (cal·g/mol)

R = constante universal de los gases (cal·g/mol°K)

T = temperatura absoluta (°K)

A = factor pre-exponencial

1.- INTRODUCCIÓN

En la tabla 2 se muestra una relación de las temperaturas cardinales (mínima, óptima y máxima) de algunas bacterias no fotosintéticas y fotosintéticas. Las temperaturas óptimas se encuentran normalmente en un rango de 0°C hasta un valor tan alto como 75°C, mientras que el crecimiento microbiano se produce en un rango de -20°C hasta más de 100°C. La temperatura de crecimiento de un microorganismo determinado abarca normalmente un margen de 30 grados centígrados. Las especies que tienen un rango pequeño se denominan estenotérmicas mientras que las que crecen en un amplio rango de temperatura se denominan euritérmicas.

Tabla 2. Temperaturas cardinales de algunos microorganismos (Prescott *et al.*, 1999)

MICROORGANISMO	TEMPERATURAS CARDINALES		
	MÍNIMA	OPTIMA	MAXIMA
BACTERIAS NO FOTOSINTÉTICAS			
Bacillus psychrophilus	-10	23-24	28-30
Micrococcus cryophilus	-4	10	24
Pseudomonas fluorescens	4	25-30	40
Staphylococcus aureus	6.5	30-37	46
Enterococcus faecalis	0	37	44
Escherichia coli	10	37	45
Neisseria gonorrhoeae	30	35-36	38
Thermoplasma	45	59	62
acidophilum			
Bacillus	30	60-65	75
stearothermophilus			
Thermus aquaticus	40	70-72	79
Sulfolobus acidocaldarius	60	80	85
Pyrococcus abyssi	67	96	102
Pyrodictium occultum	82	105	110
Pyrolobus fumarii	90	106	113
BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS			
Synechococcus eximius	70	79	84

Los microorganismos pueden clasificarse en 5 categorías en función de los rangos de temperatura de crecimiento (Prescott *et al.*, 1999) (Figura 5):

1. Los psicrófilos crecen bien a 0°C y tienen una temperatura óptima de 15°C o inferior. La máxima es de aproximadamente 20°C. Se han adaptado a su ambiente por varios mecanismos. Las enzimas, sistemas de transporte y mecanismos para la síntesis de proteínas actúan bien a temperaturas bajas.

Se encuentran en ecosistemas fríos y normalmente mueren si se exponen a temperatura ambiente

2. Los psicrótrofos o psicrófilos facultativos pueden crecer a 0°C aunque su temperatura óptima sea 20 a 30°C y la máxima de casi 35°C. En este grupo se incluyen géneros de bacterias, hongos, algas y protozoos.
3. Los mesófilos crecen a una temperatura óptima de 20 a 45°C siendo la mínima de 15 a 20°C y la máxima de casi 45°C. La mayoría de microorganismos pertenecen a esta categoría y se encuentran normalmente en animales de sangre caliente y en ambientes de latitudes templadas y tropicales.
4. Los termófilos pueden crecer hasta a temperaturas de 75°C o superiores. La temperatura mínima es normalmente de 45°C y la óptima es de 55 a 65°C. La inmensa mayoría son bacterias, aunque algunos hongos y algas son termófilos. Algunos de estos termófilos extienden su desarrollo a la región mesofílica, conociéndose estas especies como termófilas facultativas o euritermófilas. Otras especies, en cambio, crecen mejor a temperaturas superiores a los 60-65°C y no se desarrollan a temperaturas que están en la región mesofílica. A estas especies se les llama termófilas verdaderas, termófilas obligatorias o estenotermófilas.
5. Los hipertermófilos tienen una temperatura óptima de entre 80°C y casi 113°C. No suelen crecer bien por debajo de 55°C, y se encuentran en hábitats muy concretos como géisers y fuentes hidrotermales abisales.

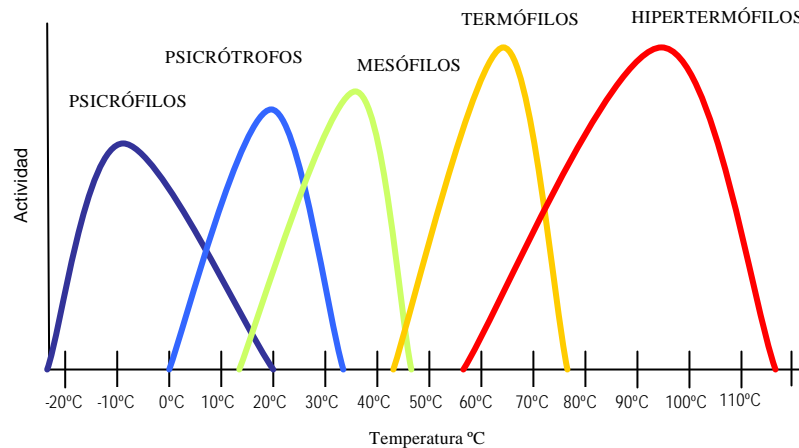


Figura 5. Clasificación de los microorganismos en función de la temperatura de crecimiento

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

Se han realizado algunos estudios acerca de la influencia que la temperatura puede tener sobre el proceso de desnitrificación, tanto en aguas contaminadas con nitratos (Welander and Mattiasson, 2003; Darbi and Viraraghavan, 2004) en suelos con actividad desnitrificante (Holtan-Hartwig *et al.*, 2002; Tschenco *et al.*, 2001), así como en sedimentos marinos (Nowicki, 1994). Se ha demostrado que la influencia de la temperatura sobre el proceso de desnitrificación puede ser expresada por la ecuación de Arrhenius en un rango de temperaturas de 5 a 25-30°C (Dawson and Murphy, 1972).

Nowiki (1994) estudió los flujos de nitrógeno de la Bahía Narragansett y del Estuario Pawcatuck, en Rhode Island, con el objetivo de determinar la importancia de la temperatura sobre el proceso de desnitrificación que ocurre en los sedimentos, además de otros factores. Realizando curvas de regresión de temperaturas en sedimentos control y sedimentos enriquecidos con nutrientes, se demostró que las tasas de desnitrificación se incrementan exponencialmente con la temperatura en ambos casos, pero este incremento resultó mucho más dramático en el mesocosmos enriquecido con nutrientes. Este estudio asegura que el efecto en los rendimientos de desnitrificación se debe única y exclusivamente a los cambios de temperatura, ya que el resto de variables, como la

presencia o ausencia de oxígeno en el mesocosmos, se mantuvieron controladas. Esta dependencia de la desnitrificación con la temperatura probablemente refleja el hecho de que la desnitrificación está asociada con la descomposición de la materia orgánica a amonio, y con la nitrificación del amonio a nitrato, procesos que también están fuertemente influidos por la temperatura. El autor establece que el hecho de que este efecto de la temperatura sea más pronunciado en los ambientes ricos en nutrientes puede deberse a la abundancia de sustrato orgánico disponible para la descomposición béntica.

En suelos con actividad desnitrificante, la capacidad de emisión de N_2O a la atmósfera está regulada por los procesos de reducción llevados a cabo por la comunidad desnitrificante. La temperatura afecta a la relación N_2O/N_2 , por lo que este proceso de desnitrificación llevado a cabo en suelos es uno de los principales contribuyentes de la emisión de N_2O a la atmósfera. En experimentos que estudian la producción de N_2O y su reducción posterior a N_2 se ha demostrado que esta relación N_2O/N_2 tiende a aumentar al disminuir la temperatura (Holtan-Hartwig *et al.*, 2002), es probable que este efecto no se deba a que la energía de activación para la reducción del N_2O sea mayor que para su producción, sino que existan anomalías en las actividades enzimáticas a bajas temperaturas. Dichos resultados coinciden con los de Öquist *et al.* (2004), que estudió los efectos de la temperatura sobre la formación de N_2O , y si los procesos de nitrificación-desnitrificación son los principales responsables de dicha producción. Dicha producción parece ser muy dependiente de la temperatura cuando ésta se encuentra por encima de los $0^\circ C$, aumentando a medida que la temperatura aumenta. Sin embargo, se observó un incremento significativo de la producción de N_2O cuando la temperatura se encontraba por debajo de los $0^\circ C$. Dicho comportamiento que se desvía del patrón establecido, ya que se llegan a alcanzar niveles similares que los descritos para altas temperaturas. La actividad enzimática responsable de la desnitrificación actúa de un modo débil a temperaturas elevadas (Tscherko *et al.* (2001), por lo que un aumento de la temperatura en el suelo ($2^\circ C$ por encima de una temperatura diurna de $12-20^\circ C$) no aceleraría los procesos de mineralización ni desnitrificación del suelo.

En aguas con altas concentraciones de nitrógeno también se observa una dependencia del proceso de desnitrificación con la temperatura. Diferentes estudios se han realizado para establecer esta dependencia, en sistemas de descontaminación de aguas

residuales con altas cantidades de nitrógeno donde se dan procesos de nitrificación-desnitrificación. Iliés y Mavinic (2001) estudiaron la capacidad de eliminación de nitrógeno en un sistema “Bardenpho” de 4 fases, con dos reactores anóxicos y dos aeróbicos. La temperatura fue disminuida progresivamente de 20°C a 10°C. El sistema experimentó una reducción de un 47% en los rendimientos de eliminación de NO_x al bajar la temperatura a 17°C. Al bajar de nuevo a 14°C, se recogió una nueva disminución de los rendimientos de desnitrificación, aunque no se observaron efectos negativos en los procesos de nitrificación. Sin embargo, al bajar a temperaturas alrededor de los 10°C, el rendimiento de desnitrificación del sistema se redujo por debajo del 5%, afectándose también los procesos de nitrificación. Estas reducciones progresivas de los rendimientos de eliminación de nitrógeno dan lugar a efluentes con altas concentraciones de amonio y nitratos. Al aumentar la temperatura de nuevo a 15°C, no se observó ninguna mejoría en los procesos, aun pasados algunos días. Este experimento denota la dependencia que en sistemas de fangos activos la microbiota desnitrificante tiene hacia la temperatura ambiente.

Similares efectos sobre la desnitrificación a causa de la temperatura fueron observados por Aslan y Türkman (2004), en un sistema de desnitrificación de flujo ascendente usando microorganismos heterótrofos sobre un medio soporte y usando paja como fuente de carbono. Cuando la temperatura se encuentra por encima de los 20°C, se consigue una eliminación casi completa del nitrato. Pero a 15°C de temperatura, el rendimiento cae hasta un 10%. A 5°C, no se produce eliminación de nitrato. Darbi y Viraraghavan (2004) también experimentaron la influencia de la temperatura en el proceso de desnitrificación autotrófica realizado por *Thiobacillus denitrificans* en un reactor biológico con azufre elemental y caliza, y también obtuvieron buenos rendimientos cuando la temperatura ambiente era de 20°C, degradando todo el nitrato y sin aparición de nitritos en el efluente. Este nitrito en el efluente se incrementaba cuando la temperatura descendía a 15°C y a 10°C, por encima de los límites permitidos (7 mg/l), aunque los niveles de nitrato en el efluente seguían siendo bajos. Cuando la temperatura es de 4°C, la desnitrificación deja de ser efectiva, porque se aumenta aún más la cantidad de nitrito en la salida, apareciendo una importante cantidad de nitrato. Se concluye en este experimento

que este sistema de desnitrificación no es efectivo a temperaturas iguales o menores que 10°C.

Sin embargo, existen estudios en los que se refleja una importante actividad desnitrificante en sistemas de tratamiento de aguas a bajas temperaturas. Rodgers y Zhan (2004), estudiando dicho proceso en un sistema de biopelículas para la eliminación de nitrógeno, a una temperatura controlada de 11°C, lograban altos rendimientos de desnitrificación, en el rango de 94-98%, y las tasas de desnitrificación superficial se mantuvieron alrededor de 2,9-3,8 g NO₃-N/(m² día). Del mismo modo, Welander y Mattiasson (2003) establecieron la adaptabilidad del sistema de biodesnitrificación usando microorganismos atrapados en un soporte de plástico que queda suspendido en el medio, concluyendo que dicho sistema es eficaz para la desnitrificación en ambientes fríos. La reducción del rendimiento recogida al pasar de 15°C a 11°C es igual a la que se experimenta entre 7°C y 3°C, siendo ésta última el 55% de la que se obtiene a 15°C. Sin embargo, sí son importantes los descensos totales de rendimiento: a 3°C, se desnitrifica alrededor de un 30% de lo que se logra a 23°C. Este descenso es importante y afecta a la eficacia final del proceso.

Queda demostrado que la temperatura puede ser un factor determinante y crucial en el proceso de desnitrificación de aguas contaminadas. Un descenso en la temperatura puede ser un serio inconveniente en la consecución de dicho proceso.

1.8 MICROORGANISMOS DESNITRIFICANTES PSICRÓTROFOS

Los ambientes fríos son actualmente mucho más comunes y extensos que los calientes. La temperatura media de los océanos es de tan solo 30°C y hay extensas áreas en el ártico y antártico que permanecen heladas la mayor parte del año. Las variaciones de temperatura, pH y salinidad del medioambiente en el que se encuentren estos organismos son de decisiva importancia para su crecimiento. Sin embargo, es difícil que estos ambientes fríos sean estériles, encontrando siempre organismos vivos si existe agua en forma líquida, ya que el agua es el disolvente primordial para la vida y debe estar presente en estado líquido para que ésta ocurra. Esto pone un límite práctico para el crecimiento de organismos muy poco por debajo de los cero grados centígrados. Sin embargo, en los

medios helados existen pequeñas bolsas o microcavidades de agua líquida, donde pueden desarrollarse algunos microorganismos.

La temperatura mínima para los microorganismos se explica por:

- un descenso en la fluidez de la membrana, deteniéndose los procesos de transporte de nutrientes y el gradiente de protones
- un aumento de la viscosidad del citoplasma
- un debilitamiento de los enlaces hídricos de las proteínas

Los microorganismos han desarrollado una serie de adaptaciones a las bajas temperaturas, como la síntesis de enzimas resistentes al frío, el desarrollo de unos sistemas de transporte adaptados a las bajas temperaturas, o un aumento de la proporción de ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos de la membrana celular, permitiendo que ésta continúe en su estado semifluido, evitándose su congelación.

Los microorganismos desnitrificantes se encuentran en numerosos y muy diferentes hábitats, no sólo los relacionados con una importante presencia de nitrato y nitrito. Como ya se ha mencionado con anterioridad, el hecho de que se detecte una actividad desnitrificante en condiciones ambientales de baja temperatura indica la existencia de microorganismos desnitrificantes que no ven inhibida su actividad en condiciones adversas de temperatura.

De los sistemas empleados en desnitrificación, los que han dado mejores resultados han sido los filtros sumergidos (Lacamp *et al.*, 1993), quedando probada su eficacia por numerosos estudios ya descritos en anteriores apartados. La inoculación selectiva de dichos filtros elimina los problemas presentados por la inoculación realizada con licor mezcla, pues no existen patógenos y se dan rendimientos superiores, imprescindible si el agua va a ser destinada para consumo humano (Moreno, 2001).

Por lo tanto, un estudio detallado del efecto que la temperatura pueda tener sobre los sistemas de filtros sumergidos para la descontaminación de aguas destinadas al consumo humano mediante la inoculación selectiva es de una gran importancia, para que los filtros sumergidos puedan ser realmente un sistema técnica y económicamente viable que permita solucionar los problemas de contaminación por nitrato de los acuíferos de pequeñas poblaciones donde que es probable que dichas instalaciones se encuentren al aire libre, con lo que quedan totalmente expuestas a las fluctuaciones de temperatura ambiental del entorno.

Por ello, los microorganismos desnitrificantes responsables de la descontaminación que se encuentren inmovilizados en la biopelícula del filtro deberán saber hacer frente a estas condiciones adversas. Su actividad no podrá verse afectada por un descenso de las temperaturas, ya que sería un serio inconveniente para la consecución del proceso de desnitrificación biológica. De igual modo, es necesario que dichos microorganismos sigan realizando su actividad a mayores temperaturas. Los microorganismos psicrótrofos, como ya hemos visto, tienen un óptimo de temperatura a unos 20°C, aunque su crecimiento se extiende hasta los 0°C, por lo que serán los preferidos para llevar a cabo la actividad desnitrificante en este tipo de sistemas. Un ejemplo lo encontramos en la especie bacteriana *Pseudomonas fluorescens*, que tiene probada actividad desnitrificante, y es capaz de crecer a temperaturas tan bajas como 4°C (Tabla 2). El uso de este tipo de microorganismos será el adecuado para poder llevar a buen término la puesta en marcha de un filtro sumergido en lugares con un amplio rango de temperaturas ambientales, como la provincia de Granada.

2. OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

La contaminación de aguas subterráneas por nitrato presenta su principal origen en la contaminación agrícola y genera problemas tanto medioambientales como de salud pública, ya que limita la utilización de los recursos subterráneos para el abastecimiento.

Una de las soluciones a este problema es el tratamiento del agua subterránea previo a su utilización, para lo cual podemos hoy día contar con diferentes tecnologías de naturaleza tanto físico-química como biológica. Los tratamientos biológicos destacan sobre el resto por su selectividad frente al ión nitrato, transformándolo en gas nitrógeno vía desnitrificación, por lo que no se genera un residuo de difícil gestión. Otra de las ventajas de esta tecnología es que no se altera el resto de los componentes salinos del agua tratada. Ahora bien, al tratarse de una tecnología de naturaleza biológica, uno de los problemas de aplicarla al tratamiento del agua destinada al consumo humano es la contaminación biológica del efluente tratado, razón por la que se escogen sistemas de biopelícula, destacando la tecnología de filtros sumergidos.

Para que este sistema sea efectivo, se debe hacer un control sobre la presencia de oxígeno disuelto en el influente y se debe añadir continuamente una fuente de carbono de fácil asimilación, que permita eliminar el nitrato vía desnitrificación biológica. Otros parámetros como el pH o la presencia de determinados nutrientes como el fósforo también deben controlarse dado el carácter biológico del proceso.

Todos estos parámetros son fácilmente controlables mediante dosificación de determinados compuestos al sistema. Sin embargo, otro parámetro como la temperatura puede influir en el proceso y es más difícil de controlar en un tratamiento de estas características. Dado que el tratamiento de desnitrificación debe ser continuo, es importante valorar el efecto que la temperatura puede presentar sobre el proceso, razón por la que nos planteamos esta investigación titulada *‘Influencia de la Temperatura sobre la Desnitrificación de Aguas Subterráneas Contaminadas Mediante Filtros Sumergidos’*, cuyo objetivo principal es **valorar la influencia de la temperatura sobre el proceso de desnitrificación biológica aplicado a la eliminación de nitrato de aguas subterráneas**

contaminadas mediante el empleo de filtros sumergidos. Para alcanzar este objetivo principal nos planteamos los siguientes objetivos secundarios:

- Estudio de la influencia de la temperatura en la formación de biopelícula sobre el soporte de un filtro sumergido a partir de la microbiota del agua subterránea, fango activo del reactor biológico de una estación depuradora y diferentes inoculantes seleccionados.
- Análisis la evolución temporal de la capacidad de eliminar nitrógeno de un sistema de filtros sumergidos destinado a la desnitrificación de aguas subterráneas contaminadas, en función de la temperatura y para los diferentes medios de generación de biopelícula indicados en el objetivo secundario anterior.
 - o Análisis la evolución temporal de la presencia de nitrato en el efluente.
 - o Análisis la evolución temporal de la presencia de nitrito en el efluente.
 - o Cálculo la tasa de eliminación de nitrógeno por unidad de superficie de material soporte.
- Valoración de la influencia de la temperatura en la calidad final del efluente procedente de un sistema de filtros sumergidos destinado a la eliminación de nitrato de aguas subterráneas contaminadas, en lo referente a turbidez, presencia de bacterias aerobias cultivables y pH.
- Estudio de la biodiversidad de las poblaciones bacterianas en las biopelículas formadas sobre el soporte de un filtro sumergido destinado al tratamiento de aguas subterráneas contaminadas mediante electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE). Valoración de la influencia de la temperatura y variaciones en la carga hidráulica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CRONOLOGÍA DEL ESTUDIO

Para el estudio del efecto de la temperatura sobre el proceso de desnitrificación mediante la tecnología de filtros sumergidos, se utilizó una planta a escala de laboratorio usando como relleno del filtro material cerámico procedente de residuos de la construcción. Para poder alcanzar los objetivos planteados el estudio se realiza en varias fases cuya cronología fue la siguiente:

- Selección de microorganismos desnitrificantes con capacidad para desarrollarse a bajas temperaturas para su posterior uso en el filtro sumergido a escala de laboratorio.
- Estudio de la capacidad de colonización del filtro sumergido por parte de los microorganismos, a diferentes temperaturas:
 - o Por la propia microbiota presente de manera natural en el agua subterránea contaminada a tratar.
 - o Por la microbiota presente en el fango activo procedente del reactor biológico de una estación depuradora de aguas residuales, usando éste como inoculante del filtro sumergido.
 - o Por los microorganismos desnitrificantes seleccionados en la fase anterior, los cuales se aplicaron como inoculantes selectivos.
- Estudio de la capacidad de eliminación de nitrógeno del sistema, diferenciando la fase de estabilización y la fase estable, para cada una de las formas de generación de biopelícula ensayada.

- Estudios de biodiversidad microbiana y de análisis de biomasa en el sistema sin inoculación e inoculado de forma selectiva.

3.2 SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS DESNITRIFICANTES

En diferentes estudios se ha establecido que para llevar a cabo un proceso de biodesnitrificación mediante la tecnología de filtros sumergidos 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 fango activo precedente del reactor biológico de una planta de tratamiento de aguas residuales (Gómez et al., 2000b), debido a la alta carga microbiana que este medio contiene y al alto porcentaje de bacterias desnitrificantes que en ese sistema se pueden encontrar. Sin embargo, el sistema inoculado con fango activo presenta diversos inconvenientes, ya que la abundancia de microorganismos, entre ellos numerosos no desnitrificantes, puede dar lugar a un exceso de consumo de materia orgánica, que no se realizaría con la presencia sólo de microorganismos desnitrificantes (Gómez et al., 2003). Es por esto que la inoculación selectiva con bacterias desnitrificantes inocuas da lugar a un proceso más eficiente (Moreno et al., 2005a).

Los microorganismos utilizados para la inoculación del filtro sumergido a escala de laboratorio se obtuvieron en los trabajos previos realizados por Gómez (1998). A partir de biopelículas formadas mediante el empleo de fango activo para la inoculación de un filtro sumergido desnitrificante a escala piloto en diferentes condiciones de funcionamiento, se aislaron un total de 250 cepas sin catalogar, una vez que el sistema se puso en marcha y alcanzó su fase estacionaria. Dichos microorganismos se conservaron mediante liofilización, por lo que el procedimiento empleado para su caracterización y selección consistió en las siguientes fases:

- Recuperación de microorganismos conservados mediante liofilización.
- Comprobación de la generación de N_2 en medio desnitrificante.
- Primera selección de microorganismos desnitrificantes mediante el estudio del crecimiento a diferentes temperaturas (4, 10, 15, 20, 25, 30 y 37°C).

- Segunda selección de microorganismos desnitrificantes mediante la cuantificación de la actividad desnitrificante.
- Selección final de microorganismos desnitrificantes mediante su identificación taxonómica.

3.2.1 Recuperación de microorganismos conservados mediante liofilización

Las bacterias aisladas del filtro sumergido a escala piloto fueron conservadas mediante liofilización, con la idea de mantenerlas viables hasta su posterior utilización.

Para recuperar el microorganismo se empleó el caldo de soja-triptona (Difco®), el cual se preparó resuspendiéndolo en agua destilada (30.0 g/l), repartiéndolo en tubos de 16 mm a razón de 5 ml/tubo y esterilizándolo a 112°C durante 30 minutos en autoclave de vapor. Este medio se añadió mediante jeringa estéril a los viales de liofilización en los que se encontraba el microorganismo (el vacío del vial fue indicativo de una buena conservación del líofilo) y tras resuspender el líofilo se tomó parte, mediante jeringa estéril, añadiéndolo a un nuevo tubo de caldo de soja-triptona. El tubo así inoculado se incubó durante 24 horas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad.

Una vez crecido el cultivo se realizó un aislamiento en medio sólido Nitrato-Sacarsa-Agar (N-S-A), modificado a partir del descrito por Rodina (1972), cuya composición por litro de agua destilada fue la siguiente:

Compuesto	g/l
NaNO ₃	2,0
K ₂ HPO ₄	1,0
KCl	0,5
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,01
Extracto de levadura	1,0
Sacarosa	30,0
Agar-Agar	20,0

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 112°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 para su siembra.

Una vez el microorganismo ha crecido en placa, fue necesaria la realización de aislamientos para obtener de nuevo un cultivo puro. Dichos aislamientos se realizaron mediante la técnica de estría múltiple en una placa de petri con medio N-S-A, incubándola a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad.

3.2.2 Comprobación de la generación de gas en medio desnitrificante semisólido

Una primera aproximación de la capacidad desnitrificante de los microorganismos aislados se consigue mediante su inoculación en diferentes medios semisólidos para observar la producción de N_2 , que vendrá determinada por la aparición de burbujas de gas que no escapan a la atmósfera y que “rompen” el medio desnitrificante, evidenciando así la reducción del NO_3^- del medio y por tanto, su carácter desnitrificante.

Los cultivos se inocularon en medios desnitrificantes análogos cuya única diferencia era la fuente de carbono adicionada. Se preparó medio desnitrificante con sacarosa como fuente de carbono, condiciones óptimas para el crecimiento de desnitrificantes. También se preparó medio desnitrificante con etanol como fuente de carbono adicionada, y un tercer medio, donde las condiciones son mas adversas para el crecimiento, ya que no se adicionaba extracto de levadura (usando sacarosa como fuente de carbono). La composición del medio desnitrificante semisólido sin fuente de carbono fue la siguiente:

Compuesto	g/l
NaNO ₃	2,0
K ₂ HPO ₄	1,0
KCl	0,5
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,01
Extracto de levadura	1,0
Agar-Agar	6,0

La composición del medio desnitrificante semisólido con sacarosa como fuente de carbono fue igual que la anterior, salvo por la adición de sacarosa en una concentración de 30.0 g/l. En el medio con etanol como fuente de carbono, se añadió etanol absoluto (una vez esterilizado el medio y antes de su solidificación) en una concentración de 29.94 ml/l. Dicha concentración de carbono fue estequiométricamente igual a la del medio con sacarosa. El tercer medio desnitrificante semisólido empleado contenía sacarosa como fuente de carbono, en una concentración de 30.0 g/l, pero eliminando de la composición el extracto de levadura.

El medio se repartió en tubos de tapón de rosca, a razón de 5 ml/tubo. Se esterilizó en autoclave de vapor a 112°C durante 30 minutos. Una vez fuera del autoclave, se dejó enfriar.

Antes de la inoculación del microorganismo se procedió a regenerar el medio. Este procedimiento consistió en eliminar el aire que pudiera quedar dentro del medio, para evitar la presencia de oxígeno que podría dar lugar a un falso positivo. Para ello los tubos se hirvieron al baño maría en un vaso de precipitado, una vez que comenzaron a hervir, se introdujeron con la mayor rapidez posible en agua fría para que solidifique sin incorporar aire.

Una vez que los tubos solidificaron, el microorganismo se sembró en picadura desde un cultivo puro en placa con un hilo de platino estéril a la llama. Seguidamente se añadió una capa de parafina previamente esterilizada (calor seco en horno Pasteur a 110°C

durante 1 hora). Dicha parafina fue añadida para mantener la ausencia de aire en el interior del tubo durante el tiempo de incubación.

Los tubos se incubaron a $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Cada 24 horas se comprobó la rotura del medio manteniendo la incubación no más de 72 horas.

3.2.3 Estudio del crecimiento del microorganismo a diferentes temperaturas

Todos aquellos microorganismos que en la primera prueba realizada evidenciaron su capacidad desnitrificante fueron estudiados en cuanto a su capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas.

El microorganismo sembrado en placa de Petri en el medio sólido N-S-A antes descrito, fue resembrado en diferentes placas e incubado a diversas temperaturas con el fin de detectar el rango de temperatura en el cual el microorganismo crece más rápidamente.

Así, los microorganismos fueron incubados a 4, 10 y 15°C en un frigotermostato, y a 20, 30 y 37°C en estufa de cultivo, observando cada 24 horas la aparición de crecimiento de la bacteria en la placa. Este estudio fue repetido a todas las temperaturas para asegurar los resultados.

3.2.4 Cuantificación de la actividad desnitrificante

Cada una de las cepas que dieron positivo en la anterior prueba de producción de N_2 fueron consideradas desnitrificantes. El siguiente paso fue analizarlas en cuanto a su capacidad de eliminar nitrato de forma desasimilatoria, transformándolo en nitrógeno gas, empleando para ello el método de Yoshinari y Knowles (1976). Este método consiste en hacer crecer la bacteria en ausencia de oxígeno, pero en presencia de una atmósfera con un 10% de acetileno, que inhibe la actividad de la enzima óxido nitroso reductasa, evitando así la transformación de N_2O en N_2 .

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 por litro de agua destilada fue la que se muestra a continuación:

Compuesto	g/l
NaNO ₃	2,0
K ₂ HPO ₄	1,0
KCl	0,5
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,01
Extracto de levadura	1,0
Sacarosa	1,0

Básicamente se trató del mismo medio de cultivo, a excepción de la sacarosa, cuya concentración se reduce para evitar interferencias en el análisis cromatográfico por exceso de producción de CO₂.

Los viales de liofilización fueron previamente esterilizados mediante calor seco en Horno Pasteur quedando herméticamente cerrados al colocarles tapones de cierre previamente esterilizados mediante calor húmedo. El medio de cultivo fue introducido en el interior del vial a través de un sistema Swinnex (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 mediante una aguja de 12 cm que permitió introducir el gas directamente en el interior del medio de cultivo. Esta operación se realizó a través de un sistema Swinnex estéril. El escape del gas arrastrado se realizó a través de otra 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 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 24 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 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 la 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.

Se preparó un patrón pinchando 1 ml de N₂O purísimo en un tubo de 130 ml herméticamente cerrado al cual se le extrajo previamente 1 ml de aire contenido en el interior. Ya que, según Avogadro, 10⁹ nmoles de gas corresponden a un volumen de 22400 ml, dicho patrón presentaba una concentración de 343,407 nmoles/ml, del cual se pinchó en el cromatógrafo una muestra de 1 ml. La concentración se calculó mediante comparación de áreas, entre la obtenida al pinchar el patrón y la obtenida con las cepas desnitrificantes.

Para evitar valores erróneos 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 del mismo modo ya mencionado, realizando diluciones seriadas e inoculando el medio N-S-A. Una vez conocida la masa bacteriana total, se calculó la actividad desnitrificante en nmoles/10⁹ bacterias por hora.

Con la finalidad de asegurar que las cepas seleccionadas realizaran totalmente el proceso de desnitrificación (hasta el último producto nitrógeno gas), se procedió a inyectar

en el cromatógrafo muestras incubadas mediante el mismo proceso descrito antes pero sin la presencia de acetileno en el vial para no inhibir el último paso de la desnitrificación. De este modo, al no detectar óxido nitroso acumulado en el vial, se pudo concluir que todo el óxido nitroso producido había sido transformado a N₂, no detectándose éste en el cromatógrafo de gases.

3.2.5 Identificación taxonómica de las cepas bacterianas

Mediante la identificación taxonómica se pueden evitar posibles problemas epidemiológicos desencadenados por la aplicación de un microorganismo patógeno en este tipo de tratamientos. Por ello se procedió a realizar una caracterización de las cepas bacterianas seleccionadas mediante la identificación genética basada en la identidad de las secuencias del gen codificante del ARN ribosómico 16s (ARNr 16s).

3.2.5.1 Extracción de ADN de las células bacterianas

La amplificación del ADN se puede llevar a cabo a partir de ADN o de un lisado celular. En este caso, se realizó a través de un lisado, siguiendo los siguientes pasos:

- Se recogió una colonia de un cultivo fresco en placa con un palillo de dientes estéril y se resuspendieron en 20 µl de una solución de lisis (NaOH 0,05 M + Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) 0,25%) en un tubo eppendorf. Para que la resuspensión fuese buena, se aplicó agitación mediante vórtex.
- Se incubaron las células en un baño de agua a punto de ebullición durante 15 minutos.
- Se adicionaron 200 µl de agua bidestilada estéril (calidad MilliQ).
- Se centrifugaron a 13000 r.p.m. durante 5 minutos.
- Se tomaron de 4 a 8 µl de lisado para la amplificación.

3.2.5.2 Amplificación de fragmentos del gen codificante del ADNr 16S mediante PCR.

Para la amplificación de regiones hipervariables del ADNr 16S, se ha empleado la pareja de cebadores fD1, rD1, descritos previamente como adecuados para amplificación de casi la totalidad de la longitud este gen en la mayoría de las eubacterias (Weisburg *et al.*, 1990). Los oligonucleótidos se sintetizaron en el Servicio de Síntesis del Instituto de Parasitología López-Neyra (CSIC, Granada). La secuencia se presenta en la tabla 3.

Tabla 3.- Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR.

CEBADOR	SECUENCIA (DE 5' A 3')
FD1	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
RD1	CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC

Las muestras de ADN se sometieron a una reacción de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Se amplificó una región correspondiente a casi la totalidad del gen (aproximadamente 1.5-1.6Kb).

La figura 6 muestra la estructura actualizada del ADNr 16S de *Escherichia coli*. La escala de colores del 1 al 5 representa un grado creciente de variabilidad de la secuencia consenso para cada una de las bases, siendo las bases representadas en color púrpura posiciones universalmente conservadas, y las bases representadas en color gris las menos conservadas.

La reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50 μ l. Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos seguidos fueron descritos por Vinuesa *et al.* (1998). En cada mezcla de reacción se utilizaron los siguientes reactivos:

Reactivo	Volumen μ l
PCR Buffer Gold 10x (Applied Biosystems)	5,0
MgCl ₂ 25 mM (Applied Biosystems)	3,0
Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato	1,0

Cebador fD1 100 μ m	0,2
Cebador rD1 100 μ m	0,2
Ampli <i>Taq</i> Gold polimerasa (Applied Biosystems)	0,2
DMS grado biología molecular (Sigma)	2,5
Seroalbúmina bovina 10 mg/ml (N E Biolabs)	1,0
Lisado celular	4 a 8
Agua bidestilada estéril grado PCR	completar hasta 50

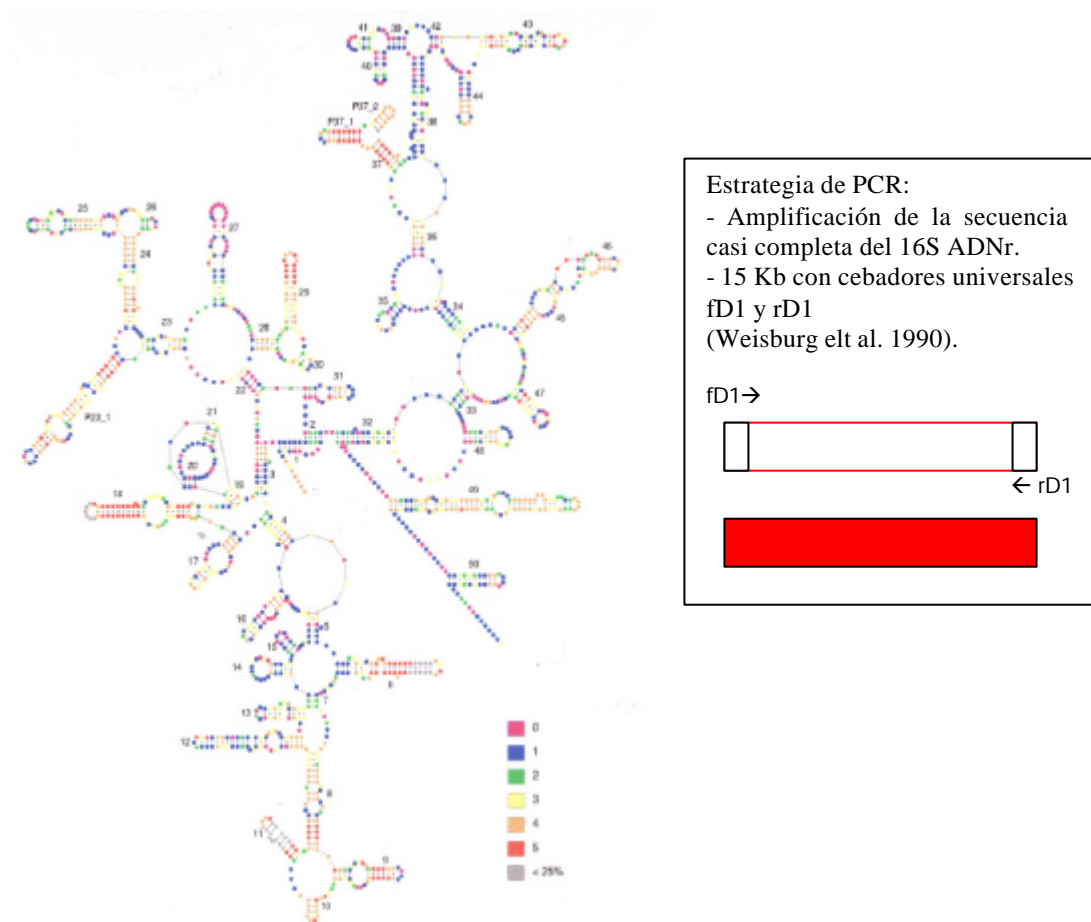


Figura 6.- Estructura secundaria del ADNr 16S de *Escherichia coli* (Van der Peer *et al.*, 1996)

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 minutos 30 segundos.
2. 25 ciclos que constan de:

- Desnaturalización: 94°C durante 1 minuto 10 segundos.
- Hibridación de los cebadores sobre el ADN molde desnaturalizado “Annealing”: 56°C durante 40 segundos.
- Extensión: 72°C durante 2 minutos.
- Extensión final: 72°C durante 6 minutos 10 segundos.
- Mantenimiento a 4°C.

Tras la reacción se tomaron alícuotas de 2 μ l que se examinaron en gel de agarosa al 0.8% para comprobar la existencia de bandas amplificadas del tamaño esperado.

3.2.5.3 Separación del ADN de las muestras mediante electroforesis

Para la electroforesis se empleó buffer TAE 1X (0,04M de Tris-Acetato y 1mM de EDTA). La separación de los distintos fragmentos se realizó mediante gel de agarosa al 0,8% preparado en 50 ml de buffer TAE. El gel de agarosa contiene una serie de pocillos donde se introducen las muestras junto con el colorante. A los 50 μ l de muestra procedente de la PCR le añadimos 5 μ l de colorante, el volumen final se repartió en dos pocillos. El colorante contiene la siguiente composición: TAE (5x), 0,1% Triton-X100, 0,01% Azul de Bromofenol, 0,01% Xilencianol y EDTA 2mM.

Las condiciones de la electroforesis fueron en voltaje constante de 80 V y durante 25 minutos.

Tras la electroforesis, los geles se sumergieron en una solución de bromuro de etidio para teñir el ADN. Transcurridos 15 minutos, se visualizaron los perfiles de bandas con luz ultravioleta empleando el sistema de documentación de geles GelDoc-2000 (BioRad®).

Las bandas individuales visualizadas se escindieron de los geles en su parte central con una espátula estéril, y el fragmento así extraído se introdujo en tubos para PCR.

3.2.5.4 Extracción del ADN del gel de agarosa

La extracción del ADN se realizó mediante el kit de extracción Quiaex II (QUIAGEN®).

El procedimiento a seguir fue el siguiente:

- Se pesaron las muestras (que contienen ADN y gel).
- Se añadieron 3 volúmenes de QX1 (Yoduro sódico 6M, capaz de disolver la agarosa).
- Se añadieron dos volúmenes de agua.
- Se agitó en vórtex 30 segundos.
- Se añadieron 10 µl de QUIAEX II. Se mezclaron y se vortearon. Previamente el Quiaex también debe ser vorteadado.
- Se incubaron a 50 °C durante 10 minutos.
- Se centrifugaron 30 segundos.
- Se retiró el sobrenadante con una pipeta estéril.
- Se lavó con 500 µl de buffer QX1 para eliminar los contaminantes residuales de agarosa. Se vortearon y centrifugaron 30 segundos, eliminando el sobrenadante con una pipeta.
- Se lavó 2 veces con 500 µl con buffer PE para eliminar las sales residuales. Se vorteoó y centrifugó 30 segundos, eliminando de nuevo el sobrenadante con una pipeta.
- Se dejó secar el pellet durante 10 o 15 minutos hasta que presentó un color blanco.
- Se eluyó el ADN con HCl (pH 8,5) o con 20 µl de agua. Se agitó con la ayuda de un vortex.

Por último se hizo una comprobación de las bandas realizando de nuevo una electroforesis. Antes de proceder a la secuenciación, es necesario realizar una serie de reacciones de secuenciación. Para ello se utilizan tres oligos: fD1, fD2 y rD2. En tres tubos

pendorf (para cada uno de los oligos) se prepara una solución con 1,0 µl de ADN, 0,62 µl del oligo y 6,38 µl de agua para PCR.

Una vez comprobadas, la secuencia parcial del ADN amplificado fue llevada a cabo por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología López Neyra (CSIC, Granada). Esta secuenciación automática se realizó en un secuenciador “Applied Biosystems ABI 373” (PERKIN-ELMER®), utilizando el kit comercial “ABI PRISM Big Dye terminador Cycle Sequencing Ready Reaction” (PERKIN-ELMER®). Se utilizaron 10 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 se procesaron con el software Chromas v. 10.1 UNIX (Genetics Computing Group, Madison, Wisconsin, USA), suministrados vía Internet por el Centro Informático Científico de Andalucía (CICA), con objeto de cribar los errores de secuenciación. Las secuencias se enviaron para su comparación a las existentes en los bancos de datos empleando el software de biocomputación WU-BLAST-n v.20 (Altschul *et al.*, 1997) a través del servidor de Internet del EBI (European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk>).

3.2.6 Conservación de los inoculantes seleccionados e identificados

Las cepas desnitrificantes seleccionadas 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 de tripticasa-soja-agar (T.S.A. de Difco®), preparado en tubos 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 112°C durante 30 minutos. El tubo se dejó inclinado para la solidificación de esta a modo de pico de flauta. Sobre este medio de cultivo se

sembraron las cepas a conservar realizándose el crecimiento durante 24 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 3 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 ayudándose de una pipeta estéril. Una vez realizada la suspensión se repartió en viales de liofilización estériles a razón de 2 ml/vial, cerrándolos con tapón de goma estéril.

Los viales así obtenidos se congelaron a -80°C liofilizándolos posteriormente en un liofilizador LABCOMCO® mediante la aplicación de vacío ($37 \cdot 10^{-3}$ mb) a -43°C durante 24 horas. Tras cerrar los viales en el interior del liofilizador, éstos se aseguraron con arandela metálica y se guardaron a 4°C en la oscuridad. Estos liófilos pueden permanecer viables durante algo más de 2 años.

El método de recuperación del microorganismo fue el descrito en el punto 1.2.1.

3.3 DESCRIPCIÓN DEL FILTRO SUMERGIDO A ESCALA DE LABORATORIO

3.3.1 Diseño del filtro sumergido y ubicación del mismo

Con objeto de determinar la influencia de la temperatura en la eliminación de nitrato de aguas subterráneas mediante filtros sumergidos, se diseñó una planta a escala de laboratorio, la cual se colocó en un frigotermostato que permitía ensayar a distintas temperaturas constantes independientemente de las fluctuaciones de la temperatura ambiental.

El uso de plantas a escala de laboratorio facilita en gran medida la investigación, ya que 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 diferentes inoculantes a diferentes temperaturas.
- Se puede llevar un mejor control del cultivo puro a nivel microbiológico y técnico.
- Los datos que se obtienen a nivel del comportamiento microbiológico del sistema son más fiables.

Se trata de una planta sin ningún tipo de automatismo y gran simplicidad de funcionamiento. Su esquema se encuentra representado en la figura 8. El sistema consiste en un cilindro de 6 cm. de diámetro preparado a partir de un probeta de laboratorio de 1 litro de capacidad. Ésta se encuentra rellena de un material de tipo cerámico procedente de residuos de la construcción hasta una altura de 20 cm., el cual actúa de soporte para la formación de la biopelícula. La granulometría de dicho material soporte es de 4-5 mm y de densidad relativa real de 1.95 g/cm^3 , con una superficie específica de $620 \text{ m}^2/\text{m}^3$ (Figura 7).



Figura 7 Aspecto del material soporte usado en el filtro sumergido.

A lo largo de la columna hay 6 puntos de entrada/salida, para estudiar las distintas posibilidades de entrada de agua y fuente de carbono y salida de agua tratada.

Como se puede ver en la figura 8, las partes fundamentales de la planta a escala de laboratorio fueron:

- Alimentación superior del agua a tratar: el influente se dispuso en un depósito de 25 litros, rellenado manualmente de forma diaria con agua procedente del acuífero de la Vega de Granada.
- Alimentación superior de la fuente de carbono: ésta se introduce por otro de los puntos de entrada distinto de la entrada de agua contaminada. La relación C/N necesaria para eliminar completamente los 100 mg/l de nitrato que aproximadamente tiene el agua de entrada varía según la fuente de carbono. Siguiendo las indicaciones de Gómez *et al.* (2000b), la fuente de carbono dosificada fue etanol, precisándose una relación C/N de 1,08. Para evitar que la fuente de carbono fuera un factor limitante en estos experimentos, se adicionó en exceso, en una relación C/N de 5.78.
- Bomba peristáltica, tanto para la entrada de agua como de fuente de carbono, regulando los caudales de ambas entradas mediante el empleo de tubos de diferente grosor, así como la regulación de la propia bomba.
- Salida del agua tratada, que se realizaba por la parte inferior de la planta, poniendo el tubo de salida en forma de sifón para lograr que el filtro permaneciera sumergido en todo momento.

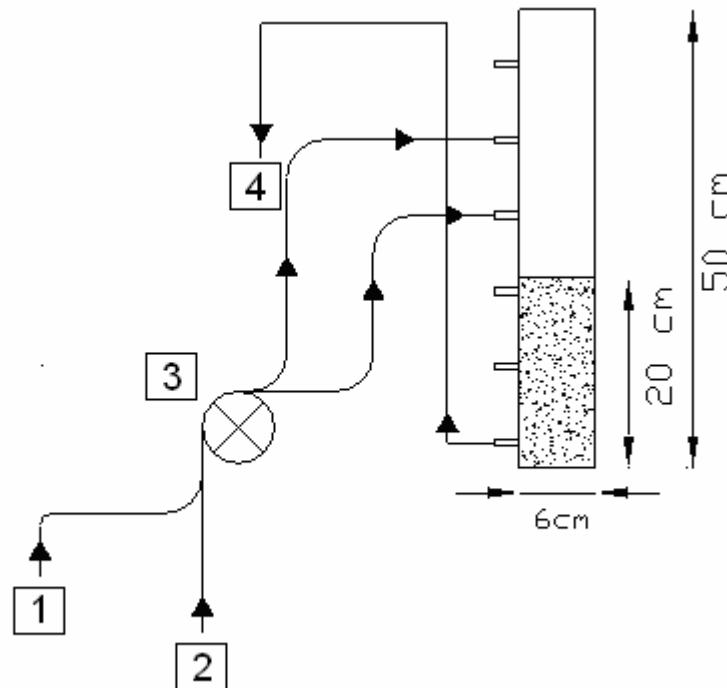


Fig. 8. Esquema de funcionamiento de la planta escala laboratorio. (1) Alimentación del agua subterránea, (2) Alimentación de la fuente de carbono, (3) Bomba peristáltica de 4 vías y (4) salida del agua tratada.

El resto de entradas y salidas se cerraron a través de llaves. Para evitar la proliferación de algas en el interior de la columna, se cubrió con papel de aluminio, el cual impedía la incidencia de luz solar en el interior. La columna así preparada se esterilizó en autoclave de vapor a 112°C durante 30 minutos. Con esto se aseguró 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.

3.3.2 Características del agua a tratar

El agua subterránea empleada provenía de un pozo situado en la Estación Depuradora Puente de Los Vados propiedad de la empresa Municipal de Aguas y Saneamiento de Granada (EMASAGRA, S.A). Las características analíticas del agua de pozo contaminada fueron: NO_3^- : 80-100 mg/l, NO_2^- : 0,0-0,01 mg/l, PO_4^{3-} : 0,4-0,8 mg/l; SO_4^{2-} : 180-210 mg/l; O_2 : 2,0-4,5 mg/l y pH 7,0-7,5. El oxígeno disuelto se eliminó, ya que su presencia afecta al rendimiento de la desnitrificación (Gómez, *et al.*, 2002). Dicha

eliminación se realizó mediante la adición de una cantidad estequiométrica de sulfito sódico hasta que la concentración de oxígeno del agua del depósito de entrada se iguala a 0,0 mg/l.

3.3.3 Lavado del sistema

Dadas las pequeñas dimensiones de la planta y de los tubos de entrada-salida, el caudal de agua que se va filtrando puede ir disminuyendo según se va colmatando el filtro y/o los tubos por la formación de la biopelícula, produciéndose una elevación de la lámina de agua sobre el filtro (pérdida de carga). De darse dicho efecto en un filtro sumergido, provocaría la necesidad de lavado del sistema. Sin embargo, el filtro sumergido usado en esta investigación es un sistema pequeño muy simplificado, que trata caudales con baja carga. Es por ello que el atasco en este sistema no fue muy frecuente, unido al hecho de que los ensayos no se mantuvieron durante mucho tiempo. Así, no se dispuso mecanismo de lavado, siendo éste necesario en contadas ocasiones durante el experimento, y siempre al finalizar cada ensayo y previamente al inicio del siguiente. Los lavados se realizaron de manera manual, agitando el relleno en un recipiente con solución salina durante 2 minutos, retornándolo a la columna una vez se ha desprendido el exceso de biomasa sobre el relleno.

3.4 INOCULACIÓN DEL SISTEMA PARA LA FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA

Para el correcto funcionamiento de un filtro sumergido se precisa la formación previa de una biopelícula, responsable del proceso descontaminador. En sistemas destinados al tratamiento de aguas subterráneas contaminadas con nitrato, es necesario formar esta biopelícula previa al tratamiento del agua, empleando como inoculante diferentes medios ricos en microorganismos como el fango activo (Gómez *et al.*, 2003). Es posible también acometer esta inoculación mediante cultivos puros (Moreno *et al.*, 2005b) tratándose de una **inoculación selectiva**.

Esta fase de inoculación es precisa dada la baja presencia de microorganismos en el agua subterránea (10^2 - 10^3 células/ml) aunque por el contenido en NO_3^- en éstos aparecen microorganismos desnitrificantes los cuales pueden ir a formar parte de la biopelícula.

Teniendo esto en cuenta se planteó estudiar la influencia de la temperatura en sistemas de filtros sumergidos cuya biopelícula se generó de tres formas distintas:

- A partir de la microbiota presente en el agua subterránea
- A partir de la microbiota presente en fangos activos
- Mediante inoculación selectiva

3.4.1 Formación de la biopelícula a partir de la microbiota natural del agua subterránea

Para la generación de una biopelícula activa sobre el material soporte del filtro a partir de la microbiota autóctona del agua subterránea se conectó el sistema estéril con el depósito continente del agua contaminada mediante tubos, tal y como se indica en la figura 8, comenzando de manera inmediata el control de los parámetros del influente y el efluente. El desarrollo de dichos experimentos fue análogo al de aquellos en los que se inoculó previamente la columna, salvo por el mencionado proceso de inoculación.

3.4.2 Inoculación con fango activo procedente del reactor biológico de la Estación Depuradora “Los Vados” (Granada)

Para este tipo de inoculación se tomaron 1.5 litros de fango activo del reactor biológico de la Estación Depuradora, conectando el recipiente contenedor del mismo con el filtro sumergido, mediante una bomba peristáltica que introduce el inoculante en la columna recirculándose de nuevo al contenedor inicial. Se usó en el recipiente del inoculante un tapón con 3 vías, uno para la alimentación, otro para el retorno y otro para la entrada de aire. El dispositivo así montado (Figuras 9 y 10) se mantuvo en recirculación

durante 48 horas, dejando tiempo suficiente para que los microorganismos presentes en el fango activo se adhiriesen al relleno de la columna, formando la biopelícula.

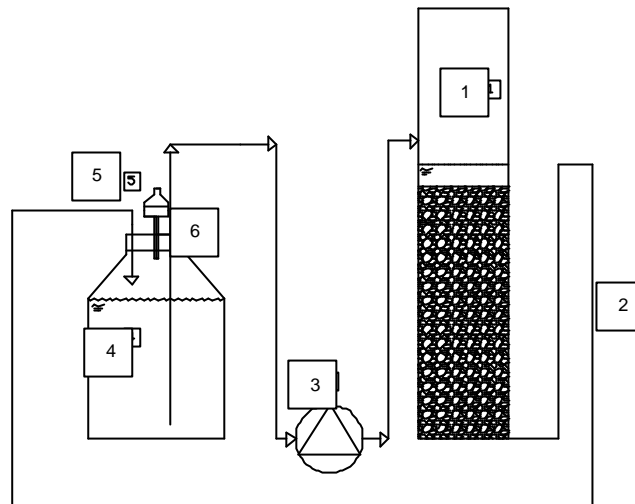


Fig. 9. Inoculación de la planta escala laboratorio. (1) Columna rellena del material soporte, (2) Sistema de vasos comunicantes, (3) Bomba peristáltica de 4 vías y (4) recipiente contenedor del inoculante, (5) sistema Swinnex (Millipore[®]) estéril y (6) tapón de 3 vías.

3.4.3 Inoculación con microorganismos previamente seleccionados

Para la inoculación selectiva se emplearon cultivos bacterianos de alta densidad, seleccionados en una fase previa de la investigación. El proceso de inoculación se realizó de forma similar al empleado para el fango activo.



Fig. 10.- Filtro sumergido a escala de laboratorio durante la inoculación

Para la inoculación del sistema con cada una de las cepas bacterianas empleadas en la investigación y para cada temperatura ensayada, se seleccionó un medio de cultivo que permitiera su crecimiento sin la presencia de factores limitantes. La composición del medio por litro de agua destilada fue la descrita a continuación:

Compuesto	g/l
NaNO ₃	2,0
K ₂ HPO ₄	1,0
KCl	0,5
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,01
Extracto de levadura	1,0
Etanol	15 ml

Una vez añadidos todos los componentes, salvo el etanol, se procedió a la esterilización del mismo, ajustando el pH final del medio a 7,2, mediante adición de HCl al 10%. Tras la esterilización se añadió el etanol con el uso de una pipeta estéril.

La inoculación se realizó mediante el procedimiento de cultivo en el medio. A partir de un cultivo puro de cada cepa crecido en una placa Petri con medio N-S-A se tomó una muestra con asa estéril, sembrándola en un matraz erlenmeyer de 250 ml, con 100 ml de medio de cultivo con la misma composición por litro. Dicho matraz se incubó en agitación en un orbital durante 24 horas, tras las cuales se tomó 1 ml del matraz y se inoculó en 1.5 l de medio, utilizados para la inoculación de la columna con el relleno. Todo ello se realizó bajo atmósfera estéril en campana de flujo laminar y en presencia de llama.

Los microorganismos desnitrificantes empleados mostraron un mejor crecimiento en presencia de oxígeno, razón por la cual los crecimientos previos a la inoculación de la columna se realizaron en sistema aireado.

A lo largo de las 48 horas en las que se mantuvo en recirculación el cultivo, se realizó un seguimiento del recirculado para conocer la población bacteriana que se mantenía y la posible presencia de contaminación del proceso. Ese seguimiento se realizó a las 4, 8, 12, 24, 28, 32, 36 y 48 horas.

En cada uno de esos intervalos de tiempo se tomaron muestras del medio a las que se les hizo un recuento de microorganismos con objeto de obtener una curva de crecimiento del microorganismo en el medio. Se empleó con este fin el medio N-S-A modificado, incubando las placas durante 48 h a $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

El medio de cultivo fue inoculado con 0.1 ml de diferentes diluciones seriadas de la muestra, las cuales se realizaron en tubos de solución salina (0.9% en NaCl) con un contenido de 9ml/tubo sobre los cuales se añadía 1 ml de la suspensión diluida inmediatamente más concentrada. El inóculo fue distribuido de forma homogénea por toda la superficie de la placa empleando una espátula de vidrio en condiciones de esterilidad.

3.5 ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE SUPERFICIE

Mediante estos ensayos, que permiten visualizar la biopelícula una vez fijada, se pueden obtener datos sobre la formación 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).

El objetivo de esta técnica es realizar un recuento de las bacterias presentes en la superficie del material soporte usando fotografías digitalizadas, con el fin de obtener el número total de bacterias por unidad de superficie de relleno, que permite comparar crecimientos bacterianos en la fase de formación de la biopelícula en función de la temperatura ensayada y la cepa utilizada, así como la observación de la morfología de las diferentes biopelículas formadas.

El material de relleno (1g) inmediatamente tras su extracción de la columna fue colocado en un vial de liofilización completamente estéril y sumergido en una solución de fijación con glutaraldeído al 3%, que permitió fijar por completo la biopelícula al material soporte manteniendo ésta la misma estructura. Estos viales tapados se guardaron hasta su análisis en lugar fresco y seco 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 portaobjetos del microscopio.

El equipo utilizado fue un microscopio de barrido de alta resolución por emisión de campo Leo 1530-GEMINI®. Mediante observaciones de diferentes esquistos arcillosos se apreció el grado de formación de la biopelícula, así como la estructura de ésta. Para cada ensayo realizado se tomaron un número aproximado de 45 fotografías representativas del estado y forma de la biopelícula. Estas fotografías fueron digitalizadas en negativo empleándose de esta forma en la investigación.

La técnica utilizada para el recuento de bacterias fue descrita por Sich y Van Rijn (1997). Como la biopelícula se fijó una vez terminado el proceso de inoculación (a las 48 horas de su comienzo), las bacterias son contadas fácilmente, sin formar acumulaciones densas que impiden su diferenciación.

3.6 CARACTERIZACIÓN DE INFLUENTES Y EFLUENTES

Tras comprobar que el proceso de inoculación se realizó correctamente se pasó a conectar el agua de pozo contaminada con nitrato al sistema según el esquema comentado. El sistema en funcionamiento se ilustra en la figura 11. La toma de muestras de agua tanto de entrada como de salida se realizó dos veces al día. A dichas muestras se les realizaron las pruebas analíticas correspondientes descritas en los siguientes apartados.

3.6.1 Determinación del pH

La concentración de ión hidrógeno es un parámetro importante de calidad, tanto en aguas naturales como en residuales. El intervalo de concentración idóneo para la existencia de la mayoría de la actividad biológica es muy estrecho y crítico. Su control se hace ineludible para garantizar los procesos biológicos. En el caso de los procesos de desnitrificación, se ha demostrado que valores de pH por debajo de 7 afectan al rendimiento de la desnitrificación, pudiendo llegar incluso a una inhibición del proceso (Glass and Silverstein, 1998). El pH óptimo de la mayoría de capas desnitrificantes de la naturaleza se encuentra entre 7 y 8. Además, el proceso de desnitrificación tiende a alcalinizar el pH del agua. Por ello, un control de dicho parámetro puede suponer una manera indirecta de controlar dicho proceso de desnitrificación.



Fig. 11.- Filtro sumergido una vez conectado con el agua subterránea contaminada

El pH de los sistemas acuosos se puede medir convenientemente con un pHmetro, en el presente trabajo el equipo empleado fue de la casa comercial Crisol modelo GLP91. El calibrado del equipo se realizó diariamente de acuerdo a las instrucciones del pHmetro con las soluciones tampón de pH 4,0, pH 7,02 y pH 9,0. El electrodo se aclaró entre ambas medidas con agua destilada.

Alícuotas de la muestra se tomaron en vasos de precipitado donde se introdujo el electrodo, manteniéndolas en agitación suave para asegurar su homogeneidad, pero al mismo tiempo reducir al mínimo el arrastre de dióxido de carbono. Se esperó hasta una lectura estable y se anotó el resultado.

3.6.2 Determinación de nitrato y nitrito

El método usado para la determinación de los iones nitrato y nitrito se basó en el uso de la cromatografía iónica, empleando para ello un cromatógrafo de la casa METROHM®.

La cromatografía iónica se basa en un proceso de separación fisicoquímica en la que los componentes a separar se distribuyen entre una fase estacionaria y una fase móvil.

Para la separación de los aniones se empleó la columna cromatográfica “Metrosep A Supp 5-250” (Methrohm®), de dimensiones 4,0 x 250 mm, cuyo material estaba compuesto por polivinil alcohol con grupos amonio cuaternarios en su superficie. El flujo estandar a través de la columna fue de 0,7 ml/min.

Como fase móvil se empleó una solución de carbonato-bicarbonato en agua bidestilada, con la siguiente concentración:

Carbonato sódico	3.2 mM
Bicarbonato sódico	1 mM

En dicho cromatógrafo se utilizó supresión química, cuya función principal es la de mejorar la detección de los aniones. Existen dos efectos en las reacciones de supresión química:

- Reducción de la alta conductividad del eluyente lo máximo posible
- Conversión de los aniones del analito en especies con conductividad considerablemente mayor

La sensibilidad de detección de aniones del aparato al utilizar supresión química es 10 veces mayor que si no se utiliza supresor químico. El cromatógrafo utilizado en esta investigación se compuso de 3 unidades de supresión que se aplicaron en turnos para la supresión, y que se regeneraron con ácido sulfúrico (50 mM) y se lavaron con agua. Para proteger el módulo de supresión química contra partículas extrañas o el crecimiento bacteriano se instalaron unidades de filtración PEEK (Metrohm®) entre la bomba presistáltica y los capilares de entrada al supresor.

El aparato constó de precolumnas de fácil intercambio situadas previamente a la inyección a la columna, para conservar estas últimas e incrementar su vida útil. Asimismo, las muestras fueron ultrafiltradas previa su inyección en la columna, utilizando una membrana de ultrafiltración en línea. Se utilizó un muestreador automático para la inyección de las muestras, realizando el aparato las diluciones necesarias en caso de que la concentración de los iones excediera el rango de calibración del mismo.

Tabla 4. Concentraciones de los patrones utilizados en la calibración del cromatógrafo iónico

Anión	Concentración (mg/l)		
	Patrón 1	Patrón 2	Patrón 3
Fluoruro	10	1	0,1
Cloruro	100	10	1
Nitrito	10	1	0,1
Bromuro	10	1	0,1
Nitrato	200	20	2
Fosfato	100	10	1
sulfato	100	10	1

El equipo se calibró para la medición de los aniones fluoruro, cloruro, nitrito, bromuro, nitrato, fosfato, sulfato, utilizando patrones de calibración con las concentraciones expresadas en la tabla 4.

Dicha calibración es almacenada en el software del cromatógrafo, manteniéndose durante un considerable periodo de tiempo. De igual modo, se inyectaron patrones de concentración conocida con una frecuencia semanal para comprobar la validez de la calibración anterior. El resultado obtenido al inyectar la muestra en el cromatógrafo se presentó como indica la figura 12, detectando automáticamente el aparato la concentración de los distintos iones en mg/l.

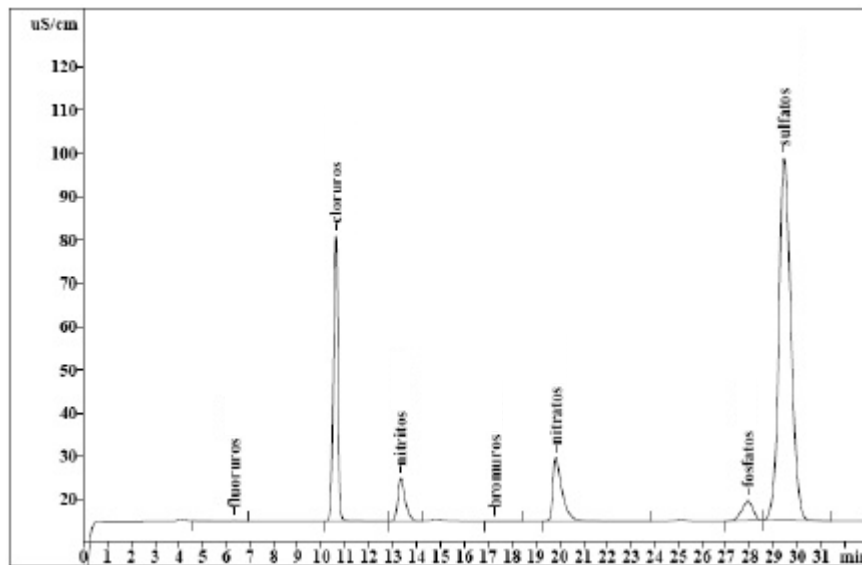


Fig 12. Cromatograma obtenido en el cromatógrafo iónico usado en el experimento

3.6.3 Determinación de la turbidez

La turbidez en el 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 el tipo de muestras analizadas en los ensayos, la turbidez fue consecuencia del desprendimiento de bacterias y restos orgánicos procedentes de la biopelícula.

El método empleado fue el espectrofotométrico, consistente 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 la turbidez o Unidades Nefelométricas de Turbidez (UNT) empleando la formacina como sustancia que da lugar a una suspensión de referencia estándar (APHA, 1992).

La suspensión de formacina se preparó cada 15 días, 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.
- 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 $r = 0.999$ se rechazaron.

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 podrían alterar la medida.

Para la determinación de la turbidez se empleó un espectrofotómetro HITACHI®. El blanco se preparó con agua bidestilada.

3.6.4 Determinación de microorganismos aerobios totales

De los sistemas de biopelícula pueden desprenderse microorganismos que aparecerán en el agua tratada, empeorando de este modo sus características. 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 biopelícula.

Para su determinación se realizó un recuento en placa, a partir del propio agua de entrada y del agua tratada, empleando como medio de cultivo el Nitrato-Sacarosa-Agar descrito anteriormente. 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, ayudándose siempre de una espátula de vidrio, 0.1 ml de la muestra de entrada o salida o de la dilución realizada (10^{-1} - 10^{-6}). 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 300 ufc.

3.7 CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA

Para la determinación del tamaño de la biopelícula que se realizó en determinados ciclos se utilizó el análisis del peso seco previa sonicación (Lazarova *et al.*, 1994). Para dicha determinación se extrajo la biopelícula formada sobre el material de relleno.

Para dicha extracción se prepararon matraces erlenmeyer de 250 ml con 10 ml de solución salina estéril (0.9 % en NaCl) adicionada de tween 80 en un 1%, por triplicado. Con este medio se facilitaba la separación de la biopelícula del material soporte. A estos erlenmeyer se le adicionaron 1 gr de material de relleno del filtro.

El matraz se sometió a agitación en orbital a 125 rpm durante 30 minutos. Tras la separación de la biopelícula, se tomó 1 ml del volumen total del matraz y se determinó la cantidad de microorganismos presentes en el mismo mediante diluciones seriadas en solución salina al 0.9% de NaCl y la posterior siembra de 0.1 ml de cada dilución sobre la superficie de la placa de Petri empleando el medio de cultivo N-S-A ya descrito. Se obtuvo así un recuento del número de microorganismos cultivables presente en la biopelícula de un gramo de relleno del filtro sumergido.

Una vez realizado esto, se retiró el material de relleno del matraz, aclarándolo con agua bidestilada. El volumen de agua que contenía la biopelícula se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio (Schleicher & Schuell®) con un tamaño de poro de 0.45 μm , previamente tarado. Dicha filtración se realizó usando un sistema de vacío Millipore®).

Los filtros se secaron en una estufa de desecación a 105°C, se enfriaron en un desecador y se pesaron. La diferencia entre el peso del filtro con la biopelícula y su tara se correspondía con la cantidad de biopelícula formada sobre un gramo de relleno.

3.8 ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS PRESENTES EN LAS BIOPELÍCULAS

Al finalizar los experimentos en los que la biopelícula se formó a partir de la microbiota natural del agua subterránea se realizaron estudios de biodiversidad, para conocer las comunidades bacterianas presentes en esta biopelícula. Con el objeto de comparar esta biodiversidad con aquella en una biopelícula en la que se hubiera realizado una inoculación selectiva previa, se realizaron nuevos experimentos en los que se utilizó *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 como inoculante selectivo. Dichos experimentos se desarrollaron a 10 y a 30°C, tomando, con una frecuencia semanal en un principio, y al modificar las condiciones de carga hidráulica más adelante, muestras de biodiversidad

bacteriana de la biopelícula. Para estas determinaciones se empleó la técnica de electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE). Los pasos seguidos fueron los siguientes:

- Extracción del ADN bacteriano total de las biopelículas.
- Amplificación de fragmentos del gen codificante del ARN ribosómico 16S (ADNr 16S), mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Separación de los fragmentos de distinta secuencia de ADN mediante TGGE.
- Identificación de los fragmentos de ADN mediante secuenciación.

3.8.1 Extracción del ADN bacteriano de las biopelículas

El protocolo empleado para la extracción de ADN de biopelículas sobre esquistos arcillosos es una modificación del descrito por Watanabe *et al.*, (1998), adaptado al tipo de muestras del presente trabajo.

Se partió de una cantidad aproximada de 10 gramos de soporte con biopelícula adherida, del cual se extrajo esta última mediante una serie de acciones:

1. Suspensión del material en 50 ml de solución salina estéril
2. Sonicación durante 1 minuto.
3. Agitación en orbital a 125 rpm durante 1 hora
4. Recuperación del relleno y repetición de los pasos primero a tercero.

Se reúnen las dos fracciones de la extracción, obteniéndose al final la biopelícula recuperada en 100 ml de solución salina. A partir de esta suspensión, se siguieron los siguientes pasos:

1. Se dejó decantar la arcilla de tamaño mas grueso, después se tomó los 100ml de solución salina con la biopelícula recuperada y se centrifugaron (50ml por tubo) a 3500 rpm 30min, obteniéndose un sedimento que se utilizó como material de partida para la extracción de ADN.
2. El sedimento obtenido en cada uno de los tubos se resuspendió en 1ml de buffer de suspensión de células (Solución I) y se incubó a 37°C durante 10min.

La solución I se preparó llevando a un volumen final de 50 ml una mezcla de: 0.5 ml de Tris HCl pH 8 10 mM, 10 ml de EDTA 0.5 M y 5.96 g de sacarosa 0.35 M. Una vez preparada la solución I, se filtra y se le añade extemporáneamente lisozima en concentración de 20 mg/ml.

3. A cada tubo se le añadió 3 ml de suspensión de lisis (Solución II) incubándose a 37°C durante 60 min.

La solución II se preparó llevando a un volumen de 50 ml una mezcla de: 5 ml de Tris HCl pH 8 1 M, 10 ml de EDTA pH 8 0.5 M, 0.87 g de NaCl y 1 g de SDS (o 1 ml de SDS al 10%). Extemporáneamente se añaden por cada 10 ml de solución II, 20 µl de β-mercaptoetanol al 2% y 10 µl de proteinasa K (solución en *stock* de 20 mg/ml mantenida a -20°C).

4. Las muestras se sometieron a dos extracciones consecutivas con un volumen de fenol:cloroformo, tomado siempre la fase acuosa (superior) y desechándose la interfase y la fase fenólica (gran parte de la arcilla quedó retenida en la interfase)

El fenol:cloroformo se prepara saturando previamente fenol con *buffer* TE (Sigma[®]) y mezclándose en proporción 1:1 con cloroformo. La disolución resultante se mantiene a 4°C.

El *buffer* TE estéril se prepara con 1 ml de disolución 1 M de Tris HCl a pH 8 y 200 µl de disolución de EDTA 0.5 M pH 8, enrasándose a 100 ml, con lo que

las concentraciones de Tris HCl y EDTA finales son 10 mM y 1 mM respectivamente.

5. Al sobrenadante recuperado se le añadió ARNasa hasta una concentración final de 125 µg/ml, incubándose a 37°C durante 10 min, extrayéndose a continuación con un volumen de cloroformo.

La ARNasa libre de ADNasa se prepara disolviendo la ARNasa comercial en Tris HCl pH 7.5 y NaCl 15 mM, calentándose 15 min a 100°C. Por último se alicuotó y se conservó a -20°C.

6. El extracto acuoso se dividió en fracciones de 800 µl como máximo y se dispuso en tubos eppendorf, añadiéndosele a cada uno igual volumen de isopropanol para precipitar el ADN. Por último se deja reposar a -20°C durante 30 min.
7. Las fracciones se sometieron a centrifugación a 13000 g durante 20 min y el sedimento obtenido se lavó (sin resuspender) añadiendo 500 µl de etanol al 70 % y centrifugando 2 min. Posteriormente, mediante succión a vacío se extrajo la mayor parte de etanol y se dejó secar completamente.
8. Al sedimento de cada tubo se le añadió 50 µl de *buffer* TE estéril, dejándose toda la noche a 4°C para que se redisolvió el ADN.
9. Se comprobó en gel de agarosa al 0.8 % disuelta en *buffer* TAE, empleando el marcador escalera de 1 Kb (Gibco®), realizándose la electroforesis a 80 V. Transcurrido el tiempo se reveló con bromuro de etidio (20 µl en 100 ml del *buffer* empleado para la preparación del gel) enjuagándose el gel en agua y fotografiándolo en un sistema de documentación de geles Gel Doc 2000 (Bisrad®).

3.8.2 Amplificación de fragmentos del gen codificante del ARNr 16S.

Las muestras de ADN se sometieron a una reacción de PCR anidada, donde se realizaron dos reacciones consecutivas de amplificación, en la primera se amplificó una región correspondiente a casi la totalidad del gen (aproximadamente 1.5-1.6Kb) y en la segunda una región interna de menor tamaño (aproximadamente 0.2Kb), correspondiente a la región hipervariable V3 (nucleótidos 341 al 534, numeración de *Escherichia coli*, Muyzer *et al.*, 1993). Se empleó la estrategia de PCR anidada con la finalidad de obtener un mayor rendimiento en la amplificación, que permite obtener patrones de bandas más completos.

Para la primera PCR se emplearon los cebadores universales fD1 y rD1 (Weisburg *et al.*, 1990), para la segunda PCR se emplearon los cebadores universales GC-P1 y P2 (Muyzer *et al.*, 1993). La secuencia del cebador GC-P1 está basada en una región conservada del gen a la que se añade una cola de 40 pares de bases ricas en Guanina-Citosina necesarias para la separación correcta mediante TGGE (Muyzer y col 1993). La Fig. 13 muestra un esquema del procedimiento completo seguido. La secuencia de todos los cebadores empleados se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR anidada

CEBADOR	SECUENCIA (DE 5' A 3')
FD1	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
RD1	CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC
GC-P1 ^A	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG
P2	ATT ACC CGC CGT GCTGG

A- En negrita se indica la cola rica en GC

La primera reacción de PCR es idéntica a la reacción de PCR descrita en el apartado 2.2.7.2, para la identificación de las bacterias desnitrificantes seleccionadas, con el uso de los mismo cebadores y reactivos, utilizando en este caso el ADN molde extraído en el apartado anterior, en una cantidad de 1µl.

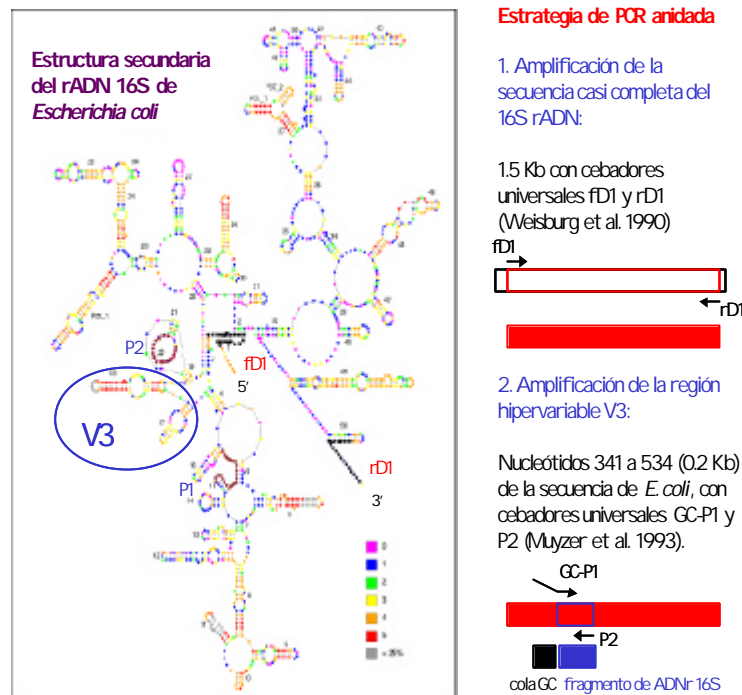


Fig 13. Esquema de la reacción de PCR anidada, donde se realizaron dos reacciones consecutivas de amplificación, en la primera se amplificó una región correspondiente a casi la totalidad del gen y en la segunda una región interna de menor tamaño.

Tras la reacción se tomaron alícuotas de 5 µl que se comprobaron en gel de agarosa al 0.8%, para comprobar la existencia de bandas amplificadas del tamaño esperado (1.5-1.6 Kb). Una vez comprobadas, las muestras fueron sometidas a una segunda PCR con el objetivo de amplificar la región hipervariable V3. La segunda reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50 µl. Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos seguidos fueron una modificación de la técnica *touch down* descrita por Watanabe *et al.* (1998). En cada mezcla de reacción se utilizaron los reactivos siguientes:

Reactivo	Volumen µl
PCR Buffer Gold 10x (Applied Biosystems)	5,0
MgCl ₂ 25 mM (Applied Biosystems)	3,0
Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato	1,0
Cebador GC-P1 100µM, purificado mediante HPLC (Sigma)	0,2
Cebador P2 100µM, purificado mediante HPLC (Sigma)	0,2
Ampli <i>Taq</i> Gold polimerasa (Applied Biosystems)	0,2
DMS grado biología molecular (Sigma)	2,5

Seroalbúmina bovina 10 mg/ml (N E Biolabs)	1,0
ADN molde (producto de la primera PCR)	1.0
Agua bidestilada estéril grado PCR	36,0

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

1. Desnaturalización inicial: 94°C durante 7 minutos.
2. 30 ciclos que constan de:
 - Desnaturalización: 94°C durante 1 minuto.
 - Hibridación de los cebadores sobre el ADN molde desnaturalizado “*Annealing*”: 65°C durante 1 minuto.

Esta temperatura se disminuyó automáticamente 1°C cada 2 ciclos, hasta alcanzar 55°C, temperatura a la cual se efectuaran 10 ciclos adicionales.

 - Extensión: 72°C durante 2 minutos.
3. Extensión final: 72°C durante 10 minutos.
4. Mantenimiento a 4°C.

Tras la reacción se tomaron alícuotas de 1 µl que se comprobaron en gel de agarosa al 3%, para confirmar la existencia de bandas amplificadas del tamaño esperado (0.2 Kb).

3.8.3 Concentración del producto de la PCR anidada.

Todos los productos de PCR finales para cada una de las muestras se concentraron aproximadamente 10 veces, empleando las membranas Microcon (Millipore®), siguiendo las indicaciones del fabricante. Gracias al uso de estas membranas se consiguió además purificar los productos de PCR eliminando las sales y componentes de bajo peso molecular.

Para ello, se toma el volumen de la PCR (máximo 500 µl) y se centrifuga en el cartucho a 500 g durante 15 min. A continuación se añaden de 15 a 20 µl de agua milliQ

estéril y se invierte el cartucho en un tubo eppendorf nuevo centrifugándose a 13000 rpm durante 3 min.

3.8.4 Separación de las muestras mediante electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE)

La electroforesis en gel con gradiente de temperatura se realizó empleando el sistema TGGE MAXI (Whatman Biometra®). Para la separación de los distintos fragmentos se emplearon geles desnaturalizantes de poliacrilamida, preparado en agua bidestilada, con la siguiente composición:

Reactivo	Concentración
Poliacrilamida-bisacrilamida 37.5:1 (Sigma®)	6,0%
Urea, grado biología molecular (Sigma®)	8M
Formamida desionizada (Sigma®)	20,0%
Glicerol (Sigma®)	2,0%
Buffer tris-acetato 40mM, EDTA 1mM (TAE) pH 8.0	1X
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), grado biología molecular	0,06%
Persulfato de amonio, grado biología molecular	0.06%

Los geles se dejaron polimerizar durante 3h antes de hacer la electroforesis.

Para la electroforesis se empleó buffer TAE (2x). Se cargaron 5µl de cada muestra mas 1µl de buffer de carga (5x) de la siguiente composición: 0.5% Tritón X100, 0.05% Azul de Bromofenol, 0.01% Xilencianol, EDTA 10mM y *buffer* TAE 10x Las condiciones de la electroforesis fueron las siguientes:

1. Migración inicial de las muestras:

- Temperatura inicial de gradiente, $T_0 = 20^{\circ}\text{C}$
- Temperatura final de gradiente, $T_{10} = 20^{\circ}\text{C}$
- Voltaje 300V
- Duración 18min

2. Establecimiento del gradiente de temperatura:

- Temperatura inicial de gradiente, $T_0 = 43^\circ\text{C}$
- Temperatura final de gradiente, $T_{10} = 63^\circ\text{C}$
- Voltaje 0V
- Duración 10min

3. Separación de las muestras:

- Temperatura inicial de gradiente, $T_0 = 43^\circ\text{C}$
- Temperatura final de gradiente, $T_{10} = 63^\circ\text{C}$
- Voltaje 125V
- Duración 18 horas

Tras la electroforesis, los geles se tiñeron con plata, empleando el kit Gel Code Silver Staining (Pierce[®]), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Como patrón de separación para los fragmentos del gen ADNr 16S, se construyó un marcador de seis especies a partir de las cepas de colección que se muestran en la tabla 6. El proceso seguido para preparar el fragmento de ADN de los patrones fue idéntico al de las muestras.

Tabla 6. Listado de las cepas de colección que se emplearon como marcadores en el TGGE.

ESPECIE	CEPA
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 8750
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC 15308
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α
<i>Nocardia corynebacterioides</i>	ATCC 21253
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341

ATCC: American Type Culture Collection

3.8.5 Reamplificación de las bandas separadas mediante TGGE.

Las bandas individuales visualizadas en los geles mediante tinción de plata se punzaron en su parte central con una punta de pipeta estéril, y el fragmento así extraído se

suspendió en 10 µl de agua bidestilada estéril en tubos para PCR de 200 µl. Partiendo de estos fragmentos como molde, se efectuó la reamplificación de cada banda individual mediante PCR, siguiendo el mismo procedimiento ya descrito en el apartado 2.8.2, empleando como cebadores GC-P1 y P2

3.8.6 Purificación y secuenciación de los fragmentos de adn reamplificados.

Los productos de PCR reamplificados se les realizó una electroforesis preparativa empleando geles de agarosa al 3% en TAE, y tras la tinción con bromuro de etidio, las bandas se escindieron del gel con una espátula estéril, siendo purificadas mediante el kit de extracción Quiaex II (Quiagen®) y el ADN suspendido en un volumen final de 20 µl de agua bidestilada estéril.

Los productos así purificados fueron secuenciados empleando como cebadores los mismos utilizados para su reamplificación. La secuenciación de ADN de doble cadena fue efectuada por el servicio de secuenciación del Instituto de Parasitología y Bioquímica López-Neira (CSIC, Granada) en un secuenciador automático.

3.8.7 Análisis informático de las secuencias.

Los datos de secuencia de ADN obtenidos fueron analizados con el programa informático de libre distribución *Chromas* v. 1.45. Para el alineamiento y la comparación de las secuencias de ADN de los distintos fragmentos obtenidos, se emplearon las herramientas de biocomputación *Align* (Kruskal, 1983) y *WU-BLAST-n* v. 2.0 (Altschul *et al.*, 1997), ambas disponibles en el servidor web del *European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk>). El programa *Clustal X* v. 1.8 (Jeanmougin y col., 1998) fue utilizado para la generación de alineamientos de las secuencias, empleando los parámetros por defecto. El programa *MEGA* (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) v. 2.1, se utilizó para el cálculo de las matrices de distancia entre las secuencias y la construcción de los árboles filogenéticos mediante el método *Neighbour-Joining* (Saitou y Nei, 1987). Los árboles se calcularon tomando como criterio la no inclusión de los huecos (*gaps*) del alineamiento. Los valores de confianza se calcularon mediante el método *Bootstrap* (n-

1000) (Felsenstein, 1985) y los porcentajes superiores al 50% aparecen reflejados en los árboles correspondientes.

3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos obtenidos en la fase experimental se sometieron a tratamiento estadístico asistido por ordenador, debido al carácter comparativo de los estudios realizados en la investigación.

Se realizaron los siguientes tratamientos:

- Resultados obtenidos en la fase de inoculación del filtro sumergido
 - Ajustes a modelos exponenciales de las curvas de crecimiento de los inoculantes en función del tiempo transcurrido desde el inicio de la inoculación para las cepas seleccionadas y para las temperaturas ensayadas.
 - Análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, siendo la variable independiente la temperatura ensayada y la variable dependiente el número de bacterias por mm^2 en la superficie del relleno, para cada uno de los inoculantes. También se realizó este ANOVA con el inoculante empleado como variable independiente, para cada una de las temperaturas ensayadas. Igualmente se completó un Test de Mínimas Diferencias Significativas (LSD) entre las medias y test de rango múltiple (t de Student) para la comparación de las fuentes de variación en los análisis de una vía.
- Resultados obtenidos por el funcionamiento del filtro sumergido a escala de laboratorio
 - Análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, siendo la variable independiente la temperatura ensayada y las variables dependientes la turbidez en UNT del efluente, los microorganismos en ufc/ml en el efluente,

el rendimiento de eliminación de nitrógeno en el sistema, la concentración de nitrito en mg/l en el efluente y los incrementos de pH; para cada uno de los inoculantes. Igualmente se completó un Test de Mínimas Diferencias Significativas (LSD) entre las medias y test de rango múltiple (t de Student) para la comparación de las fuentes de variación en los análisis de una vía.

- Ajustes de la evolución en el tiempo de los valores de Nt en el efluente para los ensayos realizados con todos los inoculantes empleados y las temperaturas ensayadas.

Para estos tratamientos se empleó el paquete informático STATGRAPHICS® Versión 4.1 (STSC Inc., Rockville, Maryland, USA 1989) propiedad de la Universidad de Granada.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DE LA SELECCIÓN DE CEPAS DESNITRIFICANTES

El fin principal de esta primera fase de selección de cepas bacterianas desnitrificantes fue la obtención de un número reducido de microorganismos que demostraran una buena capacidad de crecimiento a temperaturas bajas y medias, y además destacaran por su alta actividad desnitrificante. Dichas cepas se emplearon como inoculantes en un sistema de filtros sumergidos destinado al tratamiento de aguas subterráneas contaminadas con nitrato, el cual trabajó en un rango de temperaturas entre 5 y 30°C.

Por ello, y partiendo de una colección de 250 cepas desnitrificantes previamente aisladas de la biopelícula de un filtro sumergido, a escala piloto, aplicado a la desnitrificación de aguas subterráneas (Gómez, 1998), se realizó una selección basada en la actividad desnitrificante y capacidad de crecimiento a bajas temperaturas, junto con las características propias de la cepa seleccionada.

4.1.1 Comprobación de la generación de gas en medio desnitrificante.

La colección inicial de cepas desnitrificantes estaba conservada mediante liofilización, presentando algunos liófilos cerca de cuatro años. Debido a esto, antes de proceder a la selección de cepas se realizó una recuperación desde el liófilo, comprobando posteriormente la capacidad de crecer en medio desnitrificante semisólido regenerado. Para el ensayo se utilizaron diferentes medios de cultivo (con sacarosa o con etanol como fuente de carbono, o con y sin extracto de levadura), y se prestó especial atención a la capacidad de rotura del medio por la generación de gas. Esta capacidad, dadas las características del medio de cultivo, catalogaba a la cepa que generase gas como desnitrificante.

La capacidad de crecimiento de las cepas regeneradas fue diferente según el medio de cultivo empleado, reduciéndose en este primer paso de la selección a tan solo 95 cepas de las 250 iniciales, ya que el resto no se mostraron capaces de crecer en los medios

4.- RESULTADOS

desnitrificantes seleccionados. La figura 14 muestra el porcentaje de cepas (del total de las 95 que presentaron capacidad de crecimiento) con capacidad de crecer en los tres medios de cultivo empleados, antes o después de 24 horas de incubación.

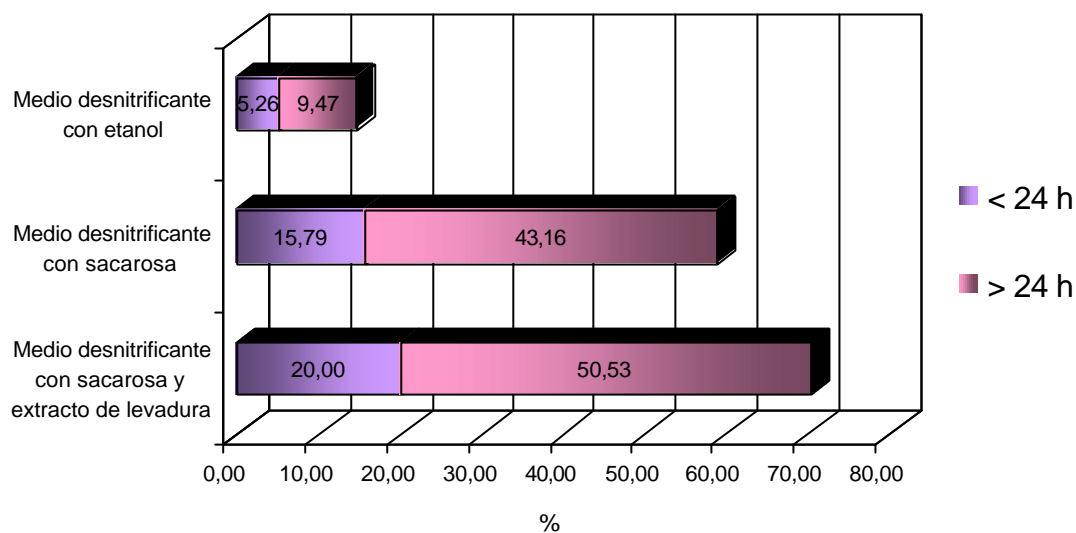


Figura 14. Porcentaje de cepas con capacidad de crecimiento, con generación de gas, en los medios desnitrificantes seleccionados (sobre un total de 95 cepas que mostraron crecimiento).

Un total del 70% de las cepas con capacidad de crecimiento se mostró capaz de generar gas en el medio enriquecido con extracto de levadura y con sacarosa como fuente de carbono, realizándolo un 20 % antes de 24 horas de incubación. Este porcentaje se redujo a un 60% al emplear un medio definido con sacarosa como fuente de carbono y a tan sólo a un 15% cuando la fuente de carbono disponible fue etanol. Tan solo un 5% del total de las cepas demostró capacidad de generar gas en el medio definido con etanol como fuente de carbono, antes de 24 horas de incubación.

4.1.2 Crecimiento de los microorganismos a diferentes temperaturas.

Dado que la variable principal de nuestras experiencias fue la temperatura, las cepas que demostraron capacidad de generación de gas en los medios de cultivo desnitrificantes seleccionados (consideradas como desnitrificantes), fueron sometidas a ensayos de crecimiento a distintas temperaturas (4, 10, 15, 20, 25, 30 y 37 °C) sobre un medio N-S-A. A medida que aumentó la temperatura de incubación, un mayor número de

bacterias mostraban capacidad de crecimiento, destacando que a 30°C crecían más del 90% del total de las desnitrificantes (Figura 15). Sin embargo, a 4°C el porcentaje de cepas capaces de crecer no alcanzó el 40%. Es destacable que, a medida que aumentó la temperatura de incubación entre 4 y 30 °C, el porcentaje de cepas capaces de crecer antes de las 24 horas de incubación se incrementó. Para la temperatura de 37°C se detectó una leve reducción en el porcentaje de cepas con capacidad de crecimiento.

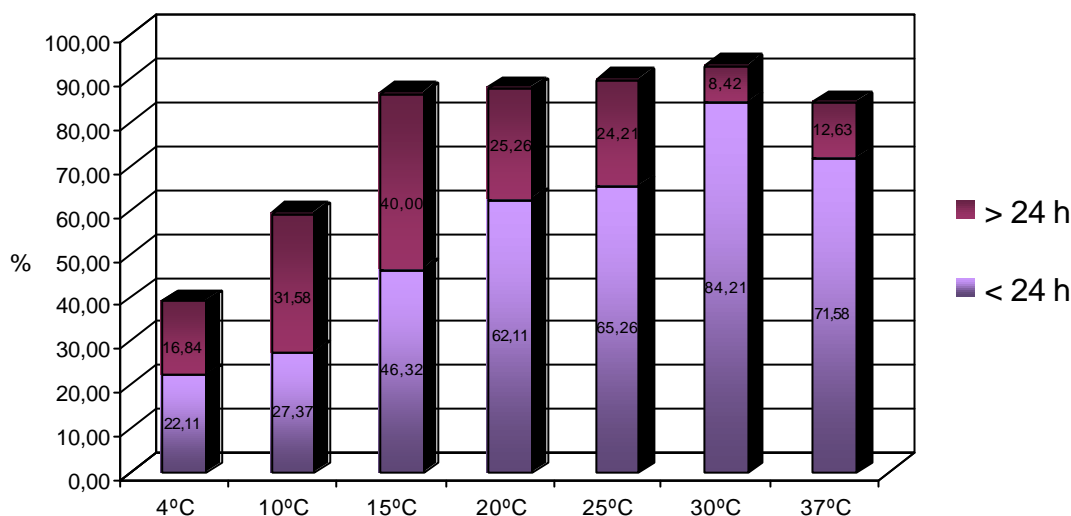


Figura 15. Resultados de los ensayos de crecimiento en placa con medio N-S-A para las cepas desnitrificantes, empleando diferentes temperaturas de incubación.

4.1.3 Actividad desnitrificante.

A todas las cepas catalogadas previamente como desnitrificantes se les realizó la determinación de su actividad desnitrificante mediante el método de inhibición por acetileno descrito por Yoshinari y Knowles (1976). De este modo se pudo comparar las cepas en función de la mayor o menor capacidad de reducir nitrato hasta N_2O en condiciones de anoxia.

Cabe resaltar que alrededor de un 40% de las cepas desnitrificantes no presentaron actividad antes de las 24 horas de incubación (figura 16), por lo que se descartó su posible uso como inoculante. Asimismo, otro 30% mostró una pobre actividad desnitrificante, con valores por debajo de $200 \text{ nmol } N_2O/10^9 \text{ ufc} \cdot \text{h}$. Las mayores actividades desnitrificantes

4.- RESULTADOS

registradas estaban en torno a $1200 \text{ nmol N}_2\text{O}/10^9 \text{ ufc}\cdot\text{h}$, valores tan solo alcanzados por un 2 % de las cepas desnitrificantes.

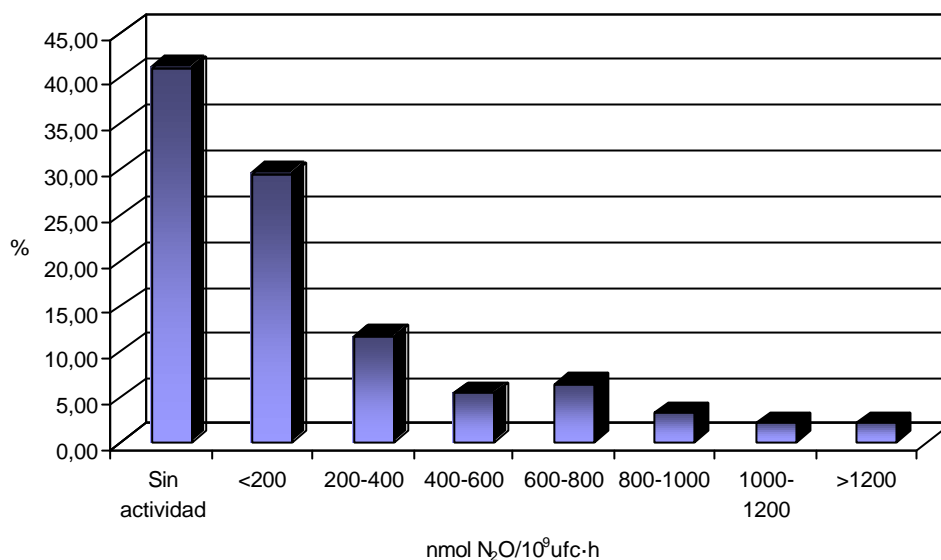


Figura 16. Actividad desnitrificante de las cepas bacterianas tras 24 horas de incubación.

Considerando tanto la actividad desnitrificante de las cepas como la capacidad de crecimiento a bajas temperaturas se seleccionaron siete de las 95 cepas iniciales. Se trata de cepas desnitrificantes con elevada actividad y con capacidad de crecer en placa a temperaturas de hasta 4°C .

Otro importante criterio de preselección de estas 7 cepas fue la capacidad de realizar completamente el proceso de desnitrificación, es decir capacidad para transformar NO_3^- en N_2 , eliminando aquellas cepas que producían acumulación de N_2O . Las Figuras 17 a 23 muestran los cromatogramas del ensayo empleado para calcular la actividad desnitrificante de cada una de las siete cepas seleccionadas, en presencia de acetileno (a) y en ausencia de éste (b). Para los ensayos con acetileno se aprecia siempre un pico de óxido nitroso acumulado dada la inhibición que el acetileno realiza sobre la óxido nitroso reductasa. Este pico es inapreciable en los ensayos en ausencia de acetileno lo que muestra la capacidad de cada una de las cepas a completar el proceso de desnitrificación hasta N_2 gas.

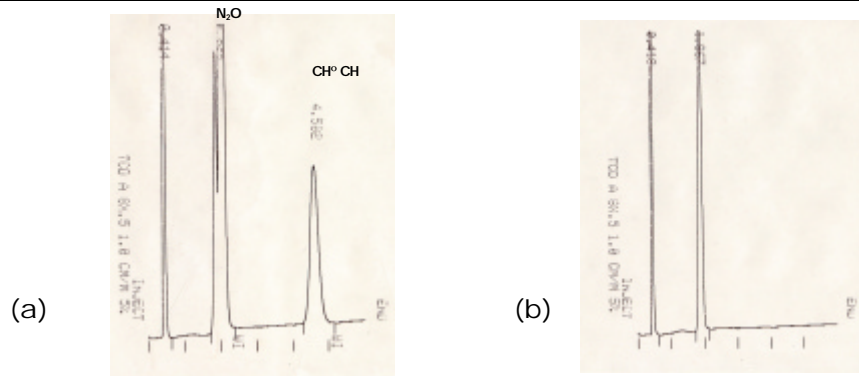


Figura 17. Cromatogramas de la cepa A24 tras incubación durante 24 horas a 30°C (a) en presencia de acetileno (b) en ausencia de acetileno.

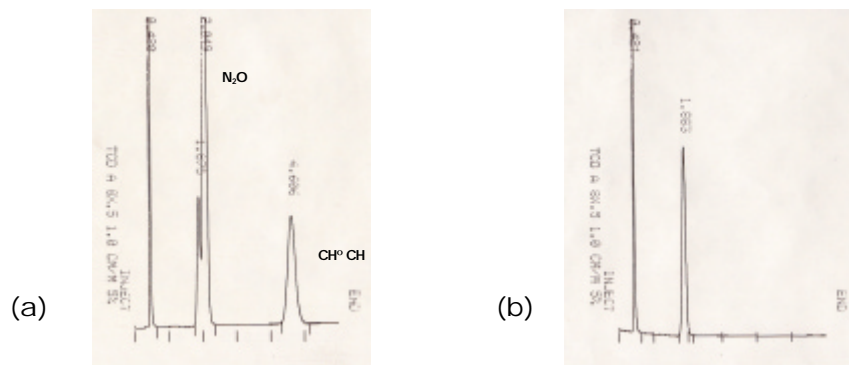


Figura 18. Cromatogramas de la cepa A103 tras incubación durante 24 horas a 30°C (a) en presencia de acetileno (b) en ausencia de acetileno.

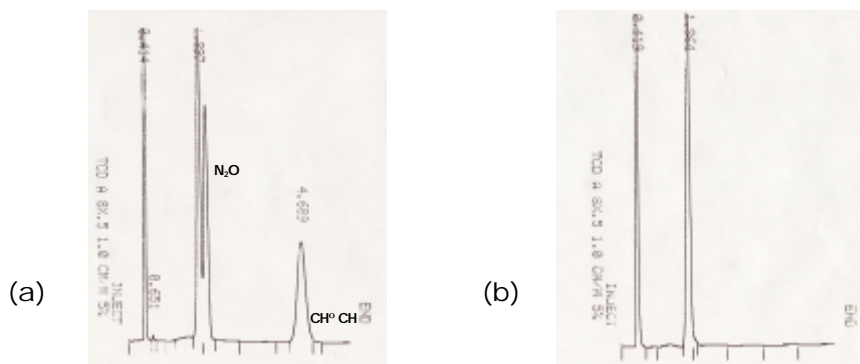


Figura 19. Cromatogramas de la cepa A106 tras incubación durante 24 horas a 30°C (a) en presencia de acetileno (b) en ausencia de acetileno.

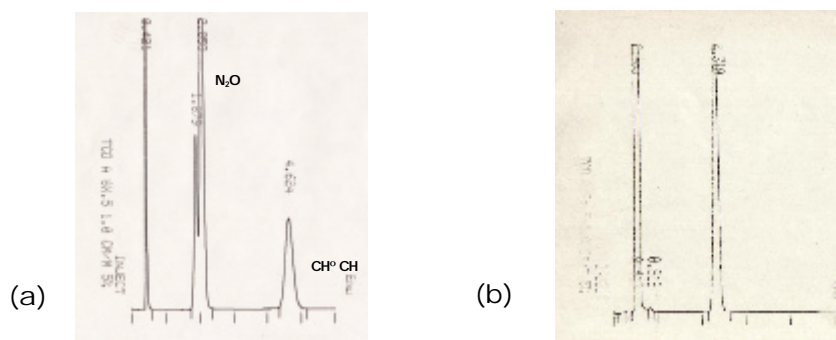


Figura 20. Cromatogramas de la cepa A115 tras incubación durante 24 horas a 30°C (a) en presencia de acetileno (b) en ausencia de acetileno.

4.- RESULTADOS

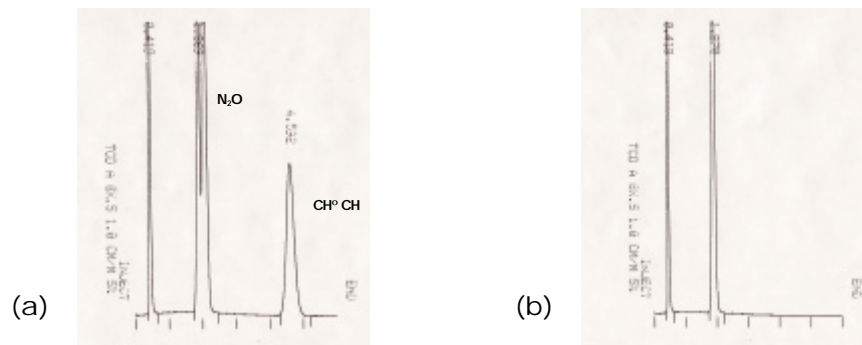


Figura 21. Cromatogramas de la cepa A179 tras incubación durante 24 horas a 30°C (a) en presencia de acetileno (b) en ausencia de acetileno.

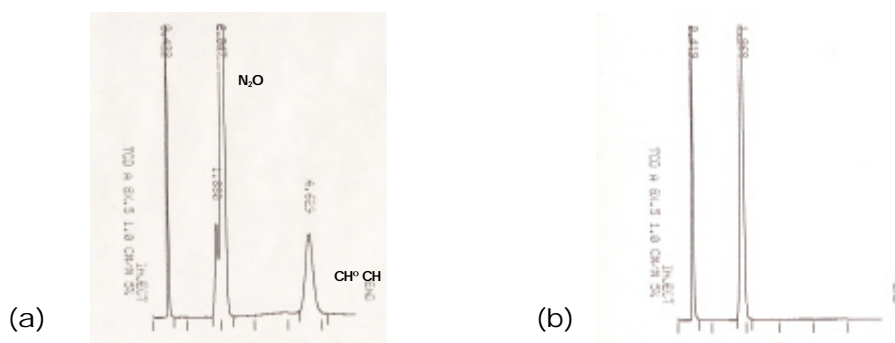


Figura 22. Cromatogramas de la cepa A343 tras incubación durante 24 horas a 30°C (a) en presencia de acetileno (b) en ausencia de acetileno.

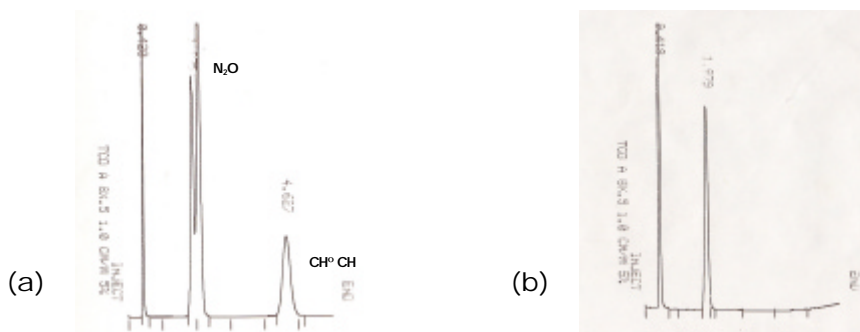


Figura 23. Cromatogramas de la cepa A467 tras incubación durante 24 horas a 30°C (a) en presencia de acetileno (b) en ausencia de acetileno.

4.1.4 Identificación de las cepas seleccionadas.

Una vez realizada la selección de las siete cepas reflejadas en los resultados anteriores, se procedió a la identificación taxonómica mediante PCR para conocer otras posibles características del microorganismo seleccionado que pudieran afectar a su posterior utilización como inoculante de un sistema de tratamiento de aguas destinadas a

consumo humano. Esta identificación taxonómica (tabla 7) nos llevó a la selección definitiva de los inoculantes empleados en el estudio.

4.1.5 Selección definitiva de las cepas desnitrificantes.

En vista de los resultados obtenidos en las diferentes pruebas comparativas realizadas, se procedió a la selección final de cepas que se emplearían como inoculantes en los ensayos posteriores, para un sistema de filtros sumergidos aplicado a la desnitrificación de aguas subterráneas.

Las cepas finalmente seleccionadas fueron:

- i. *Pseudomonas fluorescens* (Cepa A24)
- ii. *Pseudomonas mandelii* (Cepa A103)
- iii. *Pseudomonas brassicacearum* (Cepa A343)

Tabla 7. Identificación taxonómica de las cepas desnitrificantes seleccionadas .

Cepa	Secuencias de mayor identidad	Nº de acceso	Nº de pares de bases que solapan	% identidad/ % similitud
A24	<i>Pseudomonas</i> sp. cepa PsA	DQ628969	1459	99,59 / 99,59
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa PC17	AY538263	1464	99,18 / 99,18
	<i>Pseudomonas mandelii</i> cepa CIP 105273	AF058286	1464	99,11 / 99,11
A103	<i>Pseudomonas mandelii</i> cepa CIP 105273	AF058286	1442	99,72 / 99,72
	<i>Pseudomonas borealis</i> cepa Ab 131	AJ012712	1456	99,59 / 99,59
A106	<i>Pseudomonas</i> sp. cepa PSA A4(4)	DQ628969	1423	99,37 / 99,44
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato cepa DC 3000	AE016853	1423	99,02 / 99,09
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. morsprunorum cepa MAFF 302280	AB001445	1423	99,02 / 99,09
A115	<i>Pseudomonas</i> sp. cepa P12	DQ453821	1430	99,79 / 100
	<i>Pseudomonas kilonensis</i> cepa 520-20	AJ292426	1427	99,79 / 100
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa F113	AF134704	1430	99,72 / 99,93
A179	<i>Pseudomonas marginalis</i> cepa NZCX27	AF364098	1406	99,79 / 100
	<i>Pseudomonas veronii</i> cepa A1XB2-5	AY512619	1406	99,79 / 100
A343	<i>Pseudomonas</i> sp. cepa MTR-61	DQ898298	1416	99,78 / 99,93
	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> cepa 520-1	AJ292381	1416	99,72 / 99,79
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa Pf29A	DQ473439	1416	99,72 / 99,79
A467	<i>Pseudomonas veronii</i> cepa CIP 104663	AF064460	1405	99,79 / 99,93
	<i>Pseudomonas marginalis</i> cepa NZCX27	AF364098	1405	99,64 / 99,79

La cepa A24 identificada como *Pseudomonas fluorescens* presentó un buen crecimiento a todas las temperaturas, y además también poseía una buena actividad desnitrificante (932,89 nmol N₂O/10⁹ufc·h). Es altamente destacable que fue una de las cepas capaces de generar gas en un medio desnitrificante semisólido definido con etanol como fuente de carbono. Además presentó esta capacidad tras 24 horas del inicio del ensayo. No hay que olvidar que ésta es la fuente de carbono a utilizar en el sistema de filtros sumergidos a escala de laboratorio.

La cepa A103 identificada como *Pseudomonas mandelii* y la cepa A343 identificada como *Pseudomonas brassicacearum* fueron seleccionadas porque ambas presentaron un crecimiento óptimo tanto a bajas como a medias temperaturas, sin la aparición de retrasos en el crecimiento por inhibición de la temperatura, y además presentaron actividades desnitrificantes más elevadas que el resto de cepas preseleccionadas que no hubieran sido ya descartadas (781,53 y 685,75 nmol N₂O/10⁹ ufc·h respectivamente). La capacidad de generación de gas en los medios desnitrificantes aplicado fue similar para ambas cepas, con capacidad de hacerlo en medios definidos.

Aunque la cepa A467 identificada como *Pseudomonas veronii* fue la que mayor actividad desnitrificante presentó (1148 nmol N₂O/10⁹ ufc·h), su lento crecimiento a bajas temperaturas con respecto al resto (hasta los 15°C no fue capaz de crecer en placa en 24 horas) hizo que se descartara como inoculante.

Del mismo modo, la cepa A106 fue también rechazada. Presentó un crecimiento rápido a todas las temperaturas ensayadas, y además, presentaba generación de gas en los medios semisólidos definidos (sin extracto de levadura). Sin embargo, su actividad desnitrificante fue la más baja de las siete cepas preseleccionadas, con 236,57 nmol N₂O/10⁹ufc·h. Además, dicha cepa presentó un elevado porcentaje de identidad con la especie *Pseudomonas syringae* pv. *Morsprunorum*, conocida especie patógena de plantas.

Las cepas A115 y A 179 identificadas como *Pseudomonas veronii* y *Pseudomonas marginalis* respectivamente, no fueron capaces de generar gas en los medios desnitrificantes definidos, precisando para ello la existencia en el medio extracto de levadura, razón por la que ambas fueron descartadas.

4.2 DESCRIPCIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

Las tres cepas finalmente seleccionadas fueron estudiadas para conocer sus características, averiguar si han sido descritas como desnitrificantes, así como otros aspectos que pudieran ser de interés en el presente trabajo. Todas ellas pertenecen al género *Pseudomonas*, bacterias gram negativas con un metabolismo que usa el oxígeno como aceptor de electrones, pudiendo usar el nitrato como aceptor de electrones alternativo en condiciones de anoxia (Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, 2003).

4.2.1 Descripción de *Pseudomonas fluorescens*.

Pseudomonas fluorescens fue descrita por primera vez por Trevisan (1889) como *Bacillus fluorescens*, aunque fue Migula (1895) quien le dio el nombre con el que se conoce actualmente e esta especie microbiana.

Se trata de una especie que se encuentra en suelos y aguas, de donde puede ser aislada después de un enriquecimiento en un medio que contenga varias fuentes de carbono, incluida el etanol, incubada aeróbicamente. Se ha descrito actividad desnitrificante para cepas de esta especie. Su óptimo de temperatura es de 30°C, aunque pueden crecer a 4°C, siendo incapaz de hacerlo a 41°C. Son células Gram negativas, con forma de bacilo y con más de un flagelo polar. Pueden producir pigmentación fluorescente, y es incapaz de formar esporas. No suelen crecer bajo condiciones de pH inferior a 4,5.

4.2.2 Descripción de *Pseudomonas mandelii*

Pseudomonas mandelii es una especie del género *Pseudomonas* aislada a partir de aguas minerales naturales y que fue descrita por Verhille *et al.* en 1999. Su nombre se escogió en honor a M. Mandel, un distinguido microbiólogo americano, por su contribución al conocimiento del género *Pseudomonas*.

Sus células son Gram negativas, y con forma de bacilo. Parecen ser móviles y se ha observado en ellas la presencia de un único flagelo polar. Cuando crecen en agar con nutrientes, las colonias son mucosas, circulares y no pigmentadas.

Pueden producir pigmentación, las cepas descritas son catalasa y oxidasa positivas, y son capaces de llevar a cabo el proceso de desnitrificación. Del mismo modo en su descripción se incluye la facultad de crecer a bajas temperaturas (4°C), como se ha comprobado en el presente trabajo, y también en presencia de bajas concentraciones de sales (0,8%). El rango conveniente de temperaturas de crecimiento de esta especie es de 4°C a 35°C, con el óptimo de crecimiento a 30°C. No se ha descrito crecimiento en altas concentraciones de sales (5 y 7%).

4.2.3 Descripción de *Pseudomonas brassicacearum*

La especie *Pseudomonas brassicacearum* fue descrita por Achouak *et al.* (2000). Su nombre se debe a que las cepas fueron aisladas de la rizosfera de plantas pertenecientes a las *Brassicaceae*: *Arabidopsis Thaliana* y *Brassica napus*, presentes en diferentes suelos.

Se trata de bacterias Gram negativas, móviles y con forma de bacilo, de 1-1,5 µm de longitud y 0,5µm de diámetro. Puede formar colonias mucosas con márgenes regulares cuando crece en TSA y produce un pigmento marrón-anaranjado en fases estacionarias tardías en TSA y en TSB, pero no en éstos medios si se encuentran en dilución 1/10. Puede producir un pigmento fluorescente cuando crece en medio CAA (Medio Casamino Ácido, de composición por litro de agua destilada: 5g de Ácido Bacto Casamino bajo en hierro; 1,54 g de K₂HPO₄·3H₂O y 0,25 g de MgSO₄·7H₂O). Tiene un crecimiento aeróbico y es oxidasa positiva. La reducción de nitrato a nitrito es variable, presente en algunas cepas, tal como sucede con la aislada en el presente trabajo, la cual se ha manifestado como desnitrificante. La capacidad de crecimiento a distintas temperaturas no ha sido descrita, aunque en el presente trabajo se establece un rango de crecimiento de al menos 4-37°C.

4.3 COLONIZACIÓN DEL SOPORTE DEL FILTRO SUMERGIDO PARA LA FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA DESNITRIFICANTE

4.3.1 Colonización del soporte por parte de la microbiota autóctona del agua subterránea.

La microscopía electrónica permite visualizar la superficie del relleno para observar los microorganismos adheridos a ella. Es una herramienta que mejora el conocimiento de la calidad del proceso de inoculación del material soporte. Con la microscopía electrónica es posible hacer un recuento del número de bacterias presentes en la superficie del relleno por mm^2 y así comparar la mayor o menor adhesión al mismo, además de permitir una evaluación de la madurez de la biopelícula formada en el momento de tomar la muestra de relleno.

Para este ensayo las muestras de relleno fueron tomadas una vez finalizado el proceso completo, ya que en este caso no se realizó una inoculación propiamente dicha como ocurrió en el caso de los otros inoculantes utilizados (fango activo procedente de la estación depuradora de aguas residuales y cepas desnitrificantes seleccionadas). Dichas muestras de relleno se tomaron a todas las temperaturas de ensayo estudiadas: 5°C, 10°C, 20°C y 30°C. Los datos de recuentos obtenidos se compararon entre sí. Para realizar este recuento de los microorganismos presentes en la superficie del relleno por mm^2 , se tomaron 45 fotografías de cada muestra, contando, para cada una de ellas, los microorganismos totales, y dividiéndolos por la superficie total de la fotografía.

Las fotografías tomadas en los ensayos en los que no se realizó una inoculación previa del material soporte del filtro mostraron una colonización del relleno por los microorganismos presentes en el agua subterránea de manera natural tal y como se refleja en la figura 24.

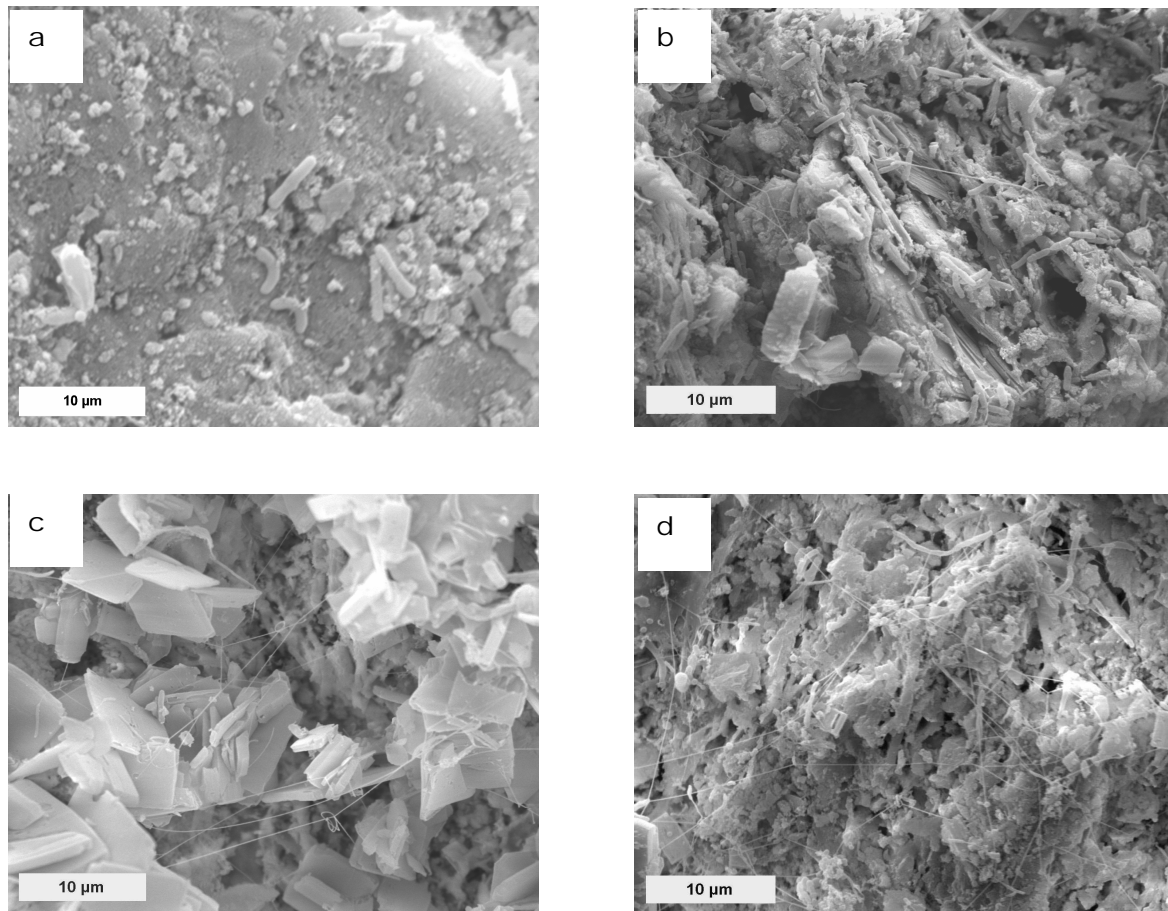


Figura 24. Fotografías de microscopía electrónica de barrido de la superficie del material soporte sin inoculación previa a las 4 temperaturas ensayadas: 5°C (a), 10°C (b), 20°C (c) y 30°C(d).

Las fotografías tomadas en estos ensayos mostraron diferencias notables entre sí en función de la temperatura de ensayo. A 5°C (Fig 24 a), se observaron un número bajo de células aisladas de morfología bacilar sobre la superficie del soporte. A 10°C (Fig 24 b), se observan por primera vez fibras y fimbrias como material de anclaje para estos primeros colonizadores. La cantidad de este material se hace más abundante a mayores temperaturas, aunque a 20°C el número de células sobre la superficie del soporte siguió siendo bajo (Fig 24 c). A 30°C (Fig 24 d), la biopelícula alcanzó su máximo desarrollo; el número de células adheridas al relleno se vio incrementado de manera substancial, mostrando un recubrimiento parcial de la superficie del soporte. La biopelícula estaba compuesta principalmente por células de diferente morfología, y una presencia importante de sustancias poliméricas extracelulares utilizadas como material de anclaje, permaneciendo además las fibras y fimbrias mencionadas anteriormente

Los recuentos de células sobre la superficie reflejaron una importante diferencia en la colonización del soporte dependiendo de la temperatura. Dicha colonización fue escasa a temperaturas bajo 20°C, incrementándose considerablemente para los ensayos a 30 °C, tal como se refleja en la figura 25.

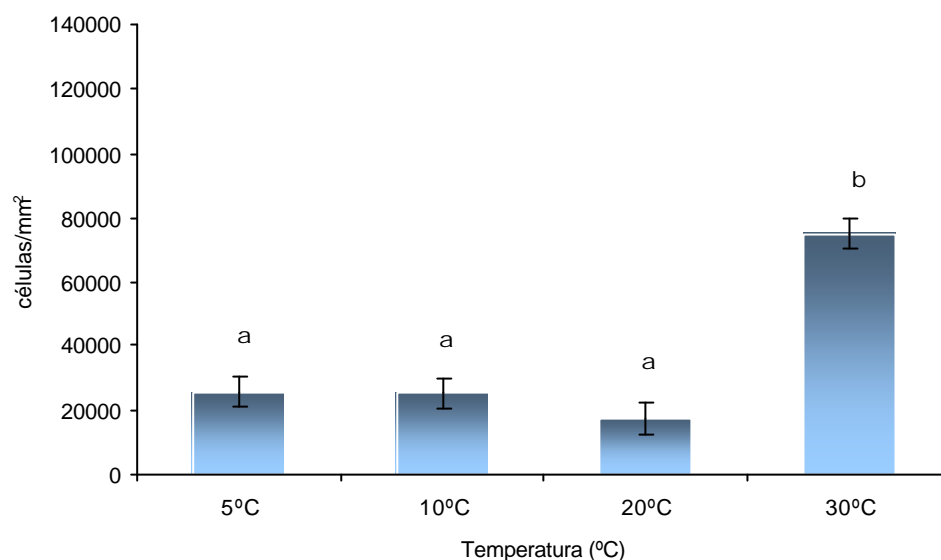


Figura 25. Recuento de células sobre la superficie del material soporte para los ensayos realizados sin inoculación previa y a cada temperatura ensayada. (ª Los grupos con distinta letra tienen diferencias estadísticamente significativas entre sí).

El análisis de varianza realizado sobre los recuentos de células a diferentes temperaturas refleja la existencia de diferencias estadísticamente significativas (Tabla 8), lo cual es motivado por la mayor presencia de células en los ensayos a 30°C. Para los ensayos por debajo de 20°C, la colonización fue similar, no apreciándose diferencias estadísticamente significativas según el test de mínimas diferencias significativas (LSD $p < 0.01$) reflejado en la figura 25.

Tabla 8. Análisis de la varianza para el número de microorganismos presentes en la biopelícula en función de la temperatura en los ensayos sin inoculación previa del filtro

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significación
Entre grupos	$1,03484 \times 10^{11}$	3	$3,44947 \times 10^{10}$	63,69	0,0000
Por temperatura	$1,01212 \times 10^{11}$	186	$5,44151 \times 10^8$		
Total corregido	$2,04696 \times 10^{11}$	189			

4.3.2 Colonización del soporte por los microorganismos presentes en el fango activo procedente del reactor biológico de una estación depuradora de aguas residuales urbanas.

Las fotografías tomadas a las 48 horas de iniciarse la inoculación con fango activo procedente de un reactor biológico mostraron que también en este caso se produjo la colonización del soporte a todas las temperaturas ensayadas, aunque de nuevo existieron diferencias reseñables entre los distintos ensayos, tal como muestra la figura 26.

El análisis fotográfico puso de manifiesto un distinto desarrollo de las estructuras celulares en función de la temperatura de ensayo. El material soporte recogido del filtro sumergido incubado a 5°C (Fig 26 a) se vio colonizado principalmente por bacterias con morfología bacilar con unas dimensiones homogéneas. Se pudieron observar otras morfologías como formas espirales, pero en ningún caso fueron tan abundantes como las formas bacilares. A esta temperatura ya se apreció una importante presencia de fibras y fimbrias como material de anclaje, y una delgada capa de material polimérico extracelular cubría ocasionalmente la superficie del material soporte.

Con relación al material soporte incubado a 10°C (Fig 26 b), también se observaron células de morfología bacilar similares a las apreciadas en el ensayo a 5°C. Sin embargo, otras morfologías bacilares, además de morfologías cocoides y espirales pudieron observarse en estas fotografías. Fue destacable la presencia de una pequeña cantidad de fibras y fimbrias, con prevalencia de sustancias poliméricas extracelulares como material de anclaje. A esta temperatura, numerosas bacterias mostraron indicios de división celular.

Para los ensayos a 20°C, se observó una amplia variedad de bacterias bacilares y cocoides (Fig 26 c). Empezaron a aparecer a esta temperatura colonias bacterianas, además de una gran cantidad de sustancias poliméricas y células en proceso de división. La morfología de la biopelícula formada sobre el material soporte inoculado a 30°C (Fig 26 d) fue muy similar a la encontrada en el relleno incubado a 20°C, sin diferencias cualitativas importantes.

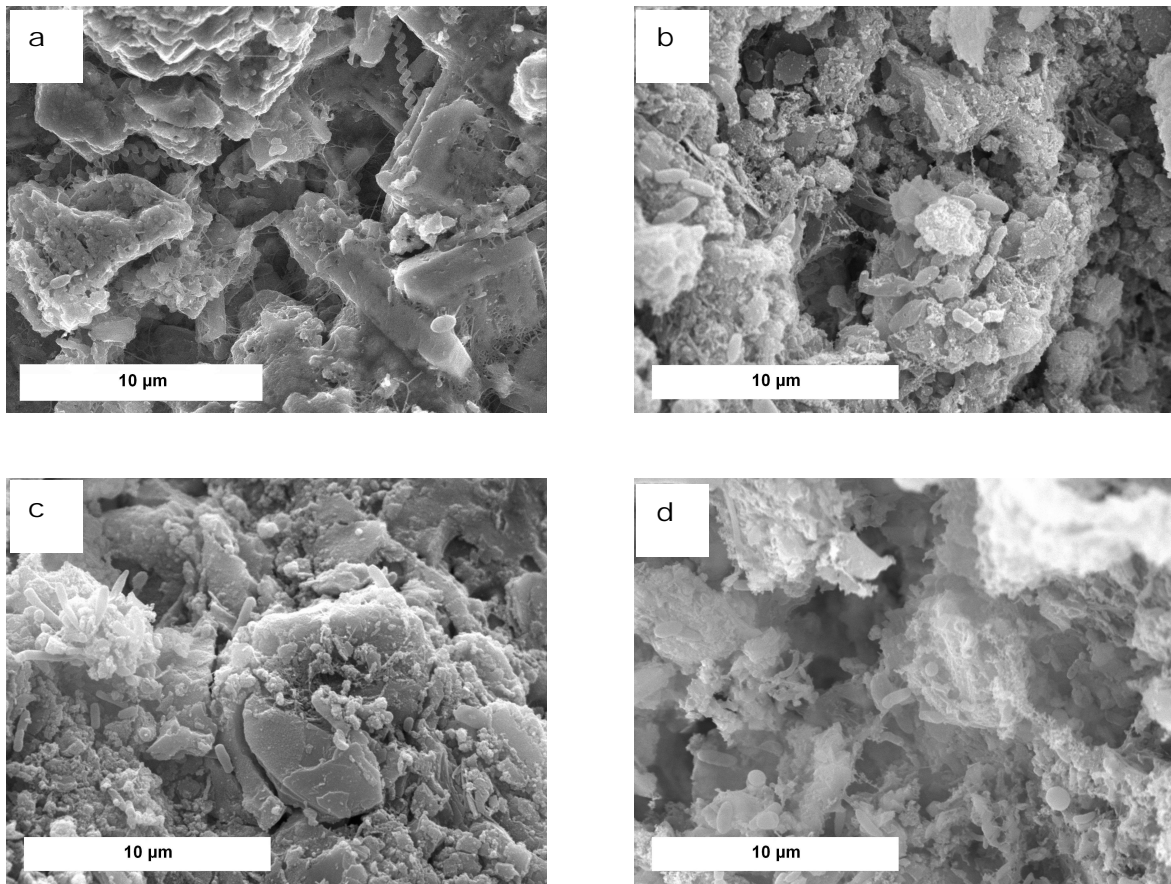


Figura 26. Fotografías de microscopía electrónica de barrido de la superficie del material soporte inoculado con fango activo a las 4 temperaturas ensayadas: 5°C (a), 10°C (b), 20°C (c) y 30°C(d).

Los recuentos de células sobre la superficie del material soporte mostraron que el número de microorganismos por unidad de superficie incrementaban a medida que lo hacía la temperatura hasta alcanzar los 20°C. A partir de este punto no se apreció un incremento destacable, obteniéndose valores medios incluso inferiores a los observados para 20 °C (Figura 27).

4.- RESULTADOS

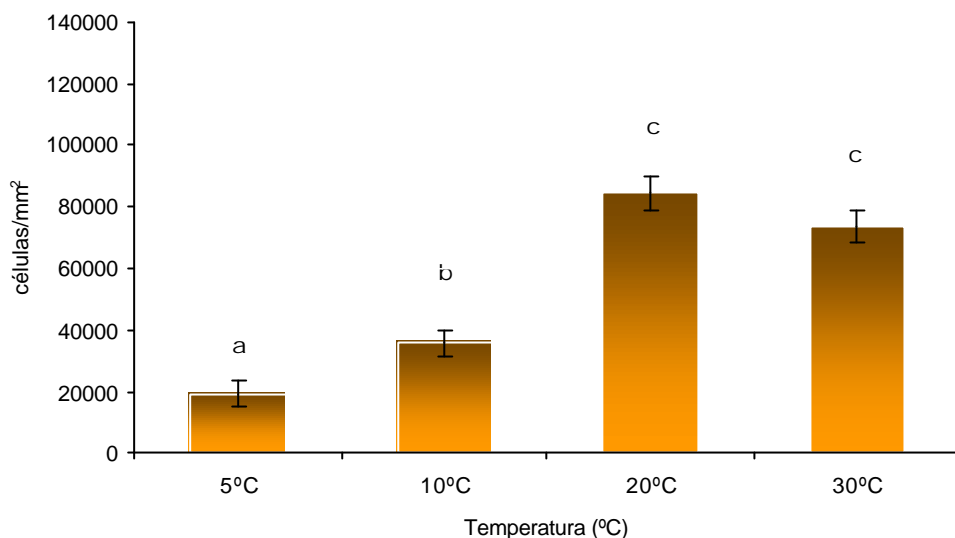


Figura 27. Recuento de células sobre la superficie del material soporte para los ensayos realizados con inoculación empleando fango activo y a cada temperatura ensayada. (ª Los grupos con distinta letra tienen diferencias estadísticamente significativas entre sí).

El análisis de varianza realizado sobre los recuentos de células a diferentes temperaturas refleja la existencia de diferencias estadísticamente significativas (Tabla 9), apreciándose según el test de mínimas diferencias significativas (LSD $p < 0.01$) diferencias estadísticamente significativas para todos los recuentos excepto entre 20 y 30°C (Figura 27).

Tabla 9. Análisis de la varianza para el número de microorganismos presentes en la biopelícula en función de la temperatura en los ensayos con inoculación por fango activo

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significación
Entre grupos	$9,40263 \times 10^{10}$	3	$3,13421 \times 10^8$	60,78	0,0000
Por temperatura	$7,94099 \times 10^{10}$	154	$5,15648 \times 10^8$		
Total corregido	$1,73436 \times 10^{11}$	157			

El número total de bacterias sobre la superficie del soporte se vio incrementado en un orden de 3.95 desde el ensayo a 5°C al ensayo a 20°C. Así como en el sistema sin inoculaciones previas hizo falta aumentar la temperatura de ensayo a 30°C para obtener una colonización apreciable, en los ensayos con fango activo se apreció una colonización a 10°C que casi doblaba a la obtenida a 5°C, y un nuevo aumento a 20°C superaba casi cuatro veces dicho valor.

4.3.3 Colonización del soporte mediante la inoculación selectiva con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24.

Para hacer un seguimiento del proceso de inoculación selectiva, se realizó un control sobre el crecimiento del cultivo bacteriano empleado como inoculante, para asegurarnos del mantenimiento de las condiciones de esterilidad durante el proceso y del correcto crecimiento de las células bacterianas aplicadas. De este modo, se representó el crecimiento bacteriano en el inoculante en recirculación durante el tiempo que duró la inoculación del filtro sumergido y para cada una de las temperaturas ensayadas con la cepa A24 (Figura 28). El proceso de inoculación se prolongó durante 48 horas para las diferentes temperaturas ensayadas excepto para 5°C, temperatura para la que se apreció un retraso en el crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo utilizado para la inoculación. Por ello, se consideró oportuno aumentar para esta temperatura el tiempo de inoculación a 96 horas, facilitando así la generación de biopelícula.

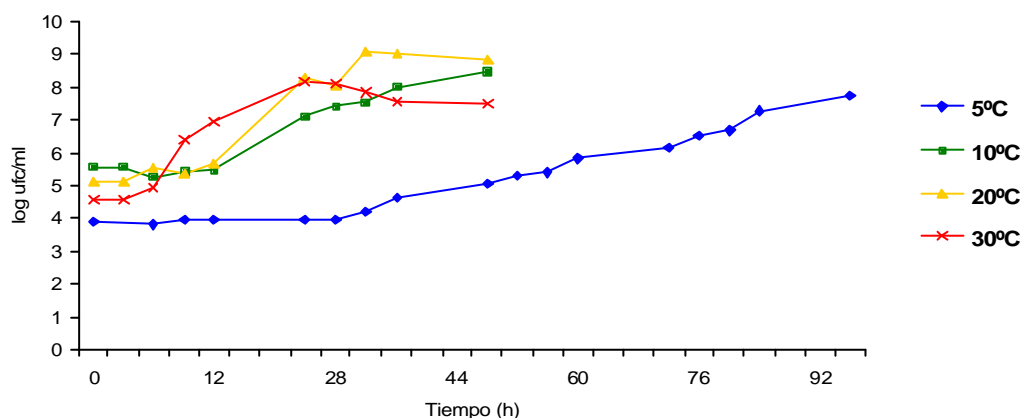


Figura 28. Crecimiento de la cepa *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 en el inoculante en recirculación a las 4 temperaturas ensayadas .

Para la cepa A24, durante el proceso de inoculación se pudo apreciar un crecimiento exponencial con respecto al tiempo, en el cultivo puro en recirculación, para las cuatro temperaturas ensayadas, tal como se refleja en los ajustes matemáticos de la tabla 10. Los coeficientes del ajuste matemático obtenido muestran la influencia de la temperatura en el crecimiento del inoculante, apreciándose un crecimiento más moderado a 5°C.

4.- RESULTADOS

Tabla 10. Ajuste exponencial del crecimiento del inoculante *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 con respecto al tiempo para cada temperatura ($y = e^{(a+bx)}$).

Temperatura	Coefficiente de correlación	a	b
5°C	0,975	7,00155	0,105224
10°C	0,970	11,6872	0,173136
20°C	0,923	10,4336	0,268848
30°C	0,790	12.6411	0,149118

Mediante la ampliación del tiempo de inoculación a 5°C, se logró que al finalizar dicho proceso el número de bacterias presentes en el cultivo puro en recirculación fuera similar al obtenido a las otras tres temperaturas, estando este por encima de las 7 unidades logarítmicas.

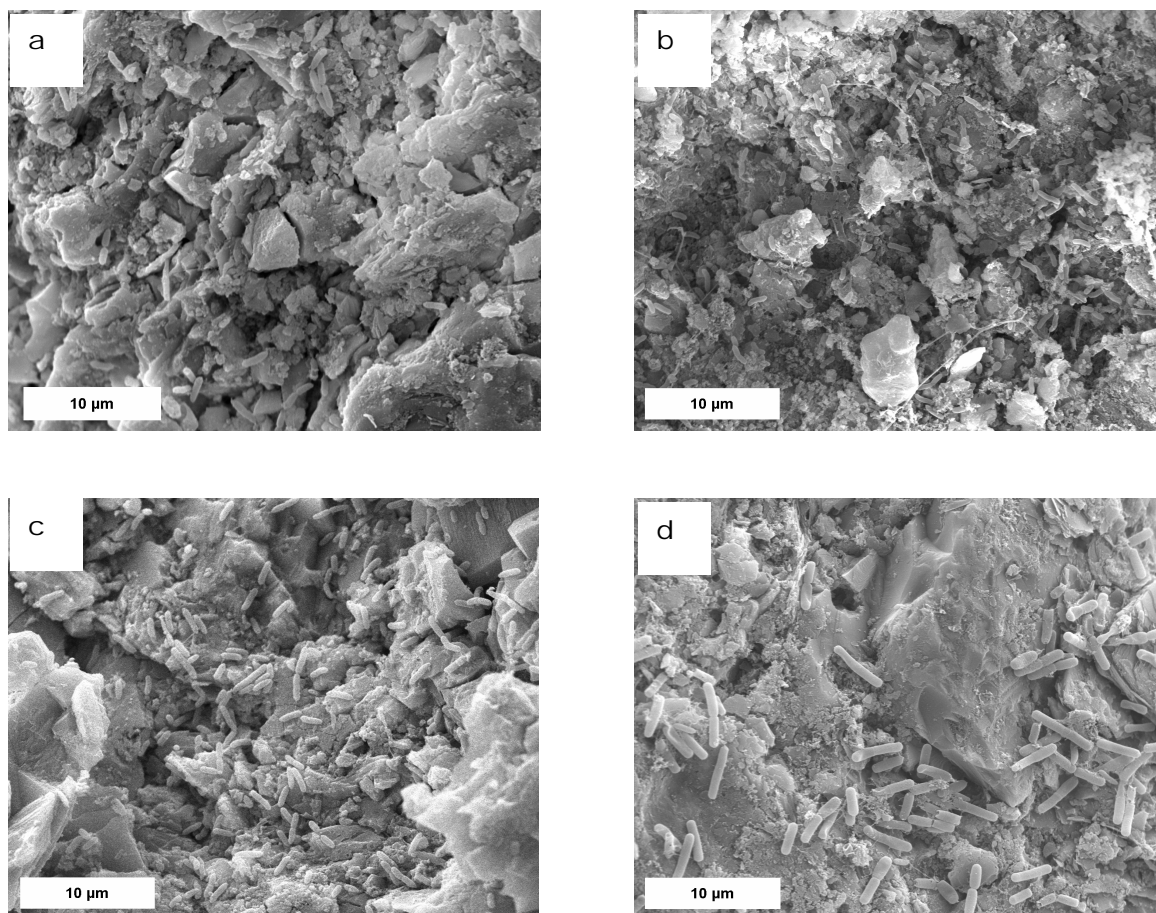


Figura 29. Fotografías de microscopía electrónica de barrido de la superficie del material soporte inoculado con un cultivo puro de *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 a las 4 temperaturas ensayadas: 5°C (a), 10°C (b), 20°C (c) y 30°C(d).

Las fotografías tomadas al finalizar la fase de inoculación con la cepa A24 mostraron una capacidad de colonización del relleno diferente en función de la temperatura

del ciclo, tal y como puede apreciarse en la figura 29. Estas diferencias se debieron principalmente a la morfología de la biopelícula.

A 5°C el número de células sobre la superficie se percibió como muy escaso (Figura 29 a), a pesar de que el tiempo de inoculación fue el doble que para el resto de temperaturas. Tampoco se aprecia la presencia de elementos de anclaje como fibras o fimbrias. Por el contrario, a 10°C (Figura 29 b), la biopelícula mostró un gran número de bacterias sobre la superficie del relleno, cubriendo parcialmente el mismo. Además, la distribución en microcolonias fue importante, con una gran producción de material polimérico extracelular. Es reseñable, aunque en pequeña cantidad, la presencia de fibras y fimbrias como material de anclaje, y un elevado número de células en división. A 20°C, (Figura 29 c) aunque el número de bacterias siguió siendo elevado, no se apreciaban microcolonias, encontrándose las células principalmente aisladas sobre la superficie del relleno. Las sustancias poliméricas extracelulares también eran escasas. A 30°C aún se pudo encontrar de manera puntual y escasa la presencia de fibras de unión y anclaje, observándose gran cantidad de células en división (Fig 29 d).

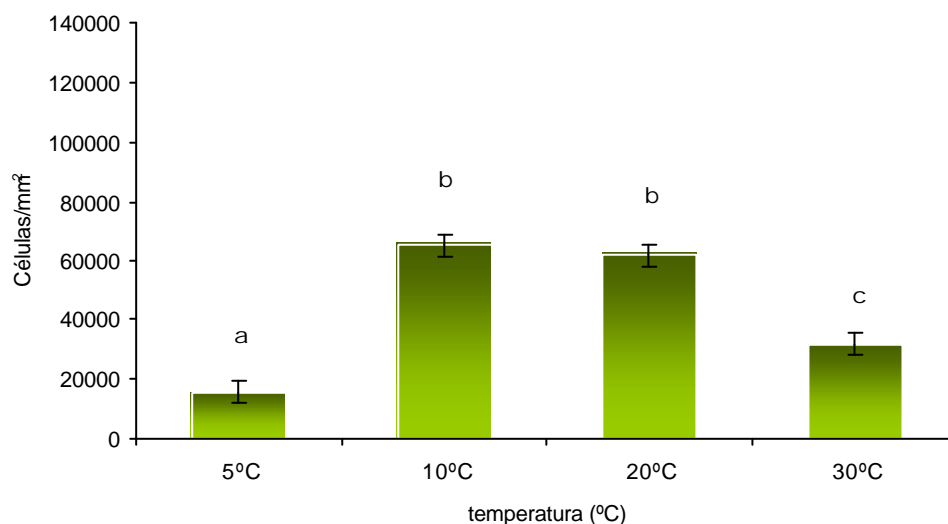


Figura 30. Recuento por microscopía electrónica en los ensayos donde se inoculó el relleno con un cultivo puro de *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 (^a Los grupos con distinta letra tienen diferencias estadísticamente significativas entre sí).

En la figura 30 se representan los resultados de los recuentos de células sobre la superficie del soporte, observándose una influencia de la temperatura en la colonización, la cual fue mejor para temperaturas entre 10 y 20 °C, tal como se indicó anteriormente para el

4.- RESULTADOS

examen visual de la morfología de la biopelícula. Por encima y por debajo de estas temperaturas, la colonización del soporte fue menor

Los recuentos de células a las diferentes temperaturas ensayadas mostraron diferencias estadísticamente significativas, tal como se aprecia en el análisis de varianza reflejado en la tabla 11. Los recuentos más bajos se observaron para los ensayos a 5°C a pesar del mayor tiempo de inoculación, seguido por los ensayos a 30 °C donde la colonización fue mejor que para el ensayo a 5°C, con diferencias estadísticamente significativas entre ambos ensayos según el test de mínimas diferencias significativas (figura 30). Los recuentos realizados para los ensayos a 10 y 20 °C no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, poniendo de manifiesto una colonización del soporte similar entre estas temperaturas.

Tabla 11. Análisis de la varianza para el número de microorganismos presentes en la biopelícula en función de la temperatura en los ensayos con inoculación por un cultivo puro de *Pseudomonas fluorescens* cepa A24.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significación
Entre grupos	$7,72446 \times 10^{10}$	3	$2,57482 \times 10^{10}$	77,29	0,0000
Por temperatura	$5,96322 \times 10^{10}$	179	$3,33141 \times 10^8$		
Total corregido	$1,36877 \times 10^{11}$	182			

4.3.4 Colonización del soporte mediante la inoculación selectiva con *Pseudomonas mandelii* cepa A103.

De modo análogo, se realizó la inoculación con un cultivo puro de *Pseudomonas mandelii* cepa A103. Los resultados obtenidos para el crecimiento del cultivo durante la inoculación se presentan en la figura 31. De nuevo, el crecimiento más lento correspondió al ensayo realizado a la temperatura más baja, 5°C, necesitando el microorganismo el doble de tiempo para alcanzar concentraciones superiores a las 7 unidades logarítmicas. A temperaturas superiores se apreció que el crecimiento exponencial comenzó más rápidamente a medida que la temperatura de ensayo fue mayor.

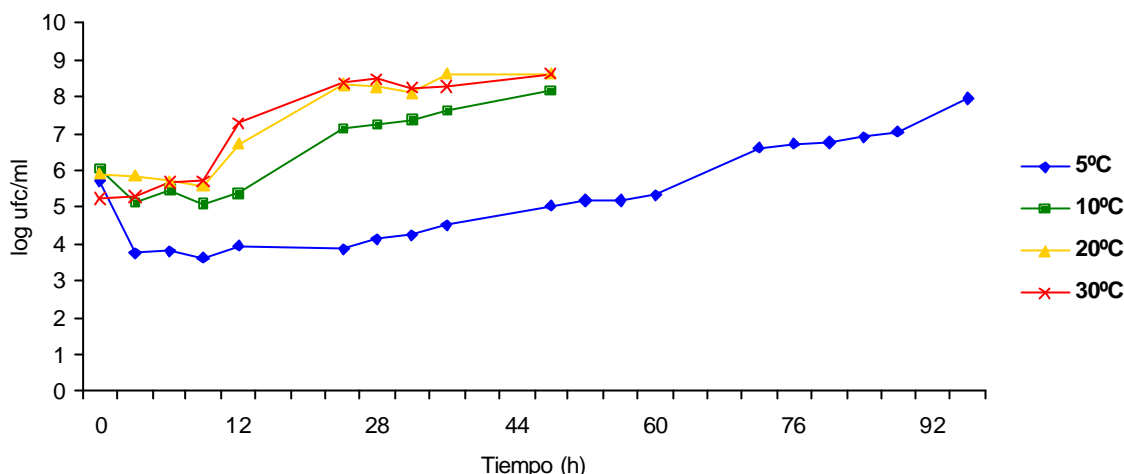


Figura 31. Crecimiento de la cepa *Pseudomonas mandelii* cepa A103 en el inoculante en recirculación a las 4 temperaturas ensayadas .

De nuevo, el crecimiento observado durante la inoculación del filtro fue un crecimiento exponencial. (tabla 11). La similitud de dichos coeficientes en las ecuaciones de crecimiento a 20 y a 30°C muestra que dicho crecimiento fue muy similar durante todo el proceso de inoculación para ambas temperaturas, solapándose sus curvas en la gráfica (Figura 31). A 10°C, los coeficientes muestran un crecimiento exponencial algo menos acusado, siendo aún menor a 5°C, poniéndose de manifiesto la influencia de un aumento de la temperatura de ensayo en el crecimiento de dicho microorganismo en el cultivo en recirculación.

Tabla 12. Ajuste exponencial del crecimiento del inoculante *Pseudomonas mandelii* cepa A103 con respecto al tiempo para cada temperatura ($y = e^{(a+bx)}$).

Temperatura	Coefficiente de correlación	a	b
5°C	0,966	7,3032	0,10119
10°C	0,907	12,1831	0,143944
20°C	0,925	13,1471	0,173226
30°C	0,904	13,0543	0,178106

Las fotografías obtenidas por microscopía electrónica para los ensayos realizados con este microorganismo permiten observar de nuevo diferencias importantes de morfología de la biopelícula y distribución de las células en la superficie del material soporte (Figura 32). Observando la biopelícula desarrollada a 5°C (Figura 32 a) se aprecian un considerable número de células distribuidas uniformemente sobre la superficie, con la presencia puntual de microcolonias de pequeño tamaño. Aún con la presencia de un pequeño número de células en proceso de división, no se detecta la aparición de fibras en

4.- RESULTADOS

la biopelícula formada, aunque sí de material polimérico extracelular, en pequeñas cantidades. Al aumentar la temperatura de inoculación a 10°C (Fig 32 b), la presencia de este material polimérico extracelular permanece, aunque en muy baja cantidad, y sí se observaron fibras, pero de manera esporádica y escasa. La distribución de las células sobre la superficie fue similar a la observada a 5°C aunque ya no se aprecia casi ninguna microcolonia.

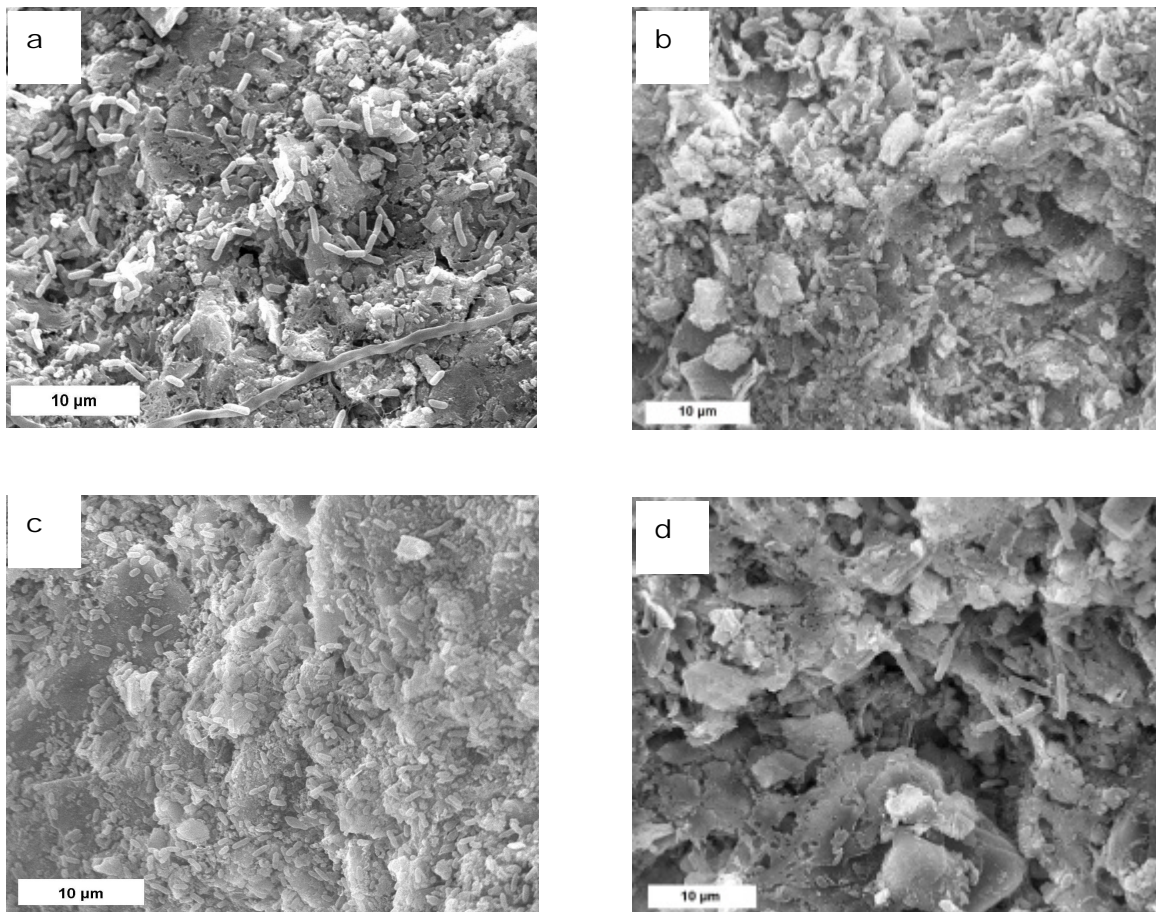


Figura 32. Fotografías de microscopía electrónica de barrido de la superficie del material soporte inoculado con un cultivo puro de *Pseudomonas mandelii* cepa A103 a las 4 temperaturas ensayadas: 5°C (a), 10°C (b), 20°C (c) y 30°C(d).

La inoculación del filtro sumergido a 20°C (Fig 32 c) mostró, sin embargo, un elevado número de bacterias en la superficie del relleno, distribuidas en microcolonias y con una abundante presencia de material extracelular segregado por las bacterias. A esta temperatura no se observaron fimbrias y fibras. La inoculación realizada a 30°C (Fig 32 d) dio lugar, a las 48 horas, a una biopelícula muy poco desarrollada: el número de células

sobre el relleno fue muy escaso, distribuidas en células aisladas, sin la presencia de fibras ni material polimérico extracelular.

A pesar de que el crecimiento a 5°C fue un crecimiento retardado en comparación con el obtenido a mayores temperaturas, la colonización del soporte alcanzada a dicha temperatura en cuanto al número de células adheridas superó a la obtenida a 10 y 30°C, tal y como se aprecia en la figura 33.

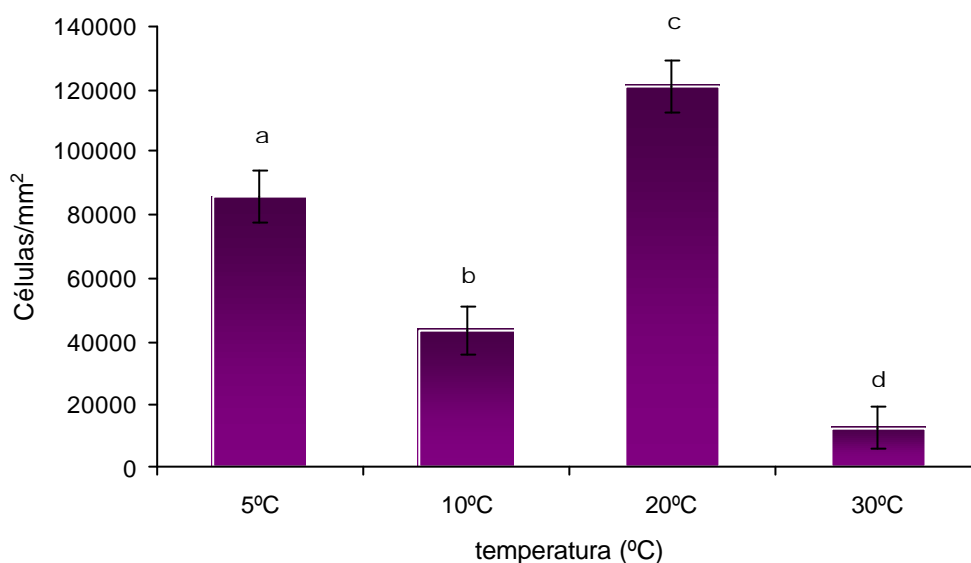


Figura 33. Recuento de células sobre la superficie del material soporte para los ensayos realizados con inoculación empleando un cultivo puro de *Pseudomonas mandelii* cepa A103 y a cada temperatura ensayada. (ª Los grupos con distinta letra tienen diferencias estadísticamente significativas entre sí).

Del mismo modo, cabe resaltar que el mejor resultado de adhesión bacteriana al material relleno del filtro sumergido se obtuvo a 20°C, con diferencias estadísticamente significativas con el resto, como muestra el análisis de varianza de la tabla 12 y el test de mínimas diferencias significativas de la figura 33. Un aumento de la temperatura a 30°C dio lugar a una seria pérdida de capacidad de adhesión, obteniendo el resultado más bajo de todos.

Tabla 13. Análisis de la varianza para el número de microorganismos presentes en la biopelícula en función de la temperatura en los ensayos con inoculación por un cultivo puro de *Pseudomonas mandelii* cepa A103.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significación
Entre grupos	$2,47215 \times 10^{11}$	3	$8,2405 \times 10^{10}$	54,98	0,0000
Por temperatura	$2,72797 \times 10^{11}$	182	$1,49889 \times 10^9$		
Total corregido	$5,20012 \times 10^{11}$	185			

4.3.5 Colonización del soporte mediante la inoculación selectiva con *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343.

La figura 34 muestra los recuentos realizados al inoculante durante el proceso de colonización del filtro sumergido. Se observa el mismo efecto obtenido para el resto de ensayos con otros inoculantes cuando se trabajó a 5°C de temperatura, por lo que se amplió también en este caso el tiempo de inoculación a 96 horas. Para el resto de temperaturas, de nuevo encontramos un comportamiento parecido en el intervalo de 10-30°C.

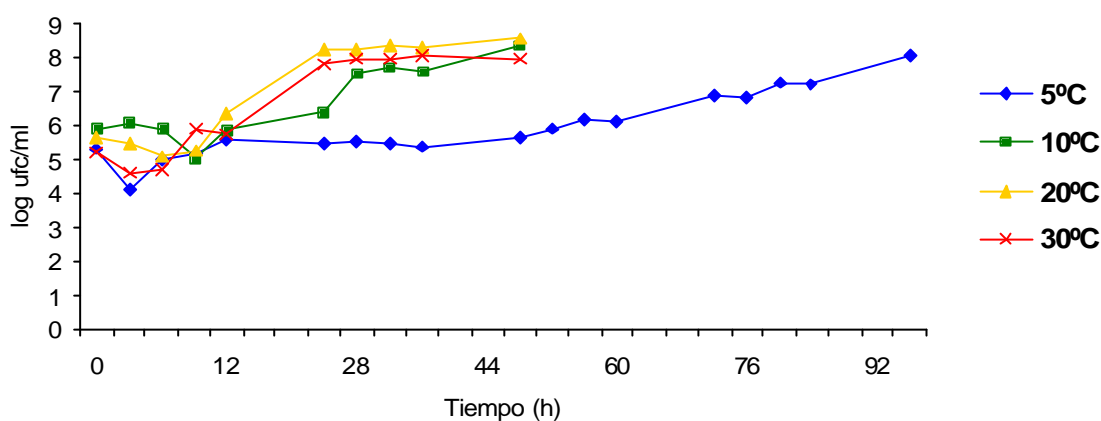


Figura 34. Crecimiento de la cepa *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343 en el inoculante en recirculación a las 4 temperaturas ensayadas.

Además, todos los ensayos mostraron también un crecimiento exponencial del microorganismo, reflejado en la tabla 13. De nuevo en el crecimiento de esta cepa, al igual que ocurrió con *Pseudomonas mandelii* cepa A103, es notable la influencia de la temperatura en el crecimiento en el medio de cultivo. A medida que aumenta la temperatura de 5 a 20°C, los coeficientes de la ecuación muestran un crecimiento exponencial más acusado. Y de nuevo, a 20 y a 30°C el crecimiento exponencial de la bacteria fue muy parecido.

Tabla 14. Ajuste exponencial del crecimiento del inoculante *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343 con respecto al tiempo para cada temperatura ($y = e^{(a+bx)}$).

Temperatura	Coefficiente de correlación	a	b
5°C	0,947	10,546	0,0719
10°C	0,90	12,4605	0,14064
20°C	0,922	12,0845	0,19888
30°C	0,917	11,4268	0,19408

En las inoculaciones realizadas utilizando el cultivo puro de *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343 dieron como resultado una adhesión bacteriana al soporte del sistema muy pobre en comparación con el resto de inoculantes utilizados.

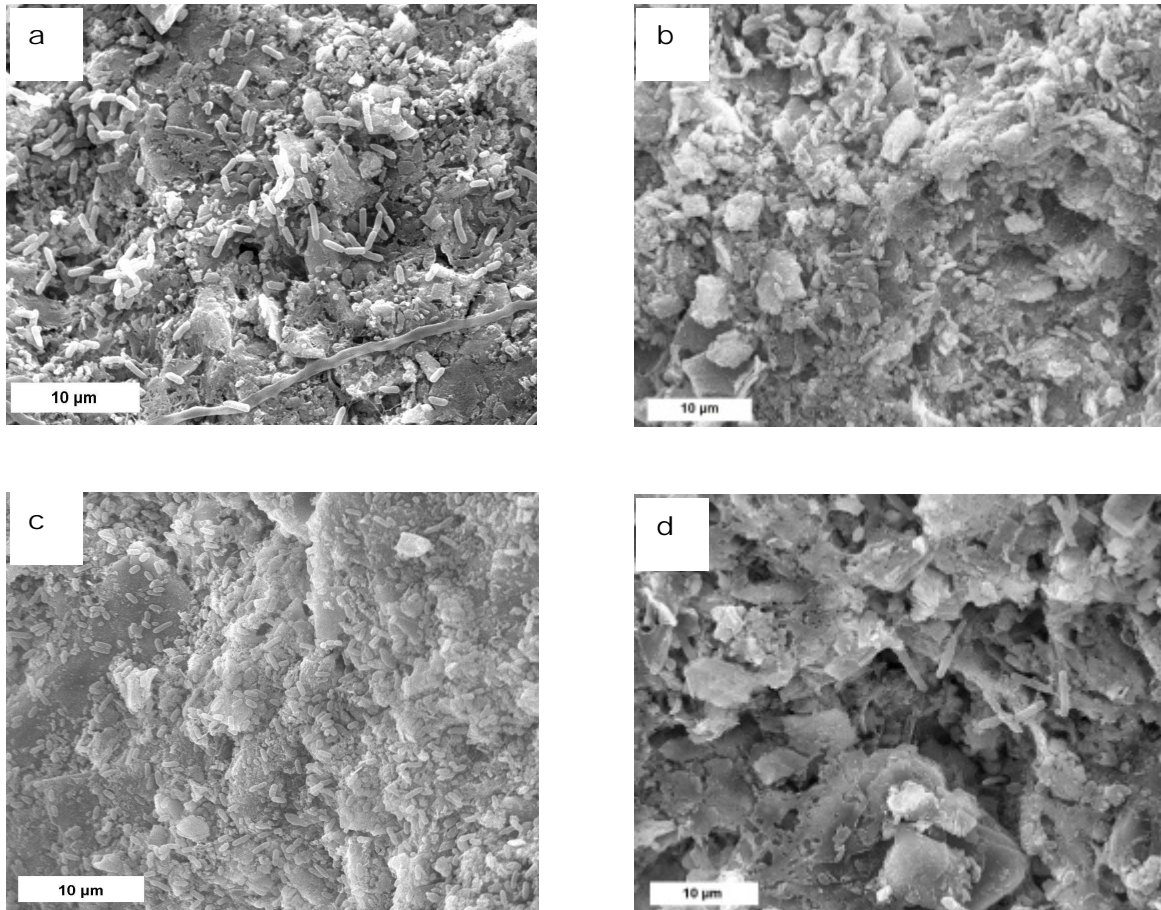


Figura 35. Fotografías de microscopía electrónica de barrido de la superficie del material soporte inoculado con un cultivo puro de *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343 a las 4 temperaturas ensayadas: 5°C (a), 10°C (b), 20°C (c) y 30°C(d).

Aunque los recuentos realizados al inoculante recirculado no mostraron diferencias importantes con los otros inoculantes empleados, la observación de las fotografías (Fig. 35) mostró que en casi ningún caso se puede hablar de biopelícula propiamente dicha al finalizar el proceso de inoculación. El máximo desarrollo se observó en las fotografías tomadas a 5°C (Fig 35 a), donde se aprecian numerosas células en proceso de división, una pequeña cantidad de fibras de anclaje y una importante presencia de material polimérico extracelular secretado por los microorganismos. Cuando la inoculación se realizó a 10°C (Fig 35 b), la cobertura de la superficie por las bacterias es menor. Aunque se siguen encontrando células en proceso de división, desaparecen casi por completo las fibras y el

4.- RESULTADOS

material polimérico extracelular. A partir de este punto, a temperaturas mayores (20 y 30°C) (Figs 35 c y d), el número de bacterias observadas fue mínimo, células aisladas sin ningún tipo de estructura de anclaje, fibras o material extracelular.

Los resultados obtenidos en los recuentos de microorganismos adheridos a la superficie del material soporte muestran que la colonización del relleno se ve afectada por la temperatura, pero de manera inversa: los mejores resultados de colonización se obtuvieron a la temperatura más baja (Fig 36), existiendo diferencias estadísticamente significativas tal y como muestra el análisis de varianza de la tabla 14.

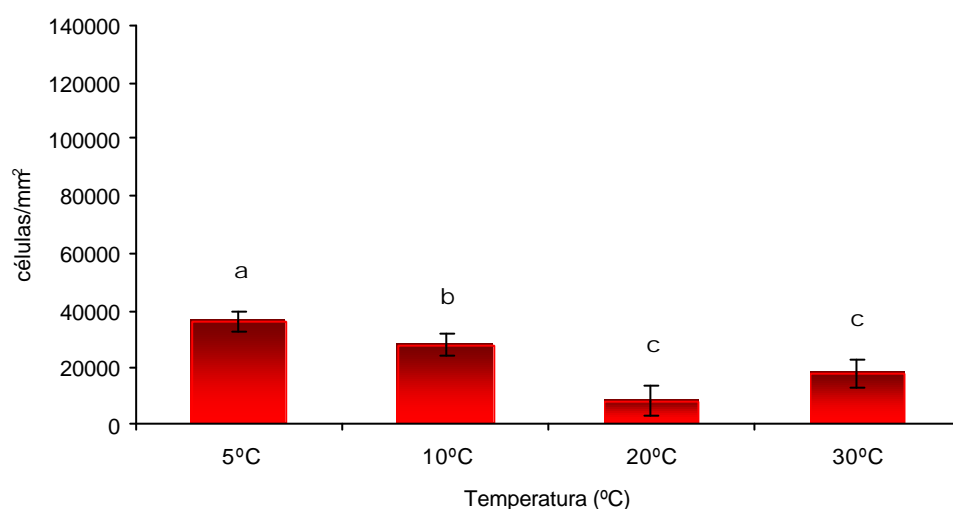


Figura 36. Recuento de células sobre la superficie del material soporte para los ensayos realizados con inoculación empleando un cultivo puro de *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343 y a cada temperatura ensayada. (ª Los grupos con distinta letra tienen diferencias estadísticamente significativas entre sí).

El test de mínimas diferencias significativas (Fig 36) muestra que esta capacidad de adhesión al soporte es estadísticamente superior a 5°C que la obtenida a mayores temperaturas. Este test mostró asimismo que a partir de 20°C no existieron diferencias significativas. Hay que reseñar que el número de células adheridas al soporte al inocular el sistema con esta cepa es también más bajo que los recuentos obtenidos con el resto de inoculantes.

Tabla 15. Análisis de la varianza para el número de microorganismos presentes en la biopelícula en función de la temperatura en los ensayos con inoculación por un cultivo puro de *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significación
Entre grupos	$1,30867 \times 10^{10}$	3	$4,36222 \times 10^9$	14,60	0,0000
Por temperatura	$3,79495 \times 10^{10}$	127	$2,98815 \times 10^8$		
Total corregido	$5,10362 \times 10^{10}$	130			

4.4 RESULTADOS DE LA CAPACIDAD DE ELIMINACIÓN DE NITRÓGENO POR EL SISTEMA

Terminada la fase de inoculación, comenzó el empleo del sistema inoculado de filtros sumergidos para la descontaminación de aguas subterráneas con las características ya especificadas en el capítulo 3.

El agua influente contenía como único compuesto nitrogenado el nitrato, mientras que en el agua efluente podían aparecer concentraciones residuales de nitrato, nitrito procedente de una desnitrificación incompleta e incluso amonio y nitrógeno orgánico procedente de la biopelícula. Los dos últimos compuestos se consideraron despreciables ante la baja concentración observada para ellos, considerando tan solo la presencia de nitrato y nitrito.

Teniendo en cuenta estas posibilidades, la concentración de nitrógeno total (N_t) se empleó para valorar la capacidad de eliminación de nitrógeno del sistema a diferentes temperaturas de trabajo. Mientras que los estudios concretos sobre la presencia de nitrito en el efluente tratado nos permitían valorar la influencia de la temperatura en la acumulación de este ión, cuya presencia en el efluente final limita la calidad del agua en su uso para consumo humano.

4.4.1 Resultados de la evolución de los valores de N_t en el efluente.

La evolución en los valores de nitrógeno total (iones nitrato y nitrito) en el efluente tratado marcan la capacidad del sistema en eliminación de nitrato de aguas subterráneas contaminadas, siendo por lo tanto el parámetro de referencia más importante para valorar

la eficacia del proceso. Este parámetro nos permitió igualmente realizar un seguimiento sobre el estado del sistema, diferenciando a grandes rasgos dos fases tras la inoculación:

- *fase de estabilización*, donde los rendimientos de eliminación de nitrógeno fueron ascendentes e irregulares.
- *fase estable*. El sistema se estabiliza en su capacidad de eliminar nitrógeno y los rendimientos en eliminación mantienen cierta regularidad. A partir de ese momento, las diferencias en los valores de nitrógeno total de los análisis realizados comenzaron a ser pequeñas, dejando de apreciarse una variación considerable de dichos valores.

La representación gráfica de los valores de nitrógeno total permitió observar la separación entre ambas fases, valorando así la influencia de la temperatura para cada tipo de inoculación aplicada, tanto en su fase de estabilización como en la fase estable.

4.4.1.1 Evolución de la capacidad de eliminación de N_t del filtro sumergido sin inoculación previa.

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados a las distintas temperaturas en los que se persiguió la formación de la biopelícula a partir de la microbiota presente en el agua subterránea contaminada, mostraron una baja capacidad de eliminación de nitrógeno a todas las temperaturas ensayadas (Figura 37). A lo largo del tiempo en el que se desarrolló cada experimento, no se apreciaron variaciones de consideración en la capacidad de eliminación de nitrógeno.

Aún siendo muy pobres los resultados de eliminación de nitrógeno, es destacable una mínima influencia de la temperatura, ya que en los ensayos a 20 y 30°C los valores de eliminación se situaron por encima de los obtenidos a 5 y a 10°C. Es imposible diferenciar aquí una fase de estabilización de una fase estable, ya que los valores no manifestaron ninguna tendencia ascendente a la estabilidad durante el espacio de tiempo en el que se mantuvo el experimento.

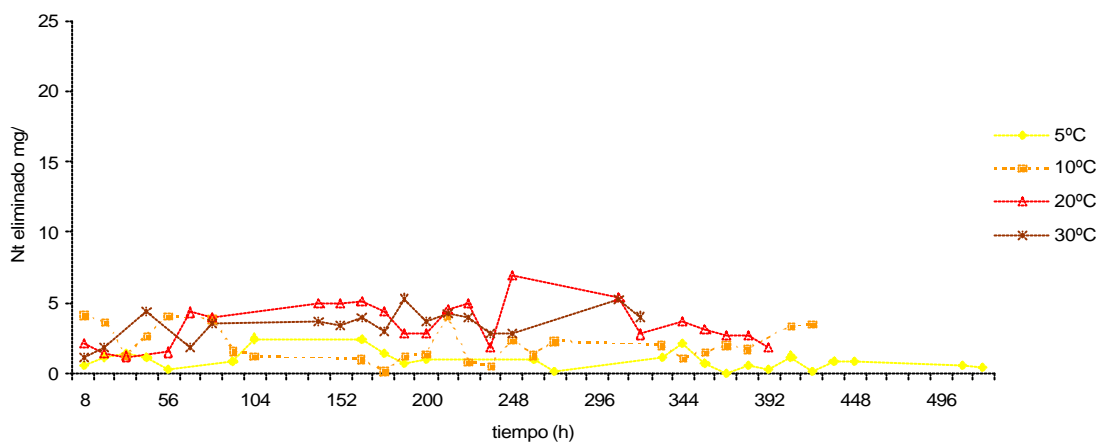


Figura 37. Evolución en el tiempo de la capacidad de eliminación de N_t del sistema de filtros sumergidos sin inoculación previa.

4.4.1.2 Evolución de la capacidad de eliminación de N_t del filtro sumergido inoculado con fango activo.

Los ensayos con inoculación previa del sistema con fango activo arrojaron los resultados de evolución de N_t mostrados en la figura 38. Puede apreciarse una gran diferencia en la evolución de dichos datos en comparación con los obtenidos de los ensayos con el sistema sin inoculación previa. Ya para estos ensayos se pudieron diferenciar las dos fases acontecidas con la evolución temporal del proceso (fase de estabilización y fase estable).

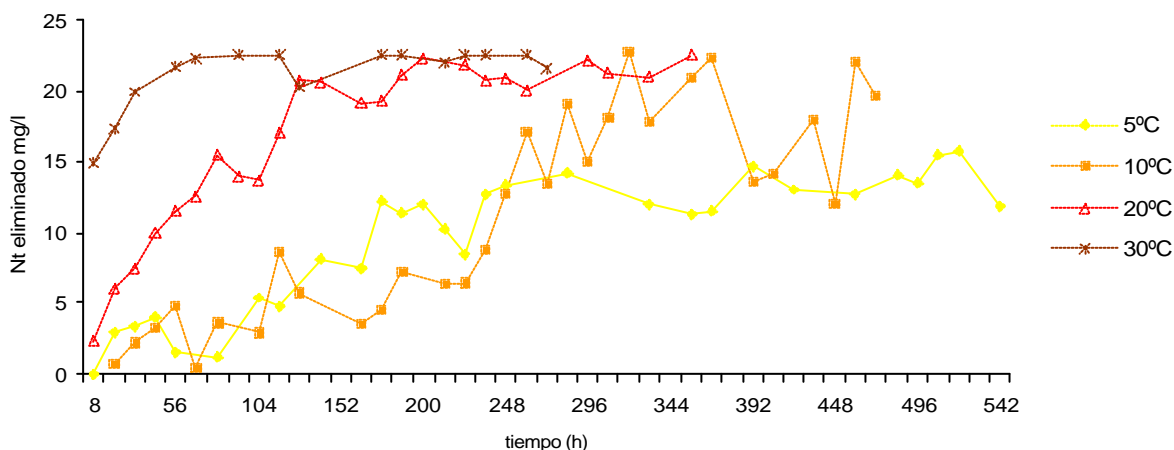


Figura 38. Evolución en el tiempo de la capacidad de eliminación de N_t del sistema de filtros sumergidos inoculado con fango activo.

Después de la fase de inoculación, y al iniciar el tratamiento de descontaminación del agua subterránea contaminada con $22,58 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{l}$, la evolución de los valores de

4.- RESULTADOS

nitrógeno total del efluente (nitrato y nitrito) mostraron la capacidad del sistema para su eliminación, la cual mostró diferencias importantes en relación con la temperatura. Para todas las temperaturas ensayadas, los valores de eliminación de nitrógeno total mostraron un patrón similar de comportamiento, que consistió en una fase inicial de capacidad de eliminación de nitrógeno ascendente e irregular seguida de una fase posterior en la que la eliminación alcanzó cierta estabilidad. Sin embargo, a medida que la temperatura de ensayo aumentó, el tiempo necesitado para alcanzar condiciones más estables de funcionamiento fue más corto. Como se muestra en la figura 38, el sistema necesitó alrededor de 6 días para alcanzar una eliminación constante de nitrógeno total en los ensayos a 20°C, y menos de 50 horas a 30°C. Sin embargo, para los ensayos a 5 y 10°C el comienzo de la fase estable fue menos evidente, con alta variabilidad en la eliminación de nitrógeno aún después de 3 semanas de ensayo

Bajo nuestras condiciones experimentales y para el rango de temperaturas estudiado, los datos de evolución de la capacidad de eliminación de nitrógeno con respecto al tiempo se ajustaron a una regresión logarítmica (Tabla 16), obteniéndose para esta expresión matemática el mayor coeficiente de correlación de entre los posibles ajustes, siendo este comportamiento coincidente para todas las temperaturas ensayadas. Este hecho pone de manifiesto el similar comportamiento del sistema a diferentes temperaturas, y cómo este parámetro afectó en relación al tiempo necesitado para alcanzar condiciones estacionarias. Los coeficientes de las ecuaciones muestran la respuesta del sistema a condiciones externas para el rango de temperaturas y periodo de tiempo estudiado.

Tabla 16. Ajustes logarítmicos de la evolución de los valores de eliminación de N_t con respecto al tiempo en los ensayos realizados con inoculación previa del filtro con licor mezcla a diferentes temperaturas.

Temperatura	Coeficiente de correlación	$y = a + b\ln(x)$	
		a	b
5°C	0.883	-22.2149	5.96082
10°C	0.840	-23.5705	6.48497
20°C	0.962	-11.6669	5.9019
30°C	0.916	11.658	2.13778

El valor del coeficiente “a” revela la actividad para t_0 del sistema a cada temperatura. Este valor es más alto en el experimento a 30°C, desciende a 20°C y es mínimo a 10 y 5°C. Por otro lado, el coeficiente “b” está directamente relacionado con el

incremento a lo largo del tiempo de la capacidad de eliminación de nitrógeno. A 30°C, se observó un valor más bajo, debido principalmente a una evolución más leve en los rendimientos de eliminación de nitrógeno, justificada por su alta capacidad inicial de eliminación. Para el resto de temperaturas, los coeficientes fueron similares entre sí, indicando una evolución más fuerte que a 30°C y con más similitudes entre dichas temperaturas.

4.4.1.3 Evolución de la capacidad de eliminación de N_t del filtro sumergido inoculado con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24.

Al inocular el sistema con un cultivo puro de *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 se obtuvieron los resultados de eliminación de N_t mostrados en la figura 39. Puede observarse de nuevo una diferenciación de las dos fases en el proceso, estabilización y estable. Sin embargo, en el uso de esta cepa como inoculante selectivo puede apreciarse que la fase estable se caracteriza por una menor variabilidad en la capacidad de eliminación llegando a la casi total eliminación de N_t para todas las temperaturas ensayadas.

De nuevo, la temperatura se mostró como un factor fundamental a la hora de alcanzar la fase estable. A la temperatura de funcionamiento de 5°C, el sistema precisó nuevamente de 21 días para alcanzar la estabilidad en eliminación de nitrógeno total, tal como sucedió en los ensayos con el sistema inoculado con fango activo. Este tiempo se vio reducido a 11 días al aumentar la temperatura de ensayo a 10°C, a algo más de 6 días a 20°C y a tan sólo 72 horas a 30°C (Figura 39).

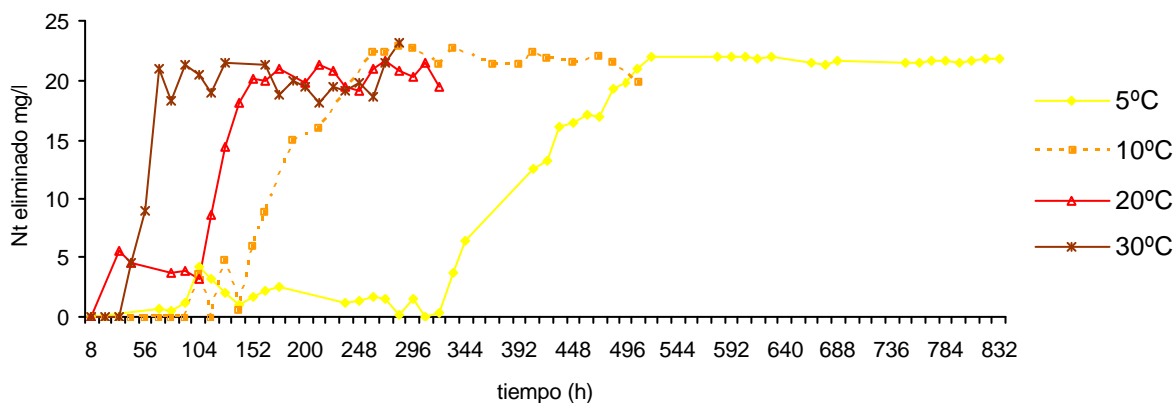


Figura 39. Evolución en el tiempo de la capacidad de eliminación de N_t del sistema de filtros sumergidos inoculado con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24.

Al igual que ocurrió con los ensayos con fango activo como inoculante, la evolución de la capacidad del sistema en eliminación de nitrógeno a lo largo del tiempo se ajustó a una regresión logarítmica para todas las temperaturas ensayadas (Tabla 17). Este ajuste matemático presentó la mejor correlación de todos los posibles, lo cual nos permite realizar una comparación más eficaz, así como obtener conclusiones claras de cómo afecta la temperatura sobre este sistema. Esta comparativa es extensible a los sistemas inoculados con fango activo cuya evolución temporal en eliminación de nitrógeno también se ajustó a una regresión logarítmica.

Tabla 17. Ajustes logarítmicos de la evolución de los valores de eliminación de N_t con respecto al tiempo en los ensayos realizados con inoculación previa del filtro con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 a diferentes temperaturas.

Temperatura	Coeficiente de correlación	y = a + bLn(x)	
		a	b
5°C	0.866	-56,7433	11.7014
10°C	0.852	-31,1043	8,47677
20°C	0.920	-49,2535	11,6862
30°C	0.846	-18,945	7,38504

Los coeficientes de las ecuaciones indicaron de nuevo que la actividad del sistema a t_0 fue mínima a 5°C, y máxima a 30°C, aunque los coeficientes fueron significativamente inferiores a los alcanzados con el sistema inoculado con fango activo. El incremento de la capacidad de eliminación de nitrato con el tiempo (coeficiente “b”) estaba igualmente influenciado por el punto de partida (coeficiente “a”), mostrándose menor para el sistema con mayor capacidad inicial, aunque para estos ensayos las diferencias no fueron muy significativas entre ensayos.

4.4.1.4 Evolución de la capacidad de eliminación de N_t del filtro sumergido inoculado con *Pseudomonas mandelii* cepa A103.

La figura 40 muestra los resultados obtenidos en eliminación de N_t en el sistema a las diferentes temperaturas usando *Pseudomonas mandelii* cepa A103 como inoculante selectivo. Los valores de eliminación de N_t alcanzados a 5°C fueron bastante bajos en comparación con los obtenidos para el resto de temperaturas, llegando a una fase estable a los 6 días de funcionamiento, donde la capacidad de eliminación de nitrógeno distaba mucho de alcanzar rendimientos del 100 %.

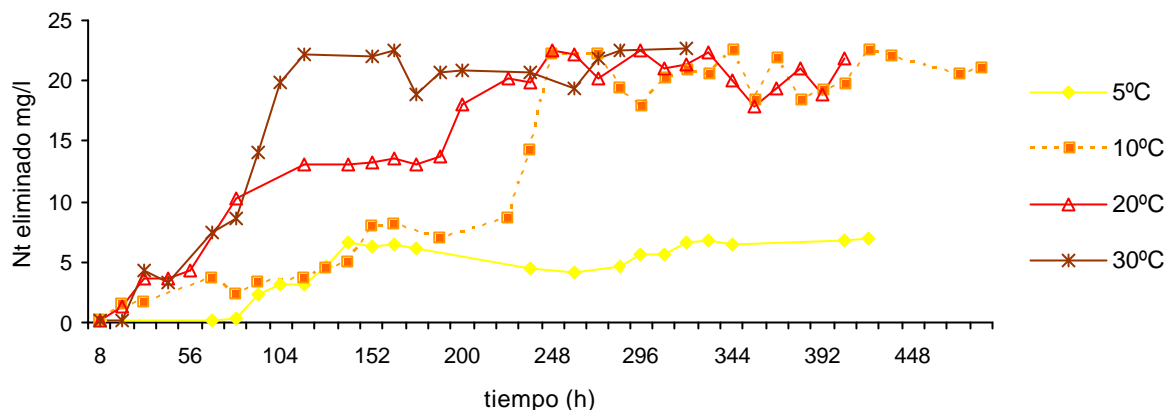


Figura 40. Evolución en el tiempo de la capacidad de eliminación de N_t del sistema de filtros sumergidos inoculado con *Pseudomonas mandelii* cepa A 103.

Para los ensayos a 20°C, el tiempo necesario para alcanzar valores estables fue ligeramente menor que a 10°C (poco más de 9 días), y a 30°C se necesitaron 5 días, alcanzando finalmente una fase estable con capacidad para eliminar la casi totalidad del nitrógeno presente en el influente. En general, esta cepa necesitó más tiempo para alcanzar una estabilización que en el caso del inoculante *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 o fango activo, a las mismas temperaturas.

Nuevamente los datos de evolución temporal en eliminación de nitrógeno, obtenidos en estos ensayos, encontraron su mejor ajuste en la regresión logarítmica (tabla 18). Para estos ensayos, puede apreciarse la similitud en la respuesta del sistema a 10 y a 30°C, el incremento de la capacidad de eliminación de nitrógeno fue similar en ambos experimentos, separados por un periodo de tiempo que los diferencia en cuanto al intervalo temporal necesario en cada uno de ellos para alcanzar condiciones estables. A 5°C, el menor valor del coeficiente “b” se debe a la pobre evolución en los valores de eliminación de N_t , debido a que el sistema alcanzó en poco tiempo un período estable de funcionamiento pero con una eliminación baja de nitrógeno.

Los coeficientes obtenidos para este ensayo a temperaturas entre 10 y 30 °C son similares a los alcanzados para el sistema con licor mezcla pero a temperaturas entre 5 y 10°C, contando como diferencia principal el poder alcanzar con el inoculante selectivo mayores rendimientos en la fase estable, trabajando a mayor temperatura.

4.- RESULTADOS

Tabla 18. Ajustes logarítmicos de la evolución de los valores de eliminación de N_t con respecto al tiempo en los ensayos realizados con inoculación previa del filtro con *Pseudomonas mandelii* cepa A103 a diferentes temperaturas.

Temperatura	Coeficiente de correlación	$y = a + b\text{Ln}(x)$	
		a	b
5°C	0.786	-5.773	2.0311
10°C	0.848	-24.8136	7.3169
20°C	0.940	-19.324	6.8152
30°C	0.912	-21.4198	7.8365

4.4.1.5 Evolución de la capacidad de eliminación de N_t del filtro sumergido inoculado con *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343.

El inoculante selectivo *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343 permitió al sistema obtener los resultados de eliminación de N_t presentados en la figura 41. Los datos de la evolución temporal en eliminación de nitrógeno también encontraron en el modelo logarítmico su mejor ajuste (Tabla 19).

Es reseñable el similar comportamiento de este sistema en los ensayos realizados a 5 y 10°C con respecto a los realizados con *Pseudomonas mandelii* cepa A103 a las mismas temperaturas. Los coeficientes de las ecuaciones de ambas cepas en los ensayos realizados a estas temperaturas indican dicha similitud en la respuesta de ambos sistemas.

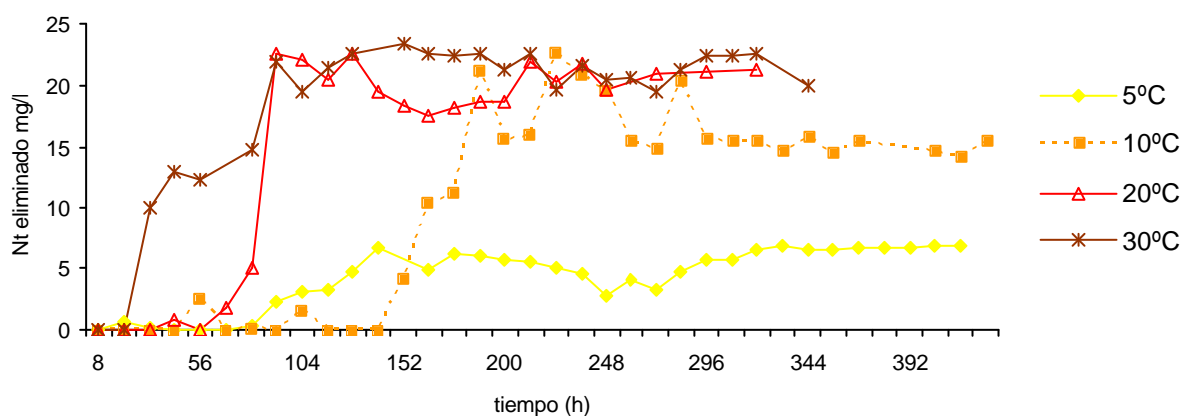


Figura 41. Evolución en el tiempo de la capacidad de eliminación de N_t del sistema de filtros sumergidos inoculado con *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343.

La influencia de la temperatura se dejó sentir de nuevo en los ensayos realizados con inoculación previa de esta cepa, tanto en el tiempo necesario para alcanzar condiciones

estacionarias como para los valores de eliminación de nitrógeno total obtenidos. De nuevo, al trabajar a 5°C de temperatura, la fase estable se alcanzó más rápidamente que a 10°C, tras 5 días de funcionamiento, pero al igual que ocurrió con el sistema inoculado selectivamente con *Pseudomonas mandelii*, con menor capacidad de eliminación. Para los ensayos a 10°C se precisaron 8 días, pero fue apreciable la menor capacidad en eliminación de nitrógeno mostrada por el sistema. A 20 y a 30°C se necesitó el mismo tiempo para alcanzar datos estables, unas 96 horas, aunque son destacables las oscilaciones en los rendimientos alcanzados.

Tabla 19. Ajustes logarítmicos de la evolución de los valores de eliminación de N_t con respecto al tiempo en los ensayos realizados con inoculación previa del filtro con *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343 a diferentes temperaturas.

Temperatura	Coeficiente de correlación	y = a + bLn(x)	
		a	b
5°C	0.849	-7.31886	2.2709
10°C	0.762	-23.7491	6.69807
20°C	0.835	-25.2391	8.42023
30°C	0.891	-12.0439	6.23117

4.4.2 Resultados de rendimiento en eliminación de N_t en condiciones estacionarias.

Alcanzada la estabilidad en el sistema, se determinó la capacidad de eliminación de nitrógeno del filtro sumergido en gr de N_t por unidad de superficie de soporte y día, en función de la temperatura y para todos los sistemas ensayados (Figura 42).

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados sin inoculación previa del filtro muestran que se obtuvo un rendimiento bajo a todas las temperaturas ensayadas (Fig 42 A), aunque puede apreciarse una influencia de la temperatura en esta capacidad de eliminación, ya que a medida que aumentó, la capacidad de eliminación de nitrógeno también aumentó significativamente, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas entre los valores alcanzados (Tabla 20), hasta llegar a los 20°C de temperatura. Por encima de este punto no se encontraron diferencias estadísticamente significativas según el test de mínimas diferencias significativas ($p < 0.01$) mostrado en la figura 42 A.

4.- RESULTADOS

Los rendimientos de eliminación de nitrógeno total fueron muy bajos, incluso a la temperatura de 30°C para la que se alcanzó la mayor capacidad con rendimientos máximos en torno al 15 % con una tasa de eliminación de 0.083 gN_t/m²-d,

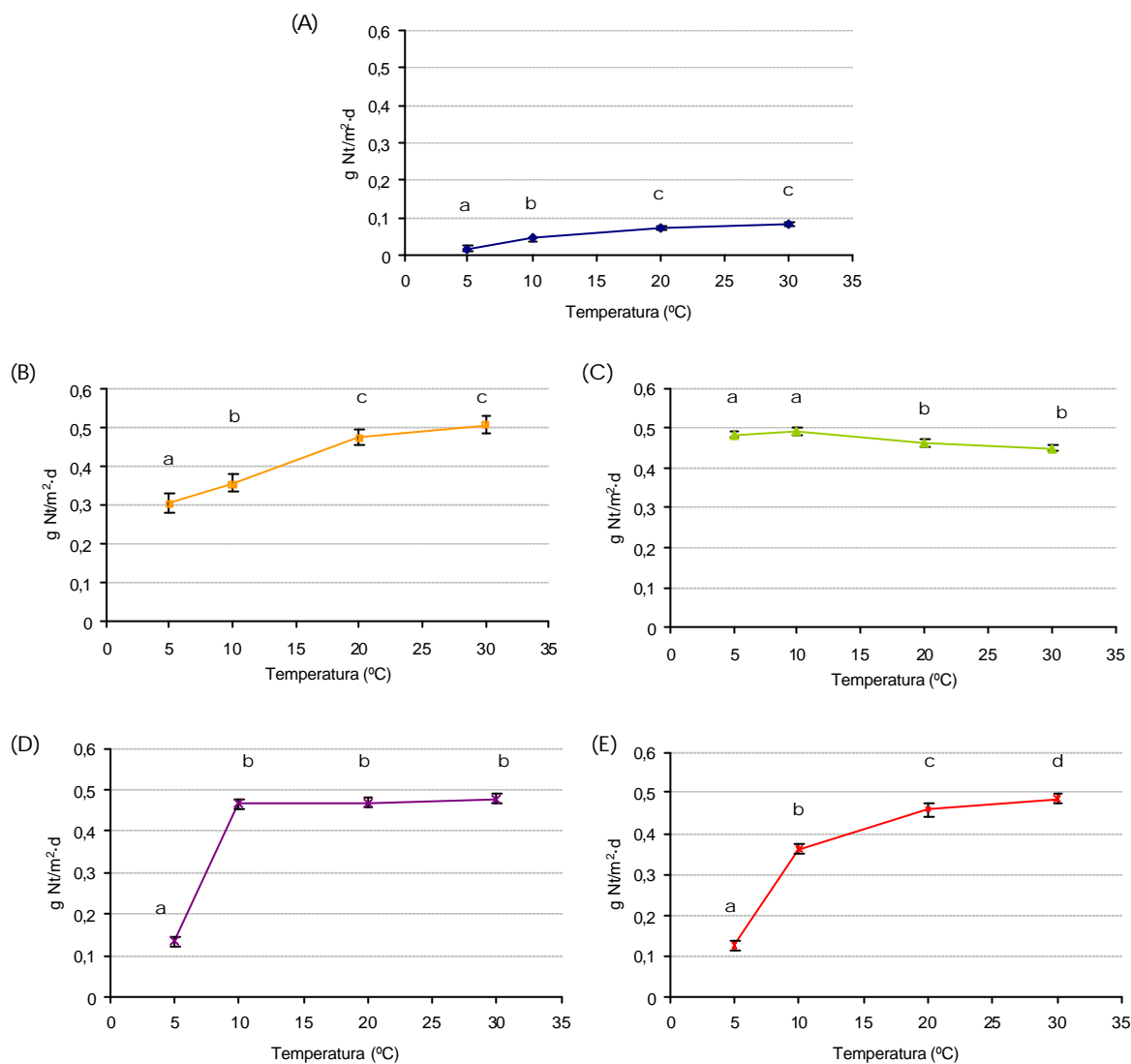


Figura 42. Tasa de eliminación de nitrógeno del sistema en los ensayos realizados: (a) sin inoculación previa del filtro sumergido, (b) inoculado con fango activo, (c) inoculado con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24, (d) inoculado con *Pseudomonas mandelii* cepa A103 y (e) inoculado con *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343, en función de la temperatura. † Grupos con distinta letra son estadísticamente diferentes entre sí).

Tabla 20. Análisis de la varianza para el rendimiento en eliminación de N_t en función de temperatura en los ensayos sin inoculación previa del filtro sumergido.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significación
Entre grupos	0,587749	3	0,0195916	36,52	0,0000
Por temperatura	0,0461312	86	0,000536409		
Total corregido	0,104906	89			

Para las curvas obtenidas se procedió a realizar un estudio de ajuste matemático (tabla 21), obteniéndose como coeficiente de correlación más significativo, el correspondiente a una regresión logarítmica. Es destacable la escasa correlación alcanzada para las diferentes expresiones matemáticas empleadas.

Tabla 21. Ajustes realizados de los valores de eliminación de N_t en función de la temperatura en los ensayos sin inoculación del filtro sumergido.

MODELO	Coefficiente de correlación	a	b
$y = a + b\ln(x)$	0,7415	-0,04316	0,0382
$y = a + b/x$	-0,7368	0,09335	-0,4002
$y = a + bv x$	0,726	-0,02372	0,02062
$y = (a + bx)^2$	0,7123	0,11996	0,00619
$y = \exp(a+b/x)$	-0,7048	-2,10937	-11,8481
$y = a + bx$	0,7012	0,01389	0,00256
$y = a x^b$	0,6831	-6,04351	1,08912
$y = \exp(a + bx) / 1 + \exp(a + bx)$	0,6292	-4,362	0,0731
$y = \exp(a + bx)$	0,6232	-4,37575	0,07029

Los resultados de eliminación de nitrógeno total en la fase estable para el sistema inoculado con fango activo (Figura 42 B) pusieron de manifiesto la influencia de la temperatura en el proceso, la cual claramente favorecía la eliminación de nitrógeno conforme se incrementaba la temperatura, existiendo diferencias estadísticamente significativas para las tasas de eliminación alcanzadas con cada temperatura como muestra la tabla 22.

Tabla 22. Análisis de la varianza para el rendimiento en eliminación de N_t en función de temperatura en los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con fango activo.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significación
Entre grupos	0,312596	3	0,104199	37,69	0,0000
Por temperatura	0,110579	40	0,00276448		
Total corregido	0,423175	43			

4.- RESULTADOS

La máxima tasa de eliminación de nitrógeno total se alcanzó en el rango de temperaturas de 20-30°C, eliminando más del 90% del N_t , con una tasa máxima de 0,508 $gN_t/m^2 \cdot d$ para 30 °C. La bajada de la temperatura a 10°C provocó una caída del rendimiento hasta el 69% (0.355 $gN_t/m^2 \cdot d$), y para una temperatura de ensayo de 5°C el sistema no era capaz de eliminar más del 60% (0,305 $gN_t/m^2 \cdot d$).

Nuevamente se procedió a realizar un estudio sobre los ajustes matemáticos de los datos obtenidos en el estudio, volviendo a alcanzarse una mayor correlación con la regresión logarítmica tal como se aprecia en la tabla 23, aunque otras expresiones matemáticas alcanzaban también similitudes en el coeficiente de correlación. Esta regresión logarítmica no es útil para comparar la capacidad de eliminación de nitrógeno del sistema inoculado con fangos activos y del sistema sin inocular, destacando especialmente la capacidad del sistema a bajas temperaturas (coeficiente “a”) el cual es significativo para el sistema inoculado con fangos activos, mientras que es negativo para el sistema sin inocular.

Tabla 23. Ajustes realizados de los valores de eliminación de N_t en función de la temperatura en los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con fango activo

MODELO	Coefficiente de correlación	a	b
$y = a + b \ln(x)$	0,8488	0,27009	0,00887
$y = a + b \sqrt{x}$	0,8485	0,15326	0,06798
$y = a + b/x$	-0,8176	0,52561	-1,16077
$y = \text{normal}(a+b \ln(x))$	0,8353	-1,04113	0,31613
$y = \text{normal}(a+b \ln(x))$	0,8353	-1,04113	0,31613
$y = a + bx$	0,8346	0,27009	0,00887
$y = \exp(a + bx) / 1 + \exp(a + bx)$	0,817	-0,98331	0,03799
$y = (a + bx)^2$	0,815	0,52278	0,00713
$y = a x^b$	0,8072	-1,71975	0,31268
$y = \exp(a + bx)$	0,7912	-1,28957	0,02313
$y = \exp(a+b/x)$	0,7781	-0,62181	-3,03998
$y = 1/(a+bx)$	-0,7289	3,6072	-0,06259
$y = 1/(a+b/x)$	0,715	1,80279	8,20282

La inoculación selectiva del sistema con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 mejoró los resultados obtenidos en condiciones estacionarias en cuanto a la tasa de

eliminación de nitrógeno total a bajas temperaturas, en comparación con los resultados obtenidos para los sistemas sin inocular e inoculados con fangos activos (Figura 42 C). Cabe destacar que, al contrario de lo que ocurrió en los dos casos anteriores, un aumento de la temperatura por encima de 10°C causó un descenso en la tasa de eliminación de nitrógeno, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas entre las tasas alcanzadas a las diferentes temperaturas del ensayo (Tabla 24).

Tabla 24. Análisis de la varianza para el rendimiento en eliminación de N_t en función de temperatura en los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significación
Entre grupos	0,0165537	3	0,0055179	11,93	0,0000
Por temperatura	0,0282059	61	0,000462392		
Total corregido	0,0447596	64			

Para temperaturas bajo los 10 °C la tasa de eliminación se situó en los 0.49 $gN_t/m^2 \cdot d$ de media (95% de eliminación), disminuyendo a 0.46 y 0.45 $gN_t/m^2 \cdot d$ para los ensayos a 20 y 30°C respectivamente. Según el test de mínimas diferencias significativas (Figura 42 C) no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas para las tasas de eliminación obtenidas entre 5 y 10 °C ni entre 20 y 30 °C.

De cualquier modo, y aunque al aumentar la temperatura por encima de 10°C el sistema perdiera capacidad de eliminación de nitrógeno, fue observable el alto rendimiento de eliminación del sistema cuando se inoculó con esta cepa, ya que el menor rendimiento obtenido (a 30°C) fue de casi un 80% de eliminación de nitrógeno.

El comportamiento del sistema en los ensayos en los que se inoculó con esta cepa fue significativamente diferente al del resto de ensayos realizados con otros inoculantes. Así, los ajustes matemáticos realizados presentaron unos coeficientes de correlación bastante bajos (tabla 25), lo cual dificulta su comparativa con el resto de ensayos.

4.- RESULTADOS

Tabla 25. Ajustes realizados de los valores de eliminación de N_t en función de la temperatura en los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24.

MODELO	Coefficiente de correlación	a	b
$y = 1/(a+bx)$	-0,6392	1,9844	0,00786
$y = \exp(a + bx)$	-0,6379	-0,68707	-0,00363
$y = (a + bx)^2$	-0,6369	0,70898	-0,00123
$y = \exp(a + bx) / 1 + \exp(a + bx)$	-0,6357	0,00943	-0,00677
$y = a + bx$	-0,6356	0,50228	-0,00168
$y = a + bv x$	-0,6288	0,52432	-0,01291
$y = a x^b$	-0,-114	-0,62088	-0,04888
$y = a + b\ln(x)$	-0,6099	0,53298	-0,02265
$y = \text{normal}(a+b\ln(x))$	-0,6098	0,08321	-0,05707

Al inocular el sistema con un cultivo puro de *Pseudomonas mandelii* cepa A103 se obtuvieron los resultados de rendimiento en eliminación de N_t mostrados en la figura 42 D. El análisis de la varianza de los resultados obtenidos (Tabla 26) puso de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las tasas de eliminación de nitrógeno alcanzadas para cada temperatura ensayada. El test de mínimas diferencias significativas señaló que por encima de 10°C no existían diferencias estadísticamente significativas (Figura 41 D), manteniéndose siempre los rendimientos de eliminación por encima del 90%. Sin embargo, para la temperatura de 5°C se apreció una pérdida importante en la tasa de eliminación, alcanzándose un valor de de 0,135 $gN_t/m^2 \cdot d$, alrededor de un 26%.

Tabla 26. Análisis de la varianza para el rendimiento en eliminación de N_t en función de temperatura en los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con *Pseudomonas mandelii* cepa A103.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significación
Entre grupos	1,1943	3	0,398099	431,11	0,0000
Por temperatura	0,0489417	53	0,000923429		
Total corregido	1,24324	56			

El comportamiento de este sistema en cuanto a su tendencia hacia valores asintóticos a medida que se incrementó de temperatura quedó demostrado en los ajustes encontrados en función de la temperatura de ensayo (Tabla 27). Los ajustes para los que se alcanzó una mayor correlación presentaban claramente esta tendencia.

Tabla 27. Ajustes realizados de los valores de eliminación de N_t en función de la temperatura en los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con *Pseudomonas mandelii* cepa A103.

MODELO	Coefficiente de correlación	a	b
$y = a + b/x$	-0,9114	0,59725	-2,12751
$y = \exp(a+b/x)$	-0,9094	-0,2855	-7,94065
$y = 1/(a+b/x)$	0,8846	0,10076	34,4305
$y = a + b\ln(x)$	0,8018	-0,06586	0,17921
$y = \text{normal}(a+b\ln(x))$	0,8002	-1,72194	0,55008
$y = a x^b$	0,7963	-2,75259	0,66576
$y = a + b \cdot x$	0,7300	0,04977	0,09041
$y = a + b x$	0,6577	0,2259	0,10515
$y = (a + b x)^2$	0,6547	0,45406	0,00992
$y = \exp(a + b x) / 1 + \exp(a + b x)$	0,6533	-1,38859	0,05441
$y = \exp(a + b x)$	0,6491	-1,66488	0,03882
$y = 1/(a+b x)$	-0.6265	6.06173	-0.16701

Para la regresión logarítmica, que fue la más significativa en los sistemas sin inocular e inoculado con fango activo, se alcanzó una correlación significativa que nos permitía comparar los sistemas en función de los coeficientes alcanzados, quedando claro el bajo rendimiento de este sistema a bajas temperaturas en función del coeficiente “a”, aunque la tasa de crecimiento (coeficiente “b”) manifestaba el rápido incremento en la capacidad de eliminación de nitrógeno para temperaturas sobre los 10 °C.

Nuevamente, El uso del inoculante *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343 a las temperaturas de ensayo experimentadas dio como resultado unas tasas de eliminación de nitrógeno con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 28).

Tabla 28. Análisis de la varianza para el rendimiento en eliminación de N_t en función de temperatura en los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significación
Entre grupos	1,76894	3	0,589647	579,18	0,0000
Por temperatura	0,0773731	76	0,0101807		
Total corregido	1,84632	79			

Un aumento de la temperatura supuso un aumento en la capacidad de eliminación de N_t (Figura 42 E), obteniendo para la temperatura de 5°C las peores tasas de eliminación de nitrógeno de entre los sistemas inoculados (0,127 $gN_t/m^2 \cdot d$) con rendimientos que no llegaron al 25% de eliminación. Sin embargo para la temperatura de 30 °C las tasas de eliminación fueron significativas (0.487 $gN_t/m^2 \cdot d$) con rendimientos del 95%.

4.- RESULTADOS

Los ajustes matemáticos para los datos obtenidos con este sistema mostraron un comportamiento similar a los obtenidos con el sistema inoculado con *Pseudomonas mandelii* (Tabla 29), siendo nuevamente significativa la regresión logarítmica con coeficientes también muy similares a los obtenidos con el sistema inoculado con *Pseudomonas mandelii*.

Tabla 29. Ajustes realizados de los valores de eliminación de N_t en función de la temperatura en los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343.

MODELO	Coefficiente de correlación	a	b
$y = a + b/x$	-0.9776	0.5674	-2.18143
$y = \exp(a+b/x)$	-0.9554	-0.35042	-8.42255
$y = a + b\ln(x)$	0.9426	-0.1652	0.20208
$y = \text{normal}(a+b\ln(x))$	0.9239	-2.03124	0.62445
$y = a + bv \ x$	0.9057	-0.60357	0.1079
$y = a \ x^b$	0.8964	-3.12618	0.75724
$y = 1/(a+b/x)$	0.8712	0.12762	39.1078
$y = a + bx$	0.8609	0.13597	0.01327
$y = (a + bx)^2$	0.8322	0.37344	0.0124
$y = \exp(a + bx) / 1 + \exp(a + bx)$	0.8239	-1.83848	0.06843
$y = \exp(a + bx)$	0.7954	-1.97246	0.04845
$y = 1 / (a + bx)$	-0.6927	7.50116	-0.21484

En general, es posible afirmar que la temperatura afectó en todos los ensayos realizados independientemente del sistema de inoculación empleado para la formación de la biopelícula. Ahora bien la tendencia si fue variable de modo que por lo general todos los sistemas incrementaban su tasa de eliminación de nitrógeno a mayor temperatura, excepto el sistema inoculado con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24.

4.4.3 Evolución temporal de la concentración de nitrito en el efluente.

La presencia de nitrito en el agua tratada puede ser un grave inconveniente para su posterior uso en el abastecimiento humano. La generación de nitrito en un sistema de desnitrificación puede tener diferentes orígenes y a su vez son diferentes los factores que afectan a su generación como el inoculante o la temperatura. Debido a esto se hace necesario realizar un control de este ión para valorar la influencia de las variables empleadas en el estudio.

4.4.3.1 Evolución de la concentración de nitrito en el efluente para los ensayos realizados sin inoculación previa del filtro sumergido.

Para el sistema sin inoculación previa se obtuvieron concentraciones de nitrito en el efluente relativamente bajas tal como se muestran en la figura 43, destacando de forma más excepcional los ensayos a 20°C, para los que se alcanzaron valores de hasta 24 mg/l.

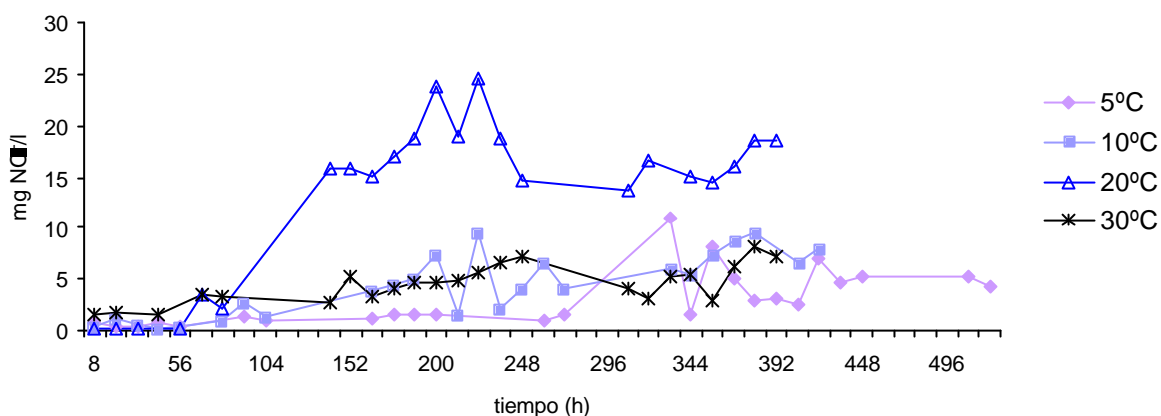


Figura 43. Evolución en el tiempo de la concentración de nitrito en el efluente en los ensayos realizados sin inoculación previa del filtro sumergido a las cuatro temperaturas ensayadas.

Para el resto de temperaturas se apreció un comportamiento similar con oscilaciones entre máximos y mínimos que podrían pasar desde 1 a 10 mg/l. Es destacable en todos los casos una tendencia alcista con el tiempo en las concentraciones de nitrito en el efluente final, para todas las temperaturas ensayadas.

4.4.3.2 Evolución de la concentración de nitrito en el efluente para los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con fango activo.

Los valores de nitrito en los sistemas que fueron inoculados previamente arrojaron datos de concentración de nitrito diferentes a los del sistema sin inocular. En el caso de los ensayos con fango activo como inoculante del sistema, se produjo una acumulación de nitrito en el efluente relacionada con la temperatura de ensayo (Fig. 44).

Los datos recogidos permitieron observar un comportamiento similar a todas las temperaturas ensayadas. Durante las primeras horas de funcionamiento, se detectaron concentraciones relativamente bajas de nitrito en el efluente. Posteriormente, estos valores

4.- RESULTADOS

sufrieron un incremento, alcanzando un máximo de concentración de nitrito que tendió a disminuir con posterioridad. El tiempo transcurrido en el que este cambio tuvo lugar, estaba relacionado con la temperatura, ocurriendo dicho proceso más tarde a temperaturas más frías. Son destacables los resultados apreciados para los ensayos a 5 y 10 °C, alcanzándose los máximos en la concentración de nitrito de forma más tardía a 10°C que a 5°C.

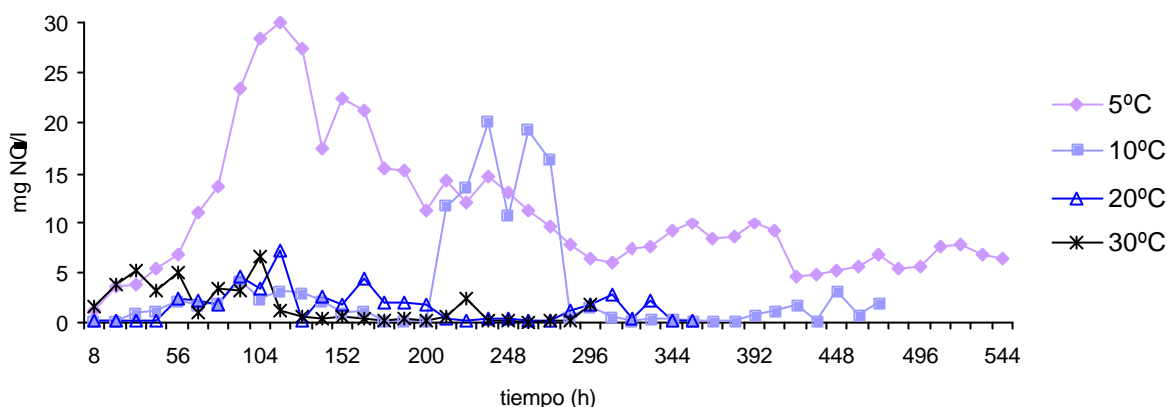


Figura 44. Evolución en el tiempo de la concentración de nitrito en el efluente en los ensayos realizados con inoculación previa con fango activo a las cuatro temperaturas ensayadas.

El valor máximo de concentración de nitrito que se observó estuvo relacionado también con la temperatura de ensayo. Así, la concentración máxima de nitrito fue mayor a menor temperatura, y descendió a medida que aumentó ésta. Los valores oscilaron entre 30 mg NO₂⁻/l a 5°C y 6,58 mg NO₂⁻/l a 30°C.

Después de alcanzar este valor máximo, los niveles de nitrito tendieron a decrecer gradualmente hasta alcanzar valores con leves variaciones, correspondiéndose con el tiempo de la fase estable del sistema. Los valores de nitrito recogidos en estas condiciones estables también se vieron influenciadas por la temperatura. A 5°C, el valor medio de concentración de nitrito fue de 7,01 mg/l, significativamente mayor que los valores detectados a mayores temperaturas, que no excedieron de 2 mg/l.

4.4.3.3 Evolución de la concentración de nitrito en el efluente para los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24.

El patrón de comportamiento del sistema de filtros sumergidos con respecto a la concentración de nitrito en el efluente procedente del sistema inoculado con fango activo volvió a presentarse en los resultados recogidos en los ensayos con inoculación selectiva por *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 (Figura 45).

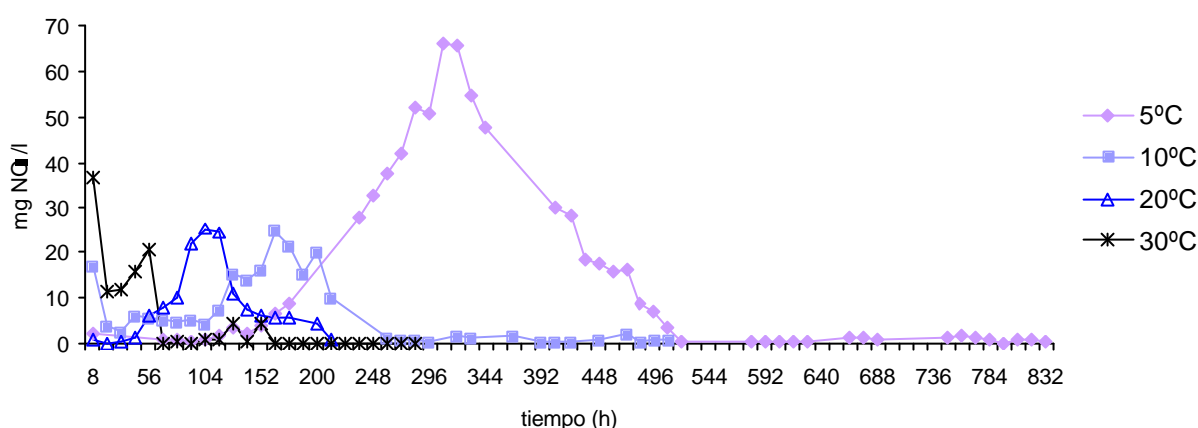


Figura 45. Evolución en el tiempo de la concentración de nitrito en el efluente en los ensayos realizados con inoculación previa con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 a las cuatro temperaturas ensayadas.

De nuevo se observó que para todas las temperaturas se da un modelo similar de comportamiento, con una fase inicial de concentraciones bajas de nitrito, seguido de un máximo y de una reducción posterior hasta llegar a unos valores estables (condiciones estacionarias). La influencia de la temperatura en dicho patrón de comportamiento volvió a ser evidente. A medida que la temperatura de ensayo aumentó, el valor máximo alcanzado de ión nitrito fue más bajo, se alcanzó en menos tiempo y su posterior reducción fue más rápida.

Sin embargo, hay que reseñar que cuando se utilizó este inoculante, todos los máximos alcanzados fueron más altos, salvo para el ensayo realizado a 10°C. Así, a 30°C, el máximo alcanzó un valor de 20mg/l, a 20 y a 10°C este valor osciló en torno a 25 mg/l y a 5°C se alcanzó un valor extremadamente alto, de 65,88 mg/l. Sin embargo, una vez alcanzado dicho máximo, los valores recogidos en condiciones estables del sistema fueron muy bajos, sin llegar a superarse el valor de 1,7 mg/l de nitrito. Asimismo, hay que

destacar que el tiempo necesitado por el sistema para reducir sus valores de nitrito cuando fue inoculado con esta cepa, fue mayor que en el caso de los ensayos donde se inoculó con fango activo.

4.4.3.4 Evolución de la concentración de nitrito en el efluente para los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con *Pseudomonas mandelii* cepa A103.

La acumulación de nitrito en el efluente para los ensayos en los que el sistema fue inoculado previamente por *Pseudomonas mandelii* cepa A103 también tuvo lugar del mismo modo que en los casos anteriores, salvo por algunas diferencias (Fig. 46).

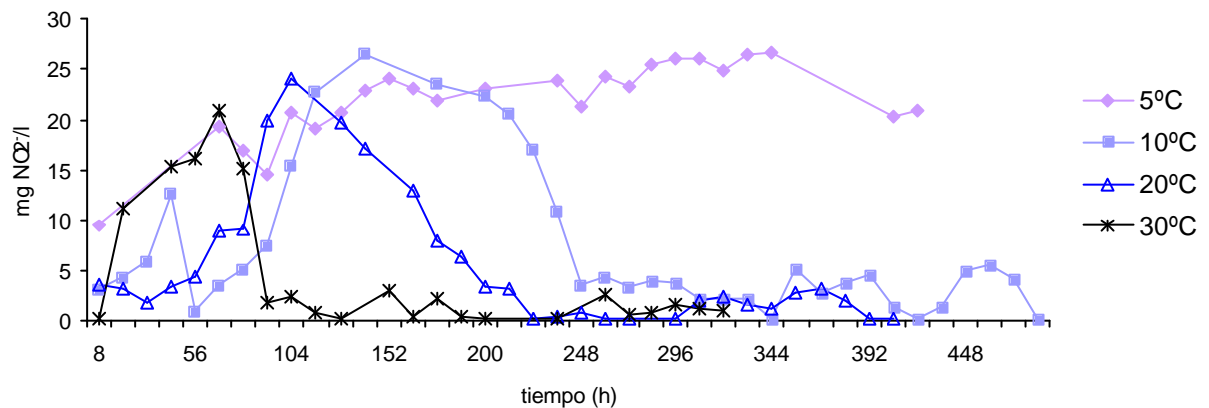


Figura 46. Evolución en el tiempo de la concentración de nitrito en el efluente en los ensayos realizados con inoculación previa con *Pseudomonas mandelii* cepa A103 a las cuatro temperaturas ensayadas.

La temperatura fue de nuevo factor fundamental en el patrón de comportamiento de dicho sistema en relación a los valores de nitrito en el efluente. A 10°C y temperaturas superiores, se repitió el modelo de comportamiento ya descrito para los otros inoculantes, con unas primeras horas de funcionamiento con bajas concentraciones, seguidas de un máximo de nitrito que decreció posteriormente. Estos máximos de nitrito también se alcanzaron más rápidamente a mayor temperatura de ensayo, siendo también más bajos; dichos máximos fueron muy similares a los alcanzados a las mismas temperaturas en los ensayos con el inoculante selectivo *Pseudomonas fluorescens* cepa A24, mostrando por ello ambas cepas un comportamiento parecido a partir de 10°C de temperatura.

Sin embargo, a 5°C, el máximo alcanzado en cuanto a valores de nitrito en el efluente se mantuvo constante y no decreció posteriormente durante el tiempo de ensayo, manteniendo unos valores constantes, en torno a 25 mg/l.

4.4.3.5 Evolución de la concentración de nitrito en el efluente para los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343.

La inoculación del filtro sumergido con *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343 también dio lugar a una acumulación del ión nitrito en el efluente a todas las temperaturas ensayadas (Figura 47).

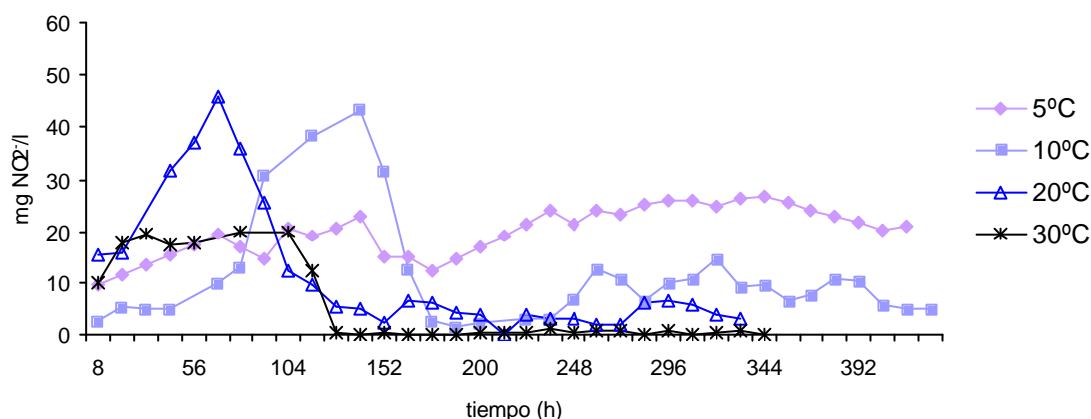


Figura 47. Evolución en el tiempo de la concentración de nitrito en el efluente en los ensayos realizados con inoculación previa con *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343 a las cuatro temperaturas ensayadas.

A 30°C, este máximo fue de 20 mg/l y se mantuvo durante 72 horas, descendiendo después y manteniéndose en valores inferiores a 1 mg/l. A 10 y 20°C, los máximos de nitrito alcanzados fueron elevados, de 43 y 45 mg/l respectivamente, también alcanzándose más rápidamente a mayor temperatura. Sin embargo los valores de nitrito en condiciones estacionarias fueron algo más elevados, de 4 y 8 mg/l de valor medio respectivamente. A 5°C se volvió a producir una acumulación de nitrito que no descendió de una concentración de 22 mg/l durante todo el experimento, como ya ocurrió a la misma temperatura en el ensayo en el que el sistema se inoculó con *Pseudomonas mandelii* cepa A103.

4.5 RESULTADOS DE TURBIDEZ Y RECUENTOS DE BACTERIAS AEROBIAS TOTALES EN EL EFLUENTE.

4.5.1 Valores de turbidez y recuentos de bacterias aerobias totales en el efluente para los ensayos sin inoculación previa del filtro sumergido.

Los valores de turbidez y los recuentos de bacterias aerobias detectados en el efluente para los ensayos donde se trató de formar una biopelícula a partir de la microbiota natural del agua subterránea se presentan en la figura 48. La turbidez mostró unos valores medios muy similares en todos los experimentos a las diferentes temperaturas, mostrando, de manera puntual, picos de valores más altos que tendieron a decrecer en determinaciones posteriores.

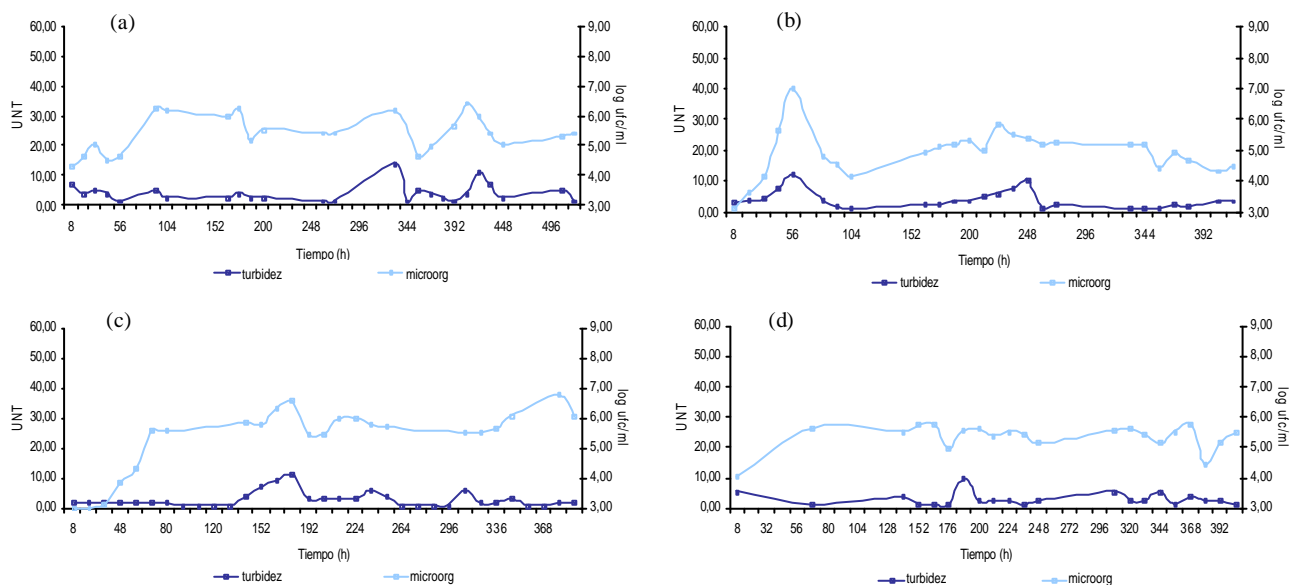


Figura 48. Turbidez y recuentos de bacterias aerobias totales en el efluente para los ensayos realizados sin inoculación previa del filtro sumergido para las temperaturas ensayadas: (a) 5°C, (b) 10°C, (c) 20°C y (d) 30°C.

Los recuentos de bacterias aerobias totales detectados en el efluente tuvieron una tendencia ascendente durante las primeras horas del experimento. Posteriormente, los resultados obtenidos variaron en función de la temperatura de ensayo. A 5°C y 10°C se detectaron puntualmente valores altos en estos recuentos, aunque a 20 y a 30°C, la estabilidad de dichos valores fue algo más evidente.

El análisis de varianza realizado para los valores de turbidez en función de la temperatura mostró que no existieron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 30). El test de mínimas diferencias significativas mostró un único grupo homogéneo entre los valores de turbidez. La temperatura no influyó en los valores de turbidez obtenidos en el sistema cuando éste no fue inoculado previamente.

Tabla 30. Análisis de varianza y test de mínimas diferencias significativas para los valores de turbidez en el efluente en el sistema sin inoculación previa.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significación
Entre grupos	32,7748	3	10,9249	1,50	0,2183
Por temperatura	711,858	98	7,26385		
Total corregido	744,632	101			
Test de Rango Múltiple (LSD 0,05)					
Temperatura	Número de medidas	Media	Grupos homogéneos		
5°C	23	4,18565	A		
10°C	25	3,752	A		
20°C	33	2,79697	A		
30°C	21	2,99143	A		

El análisis de varianza realizado para los valores de aerobios totales en el efluente mostró de nuevo la ausencia de diferencias estadísticamente significativas (tabla 31). El test de rango múltiple mostró que únicamente el ensayo a 10°C obtuvo resultados estadísticamente diferentes a los obtenidos a 5 y a 30°C.

Tabla 31. Análisis de varianza y test de mínimas diferencias significativas para los valores de microorganismos aerobios totales en el efluente en el sistema sin inoculación previa.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significación
Entre grupos	3,97609	3	1,32536	2,20	0,0933
Por temperatura	52,9306	88	0,601484		
Total corregido	56,9067	91			
Test de Rango Múltiple (LSD 0,05)					
Temperatura	Número de medidas	Media	Grupos homogéneos		
5°C	23	5,403	B		
10°C	25	4,908	A		
20°C	33	5,34961	AB		
30°C	21	4,908	B		

4.- RESULTADOS

4.5.2 Valores de turbidez y recuentos de bacterias aerobias para los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con fango activo.

En la figura 49a puede observarse que los valores de turbidez detectados a 5°C usando fango activo como inoculante fueron más bajos que los obtenidos a la misma temperatura en el sistema sin inoculación previa. Así, los valores se mantuvieron alrededor de 1.6 UNT, con picos puntuales no superiores a 5 UNT. Los recuentos de bacterias a esta temperatura también presentaron cierta estabilidad, apreciándose nuevamente un aumento al iniciarse el experimento. A 10°C también se obtuvieron valores aceptables de turbidez en el efluente (Figura 49 b), en torno a 2,2 UNT de media, aunque se detectaron máximos más frecuentemente y de más importancia, llegando a alcanzar los 7 UNT. El valor de aerobios totales en salida también fue más oscilatorio, detectando de nuevo el crecimiento inicial. Las características del efluente obtenido en los ensayos a 20 °C fueron similares al de 10 °C (Figura 49 c). Sin embargo, para los ensayos a 30°C (Figura 49 d), se dieron las mayores variaciones en los valores de turbidez y recuentos de bacterias aerobias totales, alcanzando picos de turbidez de hasta 18 UNT y recuentos próximos a 9 log ufc/ml.

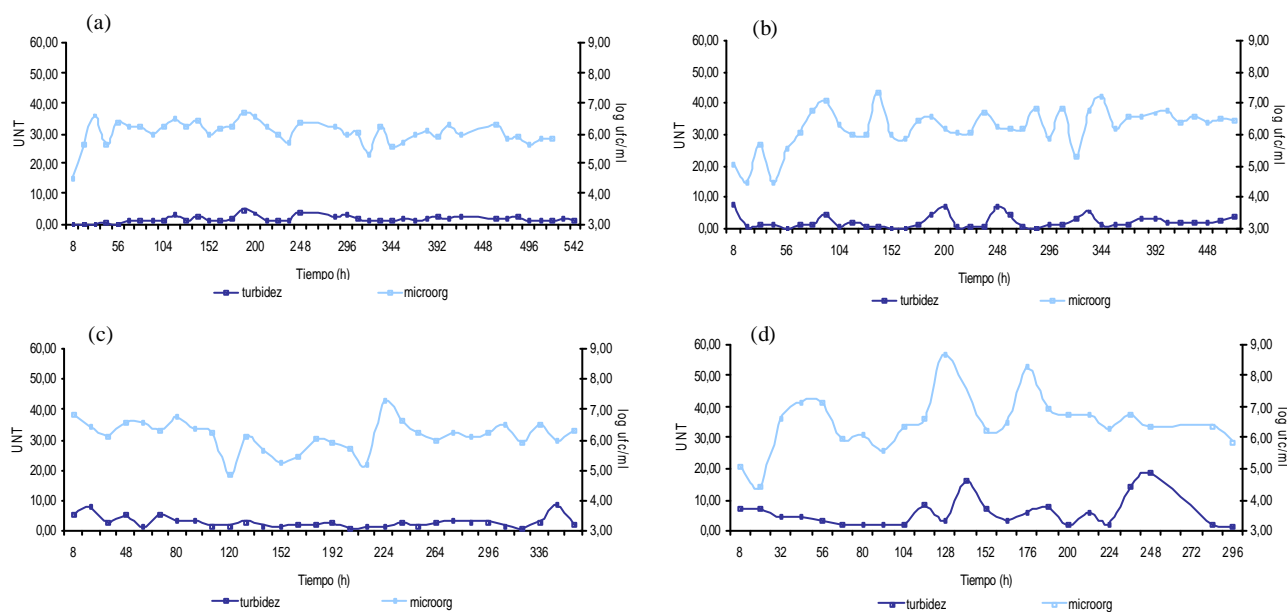


Figura 49. Turbidez y recuentos de bacterias aerobias totales en el efluente para los ensayos realizados con inoculación previa del filtro sumergido con fango activo para las temperaturas ensayadas: (a) 5°C, (b) 10°C, (c) 20°C y (d) 30°C.

De nuevo, se realizó el análisis de varianza para los resultados de turbidez a todas las temperaturas (tabla 32). Sí existieron en este caso diferencias significativas entre los

ensayos realizados. El test de mínimas diferencias significativas muestra un notable aumento de la turbidez con respecto a la temperatura de ensayo.

Tabla 32. Análisis de varianza y test de mínimas diferencias significativas para los valores de turbidez en el efluente en el sistema con inoculación previa por fango activo.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significación
Entre grupos	272,736	3	90,9121	14,83	0,0000
Por temperatura	790,903	129	6,13103		
Total corregido	1063,64	132			
Test de Rango Múltiple (LSD 0,05)					
Temperatura	Número de medidas	Media	Grupos homogéneos		
5°C	41	1,61283	A		
10°C	39	2,17433	AB		
20°C	30	2,93453	B		
30°C	23	5,74261	C		

En cuanto a los microorganismos aerobios totales, el análisis de varianza (tabla 33) no detectó diferencias significativas entre los ensayos. El test mínimas diferencias significativas mostró que los resultados obtenidos fueron muy homogéneos entre sí. Los resultados a 30°C sí fueron estadísticamente diferentes a los obtenidos a 5 y a 20°C. Es difícil por ello afirmar que la temperatura influyó en los resultados de microorganismos aerobios en el efluente.

Tabla 33. Análisis de varianza y test de mínimas diferencias significativas para los valores de microorganismos aerobios totales en el efluente en el sistema con inoculación previa por fango activo.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significación
Entre grupos	2,75687	3	0,918956	2,46	0,0663
Por temperatura	43,3543	116	0,373744		
Total corregido	46,1112	119			
Test de Rango Múltiple (LSD 0,05)					
Temperatura	Número de medidas	Media	Grupos homogéneos		
5°C	29	6,03303	A		
10°C	39	6,23849	AB		
20°C	30	6,13823	A		
30°C	22	6,48491	B		

4.- RESULTADOS

4.5.3 Valores de turbidez y recuentos de bacterias aerobias totales en el efluente para los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24.

Al inocular el sistema con *Pseudomonas fluorescens*, cepa A24, se alcanzaron en el efluente valores elevados de turbidez para los ensayos a 5°C (Figura 50 a), con máximos que llegaron a alcanzar las 50 UNT, y con valores medios superiores a los del resto de ensayos. Al aumentar la temperatura de trabajo, los valores de turbidez descendían drásticamente, obteniendo máximos que no superaban las 8 UNT, y en general mucho más estables durante todo el experimento (Figuras 50 b, c y d). Los recuentos de microorganismos totales aerobios también mantuvieron cierta estabilidad en los experimentos realizados a todas las temperaturas, destacando la tendencia descendente que se apreció en los valores en el ensayo realizado a 5°C.

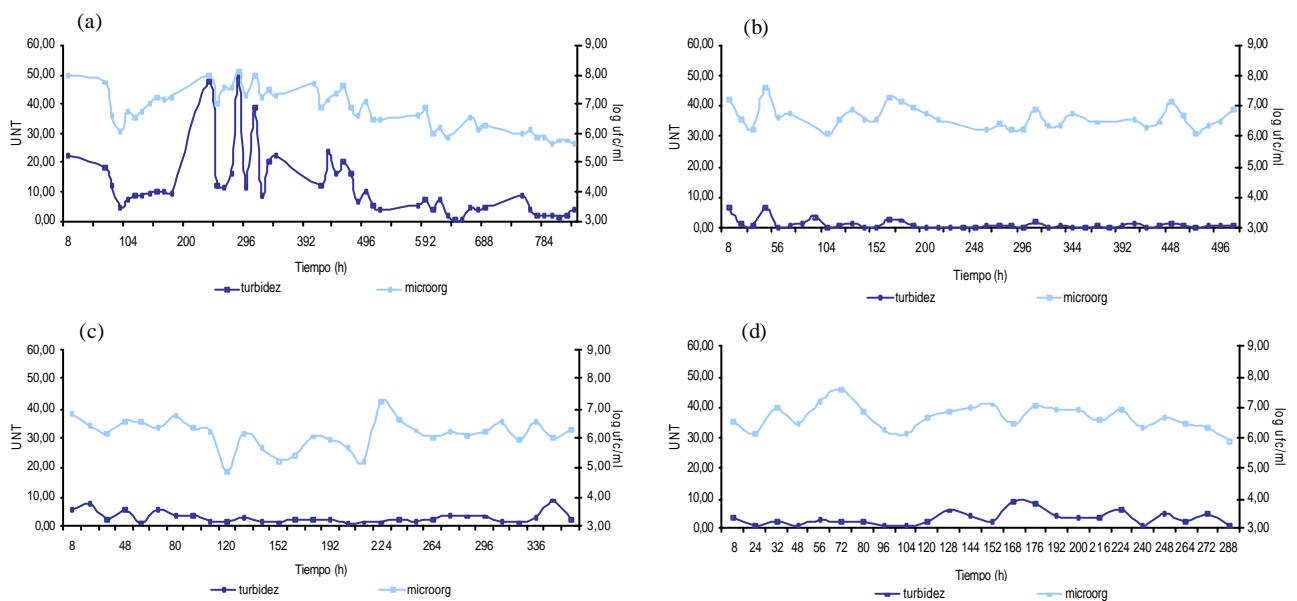


Figura 50. Turbidez y recuentos de bacterias aerobias totales en el efluente para los ensayos realizados con inoculación previa del filtro sumergido con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 para las temperaturas ensayadas: (a) 5°C, (b) 10°C, (c) 20°C y (d) 30°C.

El análisis de varianza en este caso sí encontró diferencias importantes en los resultados de turbidez (tabla 34). En el test de rango múltiple realizado se observó que la turbidez en el ensayo a 5°C fue significativamente superior a la obtenida en el resto de ensayos realizados a mayores temperaturas, que no difirieron estadísticamente entre sí.

Tabla 34. Análisis de varianza y test de mínimas diferencias significativas para los valores de turbidez en el efluente en el sistema con inoculación previa por *Pseudomonas fluorescens* cepa A24.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significación
Entre grupos	2581,27	3	860,424	19,93	0,0000
Por temperatura	5829,36	135	43,1804		
Total corregido	8410,63	138			
Test de Rango Múltiple (LSD 0,05)					
Temperatura	Número de medidas	Media	Grupos homogéneos		
5°C	48	11,3674	B		
10°C	37	1,37	A		
20°C	30	2,93453	A		
30°C	24	3,45583	A		

El ANOVA realizado a los valores de aerobios totales en salida en los ensayos inoculados con esta cepa mostró de nuevo la existencia de diferencias significativas (tabla 35), al realizar el test LSD se observó que fueron los valores obtenidos a 20°C los que se diferenciaron de manera importante del resto, que obtuvieron valores superiores de microorganismos en salida.

Tabla 35. Análisis de varianza y test de mínimas diferencias significativas para los valores de microorganismos en el efluente en el sistema con inoculación previa por *Pseudomonas fluorescens* cepa A24.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significación
Entre grupos	8,65617	3	2,88539	9,63	0,0000
Por temperatura	40,1689	134	0,299768		
Total corregido	48,8251	137			
Test de Rango Múltiple (LSD 0,05)					
Temperatura	Número de medidas	Media	Grupos homogéneos		
5°C	47	6,8087	B		
10°C	37	6,65092	B		
20°C	30	6,13823	A		
30°C	22	6,67008	B		

4.5.4 Valores de turbidez y recuentos de bacterias aerobias totales en el efluente para los ensayos realizados con inoculación previa del filtro sumergido con *Pseudomonas mandelii* cepa A103.

El uso de esta cepa se caracterizó, en cuanto a los recuentos de aerobios totales, en una mayor estabilidad en los resultados hasta 10°C, con una medida que oscilaba alrededor

4.- RESULTADOS

de las 7 log ufc/ml (Figura 51 b). Este valor fue similar en los ensayos a temperaturas superiores, pero la variabilidad en los resultados fue mayor.

En cuanto a la turbidez, ésta ofreció resultados más bajos que para los ensayos anteriormente comentados a todas las temperaturas, mostrándose a la vez más estables. Aunque los datos parecen ofrecer menos estabilidad a medida que aumentó la temperatura, el dato más bajo de turbidez se obtuvo a 5°C. Este valor aumentó a temperaturas superiores, alcanzando un valor medio máximo a 30°C de 3,7 UNT.

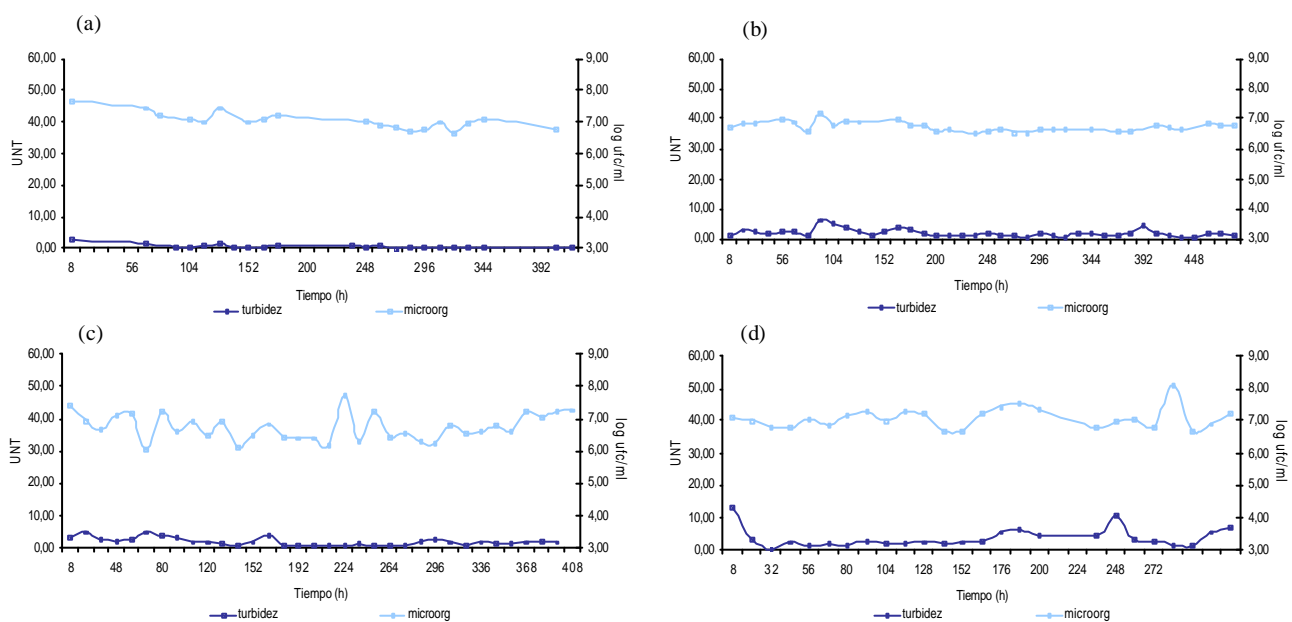


Figura 51. Turbidez y recuentos de bacterias aerobias totales en el efluente para los ensayos realizados con inoculación previa del filtro sumergido con *Pseudomonas mandelii* cepa A103 para las temperaturas ensayadas: (a) 5°C, (b) 10°C, (c) 20°C y (d) 30°C.

Estos valores de turbidez fueron estadísticamente diferentes entre sí, como muestra el análisis de varianza de la tabla 36. Al realizar el test de mínimas diferencias significativas se observó que de nuevo en este inoculante la temperatura provocó un aumento de la turbidez del efluente. El mayor valor de turbidez correspondió a la mayor temperatura ensayada.

Tabla 36. Análisis de varianza y test de mínimas diferencias significativas para los valores de turbidez en el efluente en el sistema con inoculación previa por *Pseudomonas mandelii* cepa A103.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significación
Entre grupos	106,524	3	35,508	12,08	0,0000
Por temperatura	335,207	114	2,94041		
Total corregido	441,731	117			
Test de Rango Múltiple (LSD 0,05)					
Temperatura	Número de medidas	Media	Grupos homogéneos		
5°C	20	0,73185	A		
10°C	40	2,10633	B		
20°C	33	1,79985	B		
30°C	25	3,45583	C		

Para los resultados de microorganismos el análisis de la varianza (tabla 37) también mostró la existencia de diferencias importantes. Sin embargo, al realizar el test de rango múltiple se observó que los ensayos que tuvieron un mayor valor de turbidez en salida fueron los realizados a la mayor y menor temperatura, de 5 y 30°C, obteniendo un mayor valor a temperaturas medias.

Tabla 37. Análisis de varianza y test de mínimas diferencias significativas para los valores de microorganismos en el efluente en el sistema con inoculación previa por *Pseudomonas mandelii* cepa A103.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significación
Entre grupos	2,79589	3	0,931965	8,15	0,0001
Por temperatura	13,4898	118	0,114321		
Total corregido	16,2857	121			
Test de Rango Múltiple (LSD 0,05)					
Temperatura	Número de medidas	Media	Grupos homogéneos		
5°C	23	7,07352	B		
10°C	40	6,78775	A		
20°C	34	6,73953	A		
30°C	25	7,07272	B		

4.- RESULTADOS

4.5.5 Valores de turbidez y recuentos de bacterias aerobias totales en el efluente para los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343.

El funcionamiento del filtro sumergido inoculado con la cepa seleccionada de *Pseudomonas brassicacearum* ofreció los resultados de turbidez y aerobios totales en el efluente de la figura 52. Los resultados más bajos de turbidez se obtuvieron a la temperatura de 10°C (1,23 UNT), siendo dichos valores muy estables y con pocas oscilaciones durante el tiempo que se mantuvo el ensayo. La turbidez más alta, sin embargo, se obtuvo a 5°C, para la que pudo apreciarse una leve tendencia descendente en dichos valores desde el principio del experimento. En cuanto a los recuentos de bacterias aerobias totales, las máximas variaciones se registraron a 30°C, aunque el valor medio de este parámetro en el efluente se mantuvo en unos valores similares a todas las temperaturas, oscilando alrededor de 7 log ufc/ml.

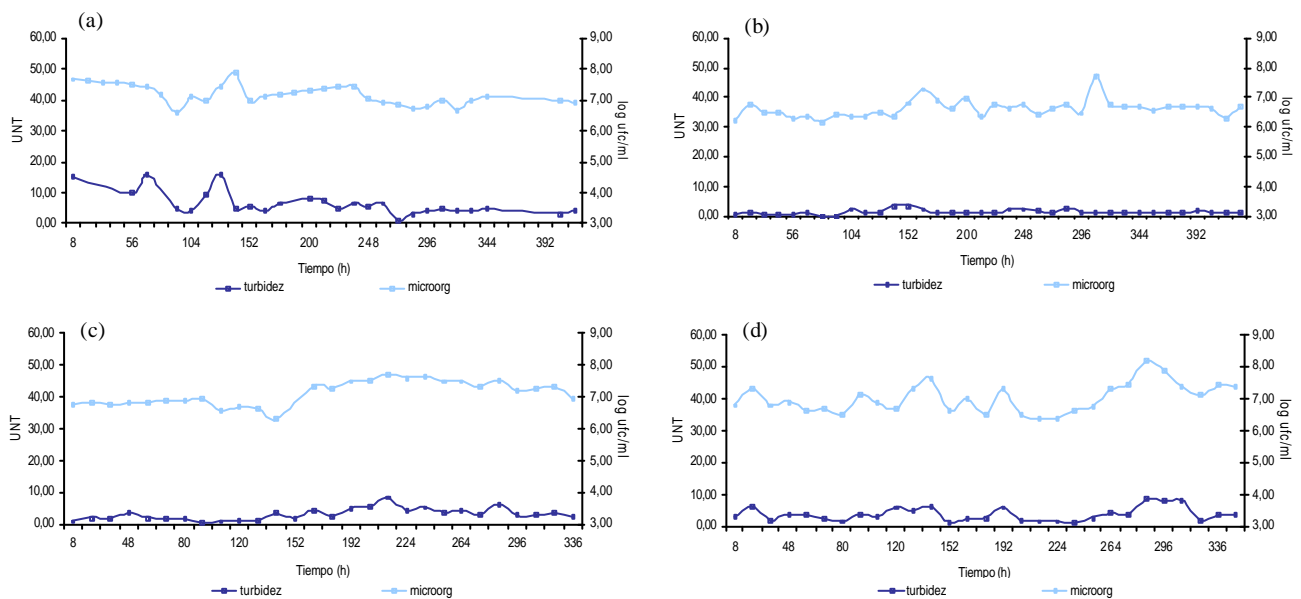


Figura 52. Turbidez y recuentos de bacterias aerobias totales en el efluente para los ensayos realizados con inoculación previa del filtro sumergido con *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343 para las temperaturas ensayadas: (a) 5°C, (b) 10°C, (c) 20°C y (d) 30°C.

La turbidez en los ensayos con este inoculante mostró diferencias estadísticamente significativas entre las temperaturas ensayadas, como muestra el análisis de varianza de la tabla 38. Al realizar el test de rango múltiple se apreció que fue a 5°C cuando se obtuvieron

los mayores valores de turbidez, siendo a 10°C la temperatura a la que se obtuvieron los valores más bajos.

Tabla 38. Análisis de varianza y test de mínimas diferencias significativas para los valores de turbidez en el efluente en el sistema con inoculación previa por *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significación
Entre grupos	429,7	3	143,233	26,63	0,0000
Por temperatura	618,534	115	5,37856		
Total corregido	1048,23	118			
Test de Rango Múltiple (LSD 0,05)					
Temperatura	Número de medidas	Media	Grupos homogéneos		
5°C	26	6,51919	C		
10°C	36	1,23109	A		
20°C	28	3,0793	B		
30°C	29	3,80648	B		

Los valores medios de microorganismos obtenidos en los ensayos con inoculación previa de la cepa A103 mostraron resultados parecidos, aunque el análisis de la varianza reveló que sí existieron diferencias estadísticamente significativas. Al realizar el test de rango múltiple se apreció que fueron los resultados obtenidos a 10°C los que se diferenciaron significativamente del resto, proporcionando los valores de aerobios en salida más bajos de todos los ensayos.

Tabla 39. Análisis de varianza y test de mínimas diferencias significativas para los valores de microorganismos en el efluente en el sistema con inoculación previa por *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significación
Entre grupos	6,73389	3	2,24463	16,69	0,0000
Por temperatura	16,0079	119	0,13452		
Total corregido	22,7418	122			
Test de Rango Múltiple (LSD 0,05)					
Temperatura	Número de medidas	Media	Grupos homogéneos		
5°C	26	7,171	B		
10°C	36	6,60344	A		
20°C	27	7,12011	B		
30°C	29	7,01448	B		

4.5.6 Análisis comparativo entre ensayos para los valores de turbidez y microorganismos.

Comparando los valores medios de turbidez en el efluente entre los diferentes sistemas en función de la temperatura de ensayo, se apreció que no existió ningún patrón común entre todos ellos en cuanto a los valores obtenidos con la temperatura (Figura 53). A 5°C, los ensayos con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 y *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343 obtuvieron valores de turbidez muy por encima del resto de ensayos, disminuyendo de manera importante estos valores al realizar el ensayo a 10°C. Otras cepas, sin embargo, obtuvieron el menor valor de turbidez a la menor temperatura ensayada de 5°C, aumentando a temperaturas mayores, como es el caso de los ensayos con fango activo y con *Pseudomonas mandelii* cepa A103.

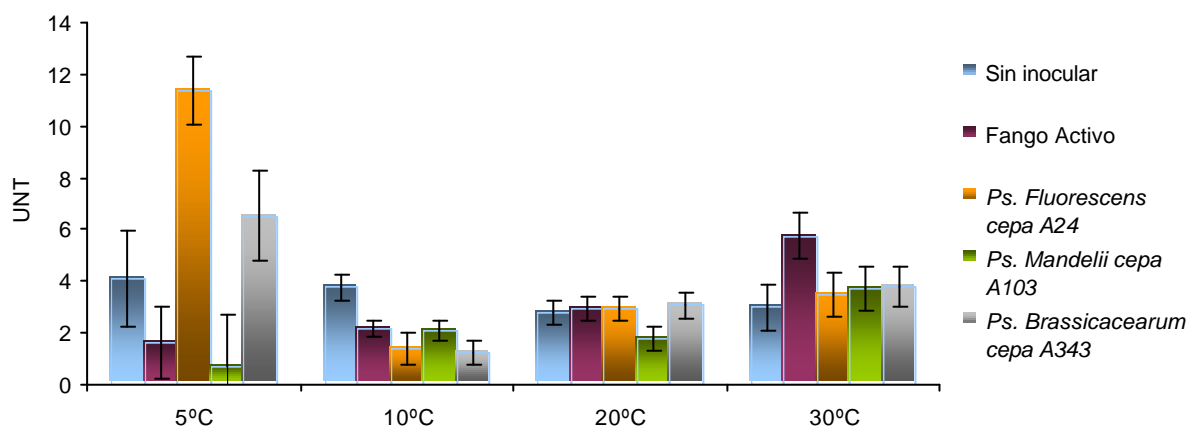


Figura 53. Valores de turbidez en el efluente para todos los ensayos realizados en función de la temperatura.

Los valores de recuentos de bacterias aerobias totales obtenidos en función de la temperatura en todos los ensayos se presentan en la figura 54. Fue claramente apreciable que los recuentos en los sistemas sin inocular fueron menores a los obtenidos en el resto de los ensayos, a todas las temperaturas. Los valores obtenidos para los ensayos con fango activo superaron a los de los sistemas sin inocular, pero aún fueron significativamente menores al resto de inoculantes empleados hasta 10°C. A partir de esa temperatura, los valores de microorganismos se equiparan a los obtenidos en el resto de ensayos.

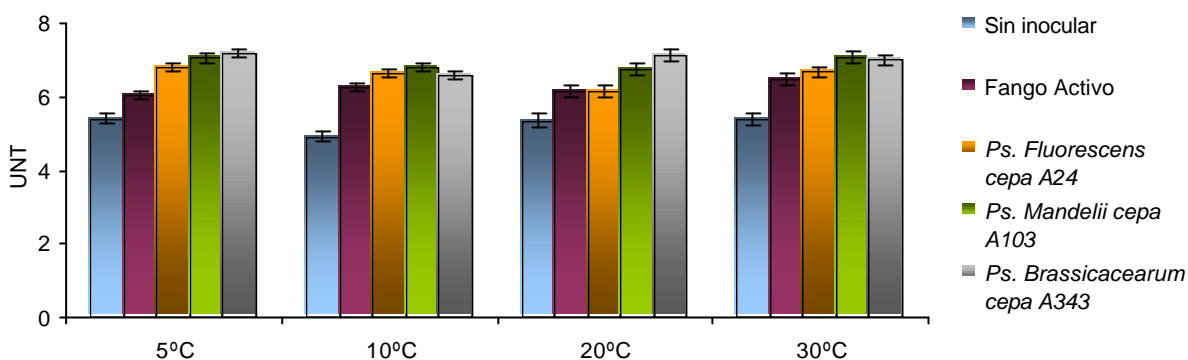


Figura 54. Valores de microorganismos aerobios totales en el efluente para todos los ensayos realizados en función de la temperatura.

4.6 RESULTADOS DE LOS VALORES DE pH DURANTE EL FUNCIONAMIENTO DEL FILTRO SUMERGIDO

El proceso de desnitrificación provoca un ascenso en los valores de pH en las aguas, como resultado de la reducción del nitrato hasta nitrógeno gas, con la liberación de iones OH⁻. El pH es un factor que puede afectar al proceso de desnitrificación, y que en numerosas ocasiones debe ser objeto de regulación en sistemas de tratamiento de aguas para abastecimiento humano. En el filtro sumergido a escala de laboratorio objeto del presente trabajo se estudió el efecto de la actividad desnitrificante del sistema a las diferentes temperaturas sobre el pH del efluente.

Los valores de pH superaron en ocasiones puntuales el valor de pH de 8,5, y en la mayoría de estas ocasiones dicha situación también se correspondió con un elevado valor de pH del agua influente, que influyó en el valor del efluente. De cualquier modo, aquellas ocasiones puntuales en que el pH superó dicho valor no tuvieron ningún efecto inhibitorio en el rendimiento de desnitrificación. El pH, por tanto, fue un factor bajo vigilancia que mejoró el control del proceso de desnitrificación que tuvo lugar en el sistema estudiado. La figura 55 muestra los incrementos de pH entre el influente y el efluente en todos los ensayos realizados para todas las temperaturas ensayadas.

Pudo apreciarse que en la mayoría de las ocasiones, estos valores fueron positivos, indicando que los valores en el efluente superan en la mayoría de los ensayos a los del agua influente, como consecuencia de la alcalinización asociada al proceso de desnitrificación.

4.- RESULTADOS

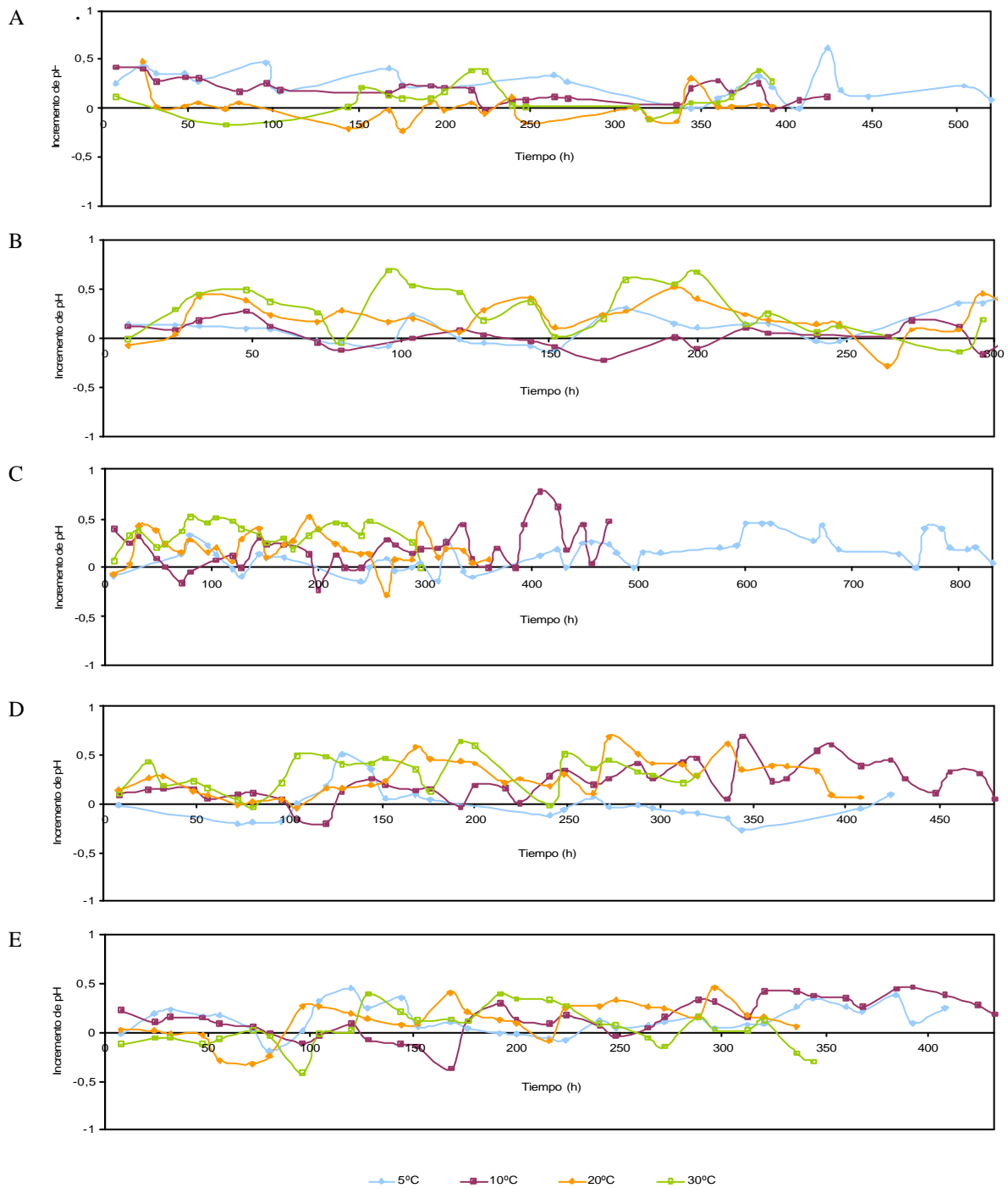


Figura 55. Incremento de los valores de pH entre el influente y el efluente a las 4 temperaturas ensayadas en los sistemas: (A) sin inoculación previa; (B) inoculados con fango activo; (C) inoculados con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24; (D) inoculados con *Pseudomonas mandelii* cepa A103 y (E) inoculados con *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343.

La figura 56 muestra los incrementos medios de pH en cada ensayo para cada temperatura. En los ensayos sin inoculación del filtro (Figura 56 A) no se apreció una

influencia de la temperatura en los valores de pH de salida, siendo este incremento medio más alto a 5°C, y prácticamente nulo a 20°C

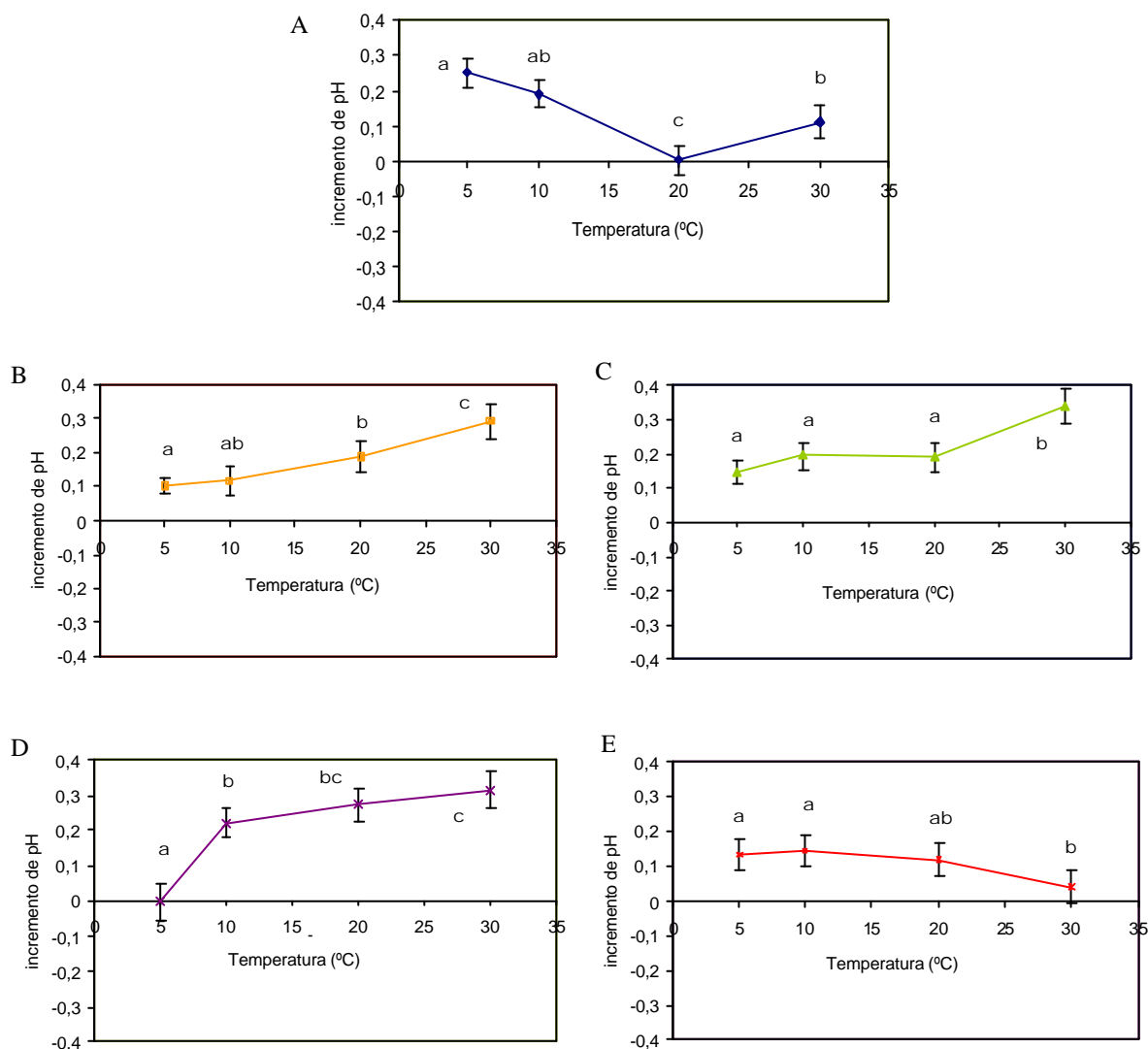


Figura 56. Valor medio del incremento de pH a las 4 temperaturas ensayadas en los sistemas: (A) sin inoculación previa; (B) inoculados con fango activo; (C) inoculados con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24; (D) inoculados con *Pseudomonas mandelii* cepa A103 y (E) inoculados con *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343. (^a grupos con distinta letra son estadísticamente diferentes entre sí).

Se realizaron análisis de varianza de todos estos resultados para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en el uso de cada inoculante, en función de la temperatura, que se presenta en la tabla 40. Los test de mínimas diferencias significativas se encuentran representados por letras en la figura 56. En todos los ensayos en los que el filtro fue inoculado se apreció que los incrementos de pH recogidos

4.- RESULTADOS

estuvieron influenciados por la temperatura de ensayo. Para los experimentos realizados con inoculación del filtro por fango activo, *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 y *Pseudomonas mandelii* cepa A103 (Figuras 56 B, C y D) los incrementos de pH fueron más acusados a medida que aumentó la temperatura de ensayo. Para los experimentos con *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343 (Figura 56 E), la temperatura influyó en estos incrementos de pH de manera inversa, disminuyendo la diferencia de los valores de pH entre el influente y el efluente a medida que se aumentó la temperatura de ensayo, aunque no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los valores a diferentes temperaturas (Tabla 40).

Tabla 40. Análisis de varianza para los valores de incremento de pH en los ensayos realizados con diferentes inoculantes en función de la temperatura.

	Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calculada	Nivel de significación
Sin inocular	Entre grupos	0.824101	3	0.2747	13.63	0,0000
	Por temperatura	1.81355	90	0.0201506		
	Total corregido	2.63766	93			
Fango activo	Entre grupos	0.62802	3	0.20934	6.49	0.0004
	Por temperatura	4.06587	126	0.0322688		
	Total corregido	4.69389	129			
<i>Pseudomonas fluorescens</i> A24	Entre grupos	0.578671	3	0.19289	6.48	0.0004
	Por temperatura	3.90073	131	0.0297765		
	Total corregido	4.4794	134			
<i>Pseudomonas mandelii</i> A103	Entre grupos	1.45485	3	0.484949	14.12	0.0000
	Por temperatura	4.05411	118	0.0343568		
	Total corregido	5.50895	121			
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> A343	Entre grupos	0.211668	3	0.0705562	2.14	0.0984
	Por temperatura	4.05163	123	0.0329401		
	Total corregido	4.2633	126			

4.7 RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS REALIZADOS CON INOCULACIÓN PREVIA DE *Pseudomonas fluorescens* cepa A24: ANÁLISIS DE BIOMASA Y BIODIVERSIDAD

Los resultados obtenidos en los ensayos anteriormente descritos propiciaron la realización de estudios más detallados del funcionamiento del filtro sumergido. En dichos estudios se utilizó el mismo sistema a escala de laboratorio, con unas condiciones iniciales idénticas a las establecidas para los experimentos anteriormente descritos, aunque en este caso la fuente de carbono no se añadió en exceso, ajustando su dosificación a la óptima establecida en este tipo de sistemas (Gómez *et al.*, 2000b), en una relación C:N de 1,08. Se empleó la cepa seleccionada de la especie *Pseudomonas fluorescens* como inoculante

selectivo del filtro, ya que los resultados obtenidos en las fases anteriores permitieron comprobar que su uso mejoró el funcionamiento del sistema en comparación con los resultados de los experimentos en los que se utilizaron las otras cepas seleccionadas en la primera fase del presente estudio. Para evaluar la influencia de la temperatura, el estudio se realizó a dos temperaturas diferenciadas: 10 y 30°C.

Transcurrido un periodo inicial, y habiendo logrado un elevado rendimiento en eliminación de Nt en el sistema, en cada uno de los ensayos se procedió a cambiar gradualmente la condiciones de trabajo, aumentando de manera progresiva la carga hidráulica en el sistema. Asimismo, la relación C:N anteriormente mencionada fue incrementada en el momento en que la relación utilizada se presentara como insuficiente para lograr una eliminación eficiente del Nt.

El sistema así montado se mantuvo en funcionamiento un periodo de tiempo determinado, tomando muestras para el análisis de biomasa y de biodiversidad de la biopelícula. Del mismo modo, se mantuvo un control de la capacidad de eliminación de Nt para conocer la respuesta del sistema a las condiciones de fuente de carbono y carga hidráulica.

4.7.1 Resultados de rendimiento de eliminación de nitrógeno y análisis de la biopelícula obtenidos en el experimento a 10°C

La figura 57 muestra el resultado obtenido en el sistema operado a 10°C en cuanto a eliminación de Nt. Se indican en ella los cambios realizados en cuanto a concentración de fuente de carbono y carga hidráulica, y su efecto en el funcionamiento general del sistema.

Durante los primeros días del experimento, los resultados de eliminación de Nt muestran que el sistema se mostró incapaz de realizar una desnitrificación eficaz. En los ensayos con esta cepa descritos anteriormente, el sistema operado a esta misma temperatura alcanzó una alta estabilidad en los resultados a partir del undécimo día de funcionamiento con una importante eliminación de Nt. Como ya se mencionó, en dichos ensayos se trabajó con un exceso de fuente de carbono, en una relación C:N de 5,78, muy superior a la utilizada en este ensayo, de 1,08. Por ello, transcurridas 3 semanas de

4.- RESULTADOS

funcionamiento se procedió a aumentar la fuente de carbono suministrada al sistema, estableciéndola en una relación C:N de 1,15. Dicha relación fue aumentada de nuevo a las 4 semanas de iniciarse el experimento a 1,20, ya que los resultados de eliminación de Nt seguían siendo bajos en comparación con los obtenidos por este sistema anteriormente. A partir de ese momento, los resultados obtenidos mejoraron en gran medida. Cuando se alcanzó un rendimiento de un 80% de eliminación, se procedió a aumentar la carga hidráulica a $4 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{d}$, lo que provocó una caída de rendimiento, recuperado a los 6 días. Así, se procedió a aumentar sucesivamente la carga hidráulica y a observar posteriormente la recuperación del sistema, hasta alcanzar una carga hidráulica de $7 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{d}$. En todos los casos, el sistema alcanzó una importante recuperación en la capacidad de eliminación de Nt, superando en todos los casos el 96% de eliminación.

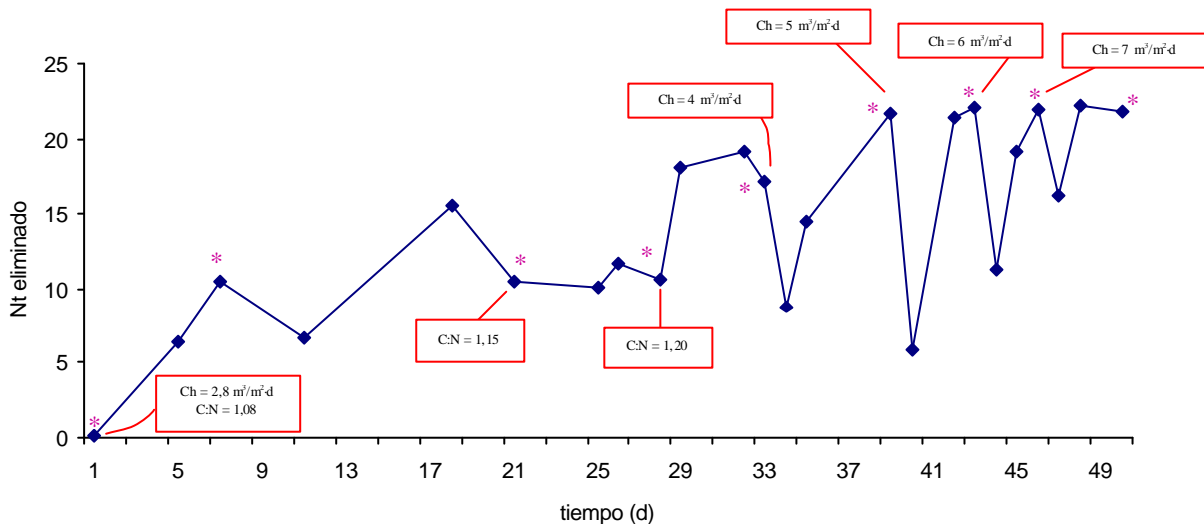


Figura 57. Eliminación de Nt en el sistema operado a 10°C. * indica la toma de muestras de biomasa.

Los valores recogidos de microorganismos cultivables presentes en la biomasa a lo largo del ensayo se muestran en la figura 58. Al iniciarse el experimento, la totalidad de los microorganismos presentes en la biopelícula fueron identificados como la cepa utilizada para la inoculación del filtro en base a su morfología colonial. Ésta fue una prueba más de la eficacia del proceso de inoculación en condiciones aisladas, ya que dicha muestra se tomó inmediatamente antes de conectar el sistema con el agua subterránea contaminada.

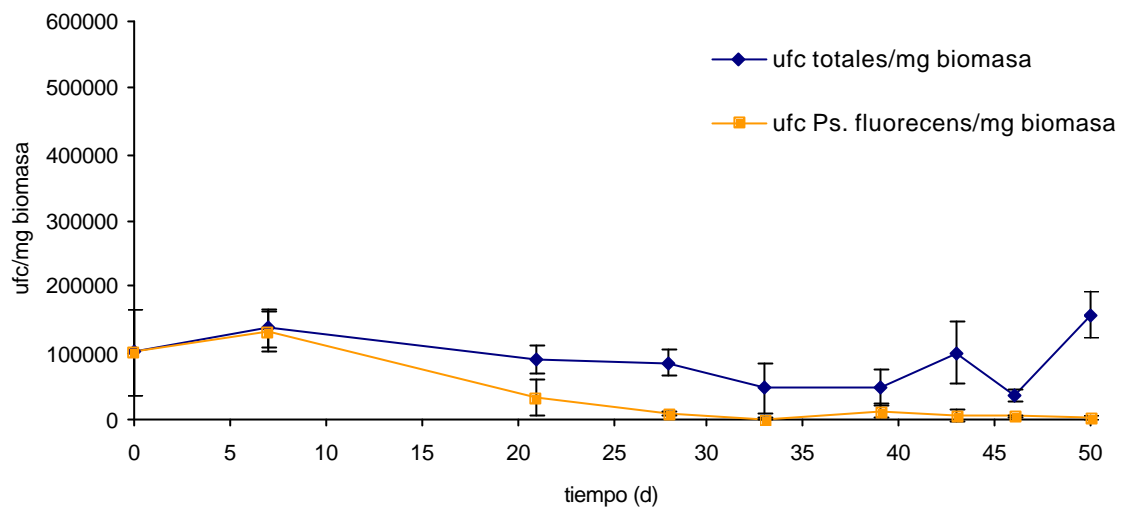


Figura 58. Microorganismos cultivables presentes en la biopelícula por miligramo de biomasa en el sistema inoculado con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 a 10°C.

Transcurridos 7 días de experimento, el número de ufc por mg de biomasa aumentó ligeramente, manteniéndose la cepa inoculada como dominante en la biopelícula formada sobre el relleno. Posteriormente, esta cepa vio relegada su posición privilegiada en la biopelícula, apareciendo otras colonias de diferente morfología. Al finalizar el experimento, se siguieron detectando colonias de la cepa inoculada, aunque su presencia en la biopelícula fue baja, alrededor de un 2,17% del total de células cultivables presentes en la misma.

4.7.2 Resultados de rendimiento de eliminación de nitrógeno y análisis de la biopelícula obtenidos en el experimento a 30°C

El experimento realizado a 30°C mostró una mejor capacidad de alcanzar altos rendimientos de eliminación de Nt sin necesidad de aumentar la concentración de etanol por encima de una relación C:N de 1,08 durante las primeras 8 semanas de experimento (Fig 59). Se aprecia la mayor rapidez en alcanzar una buena eliminación del nitrato presente en el agua subterránea poco tiempo después de iniciarse el experimento, a diferencia del anterior realizado a 10°C donde el sistema necesitó de más tiempo para elevar sus rendimientos, además de aumentar la concentración de etanol.

4.- RESULTADOS

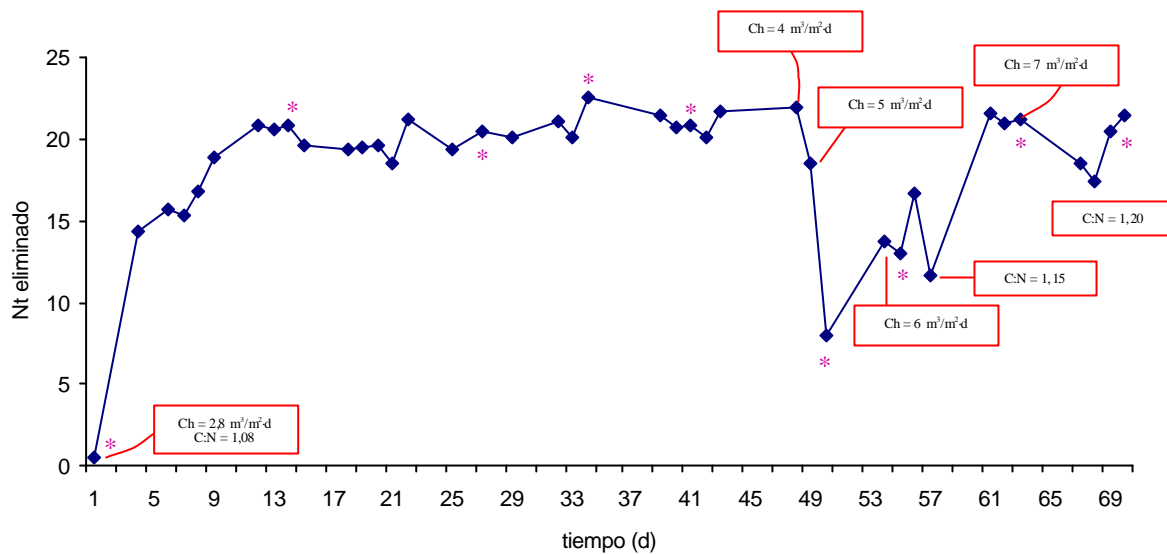


Figura 59. Eliminación de Nt en el sistema operado a 10°C. * indica la toma de muestras de biomasa.

La carga hidráulica fue aumentada asimismo sucesivamente de la misma manera que en el experimento anterior, hasta 7 m³/m²·d. Al alcanzar los 6 m³/m²·d, la relación C:N se aumentó a 1,15, y posteriormente a 1,20 tras elevar la carga hidráulica a 7, ya que el sistema se mostró incapaz de mantener los niveles de eliminación de nitrógeno a la fuente de carbono dosificada inicialmente. De cualquier modo, se volvieron a alcanzar altos rendimientos de eliminación de Nt una vez la concentración de fuente de carbono fue suficiente para llevar a cabo el proceso de desnitrificación.

En cuanto al análisis de la biopelícula, en el primer muestreo realizado la cepa utilizada para la inoculación del sistema fue la única presente en la biopelícula (Fig. 60), como era de esperar a partir del proceso de inoculación del filtro realizado, al igual que ocurrió en el experimento anterior. El número de células cultivables fue, sin embargo, casi un 50% inferior, poniendo en evidencia una menor colonización del relleno a esta temperatura.

Aunque el número de células cultivables correspondientes a *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 inoculada en el filtro sumergido se mantuvo durante al menos los siguientes 14 días del experimento, el número total de microorganismos aerobios aumentó considerablemente, alcanzando un valor de 480 x 10³ ufc/mg biomasa. Posteriormente, los valores volvieron a descender hasta los niveles iniciales, con pequeñas oscilaciones en los siguientes muestreos. El número de unidades formadoras de colonias con morfología

correspondiente a la cepa inoculada se vio reducido a una presencia mínima en la biopelícula a partir de los 40 días del experimento.

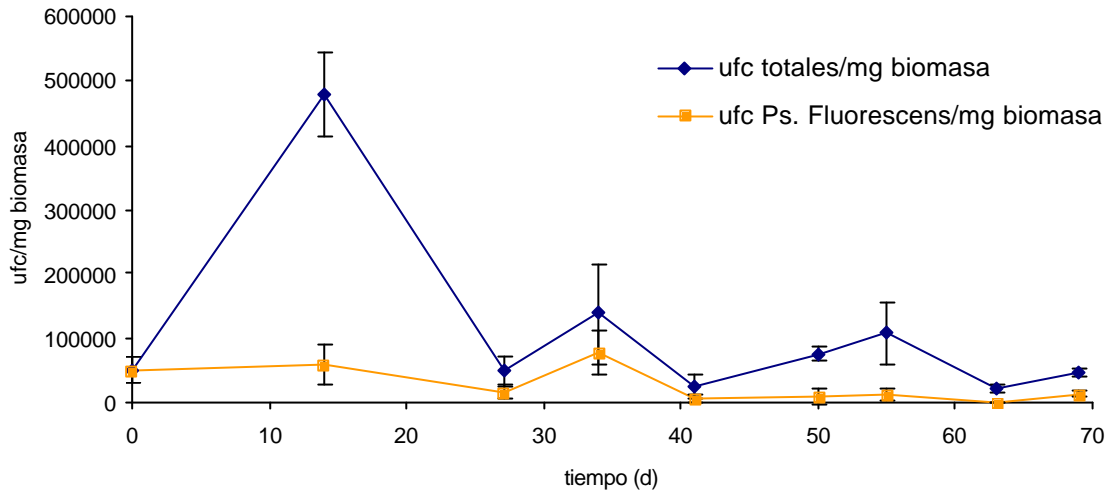


Figura 60. Microorganismos cultivables presentes en la biopelícula por miligramo de biomasa en el sistema inoculado con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 a 30°C.

4.7.3 Resultados de biodiversidad: estudio de la composición de la comunidad bacteriana del filtro sumergido mediante electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE), basada en la amplificación de fragmentos del gen codificante del ARN ribosómico 16S.

A lo largo del desarrollo de los dos experimentos indicados anteriormente (inoculando el filtro sumergido con un cultivo puro de *Pseudomonas fluorescens* cepa A24, a 10 y a 30°C), se tomaron muestras de la biopelícula, a partir de las cuales se realizó una extracción del ADN total, con el objeto de realizar un seguimiento temporal de los cambios en la biodiversidad de la comunidad bacteriana presente en las biopelículas, así como determinar la influencia de otros parámetros como la carga hidráulica. Se realizó además una comparación de dichos resultados con los obtenidos en cuanto a biodiversidad de la biopelícula en los ensayos en los que ésta se formó a partir de la microbiota presente de manera natural en el agua subterránea.

En la tabla 41 se observa la frecuencia de toma de muestras para los análisis de biodiversidad en cada uno de los experimentos, especificando las condiciones de carga hidráulica y de relación C:N en cada una de ellas.

4.- RESULTADOS

Tabla 41. Muestreos realizados para analizar la biodiversidad de las biopelículas a lo largo de los distintos experimentos sin inocular, inoculado con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 a 10°C y a 30°C.

Toma de muestras para análisis de biodiversidad									
Ensayo	Sin inocular a 5°C - C1		Sin inocular a 10°C - C2		Sin inocular a 20°C - C3		Sin inocular a 30°C - C4		
Día	22		18		17		17		
Ch (m ² /m ² -d)	2,8								
C:N	5,78								
<i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24 a 10°C									
Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Día	1	7	21	28	33	39	43	46	50
Ch (m ² /m ² -d)	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	4	5	6	7
C:N	1,08	1,08	1,15	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20
<i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24 a 30°C									
Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Día	1	22	27	34	41	50	55	63	69
Ch (m ² /m ² -d)	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	5	6	6	7
C:N	1,08	1,08	1,08	1,08	1,08	1,08	1,08	1,15	1,20

Dado que el gen codificante del ARN ribosómico 16S cumple con los requisitos para actuar como buena sonda evolutiva, se procedió a la amplificación de la región hipervariable V3 de dicho gen a partir del ADN total de la comunidad procariota presente en la biopelícula en cada una de las muestras obtenidas. Los fragmentos resultantes de la amplificación se sometieron a una TGGE para obtener los perfiles de poblaciones constituyentes de las comunidades bacterianas, y posteriormente reamplificar y secuenciar las distintas bandas obtenidas para poder así determinar la afiliación taxonómica de cada población individual. La técnica utilizada para el análisis de las comunidades microbianas (TGGE), sólo permite detectar las poblaciones que muestren una abundancia relativa superior al 1%; (Muyzer and Smalla, 1998) por ello tan sólo aparecen las bandas correspondientes a poblaciones mayoritarias.

En la figura 61 se muestran los perfiles de las comunidades bacterianas obtenidos mediante TGGE para todas las muestras tomadas en los diferentes experimentos, tanto en aquellos en los que se inoculó el filtro como en los no inoculados. En las muestras en las que el filtro no se inoculó previamente, se observó la existencia de bandas en determinados carriles que no aparecieron en otras muestras tomadas a diferente temperatura, lo que indica una influencia de la temperatura en la composición de la biopelícula.

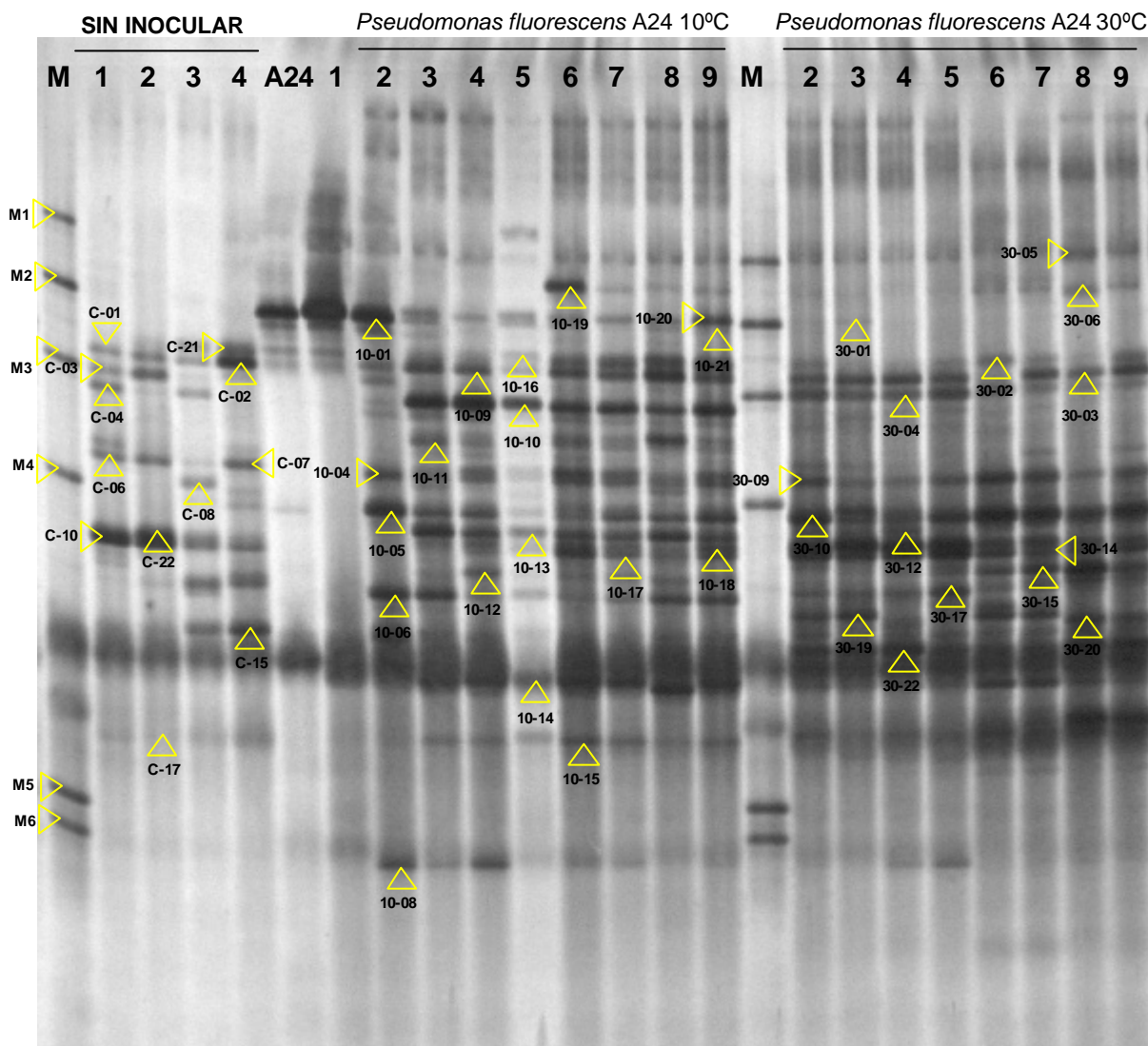


Figura 61. TGGE de fragmentos del gen ADNr 16S (región hipervariable V3) amplificados por PCR a partir de muestras de ADN extraídas de biopelícula aislada en los ensayos sin inoculación previa del filtro a 5, 10, 20 y 30°C y en los ensayos con inoculación previa con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 a 10 y a 30°C. El carril nombrado como 1 corresponde a la biopelícula extraída al finalizar la fase de inoculación con la cepa seleccionada a 10 y a 30°C. El carril nombrado como A24 corresponde al cultivo puro de la cepa seleccionada. El resto de carriles indican el día de la toma de muestra. Como marcadores (carriles M) se emplearon: M1: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, M2: *Pseudomonas putida* ATCC 8750, M3: *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 15308, M4: *Escherichia coli* DH5 α , M5: *Nocardia corynebacterioides* ATCC 21253, M6: *Micrococcus luteus* ATCC 9341.

En los experimentos en los que el biofiltro fue inoculado, se incluyó en el TGGE para su comparación el fragmento V3 amplificado por PCR de un cultivo puro de *Pseudomonas fluorescens* cepa A24. Después de inocular el sistema con dicha cepa durante 48 horas, el perfil de bandas obtenido a partir de muestras de la biopelícula es idéntico. Cuando el agua subterránea comenzó a pasar a través del filtro, el perfil de las

comunidades cambió considerablemente, debido a la colonización de la biopelícula por especies presentes en el agua subterránea.

Asimismo, es destacable la mayor abundancia de bandas en aquellos estudios en los que se inoculó previamente el sistema con la cepa seleccionada a las dos temperaturas, en comparación con aquellos ensayos en los que no se realizó este paso previo, aumentando de este modo la biodiversidad del sistema al inocular previamente el filtro. Además, se observan diferentes intensidades en algunas de las bandas presentes en función del tiempo y de las condiciones de carga hidráulica, lo que indica un aumento o disminución de la abundancia de los microorganismos que componen la comunidad procariota presente en la biopelícula.

Los perfiles de bandas obtenidos mediante TGGE se analizaron con el programa Gel Compar II v. 4.601 (Applied Maths, Bélgica) y se construyó un dendrograma que relacionó los distintos perfiles de bandas en función de su similitud. Este análisis mostró que existieron importantes variaciones de la diversidad bacteriana en las biopelículas formadas con o sin inoculación, así como dependiendo de la temperatura de ensayo. De este modo, el dendrograma construido (Figura 62) muestra cómo los perfiles de biodiversidad de las biopelículas bacterianas desarrolladas con o sin inoculación previa del filtro se separaron claramente en dos clusters diferentes, con una similitud de un 50%. Asimismo, el clúster correspondiente a los experimentos con inoculación previa del filtro con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 se subdividió de nuevo en otros dos nuevos clusters, correspondiendo cada uno de ellos a los dos experimentos desarrollados, a 10 y a 30°C, con una similitud por debajo del 60%.

En los experimentos desarrollados con el biofiltro inoculado, además, se observó una nueva subdivisión en otros dos clusters, correspondiendo a dos momentos diferenciados de ambos experimentos. El primer subcluster del experimento a 30°C correspondió a la fase inicial en que las condiciones de carga hidráulica se mantuvieron estables y en un valor de $2,8 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{d}$, mientras que el segundo subcluster correspondió a las muestras tomadas a diferentes y cada vez mayores cargas hidráulicas superficiales. Esta diferencia también se aprecia en el ensayo a 10°C, sin embargo, en este experimento, la

primera muestra tomada diverge del resto de muestras tomadas, con una similitud de 63% con el resto del experimento.

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
16S

16S

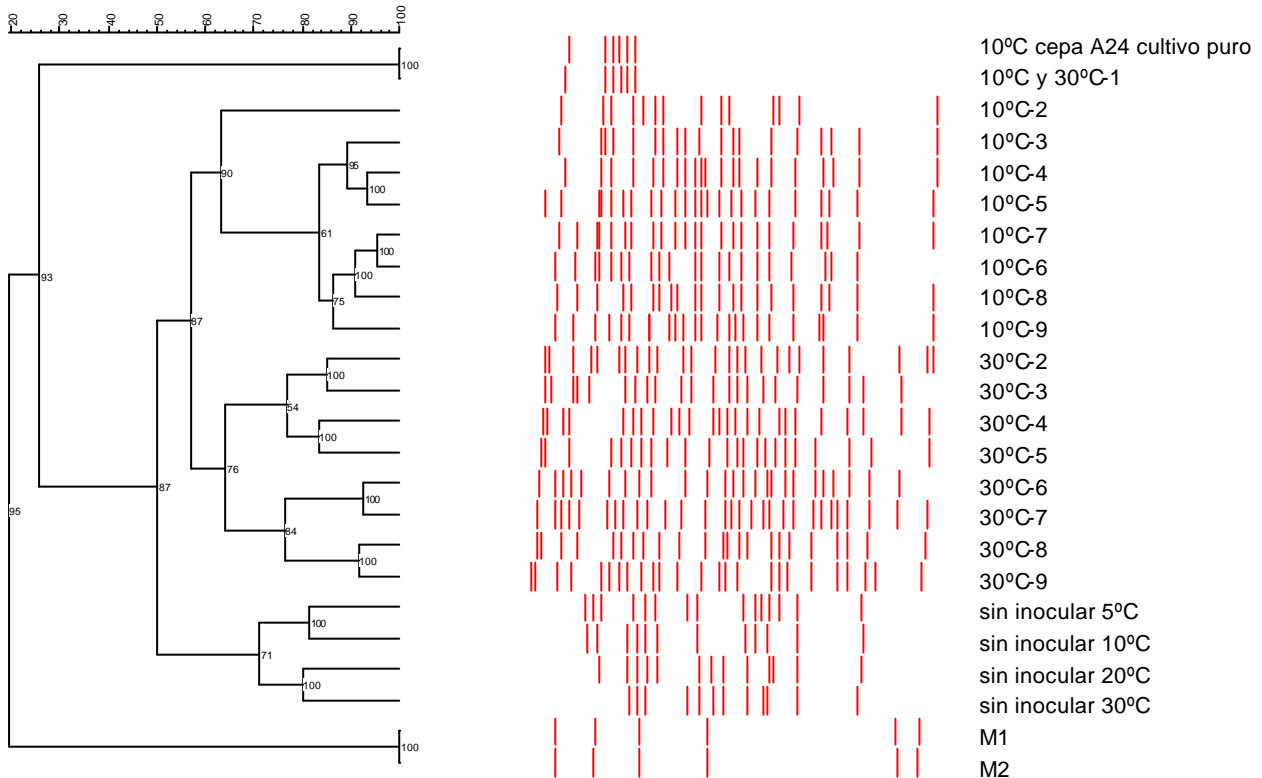


Figura 62. Dendrograma obtenido del análisis de los perfiles de bandas del TGGE de la comunidad bacteriana presente en el filtro sumergido, utilizando el programa Gel Compar II v. 4.601 (Applied Maths, Bélgica) aplicando el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) y el coeficiente de Dice. La barra superior muestra la similitud entre los perfiles de bandas y los números entre las ramas representan el coeficiente cofenético.

Con el fin de realizar una caracterización más exhaustiva de la composición de la comunidad bacteriana en las biopelículas, del gel de TGGE se intentó la extracción, reamplificación y secuenciación de un total de 72 bandas, de las cuales solo 44 se pudieron analizar comparándolas con las secuencias de ADN_r 16S depositadas en la base de datos EMBL, ya que el resto o bien no se pudieron reamplificar o bien de ellas se obtuvieron secuencias con un alto número de indeterminaciones. Dichas bandas están marcadas en la figura 60 mediante flechas de color amarillo.

En la figura 63 (al final) se representa el árbol filogenético de todas las secuencias obtenidas, elaborado a partir de un alineamiento múltiple mediante el método *Neighbour-Joining*, incluyendo como referencia secuencias de la misma región V3 del gen codificante del ARNr 16S de los microorganismos más similares depositados en la base de datos EMBL. Dichos datos de secuenciación mostraron que las biopelículas estudiadas estuvieron compuestas principalmente por poblaciones relacionadas con especies que habitan normalmente las aguas dulces, muchas de ellas de conocida actividad desnitrificante. Además, un 72% de las bandas secuenciadas estuvieron afiliadas al grupo de las β -proteobacterias, y específicamente, estas secuencias se encuadraron principalmente en las familias *Comamonadaceae* y *Rhodocyclaceae*. En un menor número se encuentran representantes de la familia de las γ -proteobacterias y algún representante de las α -proteobacterias (éste último únicamente en el ensayo sin inoculación previa). Es destacable la aparición de un pequeño grupo de bacterias Gram positivas en el ensayo efectuado con inoculación del filtro a 30°C.

Se observó asimismo que la cepa descrita como *Pseudomonas fluorescens* A24 que se utilizó para la inoculación del filtro aparece en el primer muestreo realizado en el ensayo a 10°C. La figura 64 muestra el alineamiento de la secuencia de la cepa A24 con la secuencia obtenida al reamplificar y secuenciar la banda 10-01. El fragmento amplificado es idéntico en ambas secuencias.

A24:	TGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGT	50
10-01:	TGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGT	50
A24:	GTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCA	100
10-01:	GTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCA	100
A24:	GTTACCTAATACGTATCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGC	146
10-01:	GTTACCTAATACGTATCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGC	146

Figura 64. Alineamiento de las secuencias de la cepa seleccionada A24 y la banda 10-01

Sin embargo, al comenzar el funcionamiento del sistema con agua subterránea, dicha banda desapareció de ambos experimentos. A 10°C se apreció la aparición de una banda cuya secuencia fue identificada como filogenéticamente cercana a una cepa de *Pseudomonas fluorescens* que sin embargo no coincide con la secuencia de la cepa inoculada al inicio del experimento. En la figura 65 se puede observar el alineamiento de

las secuencias amplificadas de la banda 10-1 y la banda 10-20, del cual se pudo afirmar que no se trató de la misma cepa.

10-01:	TGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGT	50
10-20:	TGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGT	50
10-01:	GTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCA	100
10-20:	GTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCA	100
10-01:	GTTACCTAATACGTATCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGC	144
10-20:	TTAACYTAATACGTTAGTGTTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGC	144

Figura 65. Alineamiento de las secuencias de las bandas 10-01 y 10-20

Asimismo, se amplificó una banda en el experimento a 30°C que apareció a la misma altura que la banda identificada como la cepa inoculada en el filtro, pero su secuenciación mostró que tampoco se trató de la cepa inoculada. Más aún, se trató de una secuencia con importantes diferencias, filogenéticamente muy distinta. Ambas secuencias se encuentran alineadas en la figura 66.

10-01:	TGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGT	58
30-01:	TGGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGA	58
10-01:	GTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAG--GG	112
30-01:	GTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTGTCCGGGAGAAATCGG	113
10-01:	CAGTTACC----TAATACGTATCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGC	144
30-01:	C-----CCGGGTAAATACCCCGGTGGRATGACGGTACCGA-AGAAGAAGC	144

Figura 66. Alineamiento de las secuencias de las bandas 10-01 y 30-01

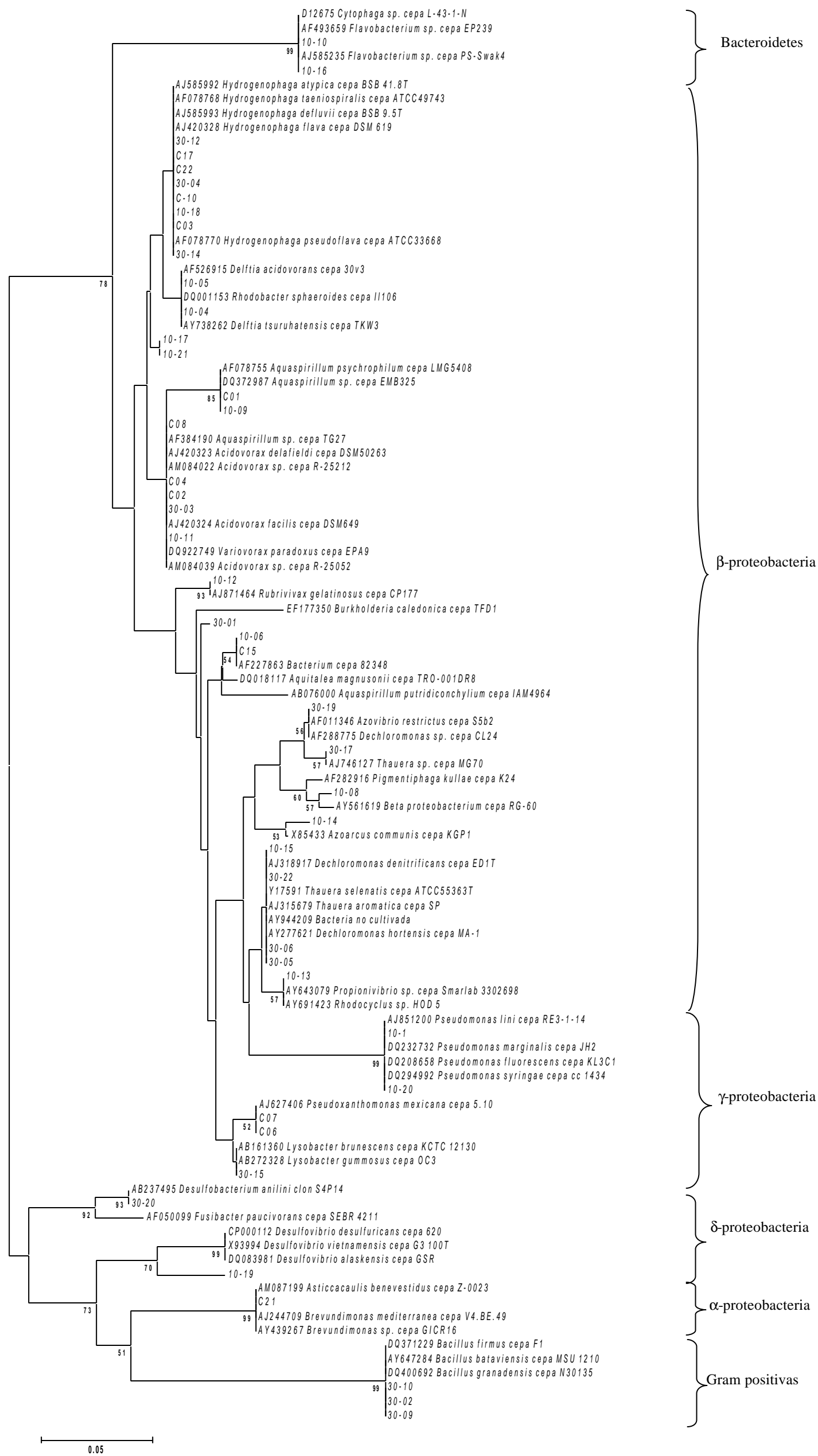


Figura 63. Árbol filogenético *Neighbour-Joining* basado en la secuencia de la región V3 del ADNr 16S, mostrando las posiciones de las secuencias de 44 bandas de TGGE obtenidas en este estudio y otras depositadas en la base de datos EMBL. La barra indica un 5% de divergencia estimada. Los números junto a las ramas indican el valor de *bootstrap* cuando éste fue superior al 50%.

5. DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

El trabajo de investigación realizado presenta varios aspectos fundamentales que obedecen a los objetivos planteados en la investigación. Por un lado la formación de la biopelícula, para lo cual empleamos diferentes inoculantes y por otro la influencia de la temperatura en todas las fases del proceso (inoculación, estabilización y fase estable). Se ha considerado además la influencia de la temperatura y otros factores operacionales como la carga hidráulica sobre la formación de la biopelícula y la biodiversidad de la misma. Los resultados obtenidos en cada una de las fases de la investigación se han analizado de forma separada, correlacionándose en aquellos aspectos que son coincidentes. De este modo este apartado de discusión se fragmentará en varios bloques.

Para el desarrollo de este trabajo se partió de la experiencia en sistemas de biopelícula de filtros sumergidos para la desnitrificación de aguas subterráneas llevadas a cabo previamente por nuestro grupo de investigación (Gómez, 1998; Moreno, 2001). Como punto de partida se ha empleado idéntica tecnología a escala de laboratorio y se han utilizado las cepas bacterianas previamente aisladas, procediendo de este modo tanto a la selección de inoculantes como a valorar el efecto de la temperatura, aspectos aun no desarrollados dentro de esta línea de investigación y de gran interés para la aplicación de la tecnología. De igual modo, se persiguió la formación de biopelícula a partir de la microbiota presente de manera natural en el agua subterránea, para comparar los resultados obtenidos a través de estas diferentes metodologías.

Selección de inoculantes.

En el tratamiento de aguas subterráneas mediante un proceso biológico de biopelícula siempre se ha realizado una inoculación previa de esta. Para realizar esta fase previa, tradicionalmente se ha empleado fango activo procedente del reactor biológico de estaciones depuradoras, dada su alta concentración en microorganismos y la presencia de diferentes especies bacterianas desnitrificantes (Gómez et al, 2000).

4.- DISCUSIÓN

El empleo de fango activo como inoculante da lugar a la formación de biopelículas heterogéneas en cuya composición microbiológica se encuentran diferentes grupos microbianos dentro de los cuales destacan diversas especies de bacterias desnitrificantes (Gómez et al, 2003). Esta composición presenta ciertos inconvenientes ya que los microorganismos no desnitrificantes consumen parte de la fuente de carbono sin una efectividad en la eliminación de nitrato, ciertos grupos microbianos como los reductores de nitrato pueden alterar la calidad del agua en especial en lo referente a la concentración de nitrito y otros como los reductores de sulfato pueden afectar a las características organolépticas. A esto debemos unirle la posibilidad de que en la biopelícula estén presentes microorganismos patógenos que afectarían a la calidad final del efluente tratado (Moreno, 2001).

Ante estos problemas presentados parece interesante emplear un cultivo puro de microorganismos previamente seleccionados para realizar una inoculación selectiva del sistema, con el cual obtener biopelículas más homogéneas que permiten un mejor rendimiento y calidad del efluente tratado (Moreno et al, 2002).

Trabajos previos realizados en el campo de la desnitrificación (Gómez, 1998), permitieron aislar 250 cepas bacterianas diferentes de una biopelícula desnitrificante formada con fango activo, las cuales presentaban como característica común el ser desnitrificantes. Todos y cada uno de estos microorganismos podría emplearse como inoculante selectivo para la formación de la biopelícula. Sin embargo, se hace necesario, debido al elevado número de estos, realizar una selección en función de diferentes características que son básicas para que el microorganismo presente interés como inoculante. Junto con esto hay que tener en cuenta que la aplicación de un microorganismo para la inoculación de un sistema cuyo objetivo sea el tratamiento de aguas destinadas al consumo humano obliga a asegurarse de la auténtica identidad de la bacteria empleada.

Los pasos para lograr la selección de las cepas desnitrificantes a inocular en el sistema en condiciones de esterilidad dieron lugar a la preselección de 7 cepas bacterianas todas ellas pertenecientes a la familia Pseudomonadaceae, y dentro de ésta, al género *Pseudomonas*. Las

bacterias pertenecientes a este género son aeróbicas, con un metabolismo que usa el oxígeno como aceptor de electrones, pudiendo usar, en algunos casos, el nitrato como aceptor de electrones alternativo. Numerosas especies de *Pseudomonas* han demostrado su capacidad desnitrificante frente a nitratos y nitritos (Mohseni-Bandpi et al., 1998, Kesseru et al., 2002). Éste es el caso de las cepas finalmente seleccionadas, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mandelii* y *Pseudomonas brassicacearum* están descritas en la literatura como especies capaces de desnitrificar (Achouak et al., 2000; Verhille et al., 1999). El crecimiento de las cepas descritas a bajas temperaturas ha sido estudiado por dichos autores, estableciendo un rango de crecimiento que coincide con el rango estudiado en nuestra investigación (4-37°C).

De este modo llegamos a la selección de tres cepas bacterianas desnitrificantes, todas ellas caracterizadas por su alta actividad y capacidad de crecimiento a bajas temperaturas, no tratándose en ningún caso de microorganismos patógenos.

Estas características no son suficientes para poder catalogar al microorganismo seleccionado como un buen inoculante. Junto a estos requerimientos básicos debemos también prestar atención a la capacidad para formar una biopelícula activa en el menor tiempo posible y que esta de lugar a un sistema estable con alto rendimiento en eliminación de nitrógeno en las condiciones de funcionamiento del filtro sumergido. A la vez se hace necesario que el proceso no afecte a otros parámetros de calidad del agua y que pueda trabajar con la mínima influencia de la temperatura.

Todas las cepas seleccionadas procedían de una biopelícula formada con fango activo de una estación depuradora de fangos activos, por lo que este se seleccionó también como inoculante para poder valorar las ventajas o inconvenientes que la inoculación selectiva presenta frente al empleo del inoculante clásico.

De las cepas identificadas y descritas, sólo la descrita como *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 en un principio demostró ser capaz de producir N_2 en medio desnitrificante semisólido cuando se usaba etanol en lugar de sacarosa como fuente de carbono. Sin embargo,

4.- DISCUSIÓN

todas las cepas ensayadas fueron capaces de usarlo cuando se inoculó el sistema con ellas. Esto implica una adaptación de la cepa a la fuente de carbono empleada, lo cual afecta al crecimiento de la misma en la fase de inoculación, tal como se manifestó en las curvas de crecimiento. La cepa catalogada como *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 presentaba cierta ventaja frente al resto, la cual se manifestó por un más rápido crecimiento del microorganismo. El modelo ajustado a los datos de crecimiento bacteriano para las 3 cepas inoculadas demuestra que en el caso de *Pseudomonas fluorescens* cepa A24, a las temperaturas de 10 y 20°C, es la cepa que experimenta antes en el tiempo el inicio del crecimiento exponencial que caracteriza todos los crecimientos de las cepas, a todas las temperaturas. Dicha ventaja en el crecimiento, cuyo origen es la mejor adaptación a la fuente de carbono, deja de manifestarse a la temperatura de 30°C, probablemente debido a una mala adaptabilidad de la cepa a esta temperatura.

Este mayor o menor crecimiento del microorganismo en la fase de inoculación no fue determinativo para la formación de la biopelícula, la cual se caracterizó a través de los recuentos de microorganismos adheridos a la superficie del soporte. Para el caso de *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 el crecimiento en el cultivo fue más significativo a 20°C, muy por encima del observado a 10 y 30°C. El recuento de bacterias adheridas a la superficie resultó ser elevado a 20°C, mientras que a 30°C resultó más bajo. Sin embargo para 10°C la presencia de bacterias adheridas a la superficie fue similar a 20 °C. Igual resultado se obtiene para la cepa *P. mandelii* cepa A103, que en los resultados de crecimiento en el cultivo se manifestó más acusada a 20 y 30°C, con respecto a 10°C. Sin embargo la adherencia al soporte fue importante a 20°C mientras que a 30°C esta adherencia resultó más pobre a pesar de la mayor presencia de microorganismos en el cultivo. Nuevamente para *P. brassicacearum* cepa A343 no se encontró correlación entre la presencia de microorganismos en el cultivo y la adherencia de estos al soporte.

Ante estos resultados debemos destacar que no hay correlación entre el mayor o menor número de microorganismos presentes en el cultivo utilizado para la inoculación y la adherencia de estos a un determinado soporte. Esta adhesión, que podemos considerar como la fase previa de formación de biopelícula (Evans, 2000) está condicionada en parte por el tipo

de microorganismo empleado y se afecta fuertemente por la temperatura, de modo que cada una de las cepas empleadas presenta un óptimo de temperatura que favorece el inicio de la formación de la biopelícula.

El cuarto inoculante, que todavía no se ha mencionado en la presente discusión, es el fango activo extraído del reactor biológico de fangos activos de una estación depuradora. De dicho inoculante no se obtuvieron curvas de crecimiento ya que este se empleaba con un alto número de microorganismos, no como un cultivo bacteriano puro. Los recuentos de bacterias adheridas a la biopelícula formada al finalizar la inoculación mostraron también una cierta influencia de la temperatura en la adherencia de microorganismos al soporte sin una relación directamente proporcional con la temperatura. De dichos resultados, se extrae que la temperatura a la que se da una mejor adhesión y crecimiento de la biopelícula es a 20°C, análogo a lo observado para *P. mandelii* cepa A103 o *Pseudomonas fluorescens* cepa A24. Esta es la temperatura a la que más se acercan las condiciones térmicas medias a las que estaba sometido el fango activo del reactor biológico de la estación depuradora en la zona de Granada, lógico es, por tanto, que los microorganismos que lo componen estén más adaptados a estas temperaturas, formando así la biopelícula con mayor facilidad para estas condiciones, tal como sucede con las especies indicadas anteriormente.

Se conoce que la adhesión y colonización de las bacterias sobre una superficie varía sustancialmente de una especie bacteriana a otra, entrando en juego numerosos factores entre los que se encuentran los efectos térmicos (Percival et al., 2000), como ya se expuso en el capítulo introductorio de la presente memoria. Además, existen otros factores a tener en cuenta, como la fuerza entre las interacciones célula-superficie, el tiempo de desarrollo de un contacto adhesivo, la influencia del pH, fuerzas iónicas, el tipo de sustrato, el ciclo de vida de la célula, etc. (Evans, 2000). Todo esto nos lleva a que la mayor o menor facilidad para la formación de una biopelícula sea dependiente del inoculante empleado, así como de los factores ambientales entre los que debemos destacar la temperatura.

Influencia de la Temperatura sobre el funcionamiento del filtro con los distintos inoculantes..

Al igual que para el resto de procesos biológicos la temperatura afecta a la desnitrificación de modo que a mayor temperatura el proceso es más rápido (Payne, 1981). Esta influencia afecta al crecimiento de los microorganismos, de modo que a mayor actividad biológica, mayor energía y por ello mayor crecimiento poblacional. Sin embargo ya hemos observado en los resultados sobre selección de microorganismos que este patrón no se repite por igual en todos los casos, existiendo unos máximo de crecimiento para las cepas estudiadas en temperaturas en torno a los 20°C, por encima de las cuales el crecimiento poblacional desciende. Es esperable pues que este comportamiento también afecte al funcionamiento del filtro sumergido.

Como cualquier sistema biológico, este precisa de un tiempo para su puesta en marcha, proceso que aceleramos con la inoculación previa del sistema. Mansell y Schroeder (1999) observaron en la desnitrificación realizada en un reactor de membrana de flujo continuo que la biopelícula formada sobre la membrana tardaba unas 48 horas en alcanzar un buen rendimiento de desnitrificación. Dicho periodo de estabilización también se refleja en nuestros resultados. Usualmente, este periodo de estabilización en el que los rendimientos en eliminación de nitrógeno son variables, suele obviarse en los estudios comparativos a nivel de investigación. Sin embargo su importancia y el efecto que la temperatura tenga sobre esta fase es de suma importancia en la explotación de este tipo de sistemas.

Se ha considerado como estabilidad del sistema aquel momento en el que se alcanzan los mejores rendimientos en eliminación de nitrógeno, los cuales se mantienen constantes a lo largo del tiempo. Teniendo esto en cuenta, el tiempo en el que el sistema alcanza la fase estable de funcionamiento demuestra una dependencia con la temperatura que afecta a todos los inoculantes empleados en el estudio. A diferencia de lo observado en la fase de colonización del material soporte, donde el inoculante empleado presenta mayor relevancia que la temperatura, el desarrollo posterior de la biopelícula, que estará condicionado por el crecimiento de los microorganismos (Percival et al, 2000), es más dependiente de la

temperatura, encontrándose en todos los casos estudiados una más rápida estabilización a mayor temperatura.

El descenso en la concentración de nitrógeno en el efluente tratado con respecto al tiempo manifestaron una alta concentración en los primeros días (fase de estabilización) y baja concentración, de forma asintótica en los días finales del experimento (fase estable). Los coeficientes de los ajustes denotan que la caída en las concentraciones de nitrógeno en el efluente con el tiempo es más o menos rápida, dependiendo en todo caso de la temperatura. El tiempo de funcionamiento, por tanto, es determinante en los rendimientos de eliminación de nitrógeno del sistema, los cuales se mantendrán constantes una vez superada la fase de estabilización. Se advierte, además, que para el tiempo ensayado, el sistema permanece estable en general, no afectándole el enriquecimiento de ésta con los microorganismos presentes en el agua subterránea. Igualmente el sistema no se vio afectado por los problemas de atascamiento del mismo, fenómeno que altera los rendimientos y la calidad del efluente obtenido mediante un tratamiento de filtros sumergidos (Gómez et al, 2004), Una vez alcanzada la fase estable del proceso, este se mantiene en funcionamiento durante diez días, periodo que nos permite valorar a modo comparativo los rendimientos entre sistemas con diferente inoculante y temperatura, sin que el filtro sumergido sufra problemas de atascamiento.

No sólo la temperatura afecta a la fase de estabilización, también depende del inoculante empleado, aunque la influencia de la temperatura en cada caso es diferente. Así para bajas temperaturas la fase de estabilización es más rápida con cultivos puros, mientras que a elevadas temperaturas, la estabilización más rápida se logró para el sistema inoculado con fango activo. Las características propias del inoculante empleado son determinantes en este proceso, así podemos considerar como más adecuado para el desarrollo de biopelículas a bajas temperaturas los cultivos puros seleccionados por su carácter psicrófilo que ya demostraron en la fase de selección de microorganismos, mientras que el fango activo estará compuesto por microorganismos más adaptados a temperaturas elevadas.

El fin último de la aplicación del sistema de filtros sumergidos es la desnitrificación del agua subterránea contaminada con nitratos. Moreno (2001) estableció que los rendimientos

4.- DISCUSIÓN

de eliminación obtenidos con la inoculación selectiva, a escala piloto, eran superiores a los obtenidos en sistemas inoculados con fango activo, por tratarse de una biopelícula más homogénea en la que el consumo de fuente de carbono estaba suponiendo una eliminación directa de nitrato.

En los ensayos realizados a escala de laboratorio con inoculantes seleccionados en función de su capacidad a crecer a bajas temperaturas, los rendimientos alcanzados en eliminación de nitrógeno para cada una de las cepas seleccionadas, no diferían mucho de los obtenidos en el sistema inoculado con fango activo, aunque hay que destacar que en todos los casos los rendimientos oscilaban en torno al 90 %, sin apreciarse oscilaciones de consideración entre inoculantes para condiciones óptimas de rendimiento (máxima temperatura). La diferencia de escala es influyente en el comportamiento del sistema, siendo por lo general peor el comportamiento del sistema cuando se incrementa la escala. Esto es debido en parte a la homogeneidad del sistema completo. Así, mientras para el ensayo a escala de laboratorio todo el filtro sumergido se encuentra colonizado por el inoculante, a escala piloto la colonización es dependiente de la altura del biofiltro (Gómez et al, 2003).

Otro aspecto diferenciador entre las escalas es la influencia de la temperatura. Así para la escala de laboratorio, la temperatura exterior se mantiene constante en el valor establecido, mientras que en escala piloto el sistema sufrirá variaciones horarias de temperatura en función de la climatología. En este caso la capacidad de adaptación del inoculante a las condiciones de temperatura es determinante en el mantenimiento del rendimiento.

Esta influencia de la temperatura en el rendimiento es observada en el sistema inoculado con *P. brassicacearum* cepa A343, que experimenta un aumento en el rendimiento con el aumento de la temperatura alcanzando el máximo a la máxima temperatura ensayada (30°C). Este comportamiento esperable en un sistema de filtros sumergidos destinado a la desnitrificación, no se repite para el resto de los inoculantes, incluido fango activo, para los cuales se obtienen rendimientos similares independientes de la temperatura, en un rango de variación de 10 a 30°C.

La influencia de la temperatura sobre la actividad biológica está sobradamente demostrada, existiendo una dependencia exponencial reflejada por la ecuación de Arrhenius. Sin embargo a excepción de los ensayos con *P. brassicacearum* cepa A343 el resto de inoculantes no mostraron esta dependencia. Hay que considerar que el sistema de biopelícula presenta una alta concentración de microorganismos, que en nuestro caso tienen la capacidad de crecer a bajas temperaturas. Sin embargo el comportamiento del fango activo tan solo obedece a un enriquecimiento en microorganismos con igual capacidad que las cepas seleccionadas.

Dichos resultados de buenos rendimientos coinciden con los obtenidos por Rodgers y Zhan (2004), que usan también un sistema de biopelículas para eliminar nitratos de aguas residuales, mediante un sistema que combina la nitrificación y la desnitrificación. Se obtienen en las unidades desnitrificantes un rendimiento en eliminación de nitrógeno entre 94-98% para una temperatura controlada de ensayo de 10°C. Estos rendimientos coinciden con los obtenidos a 10°C para la cepa *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 y son similares a los de *P. mandelii* cepa A103, aunque hay que considerar que la carga de nitrógeno entrante es más baja, de los 22,5 mg N/l que aproximadamente entran en nuestro sistema a los 9,2, 12,5 y 18 mg/l de los mencionados autores.

Otros estudios también muestran una baja dependencia del proceso de desnitrificación con la temperatura, como el llevado a cabo por Welander y Mattiasson (2003), que estudian las tasas de desnitrificación a diferentes temperaturas, usando una biopelícula desnitrificante sobre un soporte suspendido en el seno del fluido. En este estudio, no se aprecian diferencias entre los rendimientos obtenidos entre los 15 y los 11°C, ni entre los 7 y los 3°C, aunque sí hay una caída importante de rendimiento en este caso cuando se pasa de 20 a 15 y 11°C: ésta se ve reducida en un 41,3 y un 43,47% respectivamente. Este efecto inhibitor de la temperatura puede asemejarse aunque en menor medida al manifestado por la cepa *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343, cuyo rendimiento desciende un 30,4% al bajar de 30 a 10°C, y un 20,5 % al bajar de 20 a 10°C.

Aslan y Türkman (2004) también estudiaron el efecto de la temperatura en la eliminación de nitrato en un reactor usando paja de trigo como fuente de carbono. Se recogieron datos de una desnitrificación casi completa cuando la temperatura se encontraba por encima de los 20°C, mientras que por debajo de este valor de temperatura (a 15°C) la eficiencia de eliminación de nitrato se redujo drásticamente a un 10%. La cantidad de nitrógeno en forma de nitrato en el influente era la misma que la adicionada en este estudio. La actividad desnitrificante desaparecía por completo a 5°C. Los resultados de rendimiento obtenidos por estos autores a 15°C son mucho menores que los obtenidos aquí a 10°C, incluso para la cepa que obtuvo el peor resultado, *Pseudomonas brassicacearum* cepa A343, que sólo redujo a un 66,57% su eficiencia en la eliminación del nitrógeno.

La desnitrificación heterotrófica realizada en los diferentes ensayos también resultó análoga a la obtenida en el estudio realizado por Darbi y Viraraghavan (2004), que aplicaron una desnitrificación autotrófica usando *Thiobacillus denitrificans* como inculante. El nitrato presente en la salida a 10°C es el mismo que a 20°C, aunque sí se manifiesta un aumento en la concentración de nitritos. Además, aquí se produce la acumulación de sulfatos como consecuencia de la oxidación del sulfuro por *Thiobacillus denitrificans*. A 4°C, sin embargo, la eficiencia en la eliminación de nitrato baja considerablemente.

Ilies y Mavinic (2001) estudiaron la capacidad de eliminación de nitrógeno en un sistema “Bardenpho” de 4 fases, con dos reactores anóxicos. Este experimento denota la dependencia que en sistemas de fangos activos la microbiota desnitrificante tiene hacia la temperatura ambiente: el sistema experimentó una reducción de un 47% en los rendimientos de eliminación de NO_x al bajar la temperatura a 17°C. Al bajar de nuevo a 14°C, se recogió una nueva disminución de los rendimientos de desnitrificación, Al bajar a temperaturas alrededor de los 10°C, el rendimiento de desnitrificación del sistema se redujo por debajo del 5%, afectándose también los procesos de nitrificación. Estas reducciones progresivas de los rendimientos de eliminación de nitrógeno dan lugar a efluentes con altas concentraciones de amonio y nitratos. Al aumentar la temperatura de nuevo a 15°C, no se observó ninguna mejoría en los procesos, aun pasados algunos días. Resultados que contrastan con la

independencia que demuestra el sistema utilizado en esta investigación con la temperatura, en función del inoculante utilizado.

La presencia de nitritos en el efluente es un inconveniente para el uso humano del agua, debido a la alta toxicidad de dicha sustancia. En el capítulo introductorio se mencionaron todos los efectos negativos que la presencia de nitritos puede desencadenar en el cuerpo humano, por tratarse de un compuesto metahemoglobinizante y nitrosante. De ahí la importancia de que el sistema utilizado produzca un menor número de nitritos en el efluente, y, en el caso de que éstos aparezcan, poner en marcha los tratamientos posteriores necesarios por su desaparición.

El aumento que experimenta la concentración de nitritos en el efluente los primeros días de funcionamiento antes de alcanzar una fase de estabilidad se deben a que la desnitrificación que se está realizando en esos momentos no es eficiente ni completa, llevando a la acumulación de productos intermedios de desnitrificación que son los nitritos. Pasados estos primeros momentos de inestabilidad, la concentración de nitritos en el efluente baja. Dicho efecto también fue observado por Moreno (2001) en un sistema de filtros sumergidos a escala piloto.

Una de las causas que dan lugar a la presencia de nitrito en el efluente tratado es el déficit en fuente de carbono (Kesserü et al. 2003) o bien los problemas hidráulicos consecuencia del atasco del sistema de filtros sumergidos (Gómez, et al, 2004). Ninguno de estos problemas son detectados en nuestros ensayos, sobre todo en la fase inicial de estabilización, la cual transcurre con un exceso de dosificación de etanol. En esta fase la biopelícula está en formación, no siendo suficiente el número de microorganismos unidos al soporte como para transformar el nitrato presente en el efluente en las condiciones de carga establecidas. Esta situación se normaliza en la fase estable en la que la presencia de microorganismos sobre el soporte es más adecuada.

El tiempo que precisa el sistema para reducir su concentración de nitrito en el efluente sí se observa que depende en cierto grado de la temperatura, ya que tanto dichos valores

4.- DISCUSIÓN

elevados como su posterior reducción se alcanzan más rápidamente a medida que aumenta la temperatura, en la mayoría de los inoculantes empleados. Esta influencia es similar a la descrita anteriormente para la estabilización del sistema con respecto a la eliminación de nitrógeno.

Una vez alcanzado un estado de estabilidad en el sistema, los valores de nitrito en el efluente se mantuvieron dentro de unos límites. *P. brassicacearum* y *P. mandelii* cepa A103 reducen esta concentración de nitritos con el aumento de la temperatura. Darbi y Viraraghavan (2004) observaron un aumento de la concentración de nitritos debido a una pérdida de eficiencia en el proceso de desnitrificación inhibido por la temperatura, al bajar a 15 y 10°C, con una concentración de 7 mg/l de nitrito. Dichas concentraciones se asemejan a las alcanzadas por el sistema inoculado con *P. brassicacearum* cepa A343 aunque la media de los valores alcanzados por *P. mandelii* cepa A103 se encuentran bajo los 3 mg/l a 10°C, reduciendo este valor a mayores temperaturas. Es destacable el valor de nitritos de salida del sistema inoculado con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 a 20°C, cercanos a 6 mg/l.

Todo esto nos lleva a una dependencia tanto de la temperatura como del inoculante empleado para la formación de la biopelícula, sobre la presencia de nitrito en el efluente tratado. Hay que destacar que la desnitrificación varía de unos microorganismos a otros, por lo que en determinados casos se produce una acumulación de este compuesto en el agua debido al proceso desnitrificante desarrollado por el microorganismo concreto (Lazarova et al, 1994). Hay también que tener en cuenta que el efecto de la temperatura sobre las diferentes enzimas implicadas en la desnitrificación es variable en función de la cepa bacteriana que se trate, razón por la que unos inoculantes acumularán más o menos nitrito ante una variación de temperatura.

Otro de los problemas derivados de la utilización de una tecnología de naturaleza biológica para el tratamiento de agua cuyo destino final es el consumo humano, es la pérdida de calidad con respecto a los caracteres organolépticos, en especial la turbidez. Estos valores son muy variables en función de la temperatura y del inoculante empleado. Por lo general en todos los casos se superan de media 1 UNT, valor marcado por los criterios sanitarios de la

calidad del agua de consumo humano para el agua a la salida de la estación de tratamiento de aguas potables (R. D. 140/2003), lo cual obliga en toda circunstancia a realizar un post-tratamiento del agua desnitrificada.

De todos los inoculantes empleados *P. mandelii* cepa A103 se ha mostrado como el más estable frente a la alteración de este parámetro en el efluente tratado, mientras que para el resto hay una gran variabilidad dependiente también de la temperatura. Hay que destacar que en casi todos los ensayos los puntos de baja turbidez se detectaron al principio de la fase de estabilización, lo que nos lleva a relacionar esta turbidez con el desprendimiento de microorganismos de la biopelícula formada.

Los recuentos de microorganismos en el efluente tratado también resultaron excesivos para los ensayos realizados en relación con el límite marcado por la legislación de 100 ufc/ml (R. D. 140/2003). La necesidad de post-tratamiento se hace también aquí indispensable para que el agua sea apta para el consumo humano.

El fango activo es comparativamente el inoculante que menos microorganismos añade al agua a las 4 temperaturas ensayadas, superando solamente a *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 en la fase estable a la temperatura de 10°C. Salvo para el fango activo, es corriente que aparezcan menos microorganismos en salida durante la fase estable a medida que la temperatura de ensayo es más baja, debido a la ralentización del metabolismo microbiano y con ello al menor crecimiento bacteriano. Conforme se incrementa la presencia de microorganismos en la biopelícula, estos son susceptibles de desprenderse por diferentes factores, entre los que podemos destacar el flujo del agua o la propia estabilidad de la biopelícula (Percival, 2000), sobre la cual influirán otros factores como el inoculante empleado, el material de relleno etc.

Podemos considerar que las biopelículas formadas con los inoculantes previamente seleccionados son menos estables que la formada por fango activo frente a elementos de arrastre como el flujo del agua. Esto es debido a la diferente composición microbiana de la biopelícula que en el caso del fango activo permite contar con diferentes microorganismos,

4.- DISCUSIÓN

algunos de los cuales son responsables de dar estabilidad a la biopelícula. Esta ventaja que presenta la biopelícula formada por fango activo debido a su heterogeneidad en composición se ve contrarestanda por los incrementos en los consumos de fuente de carbono y por la presencia de microorganismos patógenos (Moreno, 2001).

Los ajustes lineales realizados entre los valores de turbidez y de microorganismos en salida pretendían llegar a establecer una correlación entre ambos parámetros, que justificaran la presencia de la turbidez como consecuencia directa de la presencia de microorganismos. Estos ajustes son en general muy débiles, llegando a justificar muy poco la relación entre ambos. Aunque el análisis estadístico afirma que en la mayoría de los casos esta relación existe, la aplicación del modelo es insuficiente para explicar la presencia de turbidez debida a los microorganismos. Por lo tanto, debe existir otro u otros factores que influyan en el parámetro de turbidez. No es una suposición tan rara, ya que la presencia de una biopelícula ya justifica la adición de diferentes sustancias al agua, como moléculas orgánicas, fragmentos de la propia matriz polimérica producida por los microorganismos, etc.

Salvo para el inoculante *P. brassicacearum* cepa A343, los ajustes empeoran su coeficiente de correlación a medida que la temperatura aumenta, lo que justificaría que a mayor temperatura estos otros factores influyentes en la turbidez se hacen más patentes, mientras que la presencia de microorganismos pierde fuerza. Para este inoculante, sin embargo, se obtiene un buen ajuste a 20°C y un ajuste aceptable a 30°C, por lo que puede que en este caso sí tenga más influencia la presencia de microorganismos totales en el efluente tratado.

El pH es otro de los factores de control a considerar en un procesos de desnitrificación, debido a la alcalinización del agua consecuencia de la eliminación desasimilatoria de nitrato (Payne, 1981). Esta posible variación es importante a considerar debido a la alteración de la calidad del agua y a la posible inhibición que el pH puede ejercer sobre el proceso. Existe un incremento importante en la reducción de nitratos en cultivos aclimatados al ascender el pH de 8,5 a 9 (Glass and Silverstein, 1998). El proceso origina cierta alcalinidad, provocando un incremento en los valores de pH en salida en comparación con los valores de entrada, tal como

describen autores como Oh et al. (2001) en sus estudios sobre desnitrificación mediante filtros sumergidos, y por Welander y Mattiasson (2003). En este estudio puede constatarse que no se aprecian caídas considerables de pH en salida, como consecuencia del efecto regulador sobre el pH que tiene el relleno empleado en el filtro sumergido (Ramos, 2003). Dicho proceso regulador mantuvo el pH en torno a 8 en casi todo momento, evitando por ello pHs que pudieran afectar al proceso.

El uso de residuos arcillosos de la construcción por rechazo por roturas para el relleno de los filtros sumergidos tiene la ventaja del carácter regulador sobre el pH del medio líquido en el que se encuentre inundado (Ramos, 2003), lo que permitiría descartar la adición de sustancias reguladoras de pH en sistemas de eliminación de nitrógeno.

Estudio de las comunidades bacterianas de las biopeículas utilizando TGGE basada en fragmentos amplificados del gen codificante del ARN ribosómico 16S

La cepa desnitrificante A24 identificada como *Pseudomonas fluorescens* mostró una elevada capacidad de eliminación de nitrógeno a todas las temperaturas ensayadas después de un periodo de aclimatación más o menos largo. Es destacable el hecho de que esta cepa obtuvo el mayor rendimiento de eliminación del nitrato a 5°C, comparada con el resto de los inoculantes empleados, que sufrieron una reducción drástica de su capacidad de eliminación a esta temperatura. Asimismo, aunque a mayores temperaturas el sistema se mostrara menos eficaz, el rendimiento en ningún caso fue inferior al 80%. Por tanto, se seleccionó la cepa A24 como inoculante y con el fin de realizar estudios más detallados del funcionamiento del sistema y de la biodiversidad de las biopeículas formadas en el mismo.

En los experimentos realizados, el sistema fue operado a 10 y a 30°C, y se procedió a un aumento de la carga hidráulica superficial de 2,8 a 7,0 m³/m²·d. Debido a ello, se consideró oportuno aumentar la altura del relleno de 20 a 35 cm, mejorando así la capacidad de eliminación de nitrógeno del sistema al aumentar la cantidad de biomasa desnitrificante. Durante el experimento se apreció un mayor crecimiento de biomasa sobre la superficie del relleno, pero no se registraron pérdidas de carga, por lo que no fue necesario realizar lavados

4.- DISCUSIÓN

del sistema. Experimentos llevados a cabo a cargas superiores ($10 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{d}$) en filtros sumergidos para la desnitrificación de aguas subterráneas sí necesitaron de la realización de contralavados periódicos (Moreno *et al.*, 2005). Es por ello que se consideró oportuno establecer una carga hidráulica máxima por debajo de $10 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{d}$.

El aumento progresivo de la carga hidráulica superficial del sistema tuvo efectos inmediatos en la capacidad de eliminación de nitrógeno, que disminuyó en todos los casos justo después del cambio en las condiciones de operación. Al trabajar a valores de carga hidráulica relativamente bajos, el sistema vio limitada la capacidad de crecimiento de biomasa sobre la superficie del relleno, hecho coadyuvado por la relación C/N, que no se estableció en exceso. Esta reducción de la capacidad de eliminación fue debida a la insuficiente cantidad de microorganismos desnitrificantes presentes en la biopelícula, incapaces de eliminar la carga contaminante entrante. El sistema debió, por tanto, aumentar la biomasa desnitrificante presente en la biopelícula antes de lograr una desnitrificación eficaz de la carga entrante (Oh *et al.*, 2001). Es por ello que a las pocas horas de haber aumentado la carga hidráulica el sistema recuperó la capacidad de eliminación inicial, sin provocar atascamiento por crecimiento excesivo de biomasa. En estas condiciones, la relación C/N establecida inicialmente como 1,08 fue suficiente para realizar una desnitrificación eficaz en el sistema a 30°C mientras se operó a cargas hidráulicas inferiores a $6 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{d}$. El aumento de la carga hidráulica por encima de este valor hizo necesario aumentar la dosificación de fuente de carbono ya que la relación C/N inicial fue insuficiente para mantener los rendimientos elevados de desnitrificación. Cuando se trabajó a la temperatura de 10°C , esta relación fue aumentada incluso antes de incrementar la carga hidráulica, dada la incapacidad del sistema para realizar una desnitrificación completa del agua influente.

Gómez *et al.* (2000b) establecieron esta relación C/N inicial de 1,08 al usar etanol como fuente de carbono como la idónea para la desnitrificación de aguas subterráneas contaminadas con nitrato usando una biopelícula generada a partir de fango activo procedente del tratamiento secundario de una estación depuradora de aguas residuales; otros estudios establecen una relación superior, de 1,35 (Aslan, 2005). En nuestros ensayos, la demanda de fuente de carbono aumentó al trabajar a menor temperatura, aunque ambos sistemas lograron

altos rendimientos de desnitrificación al establecer la relación C/N en 1,20. Este aumento de la necesidad de fuente de carbono al disminuir la temperatura para cumplir con los rendimientos de desnitrificación ha sido descrito en otros estudios (Elefnisiotis and Li, 2006).

Los resultados discutidos hasta el momento establecen la previa inoculación del filtro sumergido como un proceso fundamental para el correcto funcionamiento del mismo. Si bien en ausencia de inoculación se produce la formación de una biopelícula sobre la superficie del relleno a partir de la microbiota autóctona del agua subterránea, nuestros resultados demuestran que el sistema es incapaz de igualar los rendimientos de eliminación de nitrógeno alcanzados por la planta cuando es inoculada, para todas las temperaturas ensayadas en este estudio.

Los recuentos de microorganismos viables realizados a lo largo de estos dos experimentos permitieron conocer el número de microorganismos cultivables (heterotrofos aerobios) presentes en la biopelícula por mg de biomasa. La observación de las colonias en estos cultivos permitió identificar un solo tipo morfológico colonial como el único presente en la biopelícula al inicio del experimento e inmediatamente después de finalizar el proceso de inoculación (sistema operado en condiciones de esterilidad). La morfología de este tipo colonial fue idéntica a la de la cepa seleccionada inoculada en el filtro, lo cual es un indicio de que bajo las condiciones impuestas la biopelícula en efecto estaba constituida íntegramente por células de la cepa A24. Este dato fue igualmente constatado por los estudios de microscopía realizados (SEM). Sin embargo, una vez que el sistema comenzó a ser alimentado con agua subterránea, se comprobó cómo las colonias con la morfología correspondiente a la de la cepa inoculante pasaron gradualmente de ser dominantes en los recuentos en placa a representar una mínima fracción de las bacterias cultivables de la biopelícula, en los experimentos desarrollados a las dos temperaturas ensayadas (Figs. 58 y 60).

La identificación de un microorganismo dependiendo de sus características morfológicas y/o fisiológicas es sin embargo casi imposible, ya que adolecen de rasgos morfológicos destacados para su clasificación (Muyzer, 1999). Asimismo, las técnicas de cultivo estándar tienen el inconveniente de que el mínimo cambio o ajuste en el medio pueden

4.- DISCUSIÓN

provocar cambios en el número o composición de células aisladas con esta técnica (Hattori *et al.*, 1997). En los últimos años, estas limitaciones han sido resueltas mediante la aplicación de las técnicas independientes de cultivo al estudio de la microbiología de los sistemas de tratamiento de aguas, lo que ha supuesto un gran avance en el conocimiento acerca de la ecología microbiana de los mismos. La existencia de nuevos géneros bacterianos con interés biotecnológico se ha puesto de manifiesto gracias a estas técnicas, al mismo tiempo que se ha podido demostrar que determinados grupos bacterianos, cuyo cultivo en condiciones de laboratorio es difícil o hasta la fecha imposible, juegan importantes papeles en procesos como el tratamiento de las aguas residuales para la eliminación de nitrógeno (Jetten *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 2002). La comparación de datos obtenidos mediante el empleo simultáneo de técnicas dependientes e independientes de cultivo indican que la diversidad microbiana en una biopelícula es mucho mayor que el resultado de bacterias cultivables arroja (Park *et al.*, 2007; Sercu *et al.*, 2005).

Así pues, dado que el estudio basado únicamente en los recuentos de bacterias cultivables proporciona una información limitada de la composición de las comunidades microbianas complejas, en nuestros experimentos se estimó necesaria la aplicación de técnicas moleculares independientes de cultivo, al objeto de establecer con mayor claridad la evolución de las comunidades bacterianas en las biopelículas formadas en el filtro sumergido (en función del tiempo y de los cambios en los parámetros de operación del sistema), y evaluar si la inoculación con la cepa A24 influía sobre la composición de la comunidad bacteriana que se desarrolla en el biofiltro. En este estudio se escogió para tales fines la metodología TGGE, basada en la amplificación y secuenciación parcial del gen codificante del ARNr 16S. La técnica TGGE genera perfiles de bandas que representan las poblaciones dominantes dentro de una comunidad bacteriana compleja. Esta técnica, junto con su análoga DGGE, ha sido ampliamente usada en los últimos años para estudiar la variedad de diferentes ecosistemas bacterianos, incluyendo sistemas de depuración basados en filtros sumergidos (Gómez-Villalba *et al.*, 2006; Cortés-Lorenzo *et al.*, 2006; Vilchez *et al.*, 2007).

En los estudios de la comunidad microbiana mediante TGGE, generalmente se asume que cada banda corresponde a una única población (especie) y que su densidad se corresponde

con la abundancia relativa de la misma. No obstante se ha de tener en consideración que esta afirmación puede no ser del todo correcta, porque la técnica de TGGE se basa en la reacción de amplificación PCR de las poblaciones desconocidas (Becker *et al.*, 2000; Farrelly *et al.*, 1995; Polz *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1996), y dicha reacción puede introducir determinados artefactos (Wang *et al.*, 1997). En la reacción de PCR existe además una amplificación preferente de las moléculas de ADN más abundantes en la muestra inicial, produciéndose un sesgo en la composición de la muestra amplificada al final. No obstante, la abundancia y la densidad de las bandas da una medida de la diversidad de la comunidad bacteriana original, aunque no exactamente del clásico significado dado para el índice de diversidad de Shanon (Stamper *et al.*, 2003).

Aunque la técnica TGGE no es cuantitativa, diversos estudios han constatado que esta metodología sólo es capaz de detectar organismos que constituyan como mínimo un 1% de la comunidad total (Muyzer y Smalla, 1998). Este umbral limita la detección de ADN amplificado a partir de células muertas o poblaciones poco numerosas, por lo cual se ha de considerar que las bandas presentes en los perfiles de TGGE son representantes de poblaciones mayoritarias en las muestras de las que proceden, cuyos genes para el ARNr 16S se encuentran en las concentraciones más altas (Lawrence *et al.*, 2004). Si bien es evidente que la técnica tiene limitaciones que impiden el conocimiento de la diversidad completa de hábitat complejos, su gran aportación es la posibilidad que ofrece para analizar y comparar simultáneamente un número elevado de muestras, siendo una herramienta muy valiosa en estudios ecológicos y para la monitorización de las tecnologías de biorremediación (Smalla *et al.*, 2007).

En el presente estudio, al analizar los perfiles de biodiversidad obtenidos mediante TGGE, se aprecian visualmente importantes diferencias en las comunidades componentes de las biopelículas analizadas. Si se observan los perfiles de bandas del sistema control, puede apreciarse que son distintos dependiendo de la temperatura de ensayo, con la aparición y desaparición de distintas bandas (Figura 61). También se observa que las biopelículas del sistema no inoculado previamente presentaron una menor biodiversidad que las de los ensayos inoculados, manifestado este hecho por la mayor presencia de bandas en los experimentos

4.- DISCUSIÓN

realizados con la cepa *Pseudomonas fluorescens* A24. Estos resultados indican que la inoculación previa del sistema con esta cepa favoreció la colonización posterior de la biopelícula por las especies presentes en el agua subterránea.

El análisis de clusters reflejado en el dendrograma de la figura 63 ratifica estas diferencias ya comentadas en cuanto a la biodiversidad hallada en los sistemas sin inoculación previa y los sistemas inoculados, separando ambos en dos clusters diferenciados, con una similitud de tan sólo un 50%. Asimismo, muestra que el cambio en las condiciones de carga hidráulica en los experimentos inoculados con la cepa A24 afectó a la composición de la biopelícula del filtro sumergido, separando los perfiles de biodiversidad en diferentes subclusters si se trabajó a $2,8 \text{ m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{d}$ o a cargas hidráulicas superiores. Jiang y Morin (2004) establecieron que la invasibilidad de un sistema por nuevas especies puede estar íntimamente relacionada con la disponibilidad de recursos dentro del sistema. Un cambio en la disponibilidad podría incrementar dicha invasibilidad del ecosistema. El cambio en las condiciones de carga hidráulica y fuente de carbono pudieron potenciar este cambio en la estructura de las comunidades en la biopelícula.

Los estudios basados en TGGE permiten además la identificación de los miembros dominantes de las comunidades bacterianas, mediante la reamplificación y secuenciación de las bandas separadas en el gel, y la posterior comparación de las secuencias con las depositadas en las bases de datos (Muyzer y Smalla, 1998). De este modo, en el curso del presente estudio la secuenciación de las bandas aisladas de los experimentos control ha permitido llevar a cabo la afiliación taxonómica de un total de 12 microorganismos procariotas integrantes de las biopelículas, todas pertenecientes al grupo de las Proteobacterias. (Figura 63). Las Proteobacterias se han descrito con frecuencia como el grupo que constituye la mayor proporción de la microbiota tanto de los fangos activos como de las aguas fluviales, lacustres, aguas subterráneas y otros hábitats subsuperficiales (Ekendal *et al.*, 1994; Balkwill *et al.*, 1997; Crump *et al.*, 1999; Glöckner *et al.*, 2000; Detmers *et al.*, 2004).

Estudios filogenéticos recientes, realizados sobre un amplio número de muestras de diferentes procedencias geográficas, demuestran que existen clusters bacterianos

filogenéticamente coherentes típicos de aguas dulces, y confirman una abundancia global de las β -Proteobacterias en dichos hábitats, con una importante presencia numérica de integrantes de la Familia *Comamonadaceae*, que constituyen el denominado cluster cosmopolita de aguas dulces β I (Glöckner *et al.*, 2000, Brümmer *et al.*, 2003). Casi un 60% de las bandas reamplificadas en estos experimentos control se encontraron encuadradas dentro de esta familia. Varias de las bandas identificadas en las biopelículas generadas en el sistema control estaban filogenéticamente relacionadas con especies del género *Hydrogenophaga*. En especial, las bandas C-03, C-10 y C-22 aparecen con más intensidad en los carriles correspondientes a los experimentos a 5 y 10°C, siendo más tenues o desapareciendo totalmente a mayores temperaturas. Este efecto también se aprecia para otras bandas que no pudieron ser reamplificadas con éxito. Se conoce que la temperatura puede afectar a la diversidad de la biopelícula a través de la selección de los microorganismos que la componen. Se han establecido fenómenos de psicrotolerancia en determinadas especies del género *Hydrogenophaga*, (Nedwell and Rutter, 1994), y ha sido descrita su presencia en biopelículas de ambientes de agua dulce de manera más intensa en épocas invernales que en templadas (Brümmer *et al.*, 2003). Este hecho puede explicar la presencia de bandas más intensas relacionadas con esta especie a menores temperaturas.

En los experimentos realizados en el sistema inoculado con la cepa A24 a 10°C y 30°C, el grupo de las β -Proteobacterias se presentó también como el más abundante en estos experimentos, siendo identificadas dentro de este grupo cepas relacionadas con las familias *Comamonadaceae* y *Rhodocyclaceae*. Numerosas especies desnitrificantes pertenecientes a esta última familia se han aislado en plantas de tratamiento de agua residual con eliminación biológica de fósforo y nitrógeno (Thomsen *et al.*, 2007, Heylen *et al.*, 2006), como *Thauera*, *Rhodocyclus*, *Dechloromonas*, *Azoarcus* o *Azovibrio*. Bandas secuenciadas procedentes de los experimentos a ambas temperaturas se encontraron relacionadas filogenéticamente con dichos géneros. Asimismo, se encontraron diferencias en las especies colonizadoras identificadas en ambos experimentos: a 10°C se observó la presencia de bandas que al secuenciarlas se situaron cercanas filogenéticamente a la clase *Bacteroidetes*, mientras que a 30°C aparecieron bandas identificadas dentro del grupo de las Gram positivas, cercanas al género *Bacillus*. La

4.- DISCUSIÓN

coexistencia de variedad de géneros desnitrificantes diferentes ha sido observada en otros estudios sobre la diversidad desnitrificante en fangos activos (Heylen *et al.*, 2006; Osaka *et al.*, 2006). Las biopelículas heterogéneas pueden estar mejor adaptadas que los cultivos puros a soportar mejor cambios negativos en las condiciones ambientales (Ferrera *et al.*, 2004). El hecho de que la biopelícula se enriquezca con numerosas especies con actividad desnitrificante asegura un buen funcionamiento del sistema caso de producirse situaciones que puedan perjudicar a determinadas poblaciones pero no a otras, proporcionando más resistencia y versatilidad al proceso descontaminante.

Determinados géneros de la clase *Bacteroidetes* han sido descritos como desnitrificantes, como el género *Flavobacterium* (Fillery, 1983). Asimismo, las especies de *Bacillus* constituyen casi el 10% de las bacterias desnitrificantes en suelos (Weier and MacRae, 1992). Numerosos géneros de *Bacillus* presentes en suelos (Kim *et al.*, 2005) y utilizados en sistemas de tratamiento de agua residual con eliminación de nitrógeno (Park *et al.*, 2007) tienen conocida actividad desnitrificante. En particular, se han aislado cepas relacionadas con las especies *Bacillus firmus* y *Bacillus bataviensis* en sedimentos de estuarios de ríos (Fan *et al.*, 2006), siendo la primera capaz de realizar el proceso de desnitrificación, y la segunda capaz de realizar únicamente la reducción de nitrato (Heyrman *et al.*, 2004). La temperatura óptima de crecimiento de *Bacillus bataviensis* es de 30°C, lo que explicaría su abundancia en los ensayos a esta temperatura y no a temperaturas inferiores.

Dados los resultados obtenidos, puede afirmarse que la presencia de una biopelícula más o menos desarrollada al finalizar el proceso de inoculación favorece en gran medida la colonización del relleno por las especies presentes de manera natural en el agua subterránea. Es remarcable el hecho de que, a pesar de la posición dominante de la cepa inoculada *Pseudomonas fluorescens* A24 al comenzar el funcionamiento del sistema con agua subterránea contaminada, ésta es incapaz de mantenerse en la biopelícula. Al final de los experimentos, la banda correspondiente a dicha cepa desaparece de los perfiles en gel de TGGE, lo que indica que la cepa no llegó a constituir ni siquiera el 1% del total de biodiversidad presente en la biopelícula. El hecho de que en los recuentos de bacterias cultivables se detectara una cepa de idéntica morfología en bajo porcentaje (Figs. 57 y 59) es

indicativo de que aún se encontraba presente en la biopelícula, pero en muy pequeña representación. Aún así, el sistema no mostró una pérdida de rendimiento en la eliminación de nitrógeno debida a esta caída drástica en la presencia de la cepa inoculada en la biopelícula. Por tanto, el proceso de desnitrificación pudo seguir llevándose a cabo por la actividad desnitrificante de las cepas colonizadoras del filtro sumergido. Esta actividad desnitrificante fue sin embargo baja en el sistema sin inocular, debido probablemente a que la presencia de especies desnitrificantes en la biopelícula fue escasa. Por tanto, la colonización del filtro por especies autóctonas es mejorada con la previa inoculación del sistema con una cepa capaz de desarrollar una biopelícula en poco tiempo. Cabe preguntarse entonces si el hecho de que dicha cepa inoculada tenga una elevada actividad desnitrificante es un factor fundamental, o sólo coadyuvante para un mejor funcionamiento del sistema durante los primeros días de operación

Los resultados de este trabajo demuestran por tanto que las poblaciones mayoritarias de bacterias en las biopelículas se corresponden en líneas generales con las descritas con mayor frecuencia en aguas dulces, tanto prístinas como contaminadas, y que la diversidad biológica se ve claramente influenciada por las condiciones de funcionamiento del reactor. Estos resultados han permitido por tanto profundizar en el conocimiento de la estructura, actividad biológica y composición de las comunidades microbianas de las biopelículas formadas a partir de la inoculación del sistema con una cepa desnitrificante bajo diferentes condiciones de carga hidráulica. Se abre la puerta así a futuros trabajos en los que se pueda establecer de manera más precisa el papel jugado por el inoculante en los rendimientos de desnitrificación logrados por el sistema, para alcanzar la optimización de este proceso descontaminante.

6. CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio y considerando los antecedentes bibliográficos en relación con el tema, se han establecido las siguientes conclusiones que podríamos enumerar en los siguientes términos:

- 1 Para llevar a cabo una adecuada eliminación de nitrato de aguas subterráneas contaminadas, mediante la aplicación de la tecnología de filtros sumergidos, es imprescindible realizar una inoculación previa del sistema, independientemente de la temperatura de operación. Esta inoculación permite la rápida generación de biopelícula sobre el material soporte, la cual actúa como descontaminante. La supresión de la inoculación prolonga considerablemente la puesta en marcha del sistema.
- 2 La colonización del material soporte del filtro sumergido por bacterias es posible en el rango de temperaturas entre 5 y 30 °C. Sin embargo, el desarrollo posterior de la biopelícula está afectado por la temperatura de operación, la cual influye de forma diferente en función del inoculante empleado.
- 3 La evolución temporal de la eliminación de nitrato de las aguas subterráneas mediante el sistema de filtros sumergidos se subdivide en fase de estabilización y fase estable, dependiendo de la temperatura el tiempo necesario para alcanzar esta última fase, y siendo la evolución más rápida a mayor temperatura, independientemente del inoculante empleado para la formación de biopelícula.
- 4 La tasa de eliminación de nitrógeno en el sistema ensayado alcanza valores máximos cuando el sistema es operado a 20 y 30 °C, independientemente del inoculante empleado para la formación de la biopelícula. Sin embargo, para las temperaturas de 5 y 10 °C la tasa de eliminación de nitrógeno es variable, no alcanzándose siempre los máximos posibles.
- 5 La evolución temporal de la concentración de nitrito en el efluente procedente del filtro sumergido aplicado a la desnitrificación de aguas subterráneas sigue

un patrón similar independientemente del tipo de inoculante empleado y temperatura de operación. La concentración tiende a ascender durante la fase de estabilización, hasta alcanzar un máximo a partir del cual desciende hasta valores constantes. La concentración máxima detectada, el tiempo requerido para alcanzar dicha concentración, y la concentración media en la fase estable, se incrementan a menor temperatura.

- 6 La operación del sistema de filtros sumergidos a diferentes temperaturas (5, 10, 20 o 30°C) no influye sobre la turbidez y número de microorganismos cultivables detectados en el agua tratada.
- 7 La inoculación previa del sistema de filtros sumergidos con *Pseudomonas fluorescens* cepa A24 facilita la colonización de la biopelícula por especies propias del agua subterránea a tratar, desplazando paulatinamente esta microbiota colonizadora al inoculante inicial.
- 8 Las comunidades bacterianas de las biopelículas generadas en el filtro sumergido destinado a la desnitrificación de aguas subterráneas están dominadas por especies propias de ecosistemas de agua dulce, principalmente del grupo de la β -proteobacterias y en especial con géneros pertenecientes a las familias *Comamonadaceae* y *Rhodocyclaceae*. La composición de la comunidad microbiana en las biopelículas es dinámica, estando influenciada de forma significativa por características operacionales del proceso, como la temperatura y la carga hidráulica.

6 CONCLUSIONS

According to the results of the study, and taking into account the findings described in previously published papers, we conclude:

- 1 To achieve an adequate nitrate removal from contaminated groundwater using the submerged filter technology it is necessary to carry out a previous inoculation of the system, regardless the temperature of operation. This inoculation allows for the rapid generation of a biofilm on the support material, which acts as the decontaminant agent. The elimination of the inoculation process extends considerably the start-up of the system.
- 2 The colonization of the support material of the submerged filter by bacteria is possible within the range of temperatures from 5 to 30°C. However, the subsequent development of the biofilm is affected by the temperature of the operation, which has a variable influence depending of the inoculum used.
- 3 The temporal evolution of nitrate elimination capacity from contaminated groundwater using the submerged filter technology is subdivided in stabilization phase and stable phase. The time needed to reach the stable phase is temperature-dependent. This evolution is faster at higher temperatures, regardless the inoculum used for the biofilm formation.
- 4 The nitrogen removal rate in the system reaches maximum values when the system is operated at 20 and 30°C, regardless the inoculum used for biofilm formation. However, for temperatures 5 and 10°C the removal rate is variable, not always reaching the highest possible values.
- 5 The temporal evolution of nitrite concentration in the effluent from the submerged filter for the groundwater denitrification follows a similar pattern regardless the type of inoculum used and the temperature of operation. This concentration tends to increase during the stabilization phase, until it reaches a maximum from which it decreases to constant values. The maximum

concentration recorded, the time needed to reach this concentration and the average concentration in the stable phase increase at lower temperatures. .

- 6 The operation of the submerged filter system at different temperatures (5, 10, 20 and 30°C) does not have an influence on the values of turbidity and number of plateable microorganisms recorded in the effluent.
- 7 The previous inoculation of the submerged filter system with *Pseudomonas fluorescens* strain A24 facilitates the colonization of the biofilm by species typically inhabiting the groundwater to be treated; this microbiota displaces gradually the initial inoculum.
- 8 The bacterial communities of the biofilm generated in the submerged filter for the denitrification of groundwater are dominated by typical species of freshwater ecosystems, mainly from the β -proteobacteria group, and specially with genera belonging to the *Comamonadaceae* and *Rhodocyclaceae* families. The composition of the bacterial community is dynamic, being significantly influenced by characteristics of the operation process, such as temperature and hydraulic loading.

7. BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFÍA

- ACHOUAK, W.; SUTRA, L.; HEULIN, T.; MEYER, J.M.; FROMIN, N.; DEGRAEVE, S.; CHRISTEN, R. and GARDAN, L. 2000 *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis Thaliana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 9-18
- AELION, C. M.; SHAW, J. N. and WAHL, M. 1997. Impact of suburbanization on ground water quality and denitrification in coastal aquifer sediments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **213**: 31-51.
- AESØY, A.; ØDEGAARD, H.; BACH, K.; PUYOL, R. and HAMON, M. 1998 Denitrification in a packed bed biofilm reactor (BIOFOR) – experiments with different carbon sources. *Water Research* **32** (5): 1463-1470.
- AHN, Y.-H. 2006. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry* **41**: 1709–1721
- ALEXANDRA, M.; O'CONNOR, A. and KOSSON, D.S. 1994 Metabolisms of aniline under different anaerobic electron-accepting and nutritional conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry* **13**: 233-239.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; and DLIPMAN, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402
- AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA). 1999. Water quality and management. A handbook of community water supplies. Fifth edition. McGraw-Hill, Inc.
- APHA, AWWA and WEF. 1992 Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th ed. American Public Health Association. Washington, D.C.
- ASLAN, S. and TÜRKMAN, A. 2004 Simultaneous removal of endosulfan ($\alpha + \beta$) and nitrates from drinking waters using wheat straw as substrate. *Environment International* **30**: 449-455.

- ASLAN, S. 2005. Combined removal of pesticides and nitrates in drinking waters using biodenitrification and sand filter system. *Process Biochemistry*, **40**(1): 417-424.
- ATLAS, R.M. y BARTHA, R. 2002 Ecología microbiana y microbiología ambiental. Pearson Educación, S.A. Madrid.
- BALKWILL, D.L.; REEVES, R.; DRAKE, G.; REEVES, J.Y.; CROKER, F.; KING, M.B. and BOONE, D.R. 1997. Phylogenetic characterization of bacteria in the subsurface microbial culture collection. *FEMS Microbiology Reviews*, **20**: 201-216.
- BANG, D.-Y.; WATANABE, Y. and NOIKE, T. 1995. An experimental study on aerobic denitrification with polyvinyl alcohol as a carbon source in biofilms. *Water Science and Technology* **32**: 235-242.
- 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**: 2269-274.
- BECKER, S.; COGER, P.; OEHLMANN, R. and ERNST, A. 2000. PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative *Taq* nuclease assays in analyses of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 4945-4953.
- BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY (2ª Ed, Vol I). 2003. Garrity, G.; Boone, D.R.; Castenholz, R.W. (Eds) Springer Verlag, Nueva York, EE.UU.
- BERKS, B.C.; FERGUSON, S.J.; MOIR, J.W.B. and RICHARDSON, D.J. 1995. Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochimica et Biophysica Acta* **1232**: 97-173.
- BONIN, P and GILEWICZ, M. 1991. A direct 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.
- BORCHERDING, H.; LEIKEFELD, S.; FREY, C.; DIEKMANN, S. and STEINRÜCKE, P. 2000. Enzymatic microtiter plate-based nitrate detection in environmental and medical analysis. *Analytical Biochemistry*, **282**: 1-9.

- BRAUN, C. and ZUMFT, W.G. 1992 The structural genes of the nitric oxide reductase complex from *Pseudomonas stutzeri* are part of a 30-kilobase gene cluster for denitrification. *Journal of Bacteriology* **174**: 2394-2397.
- BRÜMMER, I.H.M.; FELSKÉ, A. and WAGNER-DÖBLER, I. 2003. Diversity and seasonal variability of β -Proteobacteria in biofilms of polluted rivers: analysis by temperature gradient gel electrophoresis and cloning. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(8): 4463-4473.
- CHANG, C.C.; TSENG, S.K. and HUANG, H.K. 1999. Hydrogenotrophic denitrification with immobilized *Alcaligenes eutrophus* for drinking water treatment. *Bioresource Technology* **69**: 53-58.
- CHARACKLIS, W.G. and WILDERER, P.A. (Eds) 1989 Structure and Function of Biofilms. John Wiley and Sons, Inc.
- CHARACKLIS, W.G. and MARSHALL, K.C. 1990. Biofilms. John Wiley and Sons, Inc.
- COHEN, Y. 2001. Biofiltration- the treatment of fluids by microorganisms immobilised into the filter bedding material: a review. *Bioresource Technology* **77**: 257-274.
- COLE, J.A. 1994. Biodegradation of inorganic N compounds. *En: Biochemistry of microbial degradation* (C. Ratledge, Ed.). Kluwer Academic Publishers, Londres. 487-512 pp.
- CONSTANTIN H. AND FICK, M. Influence of c-sources on the denitrification rate of a high-nitrate concentrated industrial wastewater. *Water Research* **31**: 583-589.
- CORTÉS-LORENZO, C.; MOLINA-MUÑOZ, M.L.; GÓMEZ-VILLALBA, B.; VILCHEZ, R.; RAMOS, A.; RODELAS, B.; HONTORIA, E. and GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. 2006. Analysis of community composition of biofilms in a submerged filter system for the removal of ammonia and phenol from industrial wastewater. *Biochemical Society Transactions* **34**: part 1.
- CRUMP, B.; VIRGINIA-AMBRUST, V. and BAROSS, J. 1999. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 3192-3204.
- DARBI, A. and VIRARAGHAVAN, T. 2004 Effect of low temperature on denitrification. *Fresenius Environmental Bulletin* **13** (3b): 279-282.

- DAVIES, K.J.; LLOYD, D. and BODDY, L. 1989 The effects of oxygen on denitrification in *Paracoccus Denitrificans* and *Pseudomonas Aeruginosa*. *Journal of General Microbiology* **135**: 2445-2451.
- DAWSON, R.N. and MURPHY, K.L. 1972. The temperature dependency of biological denitrification *Water Research* **6**: 71-83.
- DETMERS, J.; STRAUSS, H.; SCHULTE, U.; BERGMANN, A.; KNITTEL, K. and KUEVER, J. 2004. FISH shows that *Desulfobacterium* spp. are the dominating sulfate-reducing bacteria in a pristine aquifer. *Microbial Ecology*, **47**: 236-242.
- DRURY, C.F.; FINDLAY, W.I. and MCKENNEY, D.J. 1991. Oxygen inhibition of denitrification in chloroform fumigated and non-fumigated soil. *Soil Biology and Biochemistry* **23(8)**: 711-715.
- EKENDAL, S.; ARLINGER, J.; STAHL, F. and PEDERSEN, K. 1994. Characterization of attached bacterial populations in deep granitic groundwater from the Stripa research mine by 16S-rRNA gene sequencing and scanning electron microscopy. *Microbiology*, **140**: 1575-1583.
- ELEFNISIOTIS, P and LI, D. 2006. The effect of temperature and carbon source on denitrification using volatile fatty acids. *Biochemical Engineering Journal*, **28(2)**: 148-155.
- EVANS, L.V. 2000 (Ed) Biofilms: recent advances in their study and control. *Harwood Academic Publishers. Amsterdam*.
- FARRELY, V.; RAINEY, F.A. and STACKEBRANDT. 1995. Effect of genome size and *rrn* copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**: 2798-2801.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- FERRERA, I.; MASSANA, R.; XCASAMAYOR, E.O.; BALAGUÉ, V.; SÁNCHEZ, O.; PEDRÓS-ALIÓ, C. and MAS, J. 2004. High-diversity biofilm for the oxidation of sulfide-containing effluents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **64**: 726-734.
- FILLERY, I.R.P. 1983. Biological denitrification. In *Gaseous Loss of Nitrogen from Plant-Soil Systems*, ed. J.R. Freney and J.R. Simpson, 33-64. The Hague, Netherlands: Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Pub.

- GÁLVEZ, J.M.; GÓMEZ, M.A.; HONTORIA, E. and GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. 2003. Influence of hydraulic loading and air flowrate on urban wastewater nitrogen removal with a submerged fixed-film reactor. *Journal of Hazardous Materials* **B101**: 219-229.
- GAMBLE, R.N., BETLACH, M.R. and TIEDJE, J.M. 1977. Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. *Applied and Environmental Microbiology* **33** (4): 926-939.
- GLASS, C. and SILVERSTEIN, J. 1998 Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Water Research* **32** (3): 831-839.
- GLASS, C. and SILVERSTEIN, J. 1999 Denitrification of high-nitrate, high-salinity wastewater. *Water Research* **33** (1): 223-229.
- GLÖCKNER, F.O.; ZAICHIKOV, E.; BELCOVA, N.; DENISSOVA, L.; PERNTHALER, J.; PERNTHALER, A. and AMANN, R. 2000. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of Actinobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(11): 5063-5065.
- 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.; MORENO, B.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. y HONTORIA-GARCÍA, E. 2000a. Eliminación biológica de nitrato de aguas subterráneas mediante filtros sumergidos. *Alquibla* 6: 121-137.
- 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* **B80**: 69-80.
- GÓMEZ, M.A.; HONTORIA-GARCÍA, E and GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. 2002 Effect of dissolved oxygen concentration on nitrate removal from groundwater using a denitrifying submerged filter *Journal of Hazardous Materials* **B90**: 267-278.
- GÓMEZ, M.A.; GÁLVEZ, J.M.; HONTORIA-GARCÍA, E and GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. 2003 Influence of ethanol concentration on biofilm bacterial composition from a denitrifying submerged filter used for contaminated groundwater *Journal of Bioscience and Bioengineering* **95** (1): 1-7.

- GÓMEZ, M.A., HONTORIA, E. and GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. 2004 Nitrogen removal from saline high nitrate industrial wastewater containing phenol. *Fresenius Environmental Bulletin* **13** (4): 326-331.
- GÓMEZ-VILLALBA, B.; CALVO, C.; VILCHEZ, R.; GÓNZÁLE-LÓPEZ, J. and RODELAS, B. 2006. TGGE analysis of the diversity of ammonia-oxidizing and denitrifying bacteria in submerged filter biofilms for the treatment of urban wastewater. *Applied Microbiology and Technology* **72**: 393-400.
- GONZÁLEZ, P.J.; CORREIA, C.; MOURA, I.; BRONDINO, C.D. and MOURA, J.J.G. 2006. Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *Journal of Inorganic Biochemistry* **100**: 1015-1023
- GRADY L, DAIGGER G.T, LIM H.C. 1999 Biological wastewater treatment. Ed. MarcelDekker, Inc. New York.
- GUIMERÀ, J. and CANDELA, L. 1994. Analysis of groundwater pollution by nitrates in a Spanish coastal aquifer under intensive horticultural land-use. En *Groundwater-Drought, Pollution & Management*, ed Reeve, C. and Watts, J. A.A. Balkema, Rotterdam.
- HAGEDORN-OLSEN, C.; MOLLER, I.H.; TOTTRUP, H. and HARREMOËS, P. 1993. Oxygen reduces denitrification in biofilm reactors. *Second International Specialized Conference on Biofilm Reactors*. París pp 133-141.
- HARTER, T.; DAVIS, H.; MATHEWS, M. C. and MEYER, R.D. 2002. Shallow groundwater quality on dairy farms with irrigated forage crops. *Journal of Contaminant Hydrology* **55**: 287-315.
- HATTORI, T.; MITSUI, H.; HAGA, H.; WAKAO, N.; SHIKANO, S.; GORLACH, K.; KASAHARA, Y.; EL-BELTAGY, A. and HATTORI, R. 1997. Advances in soil microbial ecology and the biodiversity. *Antonie van Leewenhoek*, **72**: 21-28.
- HELL, F.; LAHNSTEINER, J.; FRISCHHERZ, H. and BAUMGARTNER, G. 1998. Experience with full-scale electro dialysis for nitrate and hardness removal. *Desalination* **117**: 173-180.
- HEYRMAN, J.; VANPARYS, B.; LOGAN, N.A.; BALCAEN, A.; RODRIGUEZ-DÍAZ, M.; FELSKÉ, A. and DE VOS, P. 2004. *Bacillus Novalis* sp. nov., *Bacillus vireti* sp. nov., *Bacillus soli* sp. nov., *Bacillus bataviensis* sp. nov. and *Bacillus drentensis* sp. nov., from the Drentse A grasslands. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**: 47-57.

- HEYLEN, K.; VANPARYS, B.; WITTEBOLLE, L.; VERSTRAETE, W.; BOON, N. And DE VOS, P. 2006. Cultivation of denitrifying bacteria: optimization of isolation conditions and diversity study. *Applied and Environmental Microbiology*, **72(4)**: 2637-2643.
- HOLTAN-HARTWIG, L.; DÖRSCH, P, and BAKKEN, L.R. 2002 Low temperature control of soil denitrifying communities: kinetics of N₂O production and reduction. *Soil Biology and Biochemistry* **34**: 1797-1806.
- HUDAK, P.F. 1999. Chloride and nitrate distributions in the Hickory aquifer, Central Texas, USA. *Environment International* **25 (4)**: 393-401.
- INSTITUTO TECNOLÓGICO GEOMINERO DE ESPAÑA (I.T.G.E.). 1998. Mapa de contenido en Nitrato de las aguas subterráneas en España. Escala 1: 1.500.000. Ministerio de Medio Ambiente.
- ILIES, P. and MAVINIC, D.S. 2001 The effect of decreased ambient temperature on the biological nitrification and denitrification of a high ammonia landfill leachate. *Water Research* **35 (8)**: 2065-2072.
- ISLAM, S. and SUIDAN, M.T. 1998. Electrolytic denitrification: long term performance and effect of current intensity. *Water Research* **32 (2)**: 528-536.
- IWAI, S. and KITAO, T. 1994. Wastewater treatment with microbial biofilms. Technomic publishing company, inc. Pennsylvania, EE.UU.
- JEANMOUGIN, F.; THOMPSON, J.D.; GOUY, M.; HIGGINS, D.G. and GIBSON, T.J. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochemical Science*. **23**: 403-405.
- JEONG, C.H. 2001. Effect of land use and urbanization on hydrochemistry and contamination of groundwater from Taejon area, Korea. *Journal of Hydrology* **253**: 194-210.
- JETTEN, M.S.; STROUS, M.; VAN DE PASS-SCHOONEN, K.T; SCHALK, J.; VAN DONGEN, U.G.; VAN DE GRAAF, A.A.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; VAN LOOSTRECH, M.C. and KUENEN, J.G. 1998. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Reviews* **22**: 421-437
- JETTEN, M.S.M.; SCHMID, M.; SCHMIDT, I.; WUBBEN, M.; VAN DONGEN, U.; ADMA, W.; SLIEKERS, O.; REVSBECH, N.P.; BEAMONT, H.J.E.; OTTONSEN,

- L.; VOLCKE, E.; LAANBROED, H.J.; CAMPOS, J.L.; COLE, J.; VAN LOOSDRECHT, M.; MULDER, J.W.; FUERST, J.; RICHARDSON, D.; VAN DE PAS, K.; MÉNDEZ-PAMPIN, R.; THIRD, K.; CIRPUS, I.; VAN SPANNING, R.; BOLLMANN, A.; NIELSEN, L.P.; OP DEN CAMP, H.; SCHULTZ, C.; GUNDERSEN, J.; VANROLLEGHEM, P.; STROUS, M.; WAGNER, M. and KUENEN, J.G. 2002. Improved Nitrogen removal by application of new nitrogen-cycle bacteria. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, **1(1)**: 51-63.
- JIANG, L. and MORIN, P.J. 2004. Productivity gradients cause positive diversity-invasibility relationships in microbial communities. *Ecology Letters*, **7**: 1047-1057.
- KESSERU, P.; KISS, I.; BIHARI, Z. and POLYÁK, B. 2002 Investigation of the denitrification activity of immobilized *Pseudomonas butanovora* cells in the presence of different organic substrates. *Water Research* **36**: 1565-1571.
- KESSERU, P.; KISS, I.; BIHARI, Z. and POLYÁK, B. 2003. Biological denitrification in a continuous-flow pilot bioreactor containing immobilized *Pseudomonas butanovora* cells. *Bioresource Technology* **87**: 75-80.
- KIM, Y.-H.; HWANG, E.-D.; SHIN, W.S.; CHOI, J.-H.; HA, T.W. and CHOI, S.J. 2007. Treatments of stainless steel wastewater containing a high concentration of nitrate using reverse osmosis and nanomembranes. *Desalination* **202**: 286-292.
- KNOWLES, R. 1982 Denitrification. *Microbiological Review* **46**: 43-70.
- KÖNER, H. and ZUMFT, W.G. 1989 Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in a continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 1670-1676.
- KORNAROS, M. and LYBERATOS, G. Kinetic modelling of *Pseudomonas denitrificans* growth and denitrification under aerobic, anoxic and transient operating conditions. *Water Research*, **32(6)**: 1912-1922.
- KÖRNER, H. and Mayer, 1992. Periplasmic location of nitrous oxide reductase and its apoform in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. *Archives of Microbiology* **157**: 218-222.
- KÖRNER, H. 1993. Anaerobic expression of nitric oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. *Archives of Microbiology* **159**: 410-416.

- KRAFT, G. J. and STITES, W. 2003. Nitrate impacts on groundwater from irrigated-vegetate systems in a humid north-central US sand plain. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 100: 63-74.
- KRUSKAL, J. B. 1983. An overview of sequence comparison. In D. Sankoff and J. B. Kruskal, (ed.), *Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison*, pp. 1-44 Addison Wesley.
- LAPPIN-SCOTT, H.M. and COSTERTON, J.W. (Eds) 1995 *Microbial Biofilms. Cambridge University Press, Cambridge.*
- LAWRENCE, J. R., CHENIER M. R., ROY, R., BEAUMIER, D., FORTIN, N., SWERHORNE, G. D. W., NEU, T. R. and GREER. C. W. 2004. Microscale and molecular assessment of impacts of nickel, nutrients and oxygen level on structure and function of river biofilm communities. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 4326-4339.
- LAZAROVA, V.; CAPDELILLE, B. and NIKOLOV, L. 1994. Influence of seeding conditions on nitrite accumulation in a denitrifying fluidised bed reactor. *Water Research* 28(5): 1189.
- LEE, K.C. and RITTMAN, B.E. 2002. Applying a novel autohydrogenotrophic hollow-fiber membrane biofilm reactor for denitrification of drinking water. *Water Research* **36**: 2040-2052.
- LEMA RODICIO, J.M. y ROCA BORDELLO, E. 1998. Biorreactores no convencionales. En: *Ingeniería Bioquímica* (Godiá Casablancas, F. y López Santín, J. Eds.) Editorial Síntesis, Madrid.
- LUK, G. K. and AU-YEUNG, W.C. 2002. Experimental investigation on the chemical reduction of nitrate from groundwater. *Advances in Environmental Research* **6**: 441-453.
- MANSELL, B. and SCHROEDER, E.D. 1998 Biological denitrification in a continuous flow membrane reactor *Water Research* **33 (8)**: 1845-1850.
- MANSELL, B. and SCHROEDER, E.D. 2002. Hydrogenotrophic denitrification in a microporous membrane bioreactor. *Water Research* **36**: 4683-4690.
- MATSUBARA, T and MORI, T. 1968. Studies on Denitrification: IX. Nitrous Oxide, Its Production and Reduction to Nitrogen. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* **64**: 863-871.

- MIGULA, W. 1895. Bacteriaceae. In Engler and Prantl (Eds), Pflanzenfamilien, Vol I, Abt 1a. W Engelmann, Leipzig, 20-30.
- MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE, 1998. Libro Blanco del Agua en España. Madrid
- MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE, 2006. Perfil Ambiental de España, 2005. Informe Basado en Indicadores. Madrid.
- MOHSENI-BANDPI, A. and ELLIOT, D.J. 1998 Groundwater denitrification with alternative carbon sources. *Water Science and Technology* **38**: 237-243
- MORENO, B. 2001 Mejora de los parámetros de diseño de filtros sumergidos aplicados a la desnitrificación de aguas subterráneas mediante la inoculación selectiva. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- MORENO, B.; GÓMEZ, M.A.; GÁLVEZ, J.M.; HONTORIA, E. and GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. December 2002. Selective inoculation of submerged filter to enhance the nitrate removal from contaminated groundwater. *Water Intelligence online (IWA)*
- MORENO, B.; GÓMEZ, M.A.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. and HONTORIA, E. 2005a. Inoculation of a submerged filter for biological denitrification of nitrate polluted groundwater: a comparative study. *Journal of Hazardous Materials* **B117**: 141-147.
- MORENO, B.; GÓMEZ, M.A.; RAMOS, A.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. and HONTORIA, E. 2005a. Influence of inocula over start up of a denitrifying submerged filter applied to nitrate contaminated groundwater treatment. *Journal of Hazardous Materials* **B127**: 180-186.
- MULDER, A.; VAN DE GRAAF, A.A.; ROBERTSON, L.A. AND KUENEN, J. G. 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology* **16**: 177-184.
- MUYZER, G.; DE WAAL, E.C. and UITTERLINDEN, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 695-700.
- MUYZER G. and SMALLA K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, **73**: 127-141

- MUYZER, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, **2**: 317-322.
- 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.
- NEDWELL, D.B. and RUTTER, M. 1994. Influence on growth rate and competition between two psychrotolerant Antarctic bacteria: low temperature diminishes affinity for substrate uptake. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**: 1984-1992.
- NOWICKI, B.L. 1994 The effect of temperature, oxygen, salinity and nutrient enrichment on estuarine denitrification rates measured with a modified nitrogen gas flux technique. *Estuarine, Coastal AND Shelf Science* **38**: 137-156.
- NUHOGLU, A.; PEKDEMIR, T.; YILDIZ, E.; KESKINLER, B. and AKAY, G. 2002. Drinking water denitrification by a membrane bio-reactor. *Water Research* **36**: 1155-1166.
- OENEMA, O.; BOERS, P. C. M.; van EERDT, M. M.; FRATERS, B.; van der MEER, H. G.; ROEST, C. W. J.; SCHRÖEDER, J. J. and WILLEMS, W. J. 1998. Leaching of nitrate from agriculture to groundwater: the effect of policies and measures in the Netherlands. *Environmental Pollution* **102 (S1)**: 471-478.
- OH, J.; YOON, S.M. AND PARK, J.M. 2001 Denitrification in submerged biofilters of concentrated-nitrate wastewater. *Water Science and Technology* **43 (1)**: 217-223.
- ÖQUIST, M.G.; NILSSON, M.; SÖRENSSON, F.; KASIMIR-KLEMEDTSSON, Å.; TRYGGVE, P.; WESLIEN, P. and KLEMEDTSSON, L. 2004 Nitrous oxide production in a forest soil at low temperatures- processes and environmental controls. *FEMS Microbiology Ecology* **49 (3)**: 371-378
- OREN, O.; YECHIELI, Y.; BÖHLKE, J. K. and DODY, A. 2004. Contamination of groundwater under cultivated fields in an arid environment, central Arava Valley, Israel. *Journal of Hydrology* **290**: 312-328.
- OSAKA, T.; YOSHIE, S.; TSUNEDA, S.; HIRATA, A.; IWAMI, N. and INAMORI, Y. 2006. Identification of acetate- or metanol-assimilating bacteria under nitrate-reducing conditions by stable-isotope probing. *Microbial Ecology*, **52**: 253-266.

- PARK, S.Y.; YOON, J.C.; SHIN, K.S.; KIM, E.H.; YIM, S.; CHO, Y.J.; SUNG, G.M.; LEE, D.G.; KIM, S.B.; LEE, D.U.; WOO, S.H. and KOOPMAN, B. 2007. Dominance of endospore-forming bacteria on a rotating activated bacillus contactor biofilm for advanced wastewater treatment. *The Journal of Microbiology*, **45(2)**: 113-121.
- 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. John Wiley and Sons Inc. U.S.A. 213 pp.
- PERCIVAL, S.L.; WALKER, J.T. and HUNTER, P.R. 2000. Microbiological aspects of Biofilms and drinking water. CRC Press LLC. Boca Raton, Florida.
- PETERS, R.W. AND ALLEMAN, J.E. 1982. The history of fixed film wastewater treatment systems. *Proceedings of the 1st International Conference on Fixed-Film Systems*, Kings Island, Ohio, 60-88.
- PETERSEN, S.O.; NIELSEN, T.H.; FROSTEGARD, A. and OELSEN, T. 1996 O₂ uptake, C metabolism and denitrification associated with manure hot-spots. *Soil Biological Biochemistry* **28**: 341-349.
- PHILIPPOT, L. and HØJBERG, O. 1999. Dissimilatory reductases in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* **1446**: 1-23.
- PINTAR, A. and BATISTA, J. 1999. Catalytic hydrogenation of aqueous nitrate solutions in fixed-bed reactors. *Catalysis Today* **53**: 35-50.
- PINTAR, A., BATISTA, J. and LEVEC, J. 2001 Catalytic denitrification: direct and indirect removal of nitrates from potable water. *Catalysis Today* **66**: 503-510.
- PLÓSZ, B.G.; JOBBÁGY, A. and GRADY Jr, C.P.L. 2003 Factors influencing deterioration of denitrification by oxygen entering an anoxic reactor through the surface. *Water Research* **37**: 853-863.
- POLZ, M.F. and CAVANAUGH, C.M. 1998. Bias in template to product ratios in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 3724-3730.

- PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J.P. and KLEIN, D. A. 1999 Microbiología. Mc Graw Hill. Interamericana. Madrid.
- PROBANZA, A.; GUTIÉRREZ MAÑERO, F.J.; RAMOS, B.; ACERO, N. and LUCAS, J.A. 1996 Effect of heavy metals on soil denitrification and CO₂ production after short term incubation. *Microbiología SEM* **12**: 417-424.
- RAMOS, A.F. 2003 Aplicabilidad de los lechos inundados en el tratamiento de aguas residuales industriales con alta carga en compuestos nitrogenados y fenólicos en medio salino. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- RAMOS, A.F.; GÓMEZ, M.A.; HONTORIA, E. and GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. 2007. Biological nitrogen and phenol removal from saline industrial wastewater by submerged fixed-film reactor. *Jornal of Hazardous Materials* **142(1-2)**: 175-183.
- REAL DECRETO 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.
- REDDY, K.J. and LIN, J. 1999. Nitrate removal from groundwater using catalytic reduction. *Water Research* **34 (3)**: 995-1001.
- REID, D. C.; EDWARDS, A. C.; COOPER, D.; WILSON, E: and McGAW, B.A. 2003. The quality of drinking water from private water supplies in Aberdeenshire, UK. *Water Research* **37**: 245-254.
- RIDLEY, A. M.; MELE, P. M. and BEVERLY, C. R. 2004. Legume based farming in Southern Australia: developing sustainable systems to meet environmental challenges. *Soil Biology & Biochemistry* **36 (8)**: 1213-1221.
- ROBERTSON, L.A.; VAN NIEL, E.W.J.; TORRESMONS, R.A.M. and KUENEN, J.G. 1988. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphera pantotropha*. *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 2812-2818.
- RODGERS, M.; ZHAN, X.-M. and GALLAGHER, B. 2003. A pilot plant study using a vertically moving biofilm process to treat municipal wastewater. *Bioresource Technology* **89**: 739-744.
- RODERS, M. and ZHAN, X.M. 2004 Biological nitrogen removal using a vertically moving biofilm system. *Bioresource Technology* **93**: 313-319.

- RODGERS, M.; LAMBE, A. and XIAO, L. 2006. Carbon and nitrogen removal using a novel horizontal flow biofilm system. *Process Biochemistry* **41**: 2270-2275
- RODGERS, M; HEALY, M.G. and PRENDERGAST, J. 2006. Nitrification in a vertically moving biofilm system. *Journal of Environmental Management* **79**: 242-246
- RODINA, A.G. 1972 Methods in aquatic microbiology. *University Park Press*. Baltimore. Butterworths. London.
- SAITOU, N. and NEI, M. 1987 The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.
- SÁNCHEZ PÉREZ, J. M.; ANTIGÜEDAD, I.; ARRATE, I.; GARCÍA-LINARES, C. and MORELL, I. 2003. The influence of nitrate leaching through unsaturated soil on groundwater pollution in an agricultural area of the Basque Country: a case study. *The Science of the Total Environment* **317**: 173-187.
- SAUTHIER, N.; GRASMICK, A. and BLANCHETON, J.P. 1998. Biological denitrification applied to a marine closed aquaculture system. *Water Research* **32** (6): 1932-1938.
- SCHMIDT, I.; SLIEKERS, O.; SCHMID M.; BOCK, E.; FUERST J.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. and STROUS, M. 2003. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology Reviews* **27**: 481-492.
- SCHOEMAN, J.J. and STEYN, A. 2003. Nitrate removal with reverse osmosis in a rural area in South Africa. *Desalination* **155**: 15-26.
- SERCU, B.; NÚÑEZ, D.; AROCA, G.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. and LAGENHOVE, H.V. 2005. Inoculation and start-up of a biotrickling filter removing dimethyl sulfide. *Chemical Engineering Journal*, **113**: 127-134.
- SHRIMALI, M. and SINGH, K. P. 2001. New methods of nitrate removal from water. *Environmental Pollution* **112**: 351-359.
- SICH, H. and VAN RIJN, J. 1997 Scanning electron microscopy of biofilm formation in denitrifying, fluidised bed reactors. *Water Research* **31**(4): 733-742.

- SMALLA, K.; OROS-SICHLER, M.; MILLING, A.; HEUER, H.; BAUMGARTE, S.; BECKER, R.; NEUBER, G.; KROPF, S.; ULRICH, A. and TEBBE, C.C. 2007. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, TRFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? *Journal of Microbiological Methods*, **69**: 470-479.
- STAMPER, D.M., WALCH, M. and JACOBS, R.N. 2003. Bacterial population changes in a membrane bioreactor for graywater treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoretic analysis of 16S rRNA gene fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 852-860.
- SUZUKI, M.T. and GIOVANNONI, S.J. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 625-630.
- TAVARES, P.; PEREIRA, A.S.; MOURA, J.J.G. and MOURA, I. 2006. Metalloenzymes of the denitrification pathway. *Journal of Inorganic Biochemistry* **100**: 2087-2100.
- TEJERO MONZÓN, I. 2002. Procesos biológicos de película fija. XX Curso sobre tratamiento de aguas residuales y explotación de estaciones depuradoras. CEDEX, Madrid.
- 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.
- THOMSEN, T.R.; KONG, Y. and NIELSEN, P.H. 2007. Ecophysiology of abundant denitrifying bacteria in activated sludge. *FEMS Microbiology Ecology*, **60**: 370-382.
- THORBURN, P. J.; BIGGS, J.S.; WEIER, K.L. and KEATING, B. A. 2003. Nitrate in groundwaters of intensive agricultural areas in coastal Northeastern Australia. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **94**: 49-58.
- TIEDJE, J.M.; SEXTONE, A.J., MYROLD, D.D. and ROBINSON, J.A. 1982. Denitrification: ecological niches, competition and survival. *Antonie van Leeuwenhoek* **48 (6)**: 569-583.

- TREVISAN, V. 1889. I generi e le specie delle batteriacee, Zanaboni and Gabuzzi, Milan 1-35.
- TSCHERKO, D.; KANDELER, E. and JONES, T.H. 2001 Effect of temperature on below-ground N-dynamics in a weedy model ecosystem at ambient and elevated atmospheric CO₂ levels. *Soil Biology and Biochemistry* **33**: 491-501.
- UNDEN, G.; HACKENBERG, H. And DROGER, A. 1980. Isolation and functional aspects of the fumarate reductase involved in the phosphorylative electron transport of *Vibrio succinogenes*. *Biochimica et Biophysica Acta* **591**: 275-288.
- VERHILLE, S.; BAIDA, N.; DABBOUSSI, F.; IZARD, D. and LECLERC, H. 1999 Taxonomic study of bacteria isolated from natural mineral waters: proposal of *Pseudomonas jessenii* sp. nov. and *Pseudomonas mandelii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* **22**: 45-48.
- VAN DER PEER, Y.; CHAPELLE, S. and DE WACHTER, R. 1996. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Research*, **24**: 3381-3391.
- VEZA IGLESIAS, J.M. 2002. Introducción a la desalación de aguas (1ª Edición). Servicio de publicaciones de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria.
- 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.
- VILCHEZ, R.; POZO, C.; GÓMEZ, M.A.; RODELAS, B. and GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. 2007. Dominance of Sphingomonads in a copper-exposed biofilm community for groundwater treatment. *Microbiology GSM*, **153**: 325-337.
- VOLCKE, E.; LAANBROEK, H.J.; CAMPOS-GÓMEZ, J.L.; COLE, J.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; MULDER, J.W.; FUERST, J.; RICHARDSON, D.; VAN DE PAS, K.; MÉNDEZ-PAMPIN, R.; THIRD, K.; CIRPUS, I.; VAN SPANNING, R.; BOLLMANN, A.; NIELSEN, L.P.; OP DEN CAMP, H.J.M.; SCHULTZ, C.; GUNDERSER, J.; VANROLLEGHEM, P.; STROUS, M.; WAGNER, M. and KUENEN, G. 2002. Improved Nitrogen Removal by Application of New Nitrogen-Cycle Bacteria. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **1**: 51-63.

- VOLOKITA, M.; BELKIN, S.; ABELIOVICH, A. and SOARES, M.I. 1996 Biological denitrification using newspaper. *Water Research* **30** (4): 965-971.
- WAGNER, M.; LOY, A.; NOGERIRA, R.; PURKHOLD, U.; LEE, N. and DAIMS, H. 2002. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **81**: 665-680.
- WANG, G. and WANG C-Y. 1997. Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 4645-4650.
- WATANABE, K.; TERAMOTO, M.; FUTAMATA, H. and HARAYAMA, S. 1998. Molecular detection, isolation, and physiological characterisation of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated-sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 4396-4402.
- WEIER, K.L. and MacRAE, I.C. 1992. Denitrifying bacteria in the profile of a brigalow clay soil beneath a permanent pasture and cultivated crop. *Soil Biology and Biochemistry*, **24**(9): 919-923.
- WEISBURG, W.G.; BARN, S.M.; PELLETIER, D.A. and LANE D.J. 1990. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* **173**: 697-703
- WELANDER, U.; HENRYSSON, T. and WELANDER, T. 1998 Biological nitrogen removal from municipal landfill leachate in a pilot scale suspended carrier biofilm process *Water Research* **32** (5): 1564-1570.
- WELANDER, U.; and MATTIASSON, B. 2003 Denitrification at low temperatures using a suspended carrier biofilm process. *Water Research* **37**: 2394-2398.
- WHITE, G.C. 1999. Handbook of chlorination and alternative disinfectants (4th ed). Wiley, Nueva York.
- W.H.O., 1985. Health Hazards from nitrates in drinking water. Report o W.H.O. meeting of Copenhagen.
- XIAO, L.W.; RODGERS, M. and MULQUEEN, J. 2007. Organic carbon and nitrogen removal from a strong wastewater using a denitrifying suspended growth reactor and a horizontal-flow biofilm reactor. *Bioresource technology* **98**: 739-744.

YOSHINARI, T. and KNOWLES, R. 1976 Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. *Biochemical Biophysical Research Community* **69**: 705-710.

ZHANG, W.L.; TIAN, Z.X.; ZHANG, N. and LI, X.Q. 1996. Nitrate pollution of groundwater in northern China. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **59 (3)** : 223-231.

ZUMFT, W.G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**: 533-616.

ANEXO I: FIGURAS

INDICE DE FIGURAS

Introducción

Figura 1. Fases de formación de la biopelícula: (1) Acondicionamiento de la superficie, (2) transporte, (3) adhesión reversible, (4) adhesión irreversible, (5) crecimiento de la biopelícula y (6) pérdida o desadsorción.....	10
Figura 2. Esquema general de un Filtro Sumergido.....	19
Figura 3. Ciclo del Nitrógeno.....	25
Figura 4. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.....	42
Figura 5. Clasificación de los microorganismos en función de la temperatura de crecimiento.....	44

Materiales y Métodos

Figura 6. Estructura secundaria del ADNr 16S de <i>Escherichia coli</i> (Van der Peer <i>et al.</i> , 1996).....	65
Figura 7. Aspecto del material soporte usado en el filtro sumergido.....	70
Figura 8. Esquema de funcionamiento de la planta escala laboratorio. (1) Alimentación del agua subterránea, (2) Alimentación de la fuente de carbono, (3) Bomba peristáltica de 4 vías y (4) salida del agua tratada.....	72
Figura 9. Inoculación de la planta escala laboratorio. (1) Columna rellena del material soporte, (2) Sistema de vasos comunicantes, (3) Bomba peristáltica de 4 vías y (4) recipiente contenedor del inoculante, (5) sistema Swinnex (Millipore®) estéril y (6) tapón de 3 vías.....	75
Figura 10. Filtro sumergido a escala de laboratorio durante la inoculación.....	76
Figura 11. Filtro sumergido una vez conectado con el agua subterránea contaminada.....	79.
Figura 12. Cromatograma obtenido en el cromatógrafo iónico usado en el experimento.....	82

Figura 13. Esquema de la reacción de PCR anidada, donde se realizaron dos reacciones consecutivas de amplificación, en la primera se amplificó una región correspondiente a casi la totalidad del gen y en la segunda una región interna de menor tamaño.....	90
 Resultados	
Figura 14. Porcentaje de cepas con capacidad de crecimiento, con generación de gas, en los medios desnitrificantes seleccionados (sobre un total de 95 cepas que mostraron crecimiento).....	98
Figura 15. Resultados de los ensayos de crecimiento en placa con medio N-S-A para las cepas desnitrificantes, empleando diferentes temperaturas de incubación.....	99
Figura 16. Actividad desnitrificante de las cepas bacterianas tras 24 horas de incubación.....	100
Figura 17. Cromatogramas de la cepa A24 tras incubación durante 24 horas a 30°C (a) en presencia de acetileno (b) en ausencia de acetileno	101
Figura 18. Cromatogramas de la cepa A103 tras incubación durante 24 horas a 30°C (a) en presencia de acetileno (b) en ausencia de acetileno	101
Figura 19. Cromatogramas de la cepa A106 tras incubación durante 24 horas a 30°C (a) en presencia de acetileno (b) en ausencia de acetileno	101
Figura 20. Cromatogramas de la cepa A115 tras incubación durante 24 horas a 30°C (a) en presencia de acetileno (b) en ausencia de acetileno	101
Figura 21. Cromatogramas de la cepa A179 tras incubación durante 24 horas a 30°C (a) en presencia de acetileno (b) en ausencia de acetileno	102
Figura 22. Cromatogramas de la cepa A343 tras incubación durante 24 horas a 30°C (a) en presencia de acetileno (b) en ausencia de acetileno	102
Figura 23. Cromatogramas de la cepa A467 tras incubación durante 24 horas a 30°C (a) en presencia de acetileno (b) en ausencia de acetileno	102
Figura 24. Fotografías de microscopía electrónica de barrido de la superficie del material soporte sin inoculación previa a las 4 temperaturas ensayadas: 5°C (a), 10°C (b), 20°C (c) y 30°C(d).....	108

Figura 25. Recuento de células sobre la superficie del material soporte para los ensayos realizados sin inoculación previa y a cada temperatura ensayada. (^a Los grupos con distinta letra tienen diferencias estadísticamente significativas entre sí).....	109
Figura 26. Fotografías de microscopía electrónica de barrido de la superficie del material soporte inoculado con fango activo a las 4 temperaturas ensayadas: 5°C (a), 10°C (b), 20°C (c) y 30°C(d).....	111
Figura 27. Recuento de células sobre la superficie del material soporte para los ensayos realizados con inoculación empleando fango activo y a cada temperatura ensayada. (^a Los grupos con distinta letra tienen diferencias estadísticamente significativas entre sí).....	112
Figura 28. Crecimiento de la cepa <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24 en el inoculante en recirculación a las 4 temperaturas ensayadas.....	113
Figura 29. Fotografías de microscopía electrónica de barrido de la superficie del material soporte inoculado con un cultivo puro de <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24 a las 4 temperaturas ensayadas: 5°C (a), 10°C (b), 20°C (c) y 30°C(d).....	114
Figura 30. Recuento por microscopía electrónica en los ensayos donde se inoculó el relleno con un cultivo puro de <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24 (^a Los grupos con distinta letra tienen diferencias estadísticamente significativas entre sí).....	115
Figura 31. Crecimiento de la cepa <i>Pseudomonas mandelii</i> cepa A103 en el inoculante en recirculación a las 4 temperaturas ensayadas.....	117
Figura 32. Fotografías de microscopía electrónica de barrido de la superficie del material soporte inoculado con un cultivo puro de <i>Pseudomonas mandelii</i> cepa A103 a las 4 temperaturas ensayadas: 5°C (a), 10°C (b), 20°C (c) y 30°C(d).....	118
Figura 33. Recuento de células sobre la superficie del material soporte para los ensayos realizados con inoculación empleando un cultivo puro de <i>Pseudomonas mandelii</i> cepa A103 y a cada temperatura ensayada. (^a Los grupos con distinta letra tienen diferencias estadísticamente significativas entre sí).....	119
Figura 34. Crecimiento de la cepa <i>Pseudomonas brassicacearum</i> cepa A343 en el inoculante en recirculación a las 4 temperaturas ensayadas.....	120
Figura 35. Fotografías de microscopía electrónica de barrido de la superficie del material soporte inoculado con un cultivo puro de <i>Pseudomonas</i>	

<i>brassicacearum</i> cepa A343 a las 4 temperaturas ensayadas: 5°C (a), 10°C (b), 20°C (c) y 30°C(d).....	121
Figura 36. Recuento de células sobre la superficie del material soporte para los ensayos realizados con inoculación empleando un cultivo puro de <i>Pseudomonas brassicacearum</i> cepa A343 y a cada temperatura ensayada. (^a Los grupos con distinta letra tienen diferencias estadísticamente significativas entre sí).....	122
Figura 37. Evolución en el tiempo de la capacidad de eliminación de N _t del sistema de filtros sumergidos sin inoculación previa.....	125
Figura 38. Evolución en el tiempo de la capacidad de eliminación de N _t del sistema de filtros sumergidos inoculado con fango activo.....	125
Figura 39. Evolución en el tiempo de la capacidad de eliminación de N _t del sistema de filtros sumergidos inoculado con <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24.....	127
Figura 40. Evolución en el tiempo de la capacidad de eliminación de N _t del sistema de filtros sumergidos inoculado con <i>Pseudomonas mandelii</i> cepa A103.....	129
Figura 41. Evolución en el tiempo de la capacidad de eliminación de N _t del sistema de filtros sumergidos inoculado con <i>Pseudomonas brassicacearum</i> cepa A343.....	130
Figura 42. Tasa de eliminación de nitrógeno del sistema en los ensayos realizados: (a) sin inoculación previa del filtro sumergido, (b) inoculado con fango activo, (c) inoculado con <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24, (d) inoculado con <i>Pseudomonas mandelii</i> cepa A103 y(e) inoculado con <i>Pseudomonas brassicacearum</i> cepa A343, en función de la temperatura. (^a Grupos con distinta letra son estadísticamente diferentes entre sí).....	132
Figura 43. Evolución en el tiempo de la concentración de nitrito en el efluente en los ensayos realizados sin inoculación previa del filtro sumergido a las cuatro temperaturas ensayadas.....	139
Figura 44. Evolución en el tiempo de la concentración de nitrito en el efluente en los ensayos realizados con inoculación previa con fango activo a las cuatro temperaturas ensayadas.....	140
Figura 45. Evolución en el tiempo de la concentración de nitrito en el efluente en los ensayos realizados con inoculación previa con <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24 a las cuatro temperaturas ensayadas.....	141

Figura 46. Evolución en el tiempo de la concentración de nitrito en el efluente en los ensayos realizados con inoculación previa con <i>Pseudomonas mandelii</i> cepa A103 a las cuatro temperaturas ensayadas.....	142
Figura 47. Evolución en el tiempo de la concentración de nitrito en el efluente en los ensayos realizados con inoculación previa con <i>Pseudomonas brassicacearum</i> cepa A343 a las cuatro temperaturas ensayadas.....	143
Figura 48. Turbidez y recuentos de bacterias aerobias totales en el efluente para los ensayos realizados sin inoculación previa del filtro sumergido para las temperaturas ensayadas: (a) 5°C, (b) 10°C, (c) 20°C y (d) 30°C.....	144
Figura 49. Turbidez y recuentos de bacterias aerobias totales en el efluente para los ensayos realizados con inoculación previa del filtro sumergido con fango activo para las temperaturas ensayadas: (a) 5°C, (b) 10°C, (c) 20°C y (d) 30°C.....	146
Figura 50. Turbidez y recuentos de bacterias aerobias totales en el efluente para los ensayos realizados con inoculación previa del filtro sumergido con <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24 para las temperaturas ensayadas: (a) 5°C, (b) 10°C, (c) 20°C y (d) 30°C.....	148
Figura 51. Turbidez y recuentos de bacterias aerobias totales en el efluente para los ensayos realizados con inoculación previa del filtro sumergido con <i>Pseudomonas mandelii</i> cepa A103 para las temperaturas ensayadas: (a) 5°C, (b) 10°C, (c) 20°C y (d) 30°C.....	150
Figura 52. Turbidez y recuentos de bacterias aerobias totales en el efluente para los ensayos realizados con inoculación previa del filtro sumergido con <i>Pseudomonas brassicacearum</i> cepa A343 para las temperaturas ensayadas: (a) 5°C, (b) 10°C, (c) 20°C y (d) 30°C.....	152
Figura 53. Valores de turbidez en el efluente para todos los ensayos realizados en función de la temperatura.....	154
Figura 54. Valores de microorganismos aerobios totales en el efluente para todos los ensayos realizados en función de la temperatura.....	155
Figura 55. Incremento de los valores de pH entre el influente y el efluente a las 4 temperaturas ensayadas en los sistemas: (a) sin inoculación previa; (b) inoculados con fango activo; (c) inoculados con <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24; (d) inoculados con <i>Pseudomonas mandelii</i> cepa A103 y (e) inoculados con <i>Pseudomonas brassicacearum</i> cepa A343 († grupos con distinta letra son estadísticamente diferentes entre sí).....	156

Figura 56. Valor medio del incremento de pH a las 4 temperaturas ensayadas en los sistemas: (a) sin inoculación previa; (b) inoculados con fango activo; (c) inoculados con <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24; (d) inoculados con <i>Pseudomonas mandelii</i> cepa A103 y (e) inoculados con <i>Pseudomonas brassicacearum</i> cepa A343. (^a grupos con distinta letra son estadísticamente diferentes entre sí).....	157
Figura 57. Eliminación de Nt en el sistema operado a 10°C. Los asteriscos indican la toma de muestras de biomasa.....	160
Figura 58. Microorganismos cultivables presentes en la biopelícula por miligramo de biomasa en el sistema inoculado con <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24 a 10°C.....	161
Figura 59. Eliminación de Nt en el sistema operado a 10°C. Los asteriscos indican la toma de muestras de biomasa.....	162
Figura 60. Microorganismos cultivables presentes en la biopelícula por miligramo de biomasa en el sistema inoculado con <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24 a 30°C.....	163
Figura 61. TGGE de fragmentos del gen ADNr 16S (región V2) amplificado por PCR a partir de muestras de ADN extraídas de biopelícula aislada en los ensayos sin inoculación previa del filtro a 5, 10, 20 y 30°C y en los ensayos con inoculación previa con <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24 a 10 y a 30°C. El carril nombrado como 1 corresponde a la biopelícula extraída al finalizar la fase de inoculación con la cepa seleccionada a 10 ya 30°C. El carril nombrado como A24 corresponde al cultivo puro de la cepa seleccionada. El resto de carriles indican el día de la toma de muestra. Como marcadores (carriles M) se emplearon: M1: <i>Staphylococcus aureus</i> , M2: <i>Pseudomonas putida</i> , M3: <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , M4: <i>Escherichia coli</i> , M5: <i>Nocardia corynebacterioides</i> y M6: <i>Micrococcus luteus</i>	165
Figura 62. Dendrograma obtenido del análisis de los perfiles de bandas del TGGE de la comunidad bacteriana presente en el filtro sumergido, utilizando el programa Gel Compar II v. 4.601 (Applied Maths, Bélgica) aplicando el algoritmo UPGMA (<i>Unweighted pair group method with arithmetic mean</i>) y el coeficiente de Dice. La barra superior muestra la similitud entre los perfiles de bandas y los números entre las ramas representan el coeficiente cofenético.....	167
Figura 63. Árbol filogenético <i>Neighbour-Joining</i> basado en la secuencia de la región V3 del ADNr 16S, mostrando las posiciones de las secuencias	

de 44 bandas de TGGE obtenidas en este estudio y otras descritas en bibliografía. La barra indica un 5% de divergencia estimada. Los números junto a las ramas indican el valor de <i>bootstrap</i> cuando éste fue superior al 50%.....	171
Figura 64. Alineamiento de las secuencias de la cepa seleccionada A24 y la banda 10-01.....	168
Figura 65. Alineamiento de las secuencias de las bandas 10-01 y 10-20.....	169
Figura 66. Alineamiento de las secuencias de las bandas 10-01 y 30-01.....	169

ANEXO II: TABLAS

INDICE DE TABLAS

Introducción

Tabla 1.	Porcentaje de superficie de unidades hidrogeológicas contaminada por nitratos en 2003 (Ministerio de Medio Ambiente, 2006).....	2
Tabla 2.	Temperaturas cardinales de algunos microorganismos (Prescott <i>et al.</i> , 1999).....	43

Materiales y Métodos

Tabla 3.	Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR....	64
Tabla 4.	Concentraciones de los patrones utilizados en la calibración del cromatógrafo iónico.....	81
Tabla 5.	Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR anidada.....	89
Tabla 6.	Listado de las cepas de colección que se emplearon como marcadores en el TGGE.....	93

Resultados

Tabla 7.	Identificación taxonómica de las cepas desnitrificantes seleccionadas.....	103
Tabla 8.	Análisis de la varianza para el número de microorganismos presentes en la biopelícula en función de la temperatura en los ensayos sin inoculación previa del filtro.....	109
Tabla 9.	Análisis de la varianza para el número de microorganismos presentes en la biopelícula en función de la temperatura en los ensayos con inoculación por fango activo.....	112
Tabla 10.	Ajuste exponencial del crecimiento del inoculante <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24 con respecto al tiempo para cada temperatura ($y = e^{(a+bx)}$).....	114
Tabla 11.	Análisis de la varianza para el número de microorganismos presentes en la biopelícula en función de la temperatura en los	

	ensayos con inoculación por un cultivo puro de <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24.....	116
Tabla 12.	Ajuste exponencial del crecimiento del inoculante <i>Pseudomonas mandelii</i> cepa A103 con respecto al tiempo para cada temperatura ($y = e^{(a+bx)}$).....	117
Tabla 13.	Análisis de la varianza para el número de microorganismos presentes en la biopelícula en función de la temperatura en los ensayos con inoculación por un cultivo puro de <i>Pseudomonas mandelii</i> cepa A103.....	119
Tabla 14.	Ajuste exponencial del crecimiento del inoculante <i>Pseudomonas brassicacearum</i> cepa A343 con respecto al tiempo para cada temperatura ($y = e^{(a+bx)}$).....	120
Tabla 15.	Análisis de la varianza para el número de microorganismos presentes en la biopelícula en función de la temperatura en los ensayos con inoculación por un cultivo puro de <i>Pseudomonas brassicacearum</i> cepa A343.....	123
Tabla 16.	Ajustes logarítmicos de la evolución de los valores de eliminación de N_t con respecto al tiempo en los ensayos realizados con inoculación previa del filtro con licor mezcla a diferentes temperaturas.....	126
Tabla 17.	Ajustes logarítmicos de la evolución de los valores de eliminación de N_t con respecto al tiempo en los ensayos realizados con inoculación previa del filtro con <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24 a diferentes temperaturas.....	128
Tabla 18.	Ajustes logarítmicos de la evolución de los valores de eliminación de N_t con respecto al tiempo en los ensayos realizados con inoculación previa del filtro con <i>Pseudomonas mandelii</i> cepa A103 a diferentes temperaturas.....	130
Tabla 19.	Ajustes logarítmicos de la evolución de los valores de eliminación de N_t con respecto al tiempo en los ensayos realizados con inoculación previa del filtro con <i>Pseudomonas brassicacearum</i> cepa A343 a diferentes temperaturas.....	131
Tabla 20.	Análisis de la varianza para el rendimiento en eliminación de N_t en función de temperatura en los ensayos sin inoculación previa del filtro sumergido.....	133
Tabla 21.	Ajustes realizados de los valores de eliminación de N_t en función de la temperatura en los ensayos sin inoculación del filtro sumergido.....	133

Tabla 22.	Análisis de la varianza para el rendimiento en eliminación de N_t en función de temperatura en los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con fango activo.....	133
Tabla 23.	Ajustes realizados de los valores de eliminación de N_t en función de la temperatura en los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con fango activo.....	134
Tabla 24.	Análisis de la varianza para el rendimiento en eliminación de N_t en función de temperatura en los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24.....	135
Tabla 25.	Ajustes realizados de los valores de eliminación de N_t en función de la temperatura en los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24.....	136
Tabla 26.	Análisis de la varianza para el rendimiento en eliminación de N_t en función de temperatura en los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con <i>Pseudomonas mandelii</i> cepa A103.....	136
Tabla 27.	Ajustes realizados de los valores de eliminación de N_t en función de la temperatura en los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con <i>Pseudomonas mandelii</i> cepa A103.....	137
Tabla 28.	Análisis de la varianza para el rendimiento en eliminación de N_t en función de temperatura en los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con <i>Pseudomonas brassicacearum</i> cepa A343.....	137
Tabla 29.	Ajustes realizados de los valores de eliminación de N_t en función de la temperatura en los ensayos con inoculación previa del filtro sumergido con <i>Pseudomonas brassicacearum</i> cepa A343.....	138
Tabla 30.	Análisis de varianza y test de mínimas diferencias significativas para los valores de turbidez en el efluente en el sistema sin inoculación previa.....	145
Tabla 31.	Análisis de varianza y test de mínimas diferencias significativas para los valores de microorganismos aerobios totales en el efluente en el sistema sin inoculación previa.....	145
Tabla 32.	Análisis de varianza y test de mínimas diferencias significativas para los valores de turbidez en el efluente en el sistema con inoculación previa por fango activo.....	147
Tabla 33.	Análisis de varianza y test de mínimas diferencias significativas para los valores de microorganismos aerobios totales en el efluente en el sistema con inoculación previa por fango activo.....	147

Tabla 34.	Análisis de varianza y test de mínimas diferencias significativas para los valores de turbidez en el efluente en el sistema con inoculación previa por <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24.....	149
Tabla 35.	Análisis de varianza y test de mínimas diferencias significativas para los valores de microorganismos en el efluente en el sistema con inoculación previa por <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24...	149
Tabla 36.	Análisis de varianza y test de mínimas diferencias significativas para los valores de turbidez en el efluente en el sistema con inoculación previa por <i>Pseudomonas mandelii</i> cepa A103.....	151
Tabla 37.	Análisis de varianza y test de mínimas diferencias significativas para los valores de microorganismos en el efluente en el sistema con inoculación previa por <i>Pseudomonas mandelii</i> cepa A103.....	151
Tabla 38.	Análisis de varianza y test de mínimas diferencias significativas para los valores de turbidez en el efluente en el sistema con inoculación previa por <i>Pseudomonas brassicacearum</i> cepa A343.	153
Tabla 39.	Análisis de varianza y test de mínimas diferencias significativas para los valores de microorganismos en el efluente en el sistema con inoculación previa por <i>Pseudomonas brassicacearum</i> cepa A343.....	153
Tabla 40.	Análisis de varianza para los valores de incremento de pH en los ensayos realizados con diferentes inoculantes en función de la temperatura.....	158
Tabla 41.	Muestras de biodiversidad de los distintos experimentos sin inocular, inoculado con <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24 a 10°C e inoculado con <i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa A24 a 30°C	164

ANEXO III: ENGLISH SUMMARY

ENGLISH SUMMARY

1 INTRODUCTION

During the last few decades, the different activities associated with the agricultural sector has suffered from important changes, achieving important economic benefits, but entailing harmful consequences at the same time. Nowadays, groundwater contamination with nitrate is a very frequent situation all over the world. This situation constitutes a threat, due to the incidence of nitrate on human health and on the environment. Nitrate is one of the main agents responsible for the eutrophication of freshwater ecosystems.

The effect of this pollution on the quality and availability of water resources for human consumption and the environment makes prevention one of the most important tools against it. However, the application of the current legislation has had very little effect. Then, it is necessary the use of other measures that help the recovery of those water masses contaminated with nitrate. At the present time, there is a wide variety of technologies for the reduction of nitrate in contaminated waters, from which the submerged filter technology is an appropriate alternative.

Submerged filter biodenitrification has proved to be one of the more advanced and selective methods for nitrate contaminated groundwater treatment (Gómez *et al*, 2000; Moreno *et al*, 2005a). This biofilm technology removes nitrate and nitrite ions selectively by means of dissimilatory reduction to dinitrogen. In these systems, decontamination of water is mainly due to the biofilm, which is formed on support material inside the filter through which the water passes. The filter always remains submerged in water. Formation of the biofilm on the support material in the filter is therefore essential for the correct development of the denitrification process (Figure 2).

To carry out successful biodenitrification of contaminated groundwater by submerged filter, it is first necessary to promote a formation of biofilm on the support surface. In this preliminary process, activated sludge from an urban wastewater treatment plant is normally used, since this obtains a heterogeneous channelled biofilm with a high

proportion of denitrifying bacteria (Gómez *et al*, 2003). However, there is an important presence of denitrifying bacteria present in the groundwater, and other experiments with selective inoculation of these systems have provided successful results (Moreno *et al.*, 2002).

Further requirements for the treatment of nitrate groundwater by biodenitrification include anoxic conditions (Gómez *et al*, 2002), a carbon source dosage (Gómez *et al* 2000) and pH control (Thomas *et al*, 1994). While these conditions are easily met, other factors, such as temperature, are more difficult to control in an industrial installation.

The temperature of the environment seriously affects the activity of the microorganisms, each type of which is characterized by an optimum temperature at which the cells experiment fastest growth and the enzymes show highest activity rates.

Many studies have focused on the influence of temperature on the denitrification process, in water contaminated with nitrates (Welander and Mattiasson, 2004; Darbi and Viraraghavan, 2004), soils with denitrification activity (Holtang-Hartwig, 2002) and also in marine sediments (Nowicki, 1994). In water with high concentrations of nitrogen, a dependence of the denitrification process on temperature has been observed (Ilies and Mavinic, 2001), with a reduction in the denitrification rate to less than 5% when the temperature falls to 10°C. Similar effects have been recorded by Aslan and Türkman (2004) in an upflow biological denitrification reactor, where denitrification rates fell to less than 10% at 15°C, and to zero when the temperature reached 5°C.

However, other studies indicate that the dependence on temperature is less pronounced. Rodgers and Zhan (2004) obtained high denitrification rates at a process temperature of 11°C. Similar results were obtained by Welander and Mattiasson (2003), who established the adaptability of a system using denitrifying microorganisms trapped in suspended carriers, and concluded that the method was suitable for carrying out denitrification in cold environments. At all events, it appears that temperature is a crucial factor in the denitrification of contaminated groundwater using the submerged filter technology. A descent in temperature can be a serious drawback for the successful operation of the process.

In addition to denitrifying activity, temperature affects biofilm composition by a selection of microorganisms. Norwood and Gilmour (2001) demonstrated a temperature-dependent biofilm adherence for *Listeria monocytogenes*, and the production of the aggregative fimbriae in *Salmonella typhimurium* strains has also been shown to be dependent on temperature (Stepanovic *et al.*, 2003). On the other hand, the structure of a mature biofilm community varies with the nature of the constituent microorganisms (Stickler, 1999). In this sense, Moreno *et al.* (2005b) obtained a mature channelled biofilm at 20°C after 24 hours of selective inoculation of clayey schists with pure cultures of *Hydrogenophaga pseudoflava* or *Pseudomonas kilonensis*, whereas biofilm in the first phases of formation was obtained with a pure culture of *Pseudomonas mandelii* or *Pseudomonas syringae*.

One of the major advances in the field of microbial ecology is the introduction of the molecular biology techniques based on the *in situ* detection of nucleic acids. These methods provide important information about the microorganisms in their natural habitats, and have allowed for the discovery of a wide number of microbial species that were previously unknown, due to the difficulties for their culture and preservation under laboratory conditions. In this context, denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis (DGGE/TGGE) yield extensive information about the diversity of microorganisms in their habitats (Muyzer 1999), also allowing for the taxonomic identification of community members (Cortés-Lorenzo *et al.*, 2006). These data make possible to monitor variations in the community profiles due to external factors. Both techniques were often used in recent studies on the ecology of biological processes, providing interesting new data in this area (Wagner *et al.*, 2002; Cortés-Lorenzo *et al.*, 2006, Vilchez *et al.*, 2007).

2 OBJECTIVES

Accordingly, the present study was undertaken with the aim of establishing the effect of temperature on the denitrification process applied to the nitrate removal from polluted groundwater using the submerged filter technology. To achieve this objective, other aims were also proposed:

- To study the influence of temperature on biofilm formation on the support material of a submerged filter from the groundwater microbiota, active sludge from a wastewater treatment plant and different inocula previously selected.
- To analyze the evolution of nitrogen removal capacity of a submerged filter for the denitrification of polluted groundwater, as a function of temperature and for the different methods used for biofilm formation mentioned above.
- To evaluate the influence of temperature on the final quality of the effluent from a submerged filter for the nitrate removal from polluted groundwater, in relation to values of turbidity, aerobic plateable bacteria and pH.
- To study the biodiversity of the bacterial communities in the biofilms formed on the support material of a submerged filter for the treatment of polluted groundwater using Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE). Evaluation of the influence of temperature and changes in hydraulic loading.

3 MATERIALS AND METHODS

Different experiments were carried out in this study. Firstly, the effect of temperature on the denitrification process was analysed in a series of experiments with different inocula. And with no inoculation. Afterwards, the biodiversity of the biofilms formed with no inoculation and inoculating the system with a selected strain was analysed.

Selection of the strains to be used as inoculum

The strains used for the inoculation of the submerged filter were obtained in previous works by Gómez (1998). Three final strains were selected after different tests were carried out:

- Gaseous N₂ production in semisolid denitrifying medium, to assess an initial denitrification activity. Three different media were used: without yeast extract and ethanol and sucrose as carbon source, and with yeast extract and sucrose.

- Study of the growth of the strain at different temperatures, by plating of the microorganisms on denitrifying N-S-A medium (Nitrate-Sucrose-Agar) modified from the one described by Rodina (1972) incubated at 4, 10, 15, 20, 25, 30 and 37°C.

- Quantification of denitrifying activity: using the acetylene inhibition method described by Yoshinari and Knowles (1976).

- Taxonomic identification of the selected strains: Denitrifying strains were identified by analysis of the sequence of the encoding 16S rRNA. Primers fD1 and rD1 were used to amplify almost the full length of 16S rRNA gene from strains (Weisburg *et al.*, 1991). Conditions the PCR reactions were kept as previously described (Vinuesa *et al.*, 1998). HPLC-purified oligonucleotides were purchased from Sigma, and AmpliTaq Gold polymerase (Applied Biosystems) was used for the PCR. PCR products were run on 0,8% agarose gels and the bands were purified using the Quiaex II kit (Quiagen, Germany). The nucleotide sequence of the purified bands was determined by the dideoxy chain terminator method, using the ABI-PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, USA) and automated sequencer Applied Biosystems ABI373 (Perkin-Elmer, USA). The sequences were processed with Chromas v. 10.1 UNIX (Genetics Computing Group, Madison, Wisconsin, USA) and were compared to sequences in EMBL bank using WU-BLAST-n v.20 (Altschul *et al.*, 1997).

Lab-scale submerged filter plant

The lab-scale plant used in this study consisted of a glass cylindrical column (50 cm high and 6 cm in diameter), forming an anoxic submerged filter by means of a communicating vessels system (Figure 8). The bioreactor was packed with clayey schists (6-7 mm average size, 1.75 g/cm³ density and 500 m²/m³ of specific surface), up to 20 cm high in the experiments with different inocula, and up to 35 cm high during the experiments where biodiversity of the system was being studied. The system was run downflow with nitrate-contaminated groundwater with continuous additions of ethanol as carbon source. The reactor was incubated in a thermostated chamber (Bioblock Scientific®). Experiments were carried out at temperatures of 5, 10, 20 and 30°C in order to

compare the influence of this variable in our study. There was no backwashing system in the plant due to the low loadings and the simplicity of the system.

The groundwater to be treated was taken from La Vega aquifer (Granada, Spain). The following water characteristics were determined in accordance with Standard Methods (APHA, 1992): NO_3^- 11.3-15.8 mg N- NO_3^- /l, NO_2^- n-d, NH_4^+ n-d, organic nitrogen n-d, PO_4^{3-} 0.4-0.8 mg/l, SO_4^{2-} 180-210 mg/l, D.O. 2.0-4.5 mg O₂/l and pH 7.0-7.5, organic carbon, n-d. Oxygen was completely removed by the addition of a stoichiometric quantity of sodium sulphite (Na_2SO_3). A concentrated stock solution of ethanol was pumped continuously into the influent (0.0086 l/h), obtaining an excess of carbon source (C/N=5.78). Nitrate was supplemented by the addition of an appropriate volume of a concentrated stock solution of NaNO_3 , obtaining an average concentration of 22.0 mg N- NO_3^- /l.

All assays were run for 10 days after steady state conditions had been reached, with a continuous flow rate of inlet water of 0.33 l/h (2.80 m³/m²·d of superficial hydraulic loading and 0.62 g N- NO_3^- /m² d of nitrogen loading). After each experiment, the plant and support material were cleaned manually and sterilized prior to the next test.

Inoculation of the system

The biofilm formation in the system was achieved:

- Using the microbiota present naturally in the groundwater: the system was connected with contaminated groundwater, beginning immediately after the monitoring of the variables analysed in the study

- Using activated sludge from a wastewater treatment plant: 1,5 liters were kept under recirculation for 48 hours (Figures 9 and 10)

- Using the previously selected strains, the same way as done previously with the activated sludge, using this time 1,5 l of a liquid pure culture of the selected strains, grown in N-S-A medium (without agar and with ethanol instead of sucrose as carbon

source). This was also kept in recirculation for 48 hours in the experiments at 10, 20 and 30°C and for 96 hours at 5°C.

Electron microscopy studies

After inoculation, observations by scanning electronic microscopy (SEM) were made of the biofilm produced in the submerged filter plant. These obtained bacterial counts on the surface of the support material, per surface unit. The cells of the biofilm growth on the inert support were immediately fixed with glutaraldehyde (3%) in PBS (130 Mm NaCl and 10 Mm Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.4), then rinsed and treated with 1% osmium oxide for 3 h. Subsequent dehydration involved rinsing and retention in a graded ethanol series (30%, 50%, 70%, 90% and 100%). Finally, the samples were dried to the critical point and mounted on support stubs. The samples were viewed by means of a Hitachi scanning electron microscope without gold coating. The method described by Sich and Van Rijn (1997) was used for the bacteria recount.

Sampling and analytical determinations

Samples of the inlet and the outlet were taken twice a day. Nitrate, nitrite and ammonium concentrations were set regularly by ionic chromatography (Methrohm®) to establish the removal capacity from contaminated groundwater. Separation and dilution of ions were carried out through a Metrosep A Supp 5-250 column, using a carbonate-bicarbonate solution as eluent. The samples were ultrafiltered prior to injection. Values of turbidity, pH and total platable microorganisms were also analysed. For turbidity, a spectrophotometric method was used ($\lambda=650$ nm). The number of total platable microorganisms was measured by standard serial dilution and plating on N-S-A medium. Plates were incubated at 30°C (24 h) before colonies were counted.

For the análisis of the biomass in the biofilm made in some of the experiments the method of dry weigh with a previous sonication was used (Lazarova *et al.*, 1994).

Bacterial diversity of the biofilm

Once the experiments with a biofilm formed from the natural microbiota were finished, biodiversity studies were carried out at all temperatures. For comparison, new experiments were developed with one of the selected strains mentioned above (*Pseudomonas fluorescens* strain A24) at 10 and 30°C.

PCR amplification of partial 16S rRNA gene, TGGE, and DNA sequencing: DNA was extracted from the system using a modified version of the method described by Watanabe *et al.*, (1998), adapted to the type of samples in this work. A nested approach was used for PCR amplification, as this strategy has been previously reported to avoid non-specific priming, improve amplification of species present in low numbers, and yield richer band patterns in DGGE (Nicolaisen and Ramsing 2002; Ward and O'Mullan 2002). One microliter (2–5 ng) of DNA extracted from sludge was used as template for PCR using universal primers fD1 and rD1 to amplify the 16S rRNA gene in almost its full length (Weisburg *et al.*, 1991). Subsequently, 1 µl of the first PCR product was used as a template for a nested PCR using universal primers GC-P1 and P2, targeting the V3 hypervariable region (Muyzer *et al.*, 1993). Conditions for each of the PCR reactions were kept as previously described (Vinueza *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 1998). HPLC-purified oligonucleotides were purchased from Sigma, and AmpliTaq Gold polymerase (Applied Biosystems) was used for all PCRs. Final PCR products were cleaned and/or concentrated (when required) using Microcon YM cartridges. Two to five microliters (60– 100 ng DNA) were loaded in each well for TGGE, using a TGGE Maxi system (Whatman-Biometra). Denaturing gels (6% polyacrylamide gel electrophoresis with 20% deionized formamide, 2% glycerol and 8 M urea) were made and run with 2× Tris–acetate–EDTA buffer. Temperature gradient was optimized previously for efficient separation of bands at 43 to 63°C (Cortés-Lorenzo *et al.*, 2006). The gels were run at 125 V for 18 h. Bands were visualized by silver staining using the Gel Code Silver Staining kit (Pierce). A six-species marker was included, made by amplification of V3 region from DNA of the following culture collection strains: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas putida* ATCC 8750, *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 15308, *Escherichia coli* DH5a, *Nocardia corynebacterioides* ATCC 21253, *Micrococcus luteus* ATCC 9341. Portions of individual bands on silver-stained TGGE gels were picked up with sterile pipette tips, placed in 10 µl

of filtered and autoclaved water, and directly used for reamplification with the appropriate primers. PCR products were purified by gel running and extraction with the Quiaex-II kit (Quiagen). DNA recovered was directly used for automated sequencing in an ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer.

Cluster analysis of TGGE fingerprints: Band patterns generated by TGGE were compared and clustered using the Gel Compar II v. 4.601 (Applied Maths, Belgium). Bands were automatically detected and matched, and further corrections were applied manually. Dendograms relating band pattern similarities were automatically calculated with the Dice coefficient and UPGMA algorithms (Unweighted pair group method with arithmetic mean). Cluster analysis was used to investigate the relationships between TGGE profiles by calculation of the cophenetic coefficient.

Biocomputing: DNA sequences were analyzed using the biocomputing tools provided online by the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk>). The BLASTn and BLASTx programs (Altschul et al., 1997) were used for sequencing similarity analysis. The ClustalX v. 1.8 software (Jeanmougin et al., 1998) was used for the aligning of the DNA and protein sequences. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 2.1 (Kumar et al., 2001). Gaps were excluded from the analysis. Bootstrap values below 50% are not shown in the tree.

STATISTICS

Data were analyzed using the software package STATGRAPHICS 5.0 (STSC, Rockville, MD, USA), applying the analysis of variance to identify significant differences between measurements. A significance level of 95% ($P < 0.05$) was selected. The least significant differences test (LSD-test) was used to measure differences among the means. Different models were adjusted to the values of platable bacteria during the inoculation process as well as to the values of total nitrogen removal of every system, using the same software.

4 RESULTS AND DISCUSSION

Selection of bacterial strains

Figure 14 shows the percentage of bacteria from the 250 we had initially capable to grow at the different media used. Only a 5% was able to do it using ethanol as a carbon source after 24 hours. At the same time, more bacteria were able to grow if the temperature was higher (Figure 15), being slightly reduced at 37°C. IN relation to the denitrifying activity, nearly a 40% didn't show any activity after 24 hours, and another 30% showed a very low activity (Fig 16). With all this into account, three different strains were finally selected: *Pseudomonas fluorescens* strain A24, *Pseudomonas mandelii* strain A103 and *Pseudomonas brassicacearum* strain A343. The three are well-known denitrifiers and able to grow at low temperatures.

Colonization of support material

Undertaken immediately after the inoculation, the scanning electron microscopy (SEM) studies allowed us to observe the support colonization prior to biofilm formation. As shown in Figures 24, 26, 29 and 32, support material was colonized by bacteria independently of the temperature assayed. However, the SEM studies revealed a different development of cellular structures according to the temperature in the assays with activated sludge, and a different degree of maturity in the rest of the studies.

The number of bacteria attached to the support material differed substantially in relation to the increase in temperature with statistically significant differences in many of the assays. Without a previous inoculation, the colonization was scarce below 30°C. The use of activated sludge was found to have a better colonization of the surface with the increasing temperature, and for *Pseudomonas fluorescens* strain A24 the colonization was optimum at 10-20°C. *Pseudomonas brassicacearum* had a low colonization capacity at all temperatures, being worse as the temperature was increased (Figures 27, 30, 33 and 36).

Nitrogen elimination capacity of the system

When the system began its operation with nitrate contaminated groundwater, two different phases were found in the evolution of the values of total nitrogen elimination capacity of the system: a stabilization phase, where the rates are irregular and increasing, and a stable phase, where the values of nitrogen elimination are constant. Without the previous inoculation of the system, it was not possible to achieve good rates at any time, and these two phases could not be distinguished (Figure 37). The elimination capacity of the system was kept at low values for the whole experiments. When activated sludge and the other inocula were used, the behaviour was similar. For all them, the time needed to reach the stable phase was higher with the increasing temperature (Figures 38-41), and logarithmic-x regression models were found to be the best models for the explanation of the behaviour in time of the removal capacities (Tables 16-19). The coefficients of the equations helped to explain this similar response. It should be noted that only *Pseudomonas fluorescens* strain A24 was capable of reaching high levels of nitrate removal at 5°C. Figure 42 shows the average values of total nitrogen elimination capacity during the stable phase for all the experiments. Except for *Pseudomonas fluorescens* strain A24, the rest of the experiments suffered from a loss in the removal capacity at the lower temperatures, with statistically significant differences. All the experiments where the system was inoculated there were good results in the range of 20-30°C.

The values of nitrite in the effluent also followed a similar pattern in the assays with a previous inoculation (Figures 44-47). This behaviour consisted of increasing values of nitrite during the stabilization phase until they reached a maximum value. This maximum tended to decrease later on, until they were maintained at low levels during the stable phase. Again, the time needed to reach the maximum and the maximum itself was higher with the increasing temperatures. At the same time, average values of nitrite in the stable phase were also related with temperature. For the assay without a previous inoculation, there was no evolution, and the highest values were reached at 20°C.

Turbidity and total platable microorganisms

Values of turbidity were very similar at all temperatures in all the assays. There was no common behaviour among all the assays (Figure 53). At 5°C, the values recorded with *Pseudomonas fluorescens* strain A24 and *Pseudomonas brassicacearum* strain A343 were much higher than the rest, decreasing significantly at temperatures above this point. Other strains showed a complete different response, with the lowest value at the lowest temperature assayed (active sludge and *Pseudomonas mandelii* strain A103).

In the results of total platable bacteria it can be easily observed that the values in the system without a previous inoculation were significantly lower than for the rest of assays (Figure 54). Values of active sludge at 5°C are also lower than the rest, but they are all very similar in the range of 10-30°C.

Values of pH.

These values exceeded in very few occasions a pH of 8.5, with no inhibitory effect on the denitrification process (Figure 55). The increases in the values of pH between the influent and the effluent were in the majority of the cases positive, indicating the denitrification activity. In Figure 56 it can be appreciated that the increases tended to be higher at higher temperatures for the active sludge, *Pseudomonas fluorescens* strain A24 and *Pseudomonas mandelii* strain A103. For the other inoculum used, *Pseudomonas brassicacearum* strain A343, this tendency was opposite, with less increases at higher temperatures. In the assays without inoculation, the increase of pH was maximum at 5°C and almost none at 20°C.

Community fingerprinting of total bacterial communities by TGGE.

The results of the assay at 10°C in terms of total nitrogen elimination showed that during the first days of the experiment, that the system was not capable to carry out an efficient denitrification (Figure 57). That's why the C:N ratio was increased when necessary. When the elimination capacity of the system was close to the maximum, the

hydraulic loading was increased sequentially until reaching $7 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{d}$. In all cases, the system showed an important recovery in the total nitrogen elimination capacity.

The experiment at 30°C showed a better behaviour, reaching high yields of denitrification activity without being necessary to increase the ethanol concentration above the initial ratio during the first weeks of operation. It can also be observed that it reached these high yields in a short time after the experiment had begun. The hydraulic loading was therefore increased the same way as before, until it reached $7 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{d}$. During the operation of the system, the C:N ratio was also increased due to the inability of the system to maintain the levels of nitrogen elimination at the initial carbon dosage. Apart from this, the system reached again high yields of denitrification activity once the carbon source was the needed to carry out the process.

The values of platable microorganisms in the biofilm through the experiment were also recorded. When the experiment began at 10°C , the total amount of the microorganisms present in the biofilm had the same morphology as the strain used for the inoculation of the filter. This was also the proof to the effectiveness of the inoculation process, as no other morphology was found in the sample. After 7 days, the number of cells per mg of biomass increased slightly, and the inoculated strain was still the most abundant in our experiment, although new morphologies began to appear. But as the experiment was being carried out, the number of colonies with the same morphology as the strain we had inoculated in the system was less predominant, until it represented only 2% of the total number of cultured bacteria in the biofilm.

At 30°C , we also recorded the inoculated strain as the only one in the biofilm once the inoculation period had finished. The number of cfu present was, however, almost 50% less than at 10°C , proving that the colonization of the support material was less efficient at this temperature. The number of cells corresponding to the inoculated strain was reduced drastically from the day 40 of the experiment.

This composition of the bacterial communities in the biofilm were studied by TGGE (Figure 61). For comparison, we included in the TGGE gel the V3 fragment amplified by PCR from strain A24 in pure culture. After inoculating the plant with strain

A24 and operating it under sterile conditions in both experiments, the fingerprint is identical. When non sterile water started passing through the biofilter, the community profiling considerably changed, due to the colonisation of the biofilm by the species present in water. Many changes in the community profiles were observed as time passed and conditions of Hydraulic loading and carbon dosage changed

We used the Gel ComparII software to generate a cluster analysis of the TGGE fingerprints. This analysis showed that there were important variations of the bacterial diversity, depending on the temperature of the assay (Figure 62). The dendrogram shows how the community profiles of the bacterial biofilm developed with and without inoculation significantly clustered away in two groups, with a similarity below 50%. In addition to this, the experiments with previous inoculation at 10 and 30°C also clustered away with a similarity below 60%. In both inoculated experiments, the community profiles were divided as well in two different subclusters, corresponding to the two halves of the experiment. The first half corresponds to similar conditions of superficial hydraulic loading of 2.8 m³/m² d, while these conditions changed in the second half, until reaching 7 m³/m² d.

We tried to reamplify and sequence a total of 72 bands from the TGGE gel, from which only 44 band sequences could be retrieved successfully. The sequences of these 44 bands were used to construct the phylogenetic tree. Most of the sequences were related to those of well known species of denitrifiers. It is important to highlight that the band identified as the inoculated strain disappeared from the subsequent samples, appearing others of similar sequence and phylogenetically close to the first one (Figures 64-66).

Sequencing data suggested that the biofilm was largely composed of species typically inhabiting freshwaters, with a 75% of the sequenced bands affiliated to the Beta-proteobacteria (Fig 63). Particularly, the sequences mainly fell within the families *Comamomadaceae* and *Rhodocyclaceae*. The first ones constitute what has been called the cosmopolitan freshwater cluster Beta-1, as these bacteria are predominant in the aquatic habitats worldwide. Members of the *Rhodocyclaceae* are abundant in full-scale wastewater treatment plants with biological nitrogen removal.

5 REFERENCES

All references are listed in pages 201-218.