

Andrea López Martín

Evaluación de tecnologías en el tratamiento de aguas y fangos en EDARs, para la reducción de microorganismos con riesgo sanitario y ambiental

Departamento

Ingeniería Química y Tecnologías del Medio
Ambiente

Director/es

Ormad Melero, María Peña
Mosteo Abad, Rosa

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

**EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS EN
EL TRATAMIENTO DE AGUAS Y
FANGOS EN EDARS, PARA LA
REDUCCIÓN DE
MICROORGANISMOS CON RIESGO**

Autor

Andrea López Martín

Director/es

Ormad Melero, Maria Peña
Mosteo Abad, Rosa

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente

2018



Departamento de Ingeniería
Química y Tecnologías
del Medio Ambiente
Universidad Zaragoza

Tesis doctoral

**Evaluación de tecnologías en el
tratamiento de aguas y fangos en EDARs,
para la reducción de microorganismos con
riesgo sanitario y ambiental**

Autora

Andrea López Martín

Directoras

Rosa Mosteo Abad

M^a Peña Ormad Melero

Escuela de Ingeniería y Arquitectura 2017



Departamento de Ingeniería
Química y Tecnologías
del Medio Ambiente
Universidad Zaragoza

Dña. M^a PEÑA ORMAD MELERO Catedrática de Universidad y Dña. ROSA MOSTEO ABAD, Profesora Titular, Profesoras del Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente en el Área de Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza

INFORMAN,

Que el trabajo contenido en la presente memoria de Tesis Doctoral titulada:

“EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS Y FANGOS EN EDARS, PARA LA REDUCCIÓN DE MICROORGANISMOS CON RIESGO SANITARIO Y AMBIENTAL” realizada por Dña. ANDREA LÓPEZ MARTÍN, ha sido realizado bajo nuestra dirección y se corresponde y adecúa al Plan de Investigación aprobado por la Comisión Académica del Programa de Doctorado de Ingeniería Química y del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza.

Y para que así conste, firmamos este certificado en Zaragoza, a 16 de octubre de 2017.


Fdo.: Prof.ª Dra. M^a Peña Ormad


Fdo. Prof.ª Dra. Rosa Mosteo

E.I.N.A.
Edificio Torres Quevedo
C/ María de Luna, 3
50018 Zaragoza - España

Realizar esta Tesis Doctoral ha sido como escribir una extensa y elaborada obra musical.

Hay elementos en ambas creaciones indispensables para que todo llegue a buen fin.

Para empezar, es necesario tener un buen soporte, una base, unos bajos que sostengan el peso de todo lo que va a construirse sobre ellos. Gracias a la Dra. Peña Ormad y la Dra. Rosa Mosteo, por ser desde los primeros compases un apoyo firme y constante que siempre hace falta para elaborar las cosas que merecen la pena. Mil gracias al Dr. Jairo Gómez, la Dra. Pili Goñi y a Ana Marta Lasheras, por vuestra paciencia para contestar a todas mis dudas, preguntas/interrogatorios... por creer que esto iba a sonar bien. Gracias también al Dr. José Luis Ovelleiro, la Dra. Judith Sarasa y a Pilar Sánchez, por supervisar con su experiencia este trabajo y su inestimable ayuda.

Desde luego está el grueso de la obra, los acompañamientos, voces secundarias, contra cantos, lo que le da brillo, color, tiempo y un determinado carácter a una obra. Este trabajo empezó a componerse en el Laboratorio de Calidad de la Confederación Hidrográfica del Ebro con las melodías de los clásicos de Kiss FM (José Luis, Carol, Teresa, Elena, Ana, Tania...), luego pasó por tonalidades más roqueras o incluso tecno (Jorge, Pilar, Noelia, Nati, María, Javi, Bárbara, Lucía, Amparo y tanta gente que ha pasado estos años por el laboratorio y que ha dejado pequeñas florituras) para pasar sus últimos meses con un marcado carácter a pasodoble de banda municipal (Fernando, Fernando C., Félix, Santiago, Eduardo, José Luís...) y también un toque de música indie... así que podría decirse que el camino ha sido largo, que esta obra ha pasado por muchos estilos, ha conocido muchas personas... y todas y cada una han dejado su huella impregnada. Gracias.

Y por supuesto, es necesario tener un tema principal, ese motivo que va a aparecer a lo largo de la obra, esa melodía que se repite en los momentos importantes, que da sentido a todo lo anterior y posterior, que te recuerda a tiempos pasados cuando se repite y que esperas que vuelva a aparecer. Gracias Silvia (por esos ratos "enfurruscadas"), Rosa, Ana, Leti, Marta, Jaione, Ceci, Sara, Leire, Nuria, Susana, Patricia, Blanca, Ganix, Eva, Bea, Sofía, Noe, Alberto, Fer, Abel, Iñaki, Víctor, Jorge, *cuadrilla* y *familia maña*... por estar desde el principio, antes de que sonara la primera nota, por aparecer cuando era necesario, a veces incluso quedarse en segundo plano pero siempre acompañando y hacer que este trabajo esté lleno de grandes momentos.

Finalmente, en toda obra y aunque no aparezca de forma literal, es imprescindible poner corazón, dedicarle lo único que depende de nosotros, tiempo, paciencia, esfuerzo y amor, queriendo reflejar lo mejor de uno mismo y todo esto ha sido posible porque tener unos padres y una hermana como los que tengo ha hecho que mi corazón siempre rebose felicidad. Sois un ejemplo a seguir. Gracias siempre.

Porque las cosas buenas a veces aparecen como por arte de magia, como una canción que escuchas sin buscar y te conquista desde el principio. Gracias por eso también.

Si supiéramos lo que estamos haciendo, no se le llamaría investigación

Albert Einstein

Denbora da polígrafo bakarra

Berri Txarrak

A mis padres, Pepi y Manu y a mi hermana Rakel

GLOSARIO

- AENOR: Asociación Española de Normalización y Certificación
- AGV: Ácidos grasos volátiles
- ATAD: Digestión Aerobia Termófila Autosostenida
- CCA: Chormogenic Coliform Agar
- COD: Carbono Orgánico Disuelto
- CV: Coeficiente de Variación
- DBO₅: Demanda Biológica de Oxígeno a 5 días
- DMA: Directiva Marco del Agua
- DQO: Demanda Química de Oxígeno
- EDAR: Estación Depuradora de Aguas Residuales
- EN: Norma Europea
- ISO: International Standard Organization
- L.D.: Límite de detección
- Mi: Muestra *i* tomada en la línea de tratamiento de la depuradora
- NMP: Número Más Probable
- O₂ disuelto: Oxígeno disuelto
- PEMAR: Plan Estatal Marco de Gestión de Residuos
- Qi: Caudal en un determinado punto *i* de la línea de tratamiento de la depuradora
- SM: Standard Methods
- SS: Sólidos en suspensión
- ST: Sólidos totales
- SV: Sólidos volátiles
- TBX: Agar Glucuronico triptona y bilis
- UFC: Unidades Formadoras de Colonias
- UNE: Norma Española
- UNT: Unidades Nefelométricas de turbidez
- US EPA: Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos
- V: Volumen
- θ_h : Tiempo de retención en la instalación *i*
- ϕ : Diámetro

Índice General

Índice de figuras	5
--------------------------	---

Índice de tablas	11
-------------------------	----

Capítulo 1. Introducción y objetivos

Capítulo 2. Tratamiento y gestión de aguas residuales y fangos de origen urbano

2.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS AGUAS RESIDUALES URBANAS	2-1
2.1.1 Composición general	2-1
2.1.2 Composición microbiológica	2-1
2.1.2.1 Gérmenes patógenos	2-1
2.1.2.2 La célula bacteriana	2-3
2.1.2.3 Bacterias indicadoras de contaminación microbiológica	2-5
2.2 CONTROL DE EFLUENTES PARA SU VERTIDO AL CAUCE RECEPTOR	2-8
2.2.1 Normativa	2-8
2.2.2 Etapas y procesos en la línea de aguas de una EDAR	2-8
2.2.2.1 Esquema convencional de una depuradora	2-8
2.2.2.2 Descripción de etapas y procesos de las plantas objeto de estudio	2-9
2.2.3 Composición de las aguas residuales depuradas y riesgo asociado a su contaminación	2-15
2.3 CONTROL DE FANGOS DE DEPURADORAS URBANAS PARA SU UTILIZACIÓN EN PRÁCTICAS AGRÍCOLAS	2-16
2.3.1 Generación y composición de fangos	2-16
2.3.2 Normativa y criterios de calidad	2-18
2.3.3 Etapas y procesos de tratamiento de fangos	2-22
2.3.3.1 Tecnologías disponibles	2-22
2.3.3.2 Descripción de etapas y procesos de las plantas objeto de estudio	2-22

Capítulo 3. Metodología analítica y tratamiento de datos

3.1 PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	3-1
3.2 PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS	3-3
3.2.1 Protocolo general de trabajo en el laboratorio de microbiología	3-3
3.2.2 Preparación de muestras y diluciones seriadas	3-3
3.2.3 Procedimientos de recuento en placa	3-3
3.2.3.1 Consideraciones iniciales	3-3
3.2.3.2 Preparación de placas con los medios de cultivo	3-4
3.2.3.3 Descripción del método de placa difusa y del método del vertido en placa	3-5
3.2.3.4 Descripción del método de filtración en membrana	3-7
3.2.3.5 Recuento de colonias y expresión de los resultados	3-8
3.2.3.6 Repetibilidad y reproducibilidad del recuento y de los análisis en muestras de agua	3-9
3.2.4 Procedimiento del método del Número Más Probable (NMP)	3-11
3.2.4.1 Consideraciones iniciales	3-11
3.2.4.2 Preparación de placas y tubos con los medios de cultivo	3-11
3.2.4.3 Descripción del método de NMP	3-12
3.2.4.4 Recuento de colonias y expresión de los resultados	3-13
3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS	3-15
3.4 EVALUACIÓN DE LA IDONEIDAD DE MÉTODOS DE CONTROL MICROBIOLÓGICO EN FANGOS	3-16
3.4.1 Principales dificultades del análisis en fangos	3-16
3.4.2 Metodología analítica	3-16
3.4.3 Preparación y acondicionamiento de muestras de fango	3-18
3.4.3.1 Muestras estériles fortificadas	3-18
3.4.3.2 Muestras reales	3-19
3.4.4 Resultados e interpretación	3-19

Capítulo 4. Estudio del efecto que sobre la calidad microbiológica de efluentes y fangos de depuradora tiene el sistema de tratamiento aplicado en instalaciones a escala real

4.1 SELECCIÓN DE INSTALACIONES OBJETO DE ESTUDIO	4-1
4.2 CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA EN LA EDAR 1	4-2
4.2.1 Descripción de la planta de tratamiento, toma de muestras y parámetros de caracterización	4-2
4.2.2 Resultados de caracterización de aguas y fangos a lo largo de la línea de tratamiento	4-5
4.2.3 Estimación del impacto del vertido sobre la calidad microbiológica del cauce receptor	4-9
4.3 CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA EN LA EDAR 2	4-11
4.3.1 Descripción de la planta de tratamiento, toma de muestras y parámetros de caracterización	4-11

4.3.2 Resultados de caracterización de aguas y fangos a lo largo de la línea de tratamiento	4-15
4.3.3 Estimación del impacto del vertido sobre la calidad microbiológica del cauce receptor	4-19
4.4 CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA EN LA EDAR 3	4-21
4.4.1 Descripción de la planta de tratamiento, toma de muestras y parámetros de caracterización	4-21
4.4.2 Resultados de caracterización de aguas y fangos a lo largo de la línea de tratamiento	4-24
4.4.3 Estimación del impacto del vertido sobre la calidad microbiológica del cauce receptor	4-28
4.5 CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA EN LA EDAR 4	4-30
4.5.1 Descripción de la planta de tratamiento, toma de muestras y parámetros de caracterización	4-30
4.5.2 Resultados de caracterización de aguas y fangos a lo largo de la línea de tratamiento	4-33
4.5.3 Estimación del impacto del vertido sobre la calidad microbiológica del cauce receptor	4-38
4.6 CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA EN LA EDAR 5	4-40
4.6.1 Descripción de la planta de tratamiento, toma de muestras y parámetros de caracterización	4-40
4.6.2 Resultados de caracterización de aguas y fangos a lo largo de la línea de tratamiento	4-44
4.6.3 Estimación del impacto del vertido sobre la calidad microbiológica del cauce receptor	4-48
4.7 CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA EN LA EDAR 6	4-50
4.7.1 Descripción de la planta de tratamiento, toma de muestras y parámetros de caracterización	4-50
4.7.2 Resultados de caracterización de aguas y fangos a lo largo de la línea de tratamiento	4-53
4.7.3 Estimación del impacto del vertido sobre la calidad microbiológica del cauce receptor	4-54
4.8 ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE PROCESOS E INSTALACIONES Y SU REPERCUSIÓN SOBRE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE AGUAS Y FANGOS	4-56

Capítulo 5. Estudio a escala piloto del efecto que sobre la calidad microbiológica de fangos tiene el proceso de digestión aplicado

5.1 ANTECEDENTES	5-1
5.2 ENSAYOS A ESCALA PILOTO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA MESÓFILA Y TERMÓFILA	5-2
5.2.1 Descripción de las plantas	5-2
5.2.2 Toma de muestras de fangos y parámetros de caracterización	5-4
5.2.3 Puesta en marcha y control operacional de plantas	5-4
5.2.3.1 Control en periodo de transición	5-4
5.2.3.2 Control en periodo estacionario	5-5
5.2.4 Control de calidad de fangos: resultados e interpretación	5-7
5.2.4.1 Caracterización físico-química	5-7
5.2.4.2 Caracterización microbiológica	5-15
5.3 ENSAYO A ESCALA PILOTO DE DIGESTIÓN AEROBIA TERMÓFILA AUTOSOSTENIDA	5-21
5.3.1 Descripción de la planta	5-21
5.3.2 Toma de muestras de fangos y parámetros de caracterización	5-22
5.3.3 Puesta en marcha y control operacional de planta	5-23

5.3.3.1 Control en periodo transitorio	5-23
5.3.3.2 Control en periodo estacionario	5-23
5.3.4 Control de calidad de fangos: resultados e interpretación	5-25
5.3.4.1 Caracterización físico-química	5-25
5.3.4.2 Caracterización microbiológica	5-29
5.4 ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE PROCESOS	5-33
5.4.1 Análisis de variables operacionales	5-33
5.4.2 Grado de cumplimiento de criterios de calidad del fango tratado	5-36

Capítulo 6. Estudio del aprovechamiento agrícola de fangos de EDAR

6.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	6-1
6.1.1 Selección de cultivos	6-1
6.1.2 Selección de suelos	6-2
6.1.3 Características del fango y aplicación al terreno	6-4
6.1.4 Toma de muestras, acondicionamiento y parámetros de control	6-4
6.2 RESULTADOS E INTERPRETACIÓN	6-7
6.2.1 Aplicación del fango en suelo arcilloso	6-7
6.2.2 Aplicación del fango en suelo arenoso	6-11
6.3 ESTUDIO COMPARATIVO	6-15

Capítulo 7. Conclusiones

Capítulo 8. Bibliografía

Anexo I. Protocolo de trabajo en el laboratorio de microbiología

Anexo II. Composición de los medios de cultivo

Índice de figuras

Capítulo 2

Figura 2.1: Estructura de una célula procariota	2-4
Figura 2.2: Composición estructural de la pared celular de una bacteria Gram positiva y una Gram negativa (Gamazo et al., 2005)	2-4
Figura 2.3: Esquema convencional de la línea de aguas de una EDAR (Ormad, 2011)	2-9
Figura 2.4: Lecho de filtros percoladores	2-11
Figura 2.5: Decantador secundario	2-12
Figura 2.6: Laguna aerobia empleada como tratamiento terciario	2-13
Figura 2.7: Filtro intermitente de arena	2-14
Figura 2.8: Diagrama de tecnologías disponibles para el tratamiento de fangos (Matesanz, 2011)	2-22
Figura 2.9: Tanque para el espesamiento de fangos	2-23
Figura 2.10: Reactor de digestión en régimen aerobio termófilo autosostenido (ATAD)	2-24

Capítulo 3

Figura 3.1: Esquema del procedimiento para realizar diluciones seriadas	3-3
Figura 3.2: Procedimiento e imágenes del análisis mediante el método de placa difusa	3-6
Figura 3.3: Procedimiento e imágenes del análisis mediante el método del vertido en placa	3-6
Figura 3.4: Procedimiento e imágenes del análisis mediante el método de filtración en membrana	3-7
Figura 3.5: Colonias de coloración positiva para el medio Slanetz&Bartley por triplicado	3-8
Figura 3.6: Procedimiento e imágenes del análisis mediante la técnica del Número Más Probable	3-12
Figura 3.7: Representación del test LSD de Fisher que compara las medias de dos poblaciones	3-15
Figura 3.8: Etapas de la fortificación. a) Cepa de <i>E.faecium</i> . b) Placa con un cultivo joven y puro. c) Inoculación en tubo con suero fisiológico	3-18
Figura 3.9: Intervalos LSD de los resultados del análisis de <i>E.faecium</i> en la muestra MEF1	3-20
Figura 3.10: Intervalos LSD de los resultados del análisis de <i>E.faecium</i> en la muestra MEF2	3-21
Figura 3.11: Intervalos LSD de los resultados del análisis de <i>E.faecium</i> en la muestra MEF3	3-21
Figura 3.12: Intervalos LSD de los resultados del análisis de <i>E.faecium</i> en la muestra MEF4	3-21
Figura 3.13: Intervalos LSD de los resultados del análisis de <i>E.faecium</i> en la muestra MEF5	3-22

Figura 3.14: Intervalos LSD de los resultados del análisis de <i>E.coli</i> mediante el método de placa difusa con diferentes medios de cultivo	3-23
Figura 3.15: Intervalos LSD de los resultados del análisis de <i>E.coli</i> mediante el método de filtración en membrana con diferentes medios de cultivo	3-24
Figura 3.16: Intervalos LSD de los resultados del análisis de <i>E.coli</i> mediante el método de vertido en placa con diferentes medios de cultivo	3-24
Figura 3.17: Intervalos LSD de los resultados del análisis de <i>E.coli</i> en la muestra MR1	3-25

Capítulo 4

Figura 4.1: Dibujo esquemático de la EDAR 1 y vista real	4-2
Figura 4.2: Etapas de la EDAR 1	4-3
Figura 4.3: Puntos de la toma de muestras (Mi) en las líneas de tratamiento de la EDAR 1	4-4
Figura 4.4: Imágenes de algunos puntos de muestreo. a) Salida filtros percoladores (M5); b) Salida decantador secundario _2 (M6); c) Salida espesador de fangos (M8)	4-4
Figura 4.5: Coordenadas de los puntos de muestreo en el río aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la EDAR 1	4-5
Figura 4.6: Caracterización microbiológica a lo largo de la línea de tratamiento de aguas de la EDAR 1. a) Primera campaña; b) Segunda campaña; c) Tercera campaña	4-8
Figura 4.7: Cargas microbiológicas (UFC/d) en el influente y efluente de la EDAR 1 y en el cauce	4-10
Figura 4.8: Dibujo esquemático de la EDAR 2 y vista real	4-11
Figura 4.9: Etapas de la EDAR 2	4-12
Figura 4.10: Puntos de la toma de muestras (Mi) en las líneas de tratamiento de la EDAR 2	4-13
Figura 4.11: Imágenes de algunos puntos de muestreo. a) Salida pretratamiento (M2); b) Salida decantador secundario _2 (M7); c) Salida tratamiento aerobio (M9)	4-14
Figura 4.12: Coordenadas de los puntos de muestreo en el río aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la EDAR 2	4-14
Figura 4.13: Caracterización microbiológica a lo largo de la línea de tratamiento de aguas de la EDAR 2. a) Primera campaña; b) Segunda campaña; c) Tercera campaña	4-17
Figura 4.14: Cargas microbiológicas (UFC/d) en el influente y efluente de la EDAR 2 y en el cauce	4-20
Figura 4.15: Dibujo esquemático de la EDAR 3 y vista real	4-21
Figura 4.16: Etapas de las EDAR 3	4-22
Figura 4.17: Puntos de la toma de muestras (Mi) en las líneas de tratamiento de la EDAR 3	4-23
Figura 4.18: Imágenes de algunos puntos de muestreo. a) Entrada (M1); b) Efluente (M4); c) Salida del espesador (M5)	4-23
Figura 4.19: Coordenadas de los puntos de muestreo en el río aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la EDAR 3	4-23
Figura 4.20: Caracterización microbiológica a lo largo de la línea de tratamiento de aguas de la EDAR 3. a) Primera campaña; b) Segunda campaña; c) Tercera campaña	4-26

Figura 4.21: Cargas microbiológicas (UFC/d) en el influente y efluente de la EDAR 3 y en el cauce	4-28
Figura 4.22: Dibujo esquemático de la EDAR 4 y vista real	4-30
Figura 4.23: Etapas de la EDAR 4	4-31
Figura 4.24: Puntos de la toma de muestras (Mi) en las líneas de tratamiento de la EDAR 4	4-32
Figura 4.25: Imágenes de algunos puntos de muestreo. a) Salida decantador secundario (M3); b) Salida laguna 2 (M5); c) Salida centrífuga de fangos (M9)	4-33
Figura 4.26: Coordenadas de los puntos de muestreo en el río aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la EDAR 4	4-33
Figura 4.27: Caracterización microbiológica a lo largo de la línea de tratamiento de aguas de la EDAR 4. a) Primera campaña; b) Segunda campaña; c) Tercera campaña	4-36
Figura 4.28: Cargas microbiológicas (UFC/d) en el influente y efluente de la EDAR 4 y en el cauce	4-39
Figura 4.29: Dibujo esquemático de la EDAR 5 y vista real	4-40
Figura 4.30: Etapas de la EDAR 5	4-41
Figura 4.31: Puntos de la toma de muestras (Mi) en las líneas de tratamiento de la EDAR 5	4-42
Figura 4.32: Imágenes de algunos puntos de muestreo. a) Entrada (M1); b) Reactor aerobio (M3); c) Efluente (M9)	4-43
Figura 4.33: Coordenadas de los puntos de muestreo en el río aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la EDAR 5	4-43
Figura 4.34: Caracterización microbiológica a lo largo de la línea de tratamiento de aguas de la EDAR 5. a) Primera campaña; b) Segunda campaña; c) Tercera campaña	4-47
Figura 4.35: Cargas microbiológicas (UFC/d) en el influente y efluente de la EDAR 5 y en el cauce	4-49
Figura 4.36: Dibujo esquemático de la EDAR 6 y vista real	4-50
Figura 4.37: Etapas de la EDAR 6	4-51
Figura 4.38: Puntos de la toma de muestras (Mi) en la línea de tratamiento de la EDAR 6	4-52
Figura 4.39: Imágenes de algunos puntos de muestreo. a) Tanque Imhoff (M2); b) Entrada filtro arena (M4); c) Salida filtro de arena (M5)	4-52
Figura 4.40: Coordenadas de los puntos de muestreo en el río aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la EDAR 6	4-52
Figura 4.41: Caracterización microbiológica de la EDAR 6 a lo largo de la línea de tratamiento de aguas en la primera campaña	4-54
Figura 4.42: Cargas microbiológicas (UFC/d) en el influente y efluente de la EDAR 6 y en el cauce	4-55
Figura 4.43: Reducción microbiológica a la salida de cada etapa	4-56
Figura 4.44: Reducción microbiológica a la salida de cada proceso	4-57
Figura 4.45: Reducción microbiológica global en las EDARs	4-57
Figura 4.46: Carga microbiológica de las bacterias estudiadas en el influente y efluente de las EDARs así como aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de cada EDAR	4-58

Capítulo 5

Figura 5.1: Plantas piloto anaerobias situadas en la EDAR 2	5-2
Figura 5.2: Evolución de la concentración de sólidos inorgánicos (ST-SV) en el fango de alimentación y en los digestores anaerobios en el Estacionario 1	5-6
Figura 5.3: Evolución de la concentración de sólidos inorgánicos (ST-SV) en el fango de alimentación y en los digestores anaerobios en el Estacionario 2	5-6
Figura 5.4: Evolución de la concentración de sólidos inorgánicos (ST-SV) en el fango de alimentación y en los digestores anaerobios en el Estacionario 3	5-6
Figura 5.5: Evolución de la concentración de sólidos inorgánicos (ST-SV) en el fango de alimentación y en los digestores anaerobios en el Estacionario 4	5-7
Figura 5.6: Concentración de sólidos volátiles en el fango de alimentación y los digestores durante el Estacionario 1	5-7
Figura 5.7: Concentración de sólidos volátiles en el fango de alimentación y los digestores durante el Estacionario 2	5-8
Figura 5.8: Concentración de sólidos volátiles en el fango de alimentación y los digestores durante el Estacionario 3	5-8
Figura 5.9: Concentración de sólidos volátiles en el fango de alimentación y los digestores durante el Estacionario 4	5-8
Figura 5.10: Fracción volátil en el fango de alimentación y en los digestores durante el Estacionario 1	5-9
Figura 5.11: Fracción volátil en el fango de alimentación y en los digestores durante el Estacionario 2	5-9
Figura 5.12: Fracción volátil en el fango de alimentación y en los digestores durante el Estacionario 3	5-9
Figura 5.13: Fracción volátil en el fango de alimentación y en los digestores durante el Estacionario 4	5-10
Figura 5.14: Producción de biogás en el digester anaerobio mesófilo a) TRH 20 días; b) TRH 15 días; c) TRH 12 días	5-13
Figura 5.15: Producción de biogás en el digester anaerobio termófilo a) TRH 15 días; b) TRH 10 días; c) TRH 7 días	5-14
Figura 5.16: Concentración microbiológica del fango digerido en el tratamiento anaerobio mesófilo	5-17
Figura 5.17: Reducción de la concentración microbiológica en el fango digerido en el tratamiento anaerobio mesófilo	5-17
Figura 5.18: Concentración microbiológica del fango digerido en el tratamiento anaerobio termófilo	5-18
Figura 5.19: Reducción microbiológica en el fango digerido en el tratamiento anaerobio termófilo	5-19
Figura 5.20: Planta piloto ATAD situada en la EDAR 2	5-21

Figura 5.21: Evolución de la concentración de sólidos inorgánicos (ST-SV) en el fango de alimentación y en el ATAD en el Estacionario 1	5-24
Figura 5.22: Evolución de la concentración de sólidos inorgánicos (ST-SV) en el fango de alimentación y en el ATAD en el Estacionario 2	5-24
Figura 5.23: Evolución de la concentración de sólidos inorgánicos (ST-SV) en el fango de alimentación y en el ATAD en el Estacionario 3	5-24
Figura 5.24: Concentración de sólidos volátiles en el fango de alimentación y en el ATAD durante el Estacionario 1	5-25
Figura 5.25: Concentración de sólidos volátiles en el fango de alimentación y en el ATAD durante el Estacionario 2	5-25
Figura 5.26: Concentración de sólidos volátiles en el fango de alimentación y en el ATAD durante el Estacionario 3	5-26
Figura 5.27: Fracción volátil en el fango de alimentación y en el ATAD durante el Estacionario 1	5-26
Figura 5.28: Fracción volátil en el fango de alimentación y en el ATAD durante el Estacionario 2	5-26
Figura 5.29: Fracción volátil en el fango de alimentación y en el ATAD durante el Estacionario 3	5-27
Figura 5.30: Perfil de temperaturas a) TRH 5 días; b) TRH 10 días	5-29
Figura 5.31: Concentración microbiológica del fango digerido en el ATAD	5-31
Figura 5.32: Reducción microbiológica en el ATAD	5-31
Figura 5.33: Resultados de concentración de amonio y reducción microbiológica de <i>Enterococcus</i> sp. para cada TRH en el ATAD	5-33
Figura 5.34: Resultados de concentración de amonio y reducción microbiológica de <i>E.coli</i> para cada TRH en el ATAD	5-33
Figura 5.35: Intervalos de reducción de <i>Enterococcus</i> sp. para diferentes tratamientos	5-34
Figura 5.36: Intervalos de reducción de <i>E.coli</i> para diferentes tratamientos	5-34
Figura 5.37: Intervalos LSD de los resultados de reducción de <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento anaerobio mesófilo para los diferentes TRH	5-35
Figura 5.38: Intervalos LSD de los resultados de reducción de <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento anaerobio termófilo para los diferentes TRH	5-35
Figura 5.39: Intervalos LSD de los resultados de reducción de <i>E.coli</i> en el tratamiento anaerobio termófilo para los diferentes TRH	5-36
Figura 5.40: Intervalos LSD de los resultados de reducción de <i>E.coli</i> en el tratamiento aerobio termófilo para los diferentes TRH	5-36

Capítulo 6

Figura 6.1: Cultivo de maíz	6-1
Figura 6.2: Cultivo de girasol	6-1
Figura 6.3: Imágenes del suelo arcilloso y el suelo arenoso (Google maps)	6-3
Figura 6.4: Imágenes de los suelos y la toma de muestras. a) Suelo arenoso antes de abonar; b) Toma de muestras de suelo arcilloso	6-5
Figura 6.5: Línea temporal de la toma de muestras	6-5
Figura 6.6: Suspensión inicial de las muestras sólidas tras el pretratamiento	6-6

Índice de tablas

Capítulo 2

Tabla 2.1 Características y procedencia del agua residual (Metcalf y Eddy 2002)	2-2
Tabla 2.2 Microorganismos habitualmente presentes en aguas residuales domésticas brutas (Metcalf y Eddy 2002)	2-3
Tabla 2.3: Valores límite de concentración establecidos en el RD 1310/1990	2-19
Tabla 2.4: Parámetros de control de calidad de fangos según la Orden AAA/1072/2003	2-20
Tabla 2.5: Criterios de calidad relacionados con la reducción de microorganismos en fangos de EDARs para su uso agrícola	2-20

Capítulo 3

Tabla 3.1: Parámetros físico –químicos analizados, instrumentación y metodología de referencia	3-1
Tabla 3.2: Material y reactivos para el análisis microbiológico	3-4
Tabla 3.3: Instrumentos para llevar a cabo el análisis microbiológico	3-4
Tabla 3.4: Normas de análisis y medios de cultivo empleados para la determinación de microorganismos mediante el recuento en placa	3-5
Tabla 3.5: Temperatura y tiempo de incubación de cada medio de cultivo para la determinación de cada microorganismo con los procedimientos de recuento en placa	3-7
Tabla 3.6: Resumen de los coeficientes determinados	3-9
Tabla 3.7: Coeficientes de variación para los métodos de análisis y las bacterias objeto de estudio	3-10
Tabla 3.8: Coeficientes de variación de los métodos empleados para cada bacteria objeto de estudio	3-11
Tabla 3.9: Norma de análisis y medios de cultivo empleados para la determinación de microorganismos mediante el método NMP	3-12
Tabla 3.10: Temperatura y tiempo de incubación en cada medio de cultivo para la determinación de cada microorganismo con el procedimiento del NMP	3-13
Tabla 3.11: Valores del NMP y límites al 95% de confianza para varias combinaciones de resultados positivos cuando se emplean cinco tubos por dilución (Eaton <i>et al.</i> , 2005)	3-14
Tabla 3.12: Métodos de referencia para el análisis de <i>E.coli</i> y <i>E.faecium</i> en diversas matrices	3-17
Tabla 3.13: Nomenclatura de muestras de fango estéril fortificado y rango de concentración estimada de <i>E.faecium</i> previamente a su análisis	3-19

Tabla 3.14: Nomenclatura de muestras reales de fango y rango de concentración estimada previamente a su análisis	3-19
Tabla 3.15: Resultados del análisis en de <i>E.faecium</i> (MEF1-MEF5) en muestras de fango estéril fortificado	3-19
Tabla 3.16: Resultados del análisis de <i>E.coli</i> (MR1-MR2) en muestras reales de fangos	3-22

Capítulo 4

Tabla 4.1: Caudal y carga de diseño y valores reales medios de tratamiento de la EDAR 1	4-2
Tabla 4.2: Parámetros operacionales medios de la EDAR 1	4-5
Tabla 4.3: Resultados promedio de parámetros físico-químicos en muestras de agua de la EDAR 1	4-6
Tabla 4.4: Resultados promedio de parámetros físico-químicos en muestras de fangos de la EDAR 1	4-6
Tabla 4.5: Caracterización microbiológica de muestras de agua de la EDAR 1 (UFC/100ml)	4-7
Tabla 4.6: Caracterización microbiológica de muestras de fangos en la EDAR 1 (UFC/g)	4-9
Tabla 4.7: Caracterización microbiológica en el influente y efluente de la EDAR 1 y en el cauce aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido (UFC/100ml)	4-9
Tabla 4.8: Caudales tratados en la EDAR 1 y caudales en el cauce del río	4-10
Tabla 4.9: Caudal y carga de diseño y valores reales medios de tratamiento de la EDAR 2	4-11
Tabla 4.10: Parámetros operacionales de la EDAR 2	4-14
Tabla 4.11: Resultados promedio de parámetros físico-químicos en muestras de agua de la EDAR 2	4-15
Tabla 4.12: Resultados promedio de parámetros físico-químicos en muestras fangos de la EDAR 2	4-15
Tabla 4.13: Caracterización microbiológica de muestras de agua de la EDAR 2 (UFC/100ml)	4-16
Tabla 4.14: Caracterización microbiológica de muestras de fangos de la EDAR 2 (UFC/g)	4-18
Tabla 4.15: Caracterización microbiológica en el influente y efluente de la EDAR 2 y en el cauce aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido (UFC/100ml)	4-19
Tabla 4.16: Caudales tratados en la EDAR 2 y caudales en el cauce del río	4-19
Tabla 4.17: Caudal y carga de diseño y valores reales medios de tratamiento de la EDAR 3	4-21
Tabla 4.18: Parámetros operacionales de la EDAR 3	4-24
Tabla 4.19: Resultados promedio de parámetros físico-químicos en muestras de agua de la EDAR 3	4-24
Tabla 4.20: Resultados promedio de parámetros físico-químicos en muestras de fangos de la EDAR 3	4-25
Tabla 4.21: Caracterización microbiológica de muestras de agua de la EDAR 3 (UFC/100ml)	4-25
Tabla 4.22: Caracterización microbiológica de muestras de fangos de la EDAR 3 (UFC/g)	4-27
Tabla 4.23: Caracterización microbiológica en el influente y efluente de la EDAR 3 y en el cauce aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido (UFC/100ml)	4-28
Tabla 4.24: Caudales tratados en la EDAR 3 y caudales en el cauce del río	4-28
Tabla 4.25: Caudal y carga de diseño y valores reales medios de tratamiento de la EDAR 4	4-30
Tabla 4.26: Parámetros operacionales de la EDAR 4	4-33
Tabla 4.27: Resultados promedio de parámetros físico-químicos en muestras de agua de la EDAR 4	4-34

Tabla 4.28: Resultados promedio de parámetros físico-químicos en muestras de fangos de la EDAR 4	4-34
Tabla 4.29: Caracterización microbiológica de muestras de agua de la EDAR 4 (UFC/100ml)	4-35
Tabla 4.30: Caracterización microbiológica de muestras de fangos de la EDAR 4 (UFC/g)	4-38
Tabla 4.31: Caracterización microbiológica en el influente y efluente de la EDAR 4 y en el cauce aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido (UFC/100ml)	4-38
Tabla 4.32: Caudales tratados en la EDAR 4 y caudales en el cauce del río	4-39
Tabla 4.33: Caudal y carga de diseño y valores reales medios de tratamiento de la EDAR 5	4-40
Tabla 4.34: Parámetros operacionales de la EDAR 5	4-43
Tabla 4.35: Resultados promedio de parámetros físico-químicos en muestras de agua de la EDAR 5	4-44
Tabla 4.36: Resultados promedio de parámetros físico-químicos en muestras de fangos de la EDAR 5	4-44
Tabla 4.37: Caracterización microbiológica de muestras de agua de la EDAR 5 (UFC/100ml)	4-46
Tabla 4.38: Caracterización microbiológica de muestras de fangos de la EDAR 5 (UFC/g)	4-48
Tabla 4.39: Caracterización microbiológica en el influente y efluente de la EDAR 5 y en el cauce aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido (UFC/100ml)	4-49
Tabla 4.40: Caudales tratados en la EDAR 5 y caudales en el cauce del río	4-49
Tabla 4.41: Caudal y carga de diseño y valores reales medios de tratamiento de la EDAR 6	4-50
Tabla 4.42: Parámetros operacionales de la planta	4-50
Tabla 4.43: Resultados promedio de parámetros físico-químicos en muestras de agua de la EDAR 6	4-53
Tabla 4.44: Caracterización microbiológica de muestras de agua de la EDAR 6 (UFC/100ml)	4-53
Tabla 4.45: Caracterización microbiológica en entrada y salida de la EDAR 6 y en el cauce aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido (UFC/100ml)	4-54
Tabla 4.46: Caudales tratados en la EDAR 6 y caudales en el cauce del río	4-55
Tabla 4.47: Habitantes equivalentes, relación entre caudal del río receptor y caudal tratado en la EDAR y principales procesos presentes en las instalaciones	4-56

Capítulo 5

Tabla 5.1: Periodos estacionarios en las plantas anaerobias	5-5
Tabla 5.2: Resultados de parámetros físico-químicos de control en el tratamiento anaerobio. Estacionario 1	5-10
Tabla 5.3: Resultados de parámetros físico-químicos de control en el tratamiento anaerobio. Estacionario 2	5-11
Tabla 5.4: Resultados de parámetros físico-químicos de control en el tratamiento anaerobio. Estacionario 3	5-11
Tabla 5.5: Resultados de parámetros físico-químicos de control en el tratamiento anaerobio. Estacionario 4	5-12
Tabla 5.6: Resultados de producción de biogás y ratios de control de los digestores para cada Estacionario	5-14

Tabla 5.7: Caracterización microbiológica en la carga y los digestores anaerobios durante el Estacionario 1 (UFC/ml)	5-15
Tabla 5.8: Caracterización microbiológica en la carga y los digestores anaerobios durante el Estacionario 2 (UFC/ml)	5-16
Tabla 5.9: Caracterización microbiológica en la carga y los digestores anaerobios durante el Estacionario 3 (UFC/ml)	5-16
Tabla 5.10: Caracterización microbiológica en la carga y los digestores anaerobios durante el Estacionario 4 (UFC/ml)	5-16
Tabla 5.11: Resultados del análisis de <i>Salmonella</i> spp. en el fango digerido mediante tratamiento anaerobio mesófilo en el Estacionario 2	5-18
Tabla 5.12: Resultados del análisis de <i>Salmonella</i> spp. en el fango digerido mediante tratamiento anaerobio termófilo	5-19
Tabla 5.13: Periodos estacionarios en la planta aerobia	5-23
Tabla 5.14: Resultados de parámetros físico-químicos de control en el ATAD. Estacionario 1	5-27
Tabla 5.15: Resultados de parámetros físico-químicos de control en el ATAD. Estacionario 2	5-28
Tabla 5.16: Resultados de parámetros físico-químicos de control en el ATAD. Estacionario 3	5-28
Tabla 5.17: Resultados de producción de biogás y ratios de control de los digestores para cada Estacionario	5-29
Tabla 5.18: Caracterización microbiológica en la carga y el digestor aerobio en el Estacionario 1 (UFC/ml)	5-30
Tabla 5.19: Caracterización microbiológica en la carga y el digestor aerobio en el Estacionario 2 (UFC/ml)	5-30
Tabla 5.20: Caracterización microbiológica en la carga y el digestor aerobio en el Estacionario 3 (UFC/ml)	5-30
Tabla 5.21: Resultados del análisis de <i>Salmonella</i> spp. en el fango digerido en el ATAD en el Estacionario 1	5-32
Tabla 5.22: Grado de cumplimiento de los criterios de calidad microbiológica de los fangos digeridos en las plantas piloto mediante un tratamiento convencional	5-37
Tabla 5.23: Grado de cumplimiento de los criterios de calidad microbiológica de los fangos digeridos en las plantas piloto mediante un tratamiento avanzado	5-37

Capítulo 6

Tabla 6.1: Extracción y exportación real de nutrientes principales del maíz	6-2
Tabla 6.2: Requerimientos de nutrientes del girasol	6-2
Tabla 6.3: Características de los suelos de textura arcillosa y de textura arenosa	6-3
Tabla 6.4: Caracterización físico-química del suelo arcilloso antes de ser abonado y del fango con el que se va a abonar	6-7

Tabla 6.5: Caracterización microbiológica (UFC/g seco) de las muestras iniciales del suelo arcilloso y el fango con el que se va a abonar el suelo	6-8
Tabla 6.6: Evolución temporal de los valores de parámetros físico-químicos en el suelo arcilloso	6-8
Tabla 6.7: Evolución temporal de la concentración microbiológica (UFC/g seco) en el suelo arcilloso	6-9
Tabla 6.8: Caracterización físico química del suelo arcillosos tras la recogida del cultivo (42 semanas)	6-9
Tabla 6.9: Concentración microbiológica (UFC/g seco) del suelo arcillosos tras la recogida del cultivo (42 semanas)	6-9
Tabla 6.10: Caracterización físico-química del agua de riego del suelo arcilloso	6-10
Tabla 6.11: Caracterización microbiológica (UFC/100ml) del agua de riego del suelo arcilloso	6-10
Tabla 6.12: Caracterización físico-química del suelo arenoso antes de ser abonado y del fango con el que se va a abonar	6-11
Tabla 6.13: Caracterización microbiológica (UFC/g seco) de las muestras iniciales del suelo arenoso y del fango con el que se va a abonar	6-12
Tabla 6.14: Evolución temporal de los valores de parámetros físico-químicos en el suelo arenoso	6-12
Tabla 6.15: Evolución temporal de la concentración microbiológica (UFC/g seco) en el suelo arenoso	6-13
Tabla 6.16: Caracterización físico-química del suelo arenoso tras la recogida del cultivo (24 semanas)	6-13
Tabla 6.17: Concentración microbiológica (UFC/g seco) del suelo arenoso tras la recogida del cultivo (24 semanas)	6-14
Tabla 6.18: Caracterización físico-química del agua de riego del suelo arenoso	6-14
Tabla 6.19: Caracterización microbiológica (UFC/100ml) del agua de riego del suelo arenoso	6-14
Tabla 6.20: Observaciones de otros autores en relación a la caracterización físico-química de la aplicación de fango al suelo	6-16
Tabla 6.21: Observaciones de otros autores en relación a la caracterización microbiológica de la aplicación de fango al suelo	6-17

Capítulo 1.

Introducción y objetivos

El agua en España es uno de los recursos naturales que, por su carácter limitado y variable, tanto en cantidad como en calidad, debería protegerse con especial intensidad. Conscientes de esta necesidad y en consonancia con la Estrategia Europea 2020, el programa operativo de crecimiento sostenible 2014-2020, diseñado por el Ministerio de Hacienda y Administraciones públicas, establece como uno de los ejes prioritarios de actuación la mejora de la calidad de las aguas naturales. En concreto, se incluyen entre otras prioridades en materia de I+D+i la conservación y gestión integral eficiente y sostenible de los sistemas agroecológicos y de los recursos hídricos, la mejora sostenible de los sistemas de producción agrícolas, aumentar la calidad y seguridad de los alimentos y la seguridad, trazabilidad, alerta y gestión de riesgos.

Actualmente y tras la publicación de hace ya más de 25 años de la Directiva 91/271/CEE, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas, y una vez alcanzadas las exigencias mínimas establecidas, se precisa la publicación de disposiciones y normativas más severas, acordes a las pautas establecidas en la Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de 2000, conocida como la Directiva Marco del Agua (DMA), en relación a la protección de las aguas. Generalmente, al carecer de requerimiento legal, las instalaciones de depuración no incluyen procesos de desinfección que reduzcan la carga microbiológica de los efluentes. En consecuencia, estos agentes se incorporan al medio ambiente a través del vertido directo o indirecto de estas instalaciones o a través de los fangos en los que han sido concentrados y que son utilizados como abono en prácticas agrícolas. En los últimos años se están realizando estudios de caracterización microbiológica en aguas residuales y en efluentes tratados de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) (George et al., 2002; Koivunen et al., 2003; Castro-Hermida et al., 2008; Abreu-Acosta y Vera, 2011; Tyagi et al., 2011; Rodríguez-Chueca, 2013) así como estudios de comportamiento y distribución de sustancias peligrosas y microorganismos a través de las etapas de las líneas de aguas y de fangos para conocer la evolución a lo largo del tratamiento de agua así como en los sedimentos de cauces receptores (Chen et al., 2008; Abreu-Acosta y Vera, 2011; Lloret et al., 2012; Mosteo et al., 2013; Veses et al., 2013; Marín et al., 2015; Bai et al., 2017; Torri et al., 2017).

En general, la contaminación presente en las aguas residuales puede limitar su vertido al cauce, que debe cumplir con lo establecido en el Real Decreto 670/2013, así como el uso que se puede hacer de las aguas receptoras, sobre todo en abastecimiento a poblaciones y uso recreacional (baño y otros), debiéndose cumplir principalmente con el Real Decreto 817/2015. Por otro lado, en relación a los fangos producidos en una EDAR y en el marco de una economía circular, la consideración de éstos como de un producto susceptible de su utilización, ha transformado la tradicional visión del mismo, cuyo único destino era la disposición en vertedero. El Plan Nacional de Lodos de Depuradoras de Aguas Residuales recoge la disposición en vertedero como última opción de destino para este producto, siendo la primera alternativa su aplicación al suelo (Lasheras, 2011). Como consecuencia de la aplicación de la Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados, los fangos de EDAR que se tratan en la propia instalación y que se aplican al suelo se considerarán un “subproducto” y no un “residuo”.

El fango generado en las EDARs se utiliza habitualmente en agricultura, ya que presenta una importante fuente de nutrientes y materia orgánica para el suelo. En la actualidad, la aplicación de fangos en agricultura debe cumplir el Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de lodos de depuración en el sector agrario, en el que se establecen límites para metales pero no de gérmenes patógenos. Conscientes de que esta aplicación al suelo puede suponer

un riesgo sanitario y ambiental, se publica la Orden AAA/1072/2013, de 7 de junio, sobre utilización de lodos de depuración en el sector agrario, cuyo objetivo es establecer la información que una EDAR debe proporcionar en relación con el tratamiento aplicado a sus fangos y además debe informar sobre la concentración de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* y otros contaminantes químicos inorgánicos y orgánicos presentes en el mismo (Ottoson et al., 2008; Carballa et al., 2009; Sidhu y Toze, 2009; Scaglia et al., 2014; Joo et al., 2015; Levantesi et al., 2015).

Dada la naturaleza de los fangos de EDARs, éstos suelen someterse a procesos de estabilización para reducir su capacidad de fermentación, el olor y los microorganismos potencialmente patógenos. En la actualidad existen diferentes tecnologías para conseguir estos objetivos. En concreto, destaca la aplicación de los tratamientos biológicos, muy utilizados sobre todo en EDARs situadas en pequeños-medianos núcleos de población. Los criterios, tanto de higienización como de estabilidad de fangos de EDARs quedan reflejados en distintos documentos de trabajo para la aplicación de los fangos al suelo (Environmental Protection Agency (EPA), 2003; Unión Europea 2000, 2003, 2010). El control en la aplicación del fango en agricultura, unido a una mayor exigencia en los tratamientos de los mismos, tiene como objetivo evitar la propagación de los microorganismos patógenos, tanto por escorrentías como por atracción de vectores, definido éste término como la capacidad de atraer roedores, moscas, mosquitos y otros organismos capaces de transportar agentes infecciosos. Por ello, resulta sumamente importante realizar estudios de supervivencia de estos microorganismos en el suelo, una vez que el fango se incorpora al mismo.

Son muy pocos los estudios realizados a escala real, tanto en la línea de aguas como en la de fangos, debido fundamentalmente a la dificultad habitual de acceso a instalaciones y toma de muestras. Además, resulta apropiado facilitar un enfoque integrado del control de las emisiones de las plantas de tratamiento de depuración al agua y al suelo, que otorgue una protección al medio ambiente en su conjunto, de manera que se evite la transferencia de contaminación de un elemento o recurso natural a otro.

El presente trabajo de investigación, el cual constituye esta Tesis Doctoral, se enmarca en el proyecto CTM2013-41397-R “Evaluación de procesos en el tratamiento de aguas y fangos en EDARs, para la reducción de microorganismos con riesgo sanitario y ambiental”, desarrollado entre 2014-2017, cuya finalidad es investigar procesos de tratamiento de aguas y fangos, actualmente utilizados en estaciones de depuración de aguas residuales urbanas (EDARs), con el fin de establecer criterios de selección de las mejores tecnologías disponibles, minimizando la presencia de gérmenes potencialmente patógenos en efluentes líquidos y en fangos, potenciando así su posible reutilización o aprovechamiento agrícola, con el fin último de reducir riesgos para la salud pública y el medio ambiente. El proyecto se realiza en estrecha colaboración con Nilsa (Navarra de Infraestructuras Locales S.A.), sociedad pública adscrita al Gobierno de Navarra y organismo competente en materia de depuración de las aguas residuales de la Comunidad Foral. Nilsa pone a disposición del proyecto diversas EDARs a escala real para la toma de muestras y tres plantas de digestión de fangos a escala piloto, así como personal, analíticas, etc.

El objetivo de esta Tesis Doctoral es investigar el comportamiento y evolución de microorganismos potencialmente patógenos presentes en aguas residuales urbanas a través de las instalaciones de depuración seleccionadas teniendo en cuenta los procesos existentes, con el fin de evaluar las diferentes tecnologías, que permitan establecer criterios de selección de las mejores tecnologías disponibles, así como reducir su presencia tanto en efluentes como en fangos, potenciando su

posible aprovechamiento agrícola, con el fin último de reducir riesgos para la salud pública y el medio ambiente.

El objetivo principal se puede desglosar en tres líneas principales de estudio y en los correspondientes objetivos secundarios:

1. Investigar el efecto que cada proceso y/o etapa existente dentro de las líneas de tratamiento de las EDARs seleccionadas, ejerce sobre la reducción de microorganismos y en último término, sobre la calidad de efluentes y de fangos.

1.1. Estudiar el comportamiento, distribución y evolución de cada microorganismo dentro de la línea de aguas y de fangos de cada EDAR seleccionada, evaluar las principales variables influyentes e investigar la relación entre bacterias indicadoras y microorganismos patógenos.

1.2. Identificar los procesos responsables de la reducción o concentración de microorganismos, tanto en la línea de aguas, como en la de fangos, dentro del sistema de tratamiento integral de una EDAR.

1.3. Establecer la relación existente entre los procesos de tratamiento aplicados y la calidad microbiológica de efluentes y fangos de salida de planta. Evaluar el impacto de efluentes en el cauce receptor.

1.4. Evaluar la idoneidad del control de parámetros indicadores microbiológicos para el diagnóstico de calidad de aguas y fangos.

1.5. Evaluar la idoneidad de diversas metodologías para análisis microbiológico de fangos

2. Investigar a escala piloto, la influencia que la aplicación de diferentes procesos de digestión biológica de fangos de EDARs (aerobia y anaerobia, tanto en condiciones mesofílicas como termofílicas), ejercen sobre la composición microbiológica.

2.1. Estudiar la evolución y comportamiento de bacterias indicadoras y microorganismos patógenos durante el tratamiento biológico anaerobio de fangos de EDARs, en condiciones mesofílicas y termofílicas

2.2. Estudiar la evolución y comportamiento de bacterias indicadoras y microorganismos patógenos durante el tratamiento biológico aerobio termofílico de fangos de EDARs.

2.3. Determinar la calidad de fangos de salida de EDAR en función del tratamiento biológico aplicado y condiciones de operación, evaluando dicha calidad en términos de higienización.

3. Conocer la evolución temporal de la contaminación microbiológica de fangos tras su aplicación en terrenos agrícolas y evaluar las principales variables influyentes.

Esta Tesis Doctoral se realiza dentro del grupo “Calidad y Tratamiento de Aguas” de la Universidad de Zaragoza (grupo consolidado de investigación por Resolución del Gobierno de Aragón-T33), perteneciente al Instituto Universitario de Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), en colaboración el grupo “Parasitología, Autocuidados y Salud Ambiental” (grupo consolidado de investigación por Resolución del Gobierno de Aragón-B124) y Nilsa.

La memoria de esta Tesis Doctoral se estructura en ocho capítulos y dos anexos.

Tras el primer capítulo **Introducción y objetivos**, en el capítulo dos, **Tratamiento y gestión de aguas residuales y fangos de origen urbano**, se incluyen conceptos teóricos relacionados con la calidad de las aguas residuales, las características de las aguas depuradas y los tratamientos y normativa aplicable a dichas aguas. Así mismo, se detallan conceptos relativos a las características de los fangos

de EDAR, los tratamientos empleados para su higienización y estabilización, su posible aplicación en la agricultura y la normativa vigente y aplicable a dichos fangos.

En el capítulo tres, denominado **Metodología analítica y tratamiento de datos**, se describe la instrumentación, materiales y metodología utilizados en la parte experimental del trabajo desarrollado, así como el tratamiento de los datos y resultados obtenidos. Además, se detalla el estudio realizado en relación a la evaluación de la idoneidad de métodos de control microbiológico en muestras de fangos.

En los capítulos cuatro, cinco y seis, se incluyen los procedimientos y resultados de las tres líneas principales del estudio. En concreto, en el capítulo cuatro, titulado **Estudio del efecto que sobre la calidad microbiológica de efluentes y fangos de depuradora tiene el sistema de tratamiento aplicado en instalaciones a escala real**, se incluye la descripción del procedimiento llevado a cabo para el análisis y caracterización de muestras a lo largo de las líneas de tratamiento de aguas y fangos de diferentes EDARs, así como los resultados obtenidos. En el capítulo cinco, titulado **Estudio a escala piloto del efecto que sobre la calidad microbiológica de fangos tiene el proceso de digestión aplicado**, se describe el procedimiento llevado a cabo para el análisis y caracterización de muestras de fangos tras los diferentes tratamientos de digestión aplicados en tres plantas piloto, así como los resultados obtenidos. En el capítulo seis, titulado **Estudio del aprovechamiento agrícola de fangos de EDAR**, se muestra el procedimiento llevado a cabo para el análisis y caracterización de muestras de suelo agrícola y fango en los terrenos objeto de estudio, así como los resultados obtenidos.

Para finalizar, el capítulo siete recoge las principales **Conclusiones** obtenidas como consecuencia del trabajo desarrollado y el capítulo ocho detalla la **Bibliografía** consultada a lo largo de esta investigación.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han dado lugar a elaboración de los siguientes Informes Técnicos, cuya copia se ha distribuido a Nilsa y al Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas (CEDEX), para su remisión al Joint Research Centre, tal y como se establece en el objetivo del proyecto CTM2013-41397-R.

1. 'Estudio del impacto del agua procedente de diferentes Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales de Navarra en el cauce receptor'. Junio de 2017
2. 'Caracterización del agua de diferentes Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales de Navarra'. Junio de 2017
3. 'Evaluación de la idoneidad de metodologías de análisis microbiológico en fangos'. Octubre de 2017
4. 'Estudio de procesos de digestión sobre la calidad microbiológica de fangos a escala piloto'. Octubre de 2017
5. 'Estudio del aprovechamiento agrícola de fangos de EDAR'. Octubre de 2017

Así mismo, se ha contribuido en diferentes congresos nacionales e internacionales tal y como se detalla a continuación:

- López, A., Mosteo, R., Goñi, P., Gómez, J., Lasheras, A.M. and Ormad, M.P. (2015) 'Presencia y evolución de coliformes totales, *E.coli* y *Salmonella* en la línea de aguas y fangos en EDARs', Actas del congreso *IV Jornadas del Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón*. Zaragoza (España)
- López, A., Mosteo, R., Ormad, M.P. and Ovelleiro, J.L. (2015) 'Analysis of microbiological quality of surface waters in Ebro river basin as a first approach to establish the origin of the present contamination', Libro de resúmenes del congreso *22nd World Congress&Exhibition. Ozone and Advanced Oxidation. Leading-edge Science and technologies. International Ozone Association*. ISBN 979-10-92607-02-4. Barcelona (España)
- López, A., Rodríguez, J., Valero, P., Mosteo, R., Lasheras, A.M., Ormad, M.P. and Ovelleiro, J.L. (2015) 'Efecto de las etapas de depuración de aguas residuales en la contaminación microbiológica presente', Revista *Salud Ambiental-Especial XIII Congreso de Salud Ambiental*. ISSN 1697-2971. Cartagena (España)
- López, A., Mosteo, R., Gómez, J., Lasheras, A.M., Goñi, P. and Ormad, M.P. (2016) 'Evaluation of technologies in wastewater treatment plants for the bacteria reduction in effluents', Actas del congreso *13th IWA Leading Edge Conference on Water and Wastewater Technologies*. Jerez de la Frontera (España)
- López, A., Mosteo, R., Gómez, J., Lasheras, A.M., Goñi, P. and Ormad, M.P. (2016) 'Evolución de bacterias patógenas en el tratamiento de aguas residuales urbanas', Libro de resúmenes del congreso *XII Reunión de la Mesa Española de Tratamiento de Aguas (META)*. Madrid (España)
- López, A., Pueyo, N., Mosteo, R., Goñi, P., Gómez, J., Miguel, N. and Ormad, M.P. (2017) 'Impacto de efluentes urbanos sobre la calidad microbiológica de las aguas receptoras de la cuenca del Ebro', Revista *Salud Ambiental-Especial XIV Congreso de Salud Ambiental*. ISSN 1697-2971. Zaragoza (España)
- López, A., Benito, M., Gómez, J., Mosteo, R., Lasheras, A.M. and Goñi, P. (2017) 'Comparison of methodologies used in the analysis of *Escherichia coli* in treated sewage sludges', Actas del congreso *7th Congress of European Microbiologists, FEMS 2017*. Valencia (España)
- López, A., Gómez, J., Benito, M., Lasheras, A.M. and Ormad, M.P. (2017) 'Control of indicator bacteria in sewage sludge after conventional and advanced biological treatments in pilot-scale plants', Actas del congreso *The IWA specialist conference on sludge management: Sludgetech 2017*. Londres (Reino Unido)
- Miguel, N., Sarasa, J., Labadía, J., López, A., Gómez, J. and Lasheras, A.M. (2017) 'Application of aerobic digested sewage sludge on agricultural soils under real conditions: monitoring of microbial indicators and pathogens', Actas del congreso *The IWA specialist conference on sludge management: Sludgetech 2017*. Londres (Reino Unido)
- López, A., Gómez, J., Mosteo, R., Lasheras, A.M. and Goñi, P. (2017) 'Hygienization of sewage sludge for agricultural use after conventional and advanced treatments in pilot-scale plants', Actas del congreso *The IWA specialist conference on sludge management: Sludgetech 2017*. Londres (Reino Unido)

Capítulo 2.

Tratamiento y gestión de aguas residuales y fangos de origen urbano

2.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS AGUAS RESIDUALES URBANAS	2-1
2.1.1 Composición general	2-1
2.1.2 Composición microbiológica	2-1
2.1.2.1 Gérmenes patógenos	2-1
2.1.2.2 La célula bacteriana	2-3
2.1.2.3 Bacterias indicadoras de contaminación microbiológica	2-5
2.2 CONTROL DE EFLUENTES PARA SU VERTIDO AL CAUCE RECEPTOR	2-8
2.2.1 Normativa	2-8
2.2.2 Etapas y procesos en la línea de aguas de una EDAR	2-8
2.2.2.1 Esquema convencional de una depuradora	2-8
2.2.2.2 Descripción de etapas y procesos de las plantas objeto de estudio	2-9
2.2.3 Composición de las aguas residuales depuradas y riesgo asociado a su contaminación	2-15
2.3 CONTROL DE FANGOS DE DEPURADORAS URBANAS PARA SU UTILIZACIÓN EN PRÁCTICAS AGRÍCOLAS	2-16
2.3.1 Generación y composición de fangos	2-16
2.3.2 Normativa y criterios de calidad	2-18
2.3.3 Etapas y procesos de tratamiento de fangos	2-22
2.3.3.1 Tecnologías disponibles	2-22
2.3.3.2 Descripción de etapas y procesos de las plantas objeto de estudio	2-22

2.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS AGUAS RESIDUALES URBANAS

2.1.1 Composición general

La Directiva 91/271/CEE, relativa al tratamiento de las aguas residuales urbanas, establece varias definiciones en lo que respecta a las aguas residuales:

- *Aguas residuales urbanas: aguas residuales domésticas o la mezcla de éstas con aguas residuales industriales o con aguas de escorrentía pluvial.*
- *Aguas residuales domésticas: aguas residuales procedentes de zonas de vivienda y de servicios, generadas principalmente por el metabolismo y las actividades domésticas.*
- *Aguas residuales industriales: aguas residuales vertidas desde locales utilizados para cualquier actividad comercial o industrial que no sean aguas residuales domésticas ni aguas de escorrentía pluvial y que incluyen aguas procedentes de las actividades agrícolas y ganaderas que se realicen en concentraciones urbanas de población.*

La composición de las aguas residuales urbanas, tanto química como microbiológica, es muy variada y depende del origen y del tipo de recogida que se emplee, pudiendo incluir componentes como agua residual doméstica, agua residual industrial, infiltración y aportaciones incontroladas o aguas pluviales.

El agua residual urbana contiene habitualmente concentraciones elevadas de sólidos en suspensión, materia orgánica biodegradable, nutrientes, microorganismos, algunos de ellos patógenos, y compuestos inorgánicos disueltos. En función de su procedencia pueden contener además otras sustancias como contaminantes prioritarios, metales pesados y otros contaminantes emergentes (Metcalf y Eddy, 2002). El vertido de estas aguas sin un tratamiento adecuado puede generar graves problemas ambientales como sanitarios, incluido el riesgo de transmisión de enfermedades por la presencia de los microorganismos patógenos.

Hay factores que pueden influir en la variabilidad de la composición microbiológica de estas aguas, como son la cantidad de nutrientes presentes, la concentración de sales, el pH así como los hábitos y costumbres alimentarias, socio-sanitarias, culturales o incluso la composición del terreno o la climatología (Goñi, 2011).

Algunas propiedades físicas y componentes químicos y biológicos de las aguas residuales se muestran en la tabla 2.1, así como orígenes probables de esos componentes (Metcalf y Eddy, 2002).

2.1.2 Composición microbiológica

2.1.2.1 Gérmenes patógenos

Los microorganismos constituyen un grupo extraordinariamente heterogéneo de seres microscópicos integrado por bacterias, hongos, protozoos, algas microscópicas y virus (Tortora et al., 2007). Los microorganismos que se encuentran en el agua pueden ser autóctonos (propios del agua) y alóctonos (procedentes del suelo, aire, animales o del hombre).

Tabla 2.1 Características y procedencia del agua residual (Metcalf y Eddy 2002)

	CARACTERÍSTICAS	PROCEDENCIA
PROPIEDADES FÍSICAS	Color	Aguas residuales domésticas e industriales, degradación natural de materia orgánica
	Olor	Agua residual en descomposición, residuos industriales
	Sólidos	Agua de suministro, aguas residuales domésticas e industriales, erosión del suelo, infiltración y conexiones incontroladas
	Temperatura	Aguas residuales domésticas e industriales
CONSTITUYENTES QUÍMICOS ORGÁNICOS	Carbohidratos	Aguas residuales domésticas, industriales y comerciales
	Grasas animales y aceites	Aguas residuales domésticas, industriales y comerciales
	Pesticidas	Residuos agrícolas
	Fenoles	Vertidos industriales
	Proteínas	Aguas residuales domésticas, industriales y comerciales
	Contaminantes prioritarios	Aguas residuales domésticas, industriales y comerciales
	Agentes tensoactivos	Aguas residuales domésticas, industriales y comerciales
	Compuestos orgánicos volátiles	Aguas residuales domésticas, industriales y comerciales
CONSTITUYENTES QUÍMICOS INORGÁNICOS	Otros	Depuración natural de materia orgánica
	Alcalinidad	Aguas residuales domésticas, agua de suministro, infiltración de agua subterránea
	Cloruros	Aguas residuales domésticas, agua de suministro, infiltración de agua subterránea
	Metales pesados	Vertidos industriales
	Nitrógeno	Residuos agrícolas y aguas residuales domésticas
	pH	Aguas residuales domésticas, industriales y comerciales
	Fósforo	Aguas residuales domésticas, industriales y comerciales, aguas de escorrentía
	Contaminantes prioritarios	Aguas residuales industriales y comerciales
GASES	Azufre	Aguas residuales domésticas, industriales y comerciales
	Sulfuro de hidrógeno	Descomposición de residuos domésticos
	Metano	Descomposición de residuos domésticos
	Oxígeno	Agua de suministro, infiltración de agua superficial
CONSTITUYENTES BIOLÓGICOS	Animales	Cursos de agua y plantas de tratamiento
	Plantas	Cursos de agua y plantas de tratamiento
	Eubacterias	Aguas residuales domésticas, infiltración de agua superficial, plantas de tratamiento
	Arqueobacterias	Aguas residuales domésticas, infiltración de agua superficial, plantas de tratamiento
	Virus	Aguas residuales domésticas

Los microorganismos presentes en las aguas residuales urbanas son principalmente de origen fecal, de los excrementos humanos y animales, así como de origen ambiental que se arrastran por las aguas. Las aguas residuales pueden contener virus, hongos y levaduras, bacterias, algas, protozoos y parásitos así como animales microscópicos (rotíferos, crustáceos, etc.). En la tabla 2.2 se muestran rangos de concentraciones de algunas bacterias frecuentemente detectadas en aguas residuales domésticas brutas. La variabilidad de los intervalos de valores mostrados es característico de aguas residuales urbanas (Metcalf y Eddy, 2002).

Tabla 2.2 Microorganismos habitualmente presentes en aguas residuales domésticas brutas (Metcalf y Eddy 2002)

MICROORGANISMO	CONCENTRACIÓN, Número/ml
Coliformes totales	10^5 - 10^6
Coliformes fecales	10^4 - 10^5
Streptococos fecales	10^3 - 10^4
<i>Enterococcus</i> sp.	10^2 - 10^3
<i>Shigella</i> sp.	Presente
<i>Salmonella</i> sp.	10^0 - 10^2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10^1 - 10^2
<i>Clostridium perfringens</i>	10^1 - 10^3

El agua es un vehículo de transmisión de patógenos que puede provocar enfermedades como consecuencia de la ingesta directa del agua contaminada o de alimentos que han sido regados con agua que contenga estos microorganismos (Marín-Galvín, 2003). Los virus y los parásitos que no tienen capacidad de crecer ni proliferar en el agua (quistes, ooquistes) encuentran necesariamente con rapidez un nuevo hospedador y es más fácil que se extiendan a través del agua por contacto entre personas o por bajas condiciones higiénicas. Por otro lado, los patógenos de origen hídrico que tienen un alto poder infeccioso, porque pueden proliferar en el agua o tienen alta resistencia al decaimiento fuera del cuerpo humano, provocan enfermedades más fácilmente. Se encuentran en este grupo bacterias como *Legionella* spp. y *Vibrio cholerae* o la ameba *Nagleria fowleri* (Lanao, 2012; Rodríguez-Chueca, 2013).

2.1.2.2 La célula bacteriana

Las bacterias son organismos unicelulares con una estructura celular primitiva. Su tamaño es diverso en función de la especie variando desde 0.1-0.2 μm de ancho a 5-10 μm de largo, aunque hay bacterias grandes que alcanzan 0.5 mm de largo (Lanao, 2012). Sus formas también son variadas, lo que permite su identificación y clasificación. Algunas bacterias tienen la capacidad de formar esporos.

La célula es la unidad fundamental de toda materia viva (Madigan et al., 2009). Una célula bacteriana aislada es generalmente capaz de llevar a cabo sus procesos vitales de crecimiento, generación de energía y reproducción independientemente de otras células de la misma o de diferente clase. Las células tienen una envoltura compuesta por la membrana citoplasmática y la pared celular que contiene dentro el citoplasma, como se observa en la figura 2.1.

En una célula procariota, el citoplasma es una compleja mezcla de sustancias y estructuras que llevan a cabo algunas de las funciones básicas de la célula y que se encuentran en el interior de la membrana citoplasmática. Está formado por un 80% de agua y contiene proteínas, azúcares, lípidos, iones inorgánicos y compuestos de bajo peso molecular. Las principales estructuras presentes son los ribosomas y la región nuclear o nucleoide. La región nuclear contiene una única molécula circular y larga de ADN bicatenario. Esta molécula de ADN contiene toda la información necesaria sobre la estructura y las funciones vitales de la célula, por lo que cualquier daño de éste, supone graves consecuencias para la célula (Tortora et al., 2007; Madigan et al., 2009; Picazo y Prieto, 2016). Para resistir la presión de turgencia en el interior de la célula bacteriana necesitan paredes celulares.

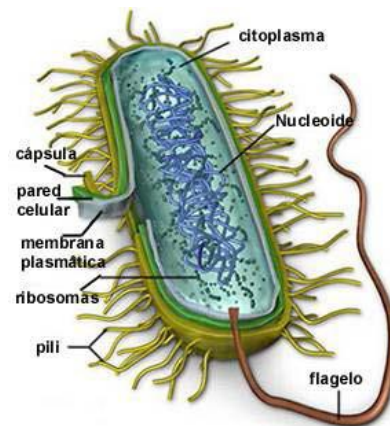


Figura 2.1: Estructura de una célula procariota

Las paredes celulares son estructuras complejas y semirrígidas, responsables de la morfología característica de las células. La pared celular recubre la membrana citoplasmática y sirve de defensa a la célula ante los cambios adversos del medio ambiente. En función de esta pared celular se realiza la primera gran división de las bacterias en Gram positivas y Gram negativas. La capa responsable de la rigidez en las paredes de las bacterias Gram positivas y Gram negativas se denomina peptidoglicano y es muy similar en su composición química tal y como se observa en la figura 2.2.

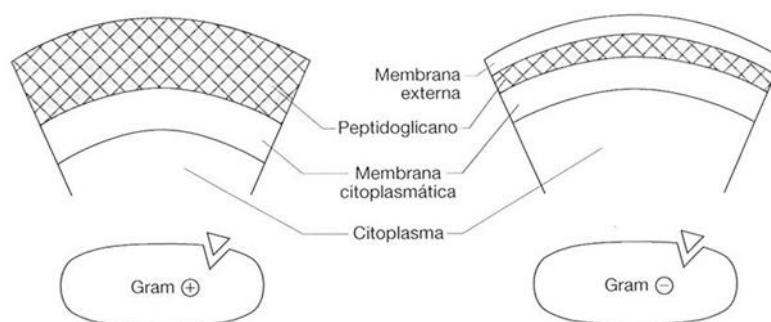


Figura 2.2: Composición estructural de la pared celular de una bacteria Gram positiva y una Gram negativa (Gamazo et al., 2005)

El peptidoglicano está compuesto por dos derivados de azúcares (N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico) y un pequeño grupo de aminoácidos (L-alanina, D-alanina, D-glutámico y lisina o en otros casos ácido diaminopimérico). La mayor parte de los cocos Gram positivos, poseen lisina en lugar de ácido diaminopimérico. La unión entre sí de todos estos componentes genera una estructura llamada tetrapéptido de glicano que se repite a lo largo de la pared. La estructura básica del peptidoglicano está constituida por una fina lámina en la que las cadenas de azúcares se conectan entre sí por puentes formados por aminoácidos. Los enlaces glucosídicos que unen a los azúcares en las cadenas de glicano son muy fuertes, pero estas cadenas por sí solas no son capaces de conferir rigidez en todas direcciones. Por ello sólo cuando se entrecruzan a través de puentes peptídicos se alcanza la rigidez propia de la pared celular. El número de puentes peptídicos que se forman varía en función del tipo de bacteria, obteniéndose paredes más rígidas en aquellas con mayor número de puentes intercatenarios (Madigan et al., 2009).

En las bacterias Gram positivas, el peptidoglicano representa hasta el 90% de la pared celular y pequeñas cantidades de ácidos teicoicos (polisacáridos ácidos) suelen también formar parte de la

misma y son responsables de la carga negativa neta de la superficie que puede servir para el transporte de iones a través de la pared celular. Muchas bacterias, especialmente las Gram positivas, tienen varias capas de peptidoglicano. Por otro lado, en las bacterias Gram negativas el peptidoglicano constituye solo el 10% de la pared celular, estando constituido el resto por una capa compleja y una capa adicional en su pared de lipopolisacárido. Esta capa representa una segunda bicapa lipídica, que consta de fosfolípidos y también de polisacáridos y proteínas. Los lípidos y polisacáridos están estrechamente unidos en la capa externa formando estructuras lipopolisacáridas específicas. En ambos casos se cree que la forma de la bacteria viene determinada por la longitud de las cadenas de peptidoglicano y el número y tipo de puentes intercatenarios que se establecen (Madigan et al., 2009).

Finalmente, la membrana plasmática es una delgada estructura que se extiende por dentro de la pared celular y cuya función es separar el exterior del interior celular. Está formada por fosfolípidos y proteínas. A través de la membrana entran los nutrientes y otras sustancias vitales para la célula y también se permite la salida de materiales de desecho y otros productos celulares. Se consideran selectivamente permeables o semipermeables (Madigan et al., 2009). La estructura general de la mayoría de las membranas citoplasmáticas consta de una bicapa lipídica. Las principales moléculas que las componen, los fosfolípidos, tienen regiones altamente hidrofóbicas como los ácidos grasos y regiones relativamente hidrofílicas como el glicerol.

2.1.2.3 Bacterias indicadoras de contaminación microbiológica

Conocer los microorganismos presentes en el agua y determinar su concentración en la medida de lo posible resulta imprescindible para diagnosticar la calidad del agua y tomar decisiones en relación al control de vertidos, tratamiento de aguas y conservación de ecosistemas (Rodríguez-Chueca, 2013). Sin embargo, existe una dificultad asociada a la gran variedad de microorganismos existentes y a la complejidad de algunos análisis en cuanto a coste y tiempo. Por ello, se establecen los denominados microorganismos indicadores, que permiten una evaluación rápida y fiable que evidencie la presencia de otras especies en las muestras.

Los indicadores más utilizados suelen ser de tipo bacteriano. De este modo, en los casos en los que se detectan los microorganismos indicadores, se afirma que los patógenos también se encuentran en esa muestra y que su comportamiento frente a factores como pH, temperatura, presencia de nutrientes o tratamiento de desinfección es similar (Marín-Galvín, 2003). En el caso de indicadores de contaminación fecal, las principales características que deben poseer son (Lanao, 2012):

- 1) Estar presente de forma exclusiva en las heces humanas y/o de animales homeotermos
- 2) Ser incapaz de reproducirse en el medio en que se analiza
- 3) Tener una capacidad de supervivencia igual o algo superior a la de los patógenos
- 4) Estar presente en un número elevado para facilitar su aislamiento e identificación
- 5) Ser detectable mediante métodos sencillos y económicos.

Al no existir ningún microorganismo que reúna todas las propiedades requeridas, se puede afirmar que no existe ningún indicador ideal, por lo que suele emplearse más de un indicador. En concreto, se ha detectado la presencia de virus, cistos y oocistos de protozoos y esporos bacterianos en muestras de aguas en las que no se detectaron indicadores bacterianos (Gesche et al., 2003; Rodríguez-Chueca, 2013).

Las bacterias indicadoras o parámetros indicadores empleados en este estudio en el control de la calidad microbiológica son los que se relacionan a continuación.

Coliformes totales

El grupo de los coliformes lo constituyen bacterias Gram negativas habituales en la región intestinal de mamíferos y aves. Se caracterizan por su capacidad de fermentación de la lactosa a 35-37 °C. Los géneros que forman parte de este grupo son *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Edwardsiella*. Pueden existir como saprófitos independientes o como microorganismos intestinales. Por tanto, se pueden diferenciar los coliformes totales, que comprenden todos los coliformes de cualquier origen y los coliformes fecales, que designan sólo a los coliformes de origen exclusivamente intestinal, con la capacidad adicional de fermentar la lactosa también a 44.5 °C (Lanao, 2012).

Escherichia coli

Es la especie de coliformes más representativa de las fuentes de contaminación fecal al ser uno de los microorganismos más comunes del tracto intestinal humano y animal (Metcalf y Eddy, 2002). Es anaerobia facultativa y Gram negativa. No forma esporas y fermenta glucosa y lactosa. La mayoría de las cepas de *E. coli* no se consideran patógenas y su determinación indica contaminación reciente. Se emplea habitualmente como indicador porque puede detectarse y cuantificarse por métodos simples tanto en aguas como en fangos (World Health Organization, 2008; Sidhu y Toze, 2009). Sin embargo, algunas limitaciones que presenta como bacteria indicadora de parásitos es que tiene periodos más cortos de supervivencia, algunos orígenes diferentes a las fuentes fecales y, según algunos estudios, la habilidad de reproducirse fuera del hospedador (Guzmán et al., 2007; Sidhu y Toze, 2009; Astals et al., 2012; Mininni et al., 2014).

Enterococcus sp.

Incluye dos grupos de estreptococos fecales que representan de manera más específica la contaminación humana. Genéricamente denominados enterococos intestinales, son bacterias cocáceas Gram positivas y anaerobias facultativas. No forman esporos y son tolerantes al cloruro de sodio y a niveles de pH alcalinos. Tienden a unirse por parejas o forman cadenas cortas. La mayoría de las especies de enterococos no se multiplican en ambientes acuáticos (World Health Organization, 2011).

Se observa que las cantidades de coliformes y estreptococos fecales descargados por los seres humanos son significativamente diferentes de las cantidades descargadas por animales. De esta manera, en base a la relación de concentraciones obtenidas puede determinarse el origen de la contaminación. Por otro lado, los enterococos intestinales tienen tendencia a sobrevivir más tiempo en el medio y presentan una mayor resistencia a la desecación y la cloración que otros microorganismos (Gantzer et al., 2001; Metcalf y Eddy, 2002; Lanao, 2012).

Pseudomonas sp.

Son bacilos rectos o ligeramente curvados Gram negativos y aerobios. Puede encontrarse comúnmente en heces, suelos, aguas superficiales y aguas residuales y su uso como indicador está menos extendido. Algunas especies como *Pseudomonas aeruginosa* son un patógenos oportunistas en humanos y en plantas, puede encontrarse en el agua en ausencia de fuentes de contaminación

fecal inmediatas (Metcalf y Eddy, 2002; Rodríguez-Chueca, 2013) y se considera indicadora de baja calidad del agua y de la presencia de algunos patógenos no fecales (Mohammed et al., 2012).

Staphylococcus aureus

Es un coco inmóvil Gram positivo y anaerobio facultativo. Es una bacteria ampliamente distribuida por el mundo y un patógeno oportunista que frecuentemente se emplea como indicador de contaminación en alimentos. Al igual que algunas especies de *Pseudomonas* suele ser indicador de baja calidad del agua y de la presencia de algunos patógenos no fecales (Mohammed et al., 2012).

Clostridium perfringens

Es una bacteria Gram positiva, persistente, anaerobia y formadora de esporas. Es la especie más habitual en aguas dentro del grupo de bacterias anaerobias sulfito-reductoras. Habita en el tracto intestinal de los seres humanos y animales de sangre caliente en menor cantidad que *E.coli* y sus esporos están difundidos en aguas, suelos y alimentos. Su poder patógeno radica en la posibilidad de elaborar potentes exotoxinas de acción hemolítica, proteolítica y edematizante, en la producción de gas y en su acción necrosante sobre los tejidos. Los esporos sobreviven en el agua grandes periodos de tiempo y son más resistentes que los organismos vegetativos en lo que respecta a la acción de los factores físicos y químicos (Lanao, 2012). El esporo es un elemento de protección frente a radiaciones, desecación, temperatura, altas presiones y la entrada de sustancias químicas. El fenómeno de esporulación bacteriana está codificado a nivel genético y representa una etapa inactiva cuya durabilidad permite a la célula sobrevivir largos periodos de tiempo hasta que de nuevo encuentra un medio idóneo que le permita activarse de nuevo.

La presencia de esta bacteria en muestras se relaciona con contaminación remota o intermitente. Hay autores que recomiendan su determinación como indicadora de contaminación fecal, virus y ooquistes de *Cryptosporidium* (Sahlström, 2003; Sidhu y Toze, 2009; Lanao, 2012; Lloret et al., 2012; Levantesi et al., 2015). Factores como la alta cantidad de proteínas, baja concentración de sales o temperaturas de hasta 50°C favorecen su crecimiento y la producción de toxinas (Sobrados et al., 2010).

Salmonella spp.

Salmonella spp. es una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, Gram negativa, anaerobia facultativa, que no forma esporas, móvil y que produce sulfuro de hidrógeno. Está ampliamente distribuida en aguas, suelos y plantas, siendo el hombre y los animales los principales reservorios. Todas las especies de este género se consideran patógenas para los seres humanos, causando enfermedades gastrointestinales. Su susceptibilidad a la desinfección en ocasiones se considera similar al grupo bacteriano coliforme (Health Canada, 2006).

Recuento de mesófilas totales a 37 °C

Este parámetro se determina para realizar una valoración global de la concentración de microorganismos aerobios y anaerobios que pueden hallarse en una muestra.

2.2 CONTROL DE EFLUENTES PARA SU VERTIDO AL CAUCE RECEPTOR

2.2.1 Normativa

Para garantizar que las aguas residuales urbanas reciben un tratamiento adecuado antes de su vertido, la Directiva 91/271/CEE, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas, establece unas pautas que deben cumplir los Estados Miembros de la Unión Europea. Las obligaciones incluyen que las aglomeraciones urbanas deben disponer de sistemas colectores para la recogida y conducción de las aguas residuales y establece distintos tratamientos a los que deben someterse las aguas antes de su retorno a aguas continentales o marinas. Los procesos se seleccionan teniendo en cuenta las características del emplazamiento donde se produce, siendo más o menos rigurosos en función de si las zonas a las que vierte se consideran Zonas Protegidas. La incorporación al ordenamiento jurídico interno de la Directiva 91/271/CEE supone la puesta en marcha de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs), que en España, previamente a su vertido al cauce receptor, deben tratar los vertidos procedentes de aglomeraciones que representan más de 2000 habitantes equivalentes. En lo referente a la composición de las aguas depuradas, la Directiva establece que las aguas de salida de EDAR que se viertan al cauce receptor deben cumplir límites de vertido para la Demanda Biológica de Oxígeno a 5 días (DBO₅), la Demanda Química de Oxígeno (DQO), sólidos en suspensión totales y en zonas propensas a eutrofización, además nitrógeno y fósforo.

Sin embargo, en relación al control de la calidad de las aguas naturales receptoras de estos vertidos, el Real Decreto 817/2015, por el que se establecen los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental, exige el control de diversos indicadores microbiológicos en las denominadas Zonas Protegidas; esto es, las destinadas a consumo humano (que deberán cumplir con el Real Decreto 140/2003), las de baño (Real Decreto 1341/2007) y cría de moluscos y otros invertebrados (Real Decreto 345/1993). De esta forma, es necesario el control en aguas naturales consideradas Zonas Protegidas de coliformes totales, coliformes fecales, *E.coli*, enterococos y *Salmonella* spp. así como el cumplimiento de las Normas de Calidad Ambiental (NCAs) correspondientes, las cuales no deben superarse con el fin de alcanzar los objetivos en la Directiva Marco del Agua (2000).

2.2.2 Etapas y procesos en la línea de aguas de una EDAR

2.2.2.1 Esquema convencional de una depuradora

Las EDARs se diseñan con el fin de cumplir los requisitos establecidos por la Directiva 91/271/CEE para reducir principalmente la materia orgánica disuelta y los sólidos y en zonas propensas a eutrofización, nitrógeno y fósforo.

Para llevar a cabo el tratamiento, la planta puede disponer de operaciones físicas (desbaste, homogeneización, flotación...), procesos químicos (precipitación química, oxidación...) o procesos biológicos (tratamientos aerobios, tratamiento anaerobios...). A pesar de que la posibilidad en la combinación de estas etapas es muy grande, la mayor parte de las EDARs se diseñan con la estructura básica o convencional que se muestra en la figura 2.3 (Ormad, 2011).

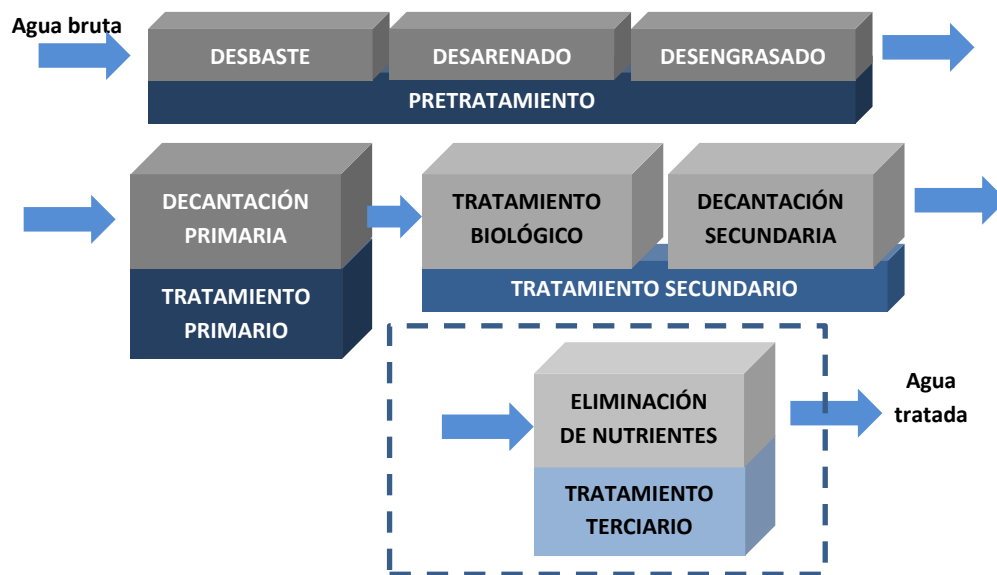


Figura 2.3: Esquema convencional de la línea de aguas de una EDAR (Ormad, 2011)

Tal y como se muestra en la figura 2.3, las primeras etapas incluyen la eliminación de sólidos gruesos en el desbaste, el desarenado y el desengrasado. Posteriormente, se eliminan sólidos en suspensión mediante decantación o precipitación química y a continuación, los sólidos biodegradables disueltos mediante tratamiento biológico. Algunas plantas disponen de sistemas de eliminación de nitrógeno y/o fósforo, sobre todo si el vertido se realiza a zonas sensibles (con propensión a ser eutróficas o con elevada concentración de nitratos).

2.2.2.2 Descripción de etapas y procesos de las plantas objeto de estudio

Las principales etapas y procesos empleados en el tratamiento de aguas residuales se describen a continuación.

Desbaste

Suele ser la primera operación de las plantas de tratamiento de aguas residuales y el principal objetivo es eliminar sólidos gruesos y finos, como pueden ser piedras, papel, trozos de metal, vidrio, palos, trapos, recipientes, materiales de higiene personal, etc.; para ello se emplean rejillas y tamices. Los sólidos separados se depositan en cintas transportadoras y finalmente en contenedores para su posterior traslado al vertedero. El material separado se denomina residuo de desbaste.

Los elementos separadores pueden estar constituidos por barras, alambres o varillas paralelas, telas metálicas o placas perforadas. Los elementos formados por varillas o barras paralelas reciben el nombre de rejillas y tienen aberturas superiores a 15 mm (Metcalf y Eddy, 2002). Su principal función es proteger bombas, válvulas, conducciones y otros elementos contra los posibles daños y obturaciones por la presencia de objetos de gran tamaño. Por otro lado, el término tamiz se asocia al uso de placas perforadas y mallas metálicas, con orificios de tamaño inferior a 15 mm, siendo la eliminación de sólidos finos su principal función.

Desarenado y desengrasado

Tras la salida del desbaste, el agua residual se somete a una eliminación conjunta de arenas y grasas.

La función principal del desarenador es eliminar todo el material sedimentable posible, sin incluir el material orgánico (que se elimina en la siguiente etapa de tratamiento). La mayor parte de este material sedimentable lo constituyen las arenas o cualquier otro material de pequeño tamaño que escape de la etapa de desbaste. La eliminación de las arenas se hace para proteger elementos mecánicos móviles de la abrasión y el excesivo desgaste, además de para evitar la formación de depósitos pesados en el interior de las tuberías, canales y conducciones, reduciendo de este modo la frecuencia de limpieza provocada por la excesiva acumulación de arenas. Existen dos tipos de desarenadores: por gravedad o aireados.

Por otro lado, los desengrasadores tienen como objetivo la eliminación de aceites y grasas procedentes de sectores y actividades como restaurantes, garajes, gasolineras, mataderos, etc. La eliminación de las grasas se realiza para evitar fenómenos de flotación indeseable de fangos en procesos posteriores de decantación de agua, así como para evitar obstrucciones y ensuciamientos que interfieran en la separación de los sólidos. Las grasas se eliminan mediante flotación artificial o forzada (Metcalf y Eddy, 2002).

Las grasas separadas tienen un porcentaje de humedad muy elevado (97-98%) por lo que se suelen trasladar a un espesador de grasas donde se concentran mediante reposo. El agua separada de las grasas regresa a la línea de aguas y las grasas son consideradas como residuo peligroso y gestionadas por un gestor autorizado.

Decantación primaria

En esta fase se separan del agua residual la mayor parte de sólidos sedimentables y de material flotante que no puede ser eliminado en etapas anteriores y se reduce el contenido de sólidos en suspensión del agua. Los tanques de sedimentación primaria pueden ser el principal tratamiento del agua residual o se pueden emplear como paso previo a un tratamiento posterior.

Si la velocidad del agua se reduce a menos de 0.3 m/s, la mayor parte de los sólidos más pesados sedimentan y los más ligeros ascienden hasta la superficie. Los tanques de sedimentación primaria con un correcto dimensionamiento y explotación, alcanzan una eliminación entre el 50 y el 70% de los sólidos en suspensión y entre el 25 y el 40% de la DBO₅ (Metcalf y Eddy, 2002).

Procesos biológicos de película fija: filtros percoladores

El objetivo principal de este tratamiento biológico aerobio es la degradación de la materia orgánica disuelta por acción de los microorganismos presentes. En estos procesos los microorganismos responsables de la conversión de la materia orgánica están fijados a un medio inerte (filtros percoladores) tal y como muestra la figura 2.4. El medio filtrante es un material con un gran área superficial por unidad de volumen y habitualmente suelen ser de plástico. Los microorganismos se adhieren al medio permeable y el agua residual se distribuye continuamente a través del mismo. Por la parte inferior de los tanques sale el agua tratada y los sólidos que se han separado del medio. En el proceso de degradación participan principalmente bacterias, así como hongos, algas, protozoos e incluso gusanos o larvas de insectos.



Figura 2.4: Lecho de filtros percoladores

Los filtros percoladores se clasifican según la carga orgánica o hidráulica aplicada. En algunos casos se emplean sistemas de dos etapas en los que se conectan en serie dos lechos de filtros percoladores.

Para el correcto funcionamiento de un filtro percolador es esencial la presencia de aire que se introduce por ventilación natural y por la acción del viento. Por otro lado, los medios sintéticos actualmente utilizados necesitan un determinado caudal de agua por unidad de área que favorezca el desarrollo de la capa biológica sobre los mismos y en consecuencia habitualmente es necesario recircular parte del caudal de salida para mantener el grado de mojado necesario para cada medio determinado.

Procesos biológicos de cultivo en suspensión

En este tratamiento biológico, los microorganismos responsables de la conversión de la materia orgánica u otros constituyentes del agua residual, se mantienen en suspensión dentro del líquido. Los procesos biológicos pueden llevarse a cabo en condiciones aerobias, anaerobias o anóxicas y en unidades unitarias o combinadas en una o varias etapas.

En el proceso de tratamiento de cultivo en suspensión aerobio o de fangos activados, el afluente se introduce en el reactor donde tienen lugar la conversión de la materia orgánica en presencia de oxígeno. Las bacterias son las responsables de la descomposición de la materia orgánica y de la obtención de energía para la síntesis de células nuevas. Una parte del sustrato se oxida a productos orgánicos estables y el resto se sintetiza en forma de materia celular. Algunas de las bacterias que intervienen en el proceso pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Zooglea*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Bdellovibrio*, *Mycobacterium* y como bacterias nitrificantes las más comunes son *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. Otros microorganismos presentes en el fango activo son protozoos o rotíferos. El ambiente aerobio se obtiene mediante el uso de difusores o aireadores, que a su vez mantienen en el reactor el estado de mezcla perfecta. Así mismo, es importante la adecuada formación del flóculo para su posterior sedimentación (Metcalf y Eddy, 2002).

Siguiendo esquemas de funcionamiento basados en el proceso de fangos activados, se desarrollan procesos biológicos para la eliminación conjunta de nitrógeno y fósforo; tal es el caso del proceso patentado denominado A_2/O y otros basados en éste. Se implementan sistemas con zonas o compartimentos aerobios, anóxicos y anaerobios en serie. En general, en la zona anóxica se produce la desnitrificación. Se trata de una zona que es deficitaria en oxígeno disuelto pero que tiene

disponibilidad de oxígeno químicamente ligado en forma de nitratos o nitritos gracias a la recirculación desde la zona aerobia del líquido mezcla nitrificado. En la fase aerobia tiene lugar la nitrificación y el fósforo es asimilado por la masa celular. En la fase anaerobia no hay oxígeno disponible y tienen lugar reacciones de hidrólisis, acidogénesis y metanogénesis y se libera fósforo. El fósforo se emplea en el mantenimiento celular, síntesis y transporte de energía además de su almacenamiento para uso posterior. Un factor crítico en la eliminación biológica del fósforo es la exposición de los organismos a secuencias alternadas de condiciones aerobias y anaerobias, ya que fuerza a los microorganismos a consumir cantidades de fósforo superiores a los niveles de consumo normales.

Decantación secundaria

El principal objetivo de esta etapa es la separación del agua tratada del fango formado en el proceso biológico. La figura 2.5 muestra un decantador secundario.



Figura 2.5: Decantador secundario

El fango se deposita en el fondo y el agua depurada se evacua por los vertederos para incorporarse, salvo excepciones, al dominio público hidráulico con las garantías de calidad exigidas. En general, los decantadores secundarios son de mayor superficie que los primarios.

Generalmente, los fangos depositados en los tanques de sedimentación que siguen al tratamiento biológico (a excepción de los filtros percoladores) son recirculados al tanque de aireación.

Tratamiento en tanque Imhoff

Considerada una tecnología de bajo coste, consiste en un proceso de eliminación conjunta de sólidos sedimentables y materia orgánica mediante digestión anaerobia, que se emplea como sistema de tratamiento para pequeñas comunidades. La sedimentación se produce en el compartimento superior y la digestión de los sólidos sedimentados en el compartimento inferior. Los sólidos pasan a través de una apertura de la parte inferior de la cámara de sedimentación al compartimento para su digestión sin calentamiento. Los gases producidos durante la digestión escapan a través del sistema de venteo. La propia configuración de la comunicación entre las cámaras impide el paso a la cámara de sedimentación de los gases generados en la digestión y de las partículas de fango que ascienden desde la capa de fango depositada en el fondo debido a la presencia de gases (Metcalf y Eddy, 2002).

Sistemas de lagunaje

Son instalaciones diseñadas y construidas para que se den de forma controlada los procesos autodepuradores que tienen lugar de manera natural en ríos y lagos (Salas et al., 2007a). Pueden emplearse en pequeñas comunidades, con ventajas de costes reducidos de construcción y explotación o también como tratamiento terciario (figura 2.6). En función de la presencia de oxígeno se pueden clasificar como aerobias, facultativas y anaerobias.



Figura 2.6: Laguna aerobia empleada como tratamiento terciario

Las lagunas aerobias son depósitos excavados en el terreno y poca profundidad, entre 0.8 y 1 m, donde el tratamiento se lleva a cabo a través de procesos naturales mediante el uso de algas y bacterias. Se dan las condiciones propicias para la penetración de la radiación solar. El principal objetivo es conseguir un elevado grado de eliminación de organismos patógenos y lograr una reducción de la presencia de microalgas en el efluente final depurado (Salas et al., 2007a).

En las lagunas facultativas, la estabilización de las aguas residuales se lleva a cabo por la combinación de bacterias facultativas, anaerobias y aerobias. Se establecen de forma natural tres franjas. En la zona superficial existen bacterias aerobias y algas, en la zona inferior las condiciones son anaerobias y en ella descomponen los sólidos acumulados por acción de las bacterias anaerobias y en la zona intermedia, que es parcialmente aerobia y anaerobia, la descomposición de la materia orgánica la llevan a cabo las bacterias facultativas. El espesor de estos estratos varía en función del momento del día, las estaciones y el nivel de carga orgánica aplicada a la laguna (Salas et al., 2007a).

Algunos de los factores que influyen en el proceso de lagunaje son la radiación solar, la temperatura, los nutrientes, la evaporación y precipitación y la presencia de sulfatos en el agua. La eliminación de organismos patógenos es especialmente eficaz en lagunas facultativas y lagunas aerobias, donde influyen factores físicos como la temperatura y la sedimentación, físico-químicos como salinidad del agua, pH, concentración de oxígeno e intensidad de luz solar y bioquímicos como la concentración de nutrientes, presencia de compuestos tóxicos y depredadores.

Humedales artificiales

También considerados sistemas de bajo coste, los humedales artificiales combinan procesos físicos, biológicos y químicos como sedimentación, filtración, transferencia de gases, adsorción o descomposición biológica así como procesos propios de sistemas naturales como la fotosíntesis, la

fotooxidación y la asimilación por parte de las plantas. Estos tratamientos deben ir precedidos por alguna operación que elimine los sólidos gruesos. Pueden diseñarse de manera que sean de flujo superficial o flujo sub-superficial. Los humedales artificiales de flujo superficial se asemejan a los sistemas de lagunaje pero operan con menores profundidades de la lámina de agua (inferiores a 0.4 m) y las balsas se encuentran colonizadas por plantas acuáticas emergentes. La vegetación empleada en este tipo de humedales es la misma que coloniza los humedales naturales (Salas et al., 2007b). La eliminación de sólidos suspendidos totales y DQO puede ser superior al 90% y 85% respectivamente en el caso de humedales híbridos. Por otro lado, la eliminación de nutrientes se produce principalmente por procesos de nitrificación-desnitrificación para el nitrógeno y por adsorción o precipitación para el fósforo (Salas et al., 2007b).

Entre las ventajas de este tratamiento están su fácil construcción, operación y mantenimiento, gran estabilidad para fluctuaciones de cargas hidráulicas y orgánicas y baja producción de fango. Los mayores inconvenientes que pueden presentar estos tratamientos son la baja eliminación de nutrientes, las limitaciones de transferencia de oxígeno y la necesidad de terrenos extensos (Metcalf y Eddy, 2002; Ilyas y Masih, 2017)

Filtros intermitentes de arena

Este proceso se utiliza como tratamiento terciario de bajo coste o como sistema de tratamiento para pequeñas comunidades. Se trata de lechos de arena poco profundos provistos de un sistema de distribución superficial y un sistema de drenaje inferior. Muchos filtros intermitentes de arena están enterrados aunque también se emplean filtros abiertos al aire libre (figura 2.7).

En un filtro intermitente, el tratamiento del agua se produce mediante transformaciones físicas, químicas y biológicas. La eliminación de los sólidos suspendidos se lleva a cabo, principalmente, por arrastre mecánico debido a choques aleatorios y por sedimentación. La eliminación de DBO_5 y la nitrificación se producen por la acción de los microorganismos presentes en el lecho de arena bajo condiciones aerobias. La desnitrificación se produce por la acción de bacterias anaerobias que coexisten en los microambientes que se desarrollan dentro del lecho, dando lugar a una importante liberación del nitrógeno. La aplicación intermitente de carga y la ventilación del sistema contribuyen a mantener el filtro bajo condiciones aerobias.



Figura 2.7: Filtro intermitente de arena

2.2.3 Composición de las aguas residuales depuradas y riesgo asociado a su contaminación

Las características de las aguas depuradas dependen fundamentalmente de los aportes industriales al vertido urbano y de los procesos a los que han sido sometidas en la EDAR correspondiente (Rodríguez-Chueca, 2013). A pesar del tratamiento, en estas aguas todavía se pueden identificar diversos contaminantes; en general, estas aguas se caracterizan por la presencia de:

- Materia orgánica, que representan una DBO₅ de hasta 25 mg/l y una DQO de hasta 125 mg/l, límites establecidos por la legislación vigente. Puede diferenciarse la materia orgánica no peligrosa, que está formada mayoritariamente por compuestos que no han sido degradados y que en principio no resultan tóxicos como los ácidos carboxílicos, ésteres, proteínas, hidratos de carbono, aminoácidos, etc. y la materia orgánica peligrosa, sustancias persistentes que no se han eliminado en el tratamiento de depuración y pueden resultar un problema ambiental y sanitario como fármacos, pesticidas o plastificantes, algunos de ellos con características tóxicas, mutagénicas y cancerígenas. Estos últimos compuestos se denominan contaminantes emergentes (Rodríguez-Chueca, 2013).
- Sólidos en suspensión, en concentración de hasta 60 mg/l.
- Turbidez elevada.
- Contaminantes inorgánicos como cloruros, nitrógeno y fósforo y en algunas ocasiones metales pesados no eliminados en el tratamiento y cuya concentración depende de la componente industrial del vertido urbano.
- Gérmenes patógenos de diversa variedad que suponen un factor de riesgo asociado a usos posteriores de las aguas depuradas. En general, muchos de los microorganismos detectados en aguas residuales urbanas pueden encontrarse también en aguas tratadas (apartado 2.1.2.1).

En concreto, se detecta contaminación microbiológica de las aguas de salida de depuradoras asociada a la presencia de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, anaerobias totales, *Clostridium perfringens*, nemátodos y amebas con cierta patogenicidad y capacidad de albergar en su interior organismos patógenos (*Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Legionella pneumophila*) (Mosteo et al., 2013). Por ello, la contaminación microbiológica presente puede permanecer después de los procesos de depuración y aparecer en ecosistemas y en la transmisión de enfermedades al hombre y a animales (Goñi, 2011).

2.3 CONTROL DE FANGOS DE DEPURADORAS URBANAS PARA SU UTILIZACIÓN EN PRÁCTICAS AGRÍCOLAS

2.3.1 Generación y composición de fangos

Tal y como se indica en el Plan Estatal Marco de Gestión de Residuos (PEMAR) 2016-2022, se estima que en España se generan alrededor de 5000000 t/año de fangos y según los datos del Registro Nacional de Lodos, aproximadamente el 80% de los lodos generados en 2012 tuvo como destino final, su utilización agrícola. En concreto, dentro de la Comunidad Foral de Navarra, comunidad autónoma donde se lleva a cabo este trabajo de investigación, la generación de fangos de depuradora ha experimentado un importante aumento en los últimos años, siendo en 2014 de 76454 toneladas (Plan Integrado de Gestión de Residuos de Navarra para 2017-2027). En lo relativo al destino final en esta comunidad, datos de 2014 indican que la aplicación de fangos de EDAR directamente en suelo fue del 41% y el 88% de esos fangos aplicados al suelo lo fueron en suelo agrícola.

El fango generado en las EDARs tiene un contenido en sólidos variable entre el 0.2 y el 12% en peso y está compuesto mayoritariamente por materia orgánica sujeta a procesos de descomposición. La cantidad y calidad del fango varía en función del origen y edad del fango así como del tratamiento y condiciones al que ha sido sometido (pH, temperatura, tiempo de retención, competición microbiológica) (Metcalf y Eddy, 2002; Sahlström et al., 2004; S. R. Smith et al., 2005; Fytli y Zabaniotou, 2008; Rajagopal et al., 2013). Concretamente, el fango primario, procedente de los tanques de decantación primaria, es generalmente gris y grasiento, altamente fermentable y poco estabilizado. En cuanto al fango secundario, si se ha digerido por vía aerobia tiene un color marrón más o menos oscuro y apariencia floculenta y no suele tener olor molesto mientras que el fango digerido por vía anaerobia es de color marrón oscuro-negro y contiene una elevada cantidad de gas.

El fango generado en EDARs se utiliza en agricultura porque representa una importante fuente de nutrientes y materia orgánica para el suelo. En concreto, algunas de las propiedades que se controlan en los fangos para una aportación beneficiosa al suelo son (Sobrados et al., 2010):

- pH: Influye en la asimilación de los nutrientes por parte de las plantas.
- Conductividad eléctrica: Su control es importante para evitar que la raíz no pueda extraer agua o nutrientes debido a la elevada presión osmótica en el medio. La mayoría de los cultivos no presentan problemas en suelos con conductividades entre 100 y 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$.
- Contenido en humedad: Dependiendo del tratamiento aplicado a los fangos, la humedad puede variar e influir en parámetros como la compacidad o la actividad biológica.
- Materia orgánica: Determina las propiedades enriquecedoras. Interesa que los compuestos estén en forma simple como ácidos grasos, aminoácidos, hidrocarburos insaturados o ácidos húmicos que mejoran las propiedades estructurales del suelo aumentando su capacidad para retener agua.
- Nitrógeno: Es un parámetro de gran interés al ser uno de los nutrientes esenciales para el metabolismo del suelo y la nutrición de las plantas. Participa en la multiplicación celular y es determinante en el crecimiento y desarrollo de la planta. El nitrógeno puede aparecer como nitrógeno orgánico, amoniacal o como nitratos. El nitrógeno orgánico es de lenta asimilación por parte del cultivo ya que debe mineralizarse previamente. El nitrógeno amoniacal puede

asimilarse directamente en pequeñas cantidades y es poco móvil. Los nitratos son asimilables inmediatamente aunque suponen un mayor riesgo ambiental, especialmente en acuíferos. Por otro lado, la relación carbono/nitrógeno (C/N) aporta información sobre la calidad del producto fertilizante y esto a su vez puede relacionarse con la cantidad de fango a aplicar para tener unas condiciones óptimas (Bueno et al., 2008).

- Fósforo: Puede estar presente como fósforo orgánico o como sales inorgánicas insolubles del mismo, siendo ambas formas de muy lenta asimilación, o como ortofosfatos, de rápida asimilación. En los fangos sin tratar se encuentra en forma compleja y en los fangos tratados aparece en forma disuelta.
- Potasio: En los fangos se encuentran en forma de cloruros fácilmente asimilables por las plantas.

El contenido en fósforo y sobre todo en potasio de los fangos puede resultar demasiado bajo para satisfacer las demandas específicas de las plantas. El nitrógeno, el fósforo y el potasio son los que determinan la dosificación apropiada del fango en un determinado cultivo. Frente los fertilizantes artificiales que no mejoran la calidad del suelo, el nitrógeno disponible en el fango presenta beneficios económicos y el fango como fuente de fósforo permite no malgastar reservas de fósforo (Vieira y Pazianotto, 2016).

Sin embargo, el fango también puede contener otras sustancias que resultan potencialmente contaminantes como cadmio, cromo, cobre, mercurio, plomo, zinc, microorganismos patógenos o contaminantes orgánicos. La concentración de metales detectada en los mismos depende en la mayoría de los casos del tipo de vertido y su componente industrial; algunos estudios determinan que aproximadamente la mitad de la cantidad de metales pesados en aguas residuales brutas se encuentra precipitada en el fango (Tervahauta et al., 2014; Liu, 2016). El principal problema asociado a la presencia de metales pesados en el suelo radica en que algunos son móviles, asimilables por las plantas y acumulables en sus tejidos dependiendo del pH y el estado de oxidación en que aparecen, pudiendo trasladarse a los sucesivos eslabones de la cadena trófica (Sobrados et al., 2010).

Así mismo, determinados patógenos que pueden estar presentes en los fangos podrían transferirse a los terrenos. Algunos patógenos son muy sensibles a la pérdida de humedad y tienen requerimientos nutricionales específicos, por tanto una vez que se incorpore el fango al suelo cabe esperar una reducción o incluso su eliminación. Sin embargo, en ocasiones los cultivos en contacto con los fangos son capaces de retenerlos y pueden causar problemas relacionados con la salud pública si se ingieren en alimentos de consumos crudo. La supervivencia de los microorganismos en los fangos aplicados al suelo depende principalmente de las condiciones ambientales, el pH, la humedad, el tiempo de retención en los fangos y las características de los organismos presentes (Moynihan et al., 2015). Se han detectado patógenos en fangos de EDAR como *Salmonella*, *Listeria*, *E.coli*, *Campylobacter*, *Mycobacter*, *Clostridia*, *Yersinia* o *Cryptosporidium* (Sahlström, 2003; J. E. Smith et al., 2005; Sidhu y Toze, 2009). Además, los animales pueden jugar un papel importante en los ciclos infecciosos, ya que pueden entrar en contacto con los biosólidos aplicados al suelo, infectarse y transportar después esta infección a otras zonas (Huete, 2007).

2.3.2 Normativa y criterios de calidad

En relación a la normativa aplicable, la Directiva 2008/98/CE, de 19 de noviembre, del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre residuos, señala que los Estados Miembros tienen la obligación de elaborar planes de gestión que deberán ajustarse a los principios generales de la política de residuos, para alcanzar el objetivo principal de integrar el desarrollo económico con la protección del medio ambiente. Dentro de estos principios destacan el principio de prevención, el de jerarquía, el de proximidad y suficiencia y el de responsabilidad del productor. Estas medidas deberán ser claramente identificables y tener como finalidad la consecución de los objetivos propuestos así como el desarrollo y la mejora de actuaciones en materia de prevención (Gobierno de Navarra, 2016).

La Directiva 2008/98/CE, traspuesta al ordenamiento español mediante la Ley 22/2011 de 28 de julio, de Residuos y Suelos contaminados, establece que los planes de gestión deben presentar un análisis actualizado en cuanto a la gestión de los residuos, estableciendo objetivos de prevención, preparación para la reutilización, reciclado, valorización y eliminación y la estimación de la contribución a la consecución de los objetivos globales previstos. Se definen 13 flujos de residuos, siendo uno de ellos los fangos de EDAR. El PEMAR 2016-2022 incluye los contenidos indicados en la Ley 22/2011 para los planes de gestión y para los programas de prevención.

Si el tratamiento final de los lodos de depuradora es la aplicación en los suelos agrícolas, el gestor que realice la aplicación debe, además de cumplir lo establecido en la Ley de Residuos y Suelos contaminados, cumplir lo establecido en el Real Decreto 1310/1990, por el que se regula la utilización de lodos de depuradora en el sector agrario y que transpone la Directiva del consejo de 12 de junio de 1986 relativa a la protección del medio ambiente y, en particular, de los suelos, en la utilización de los lodos de depuradora en agricultura. Asimismo, si los fangos de depuradora se aplican a zonas vulnerables, se debe cumplir de manera complementaria el Real Decreto 817/2015.

En el Real Decreto 1310/1990, se establecen las siguientes definiciones:

- *Lodos de depuración: Lodos residuales salidos de todo tipo de estaciones depuradoras de aguas residuales domésticas, urbanas o de aguas residuales de composición similar a las anteriormente citadas, así como los procedentes de fosas sépticas y de otras instalaciones de depuración similares, utilizadas para el tratamiento de aguas residuales.*
- *Lodos tratados: Lodos de depuración tratados por una vía biológica, química o térmica, mediante almacenamiento a largo plazo o por cualquier otro procedimiento apropiado, de manera que se reduzca de forma significativa su poder de fermentación y los inconvenientes sanitarios de su utilización.*
- *Actividad agraria: La encaminada a la producción de especies vegetales con finalidad alimentaria, para el consumo humano o ganadero, o con otras finalidades no alimentarias.*
- *Utilización: Cualquier sistema de aplicación de los lodos al suelo, tanto en superficie como en su interior, realizada con fines agrarios.*

En el Real Decreto 1310/1990, la definición de “lodos tratados” incluye la estabilización (reducción de materia orgánica biodegradable) e higienización (reducción de concentración de patógenos) del fango. Además, en dicho Real Decreto ya se menciona la problemática relacionada con el almacenamiento y eliminación de lodos procedentes de la depuración de aguas residuales

domésticas o urbanas, dada su elevada producción. Así mismo, se destaca la fuente de sustrato orgánico y nutrientes que puede suponer en su posible uso en actividades agrícolas, permitiendo así la incorporación a los ciclos naturales de materia y de energía. Por otro lado, tal y como también contempla el citado Real Decreto, una de las principales características perjudiciales asociada a los lodos, es la presencia de determinadas especies químicas inorgánicas tóxicas como son los metales pesados, en concentraciones superiores a un cierto umbral; su aplicación de manera sistemática o discontinua, en determinados tipos de suelos, a dosis muy altas o en momentos determinados del ciclo vegetativo de plantas que pudieran ser aprovechadas directamente por animales o por el hombre podría generar un problema grave sanitario y/o ambiental (Bernal y Gondar, 2007). En consecuencia, en el RD 1310/1990 se establecen normas de calidad en relación al contenido de metales pesados, para la utilización de fangos en el sector agrario y mostrados en la tabla 2.3.

Tabla 2.3: Valores límite de concentración establecidos en el RD 1310/1990

	PARÁMETRO	UNIDADES	Suelos con pH<7	Suelos con pH>7
ANEXO IA Valor límite de concentración de metales pesados en los suelos	Cadmio		1	3.0
	Cobre		50	210.0
	Níquel		30	112.0
	Plomo	mg/kg materia seca	50	300.0
	Zinc		150	450.0
	Mercurio		1	1.5
	Cromo		100	150.0
ANEXO IB Valor límite de concentración de metales pesados en los lodos destinados a su utilización agraria	Cadmio		20	40
	Cobre		1000	1750
	Níquel		300	400
	Plomo	mg/kg materia seca	750	1200
	Zinc		2500	4000
	Mercurio		16	25
	Cromo		1000	1500

Sin embargo, el Real Decreto no establece límites en cuanto a parámetros microbiológicos, por lo que la presencia de patógenos podría limitar su aprovechamiento agrícola además de suponer un riesgo para la salud y el medio ambiente (Zaleski et al., 2005; Guzmán et al., 2007; Salsali et al., 2008; Sidhu y Toze, 2009; Lloret et al., 2012; Erkan y Sanin, 2013; Mininni et al., 2014; Pascual-Benito et al., 2014; Levantesi et al., 2015).

En España, conscientes de que la aplicación de fangos de EDAR al suelo puede suponer un riesgo, se publica la Orden AAA/1072/2013 sobre utilización de lodos de depuración en el sector agrario, cuyo objetivo es establecer la información que una EDAR tiene que proporcionar relacionada con el tratamiento aplicado a sus fangos. De esta manera, las instalaciones que tratan los lodos y los gestores que vayan a realizar la aplicación agrícola de los mismos, deben rellenar unos formularios, tal y como establece el Registro Nacional de lodos y donde se incluyen ciertos indicadores microbiológicos, parámetros agronómicos y metales tal y como muestra la tabla 2.4.

Tabla 2.4: Parámetros de control de calidad de fangos según la Orden AAA/1072/2003

PARÁMETRO		UNIDADES
METALES PESADOS	Cadmio/Cobre/Níquel/Plomo/Zinc/Mercurio/Cromo	mg/kg materia seca
	Materia seca	%
	Materia orgánica total	% (sobre materia seca)
	pH	-
	C/N	-
PARÁMETROS AGRONÓMICOS	Nitrógeno total	%N (sobre materia seca)
	Nitrógeno amoniacal	% NH ₄ ⁺ (sobre materia seca)
	Fósforo total	mgP ₂ O ₅ /kg materia seca
	Potasio total	mg K ₂ O/kg materia seca
	Calcio total	Mg CaO /kg materia seca
	Magnesio total	Mg MgO/kg materia seca
	Hierro	Mg FeO/kg materia seca
PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS	<i>Salmonella</i>	Presencia o ausencia/25g
	<i>Escherichia coli</i>	UFC/g

Con el objetivo de reducir los microorganismos patógenos hasta un nivel aceptable para la salud pública (Sobrados et al., 2010) y obtener un fango que se considere higienizado, a nivel mundial se establecen distintas normas, guías o propuestas donde se marcan criterios de calidad relativos a microorganismos indicadores para la aplicación idónea de fangos en suelo. La tabla 2.5 muestra las normas o guías actualmente existentes, que con el fin de establecer unas pautas de actuación y unificar criterios, han propuesto la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (US EPA) y la Unión Europea.

Tabla 2.5: Criterios de calidad relacionados con la reducción de microorganismos en fangos de EDARs para su uso agrícola

REFERENCIA	NORMA O CRITERIO DE CALIDAD			TRATAMIENTO
	INDICADOR MICROBIOLÓGICO	VALOR	UNIDADES	
Documento de trabajo, UE, 2000	<i>E.coli</i>	Reducción 6 log hasta $<5 \cdot 10^2$	UFC/g base húmeda	Tratamiento avanzado
	<i>Salmonella</i> spp.	Ausencia	50 g base húmeda	
	<i>E.coli</i>	Reducción 2log	UFC/g base húmeda	Tratamiento convencional
Propuesta de directiva, UE, 2003	<i>E.coli</i>	$<1 \cdot 10^3$ o reducción 99.99%reducción	UFC/g base seca	Tratamiento avanzado
	Huevos <i>Ascaris</i>	Ausencia	-	
	<i>Clostridium perfringens</i>	$<3 \cdot 10^3$ esporas	1 g base seca	
	<i>Salmonella</i> spp.	Ausencia	50 g base húmeda	
Documento de trabajo UE 2010	<i>E.coli</i>	$<5 \cdot 10^5$	UFC/g base húmeda	No especificado
	<i>Salmonella</i> spp.	Ausencia	25-50 g base húmeda	
US EPA, 2003	Coliformes fecales	$<1 \cdot 10^3$	NMP/g base seca	Procesos para reducir patógenos mayormente(PFRP)
	<i>Salmonella</i> sp.	<3 NMP	4 g base seca	
	Virus entéricos	<1 PFU	4 g base seca	
	Huevos Helminthos viables	<1	4 g base seca	
	Coliformes fecales	$<2 \cdot 10^6$ o reducción de 2log	NMP o CFU/g base seca	

En la actualidad, en la Unión Europea se han publicado varios documentos de trabajo y propuestas, tal y como se muestra en la tabla 2.5, que tendrían por objeto la publicación de una nueva Directiva; en concreto, el documento de trabajo de la Comunidad Europea elaborado en el 2000, introduce el concepto de “tratamiento avanzado” y “tratamiento convencional”, en función de la reducción de microorganismos patógenos que con ellos se consiga y define dos tipos de usos de fango en el suelo: uso agrícola y uso no agrícola. Así mismo, en este documento se incluyen valores límites para determinados microorganismos, estableciendo como microorganismos de control *E.coli* y *Salmonella* spp.. En concreto, define que un fango ha sido higienizado cuando se ha sometido a un “tratamiento avanzado”, siendo aquel capaz de conseguir reducir 6 unidades logarítmicas de *Salmonella senftenberg* W775. Entre los tratamientos considerados como avanzados se encuentran el compostaje en pilas, el compostaje en túnel, el secado térmico, la estabilización termófila aerobia o anaerobia, el tratamiento térmico del fango (relación temperatura y tiempo determinados) y el acondicionamiento con CaO (Lasheras, 2011). Posteriormente en la propuesta de Directiva de 2003, además de lo señalado en el documento de trabajo del año 2000, se recomiendan como parámetros adicionales *Clostridium perfringens* y huevos de *Ascaris*. Por último, el documento de la Unión Europea de 2010 sugiere como límite para la aplicación del fango en agricultura, una concentración de *E.coli* inferior a $5 \cdot 10^5$ UFC por gramo de muestra, en base húmeda y ausencia de *Salmonella* spp. en 25-50 gramos de muestra, en base húmeda (Levantesi et al., 2015).

A nivel de Estados Unidos, la Agencia de Protección Medioambiental (US EPA), publicó en 2003 la norma 503, sobre el control de patógenos y atracción de vectores en lodos de depuradora. En esta norma se define la estabilidad de un fango como el punto en el que el sustrato, para una actividad microbiológica rápida, no se encuentra disponible y considera que el fango está estabilizado cuando cumple una cierta reducción de “atracción de vectores”, definido como “la capacidad de atraer roedores, moscas, mosquitos u otros organismos capaces de transportar agentes infecciosos”. De esta manera, la principal preocupación es evitar que exista riesgo para la población por agentes infecciosos. En el documento se clasifican los fangos como Clase A o Clase B, respecto a su contenido en patógenos, siendo el de Clase A el que presenta las mejores condiciones de higienización. En concreto, los fangos de Clase A se obtienen tras aplicar un proceso que se considera consigue una alta reducción de patógenos (PFRP), dentro de los que se encuentran el compostaje, la digestión aerobia y anaerobia termófila o el secado térmico. Al igual que en Europa, *Salmonella* sp. es uno de los microorganismos de control en estos procesos tal y como se muestra en la tabla 2.5. Por otro lado, en vez de *E.coli*, se establecen límites para coliformes fecales y en los casos más restrictivos se analizan virus entéricos y huevos de helmintos viables. Además, la metodología empleada para el análisis de los parámetros microbiológicos es diferente a la utilizada siguiendo criterios europeos.

Existe una dificultad añadida en la determinación y cuantificación de patógenos en biosólidos y suelos porque además de la heterogeneidad asociada a la matriz, generalmente éstos aparecen en pequeñas cantidades y de manera intermitente. Por ello, la determinación y control de indicadores microbiológicos, que suelen estar en mayor concentración, supone una aproximación consolidada para evaluar la eficiencia de los tratamientos de fangos y la posible presencia de estos patógenos. Sin embargo, algunos autores determinan que es mejor emplear las bacterias indicadoras para monitorizar la eficiencia de un tratamiento en vez de para detectar la ausencia o presencia de un patógeno (Sidhu y Toze, 2009; Pascual-Benito et al., 2014). *E.coli*, y *Clostridium perfringens* se determinan habitualmente (Sahlström, 2003; Huete, 2007; Sidhu y Toze, 2009; Lloret et al., 2012;

Levantesi et al., 2015), aunque la idoneidad del uso de estos parámetros microbiológicos como indicadores del grado de higienización del fango también es objeto de estudio (Higgins et al., 2007; Mininni et al., 2014).

2.3.3 Etapas y procesos de tratamiento de fangos

2.3.3.1 Tecnologías disponibles

Las características del fango imposibilitan que sean utilizados sin una serie de tratamientos previos que principalmente reduzcan el volumen y el poder de fermentación. La reducción de volumen se consigue mediante la concentración de sólidos y se suelen alcanzar concentraciones de sólidos entre 20-25% en el fango tratado. Por otro lado, dada su naturaleza putrescible, los fangos suelen ser parcialmente estabilizados para reducir ese fenómeno y disminuir así los periodos de olor; habitualmente se considera que un fango está estabilizado cuando se alcanzan reducciones de aproximadamente el 40% de materia volátil (Lasheras, 2011; Matesanz, 2011).

En general, los tratamientos de fangos se pueden agrupar en procesos de acondicionamiento, concentración, conversión y deshidratación tal y como muestra la figura 2.8.

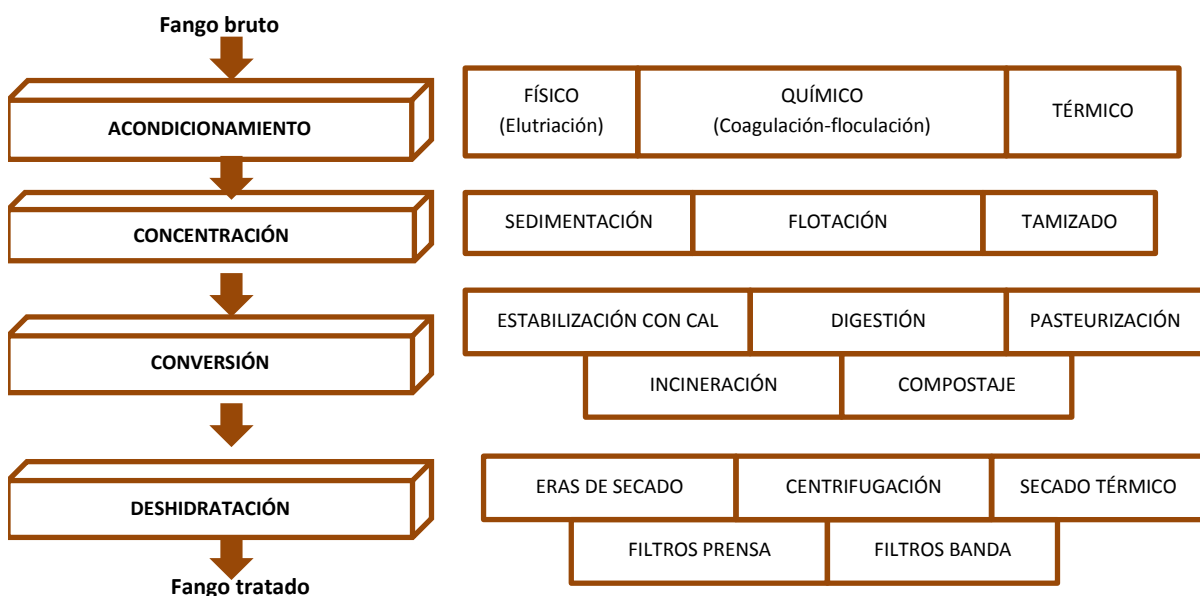


Figura 2.8: Diagrama de tecnologías disponibles para el tratamiento de fangos (Matesanz, 2011)

La utilización de un proceso u otro dependerá de diversos factores como el caudal a tratar, los costes de funcionamiento, las características del vertido, el tipo de tratamiento en la línea de aguas o el destino final de los fangos (Matesanz, 2011).

2.3.3.2 Descripción de etapas y procesos de las plantas objeto de estudio

Espesamiento

Este procedimiento se emplea para aumentar el contenido de sólidos en el fango por eliminación de parte de la fracción líquida del mismo. La figura 2.9 muestra un espesador de fangos.



Figura 2.9: Tanque para el espesamiento de fangos

Digestión anaerobia

Es uno de los procesos más antiguos empleados en la estabilización de fangos, donde se produce la descomposición de materia orgánica e inorgánica en ausencia de oxígeno molecular. Los fangos se introducen en el reactor de forma continua o intermitente y permanecen en su interior durante periodos de tiempo variables. El fango digerido se puede extraer de manera continua o intermitente. En general éste tiene un bajo contenido de materia orgánica y no es putrescible.

La conversión biológica de la materia orgánica se produce en tres etapas. En el primer paso se produce la hidrólisis de los compuestos de alto peso molecular, transformándose en compuestos que puedan servir como fuentes de energía y de carbono celular. En el segundo paso tiene lugar la acidogénesis, que implica la conversión bacteriana de los compuestos producidos en la primera etapa en compuestos intermedios identificables de menor peso molecular. En el tercer paso se produce la metanogénesis, que supone la conversión bacteriana de los compuestos intermedios en productos finales más simples, que son principalmente metano y dióxido de carbono. Existen diferentes grupos de microorganismos dentro del reactor anaerobio y cada uno tiene un cometido. Algunos microorganismos hidrolizan los polímeros orgánicos y los lípidos para formar elementos estructurales básicos como monosacáridos o aminoácidos. Un segundo grupo de bacterias fermenta los productos de la descomposición para producir ácidos orgánicos simples, siendo el ácido acético el de mayor frecuencia en los digestores orgánicos. Este grupo de bacterias son facultativas y anaerobias estrictas entre las que se encuentran *Clostridium* spp., *Peptococcus anaerobus*, *Bifidobacterium* spp., *Desulphovibrio* spp., *Corynebacterium* spp., *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Staphylococcus* o *Escherichia coli*. El tercer grupo de microorganismos convierte el hidrógeno y el ácido acético en gas metano y dióxido de carbono. Los principales géneros identificados incluyen *Methanobacteriu*, *Methanobacillus*, *Methanococcus*, *Methanosarcina* (Sobrados et al., 2010). Con el objetivo de mantener un sistema de tratamiento que estabilice correctamente el residuo orgánico, los microorganismos formadores de ácidos y de metano se deben encontrar en un estado de equilibrio dinámico, que se consigue mediante la ausencia de oxígeno disuelto y de concentraciones inhibitorias de constituyentes tales como metales pesados y sulfuros. Para asegurar el correcto funcionamiento del reactor se controlan parámetros como pH, alcalinidad y concentración de ácidos volátiles.

Si la digestión tiene lugar entre 30-38°C, se considera una Digestión Anaerobia Mesófila y es uno de los tratamientos más comunes en la estabilización de fangos de grandes municipios (S. R. Smith et al., 2005; Huete, 2007; Kelessidis y Stasinakis, 2012; Levantesi et al., 2015). Si la digestión anaerobia se lleva a cabo entre 49-57°C se considera una Digestión Anaerobia Termófila. Algunas de las ventajas que muestra este último tratamiento es el aumento de la tasa de eliminación de materia orgánica, mayor solubilización de la materia orgánica particulada, la reducción de los tiempos de retención necesarios y mayores reducciones microbiológicas asociadas al efecto de pasteurización. Por otro lado, el fango tratado en condiciones termófilas presenta una menor estabilidad del sobrenadante y mayor potencial de producir malos olores (Chen et al., 2008; Astals et al., 2012; Levantesi et al., 2015). La producción de biogás en estos tratamientos suele ser de entre 750-1100 litros de biogás por kg de sólido volátil (SV) eliminado.

Algunos autores encuentran desventajas en los procesos anaerobios relacionados con la complejidad del control del tratamiento (Tomei y Carozza 2015) aunque otros estudios concluyen lo contrario (Huete, 2007; Sobrados et al., 2010). Una desventaja notable frente a los tratamientos aerobios es el lento crecimiento de las bacterias formadoras de metano.

Digestión aerobia termófila autosostenida

La Digestión Aerobia Termófila Autosostenida (ATAD) se puede llevar a cabo sin fuentes externas de calor utilizando el calor desprendido durante la oxidación microbiana de la materia orgánica para el calentamiento del fango. El proceso precisa de un aislamiento adecuado de los reactores. Teóricamente, el fango alimentado debe contener más de un 3% de sólidos para soportar el proceso en condiciones óptimas. Presenta algunas ventajas como el efecto de pasteurización debido a la temperatura y el pH, la alta tasa de estabilización, la conservación del nitrógeno y por ello mayor recuperación del valor del fango como fertilizante y la posibilidad de recuperación del calor en bajos tiempos de retención (García et al., 2007; Piterina et al., 2010; Lloret et al., 2012). Las desventajas están relacionadas con las características menos ventajosas para la deshidratación mecánica del fango digerido. La figura 2.10 muestra un digestor ATAD.



Figura 2.10: Reactor de digestión en régimen aerobio termófilo autosostenido (ATAD)

En el proceso de digestión se generan espumas por la desestabilización del fango relacionado con la rotura de las bacterias presentes a esa temperatura de operación. Las espumas generadas se suelen recircular para aprovechar el oxígeno, las bacterias y el sustrato presente en las mismas.

Deshidratación en centrífuga

Es una operación mecánica para reducir el contenido de humedad del fango. Las centrífugas pueden ser de camisa maciza o de cesta. Habitualmente, el sobrenadante se recircula a cabecera de la planta de tratamiento. La superficie para la instalación y el coste de inversión son menores que para otros sistemas de deshidratación.

Capítulo 3.

Metodología analítica y tratamiento de datos

3.1 PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	3-1
3.2 PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS	3-3
3.2.1 Protocolo general de trabajo en el laboratorio de microbiología	3-3
3.2.2 Preparación de muestras y diluciones seriadas	3-3
3.2.3 Procedimientos de recuento en placa	3-3
3.2.3.1 Consideraciones iniciales	3-3
3.2.3.2 Preparación de placas con los medios de cultivo	3-4
3.2.3.3 Descripción del método de placa difusa y del método del vertido en placa	3-5
3.2.3.4 Descripción del método de filtración en membrana	3-7
3.2.3.5 Recuento de colonias y expresión de los resultados	3-8
3.2.3.6 Repetibilidad y reproducibilidad del recuento y de los análisis en muestras de agua	3-9
3.2.4 Procedimiento del método del Número Más Probable (NMP)	3-11
3.2.4.1 Consideraciones iniciales	3-11
3.2.4.2 Preparación de placas y tubos con los medios de cultivo	3-11
3.2.4.3 Descripción del método de NMP	3-12
3.2.4.4 Recuento de colonias y expresión de los resultados	3-13
3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS	3-15
3.4 EVALUACIÓN DE LA IDONEIDAD DE MÉTODOS DE CONTROL MICROBIOLÓGICO EN FANGOS	3-16
3.4.1 Principales dificultades del análisis en fangos	3-16
3.4.2 Metodología analítica	3-16
3.4.3 Preparación y acondicionamiento de muestras de fango	3-18
3.4.3.1 Muestras estériles fortificadas	3-18
3.4.3.2 Muestras reales	3-19
3.4.4 Resultados e interpretación	3-19

3.1 PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

La caracterización físico-química de las muestras incluye el análisis de los parámetros indicados en la tabla 3.1. Cada determinación se realiza por triplicado.

Tabla 3.1: Parámetros físico –químicos analizados, instrumentación y metodología de referencia

PARÁMETRO	UNIDADES	INSTRUMENTACIÓN	ERROR	MÉTODO (REFERENCIA)
pH	-	Medidor portátil multiparamétrico ORION Star A3295	≤0.02	4500H ⁺ -B (Eaton et al., 2005)
Conductividad	μS/cm	Conductímetro Hanna HI 9033 Multirange Medidor portátil multiparamétrico ORION Star A3295	≤0.5μS/cm	27888:1994 (Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), 1994)
Oxígeno disuelto/ Temperatura	% Saturación/ °C	Medidor portátil ORION Star A3295	±0.01mg/l	Método Winkler, 4500 O-C (Eaton et al., 2005)
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	mg/l	Fotómetro multiparamétrico Hanna	±1	410.4 (EPA, 1993)
Carbono Orgánico Disuelto (COD)	mg/l	Analizador de COT Shimadzu	5-10%	5310B (Eaton et al., 2005)
Turbidez	UNT	Turbidímetro Hanna	≤0.2UNT	7027:2001 (ISO y AENOR, 2001)
Sólidos Totales (ST)	mg/l			
Sólidos en Suspensión (SS)	mg/l	Balanza de laboratorio Estufa	7%	2540 G;D;E (Eaton et al., 2005)
Sólidos volátiles (SV)	mg/l			
Nitratos	mg/l	Fotómetro multiparamétrico Hanna	±0.1mg/l	4500 NO ₃ -E (Eaton et al., 2005)
Nitritos	mg/l	Fotómetro multiparamétrico Hanna	±1mg/l	354.1 (EPA, 1971)
Nitrógeno amoniacal	mg/l	Electrodo selectivo	±0.5mg/l	4500 NH ₃ -C (Eaton et al., 2005)
Nitrógeno orgánico	%	Digestor	-	4500-N _{org} (Eaton et al., 2005)
Alcalinidad bicarbonatos, total y ácidos grasos volátiles	mg/l	pH-metro	0.02	2320 (Eaton et al., 2005)
Fósforo	mg/l	Fotómetro multiparamétrico Hanna	±0.2mg/l	4500-P (Eaton et al., 2005)
Fósforo asimilable	mg/l	-	-	Método Olsen 4500-P (Eaton et al., 2005)
Potasio asimilable	mg/l	Espectrómetro de absorción atómica (llama)	-	3111 (Eaton et al., 2005)
Calcio (Ca) / Hierro (Fe) / Magnesio (Mg) / Cadmio (Cd) / Cobre (Cu) / Níquel(Ni) / Plomo (Pb) / Zinc (Zn) / Mercurio (Hg) / Cromo (Cr)	mg/g	Espectrómetro de emisión atómica (ICP-OES)	-	3120B (Eaton et al., 2005)
Caudal de biogas	l/h	Bronkhorst F-101E -AAD-22-K Iberfluid	0.5%	-
Temperatura	°C	Sensor de temperatura Pt-100	-	-
Potencial de oxidación-reducción	mV	Sonda de medición	-	-

El análisis de nitrógeno, fósforo y potasio se realiza en el laboratorio ANALIZA Control de Calidad S.L. y el análisis de metales se lleva a cabo en el Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza.

3.2 PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS

3.2.1 Protocolo general de trabajo en el laboratorio de microbiología

El trabajo dentro de un laboratorio de microbiología requiere de un orden y una limpieza minuciosa, para poder llevar a cabo los análisis microbiológicos sin riesgo para la salud del personal del laboratorio, ni posibilidad de cometer errores por contaminación de muestras o material de laboratorio. En el anexo I de la presente memoria, se detalla el protocolo de trabajo y buenas prácticas elaborado para trabajar en el laboratorio de microbiología del grupo de investigación “Calidad y Tratamiento de Aguas” de la Universidad de Zaragoza.

3.2.2 Preparación de muestras y diluciones seriadas

Debido a que no se conoce de antemano la concentración microbiológica presente en la muestra a analizar, en aquellos casos que se prevé una concentración elevada, se realizan diluciones en serie de la misma hasta obtener una concentración que pueda determinarse o contabilizarse con fiabilidad. Las diluciones en serie se utilizan para crear disoluciones diluidas con precisión a partir de la muestra inicial. Estas diluciones se realizan con suero fisiológico estéril (NaCl 0,9%). En la figura 3.1 se muestra un esquema con los pasos seguidos para preparar las diluciones.

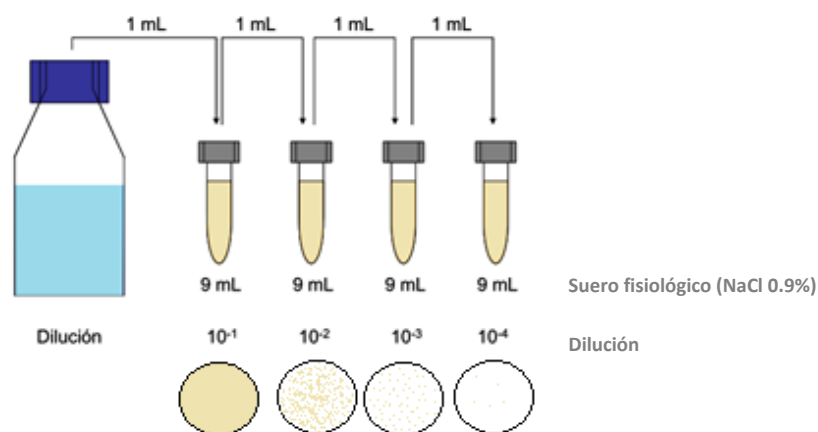


Figura 3.1: Esquema del procedimiento para realizar diluciones seriadas

3.2.3 Procedimientos de recuento en placa

3.2.3.1 Consideraciones iniciales

El recuento o cultivo en placa es un procedimiento de recuento de células viables, que se basa en la suposición de que cada bacteria crece y se divide para producir una sola colonia. Esto no siempre es cierto porque las bacterias pueden crecer con frecuencia unidas en cadena o agrupadas. Con estas consideraciones, los recuentos en placa se expresan como unidades formadoras de colonias (UFC) (Tortora et al., 2007; Lanao, 2012; Rodríguez-Chueca, 2013). El procedimiento de recuento en placa se puede realizar por el método de placa

difusa, el método del vertido en placa o el método de filtración en membrana y se emplea uno u otro en función de la concentración microbiológica de la muestra.

La tabla 3.2 muestra el material fungible y reactivos necesarios para la realización del análisis y la tabla 3.3 muestra los instrumentos empleados.

Tabla 3.2: Material y reactivos para el análisis microbiológico

MATERIAL	MARCA
Placas Petri estériles $\phi=90\text{mm}$ y $\phi=55\text{mm}$	Gosselin [®]
Filtros de membrana estériles	Whatman [®]
Embudos de filtración	Millipore [®]
Asa de Drigalsky (o asa de vidrio)	-
Pinzas estériles	-
Medios de cultivo deshidratados	Scharlau [®]
Suero fisiológico (0.9% NaCl) o agua de peptona	Scharlau [®]
Agua desionizada	-

Tabla 3.3: Instrumentos para llevar a cabo el análisis microbiológico

INSTRUMENTO	MARCA	MODELO	FUNCIÓN
Autoclave	J.P. Selecta [®]	Presoclave III 50	Esterilización
Estufas de cultivo	J.P. Selecta [®]	Incudigit 36L y 72L	Cultivo bacteriológico
Cabina de flujo laminar	Cruma	670 FL	Atmósfera estéril
Vortex agitador	Velp Científica [®]	ZX3	Homogeneización
Rampa de filtración	Millipore [®]	Sistema Microfil	Análisis bacteriológico
Contador de colonias	Interscience	Scan 100	Recuento
Micropipetas	Gilson	Pipetman Classic	Medición volúmenes
Mechero bunsen	-	-	Atmósfera estéril

3.2.3.2 Preparación de placas con los medios de cultivo

La tabla 3.4 muestra los medios de cultivo empleados para cada microorganismo y los métodos estandarizados de análisis utilizados. Todos los medios salvo el agar nutritivo son selectivos a un determinado microorganismos. En el anexo II se muestra la composición de los medios de cultivo empleados.

Los medios de cultivo para los métodos de recuento en placa se encuentran en forma deshidratada. Se adiciona una cantidad determinada de medio por volumen de agua desionizada. La mezcla se lleva a ebullición permitiendo la disolución completa del medio en el agua. A continuación se disponen en botellas aptas para el autoclave los medios que así lo requieran y se autoclavan a 121°C y 1 bar de presión durante 15 minutos (tabla 3.3). Tras el autoclavado, se dejan enfriar hasta una temperatura aproximada de 55°C y se vierten en placas Petri. En algunos casos es necesario añadir un suplemento antes de verter el medio en las placas. Una vez solidificado el agar, las placas se guardan en la nevera hasta su utilización. Las placas preparadas se pueden conservar en nevera entre dos semanas y un mes para los medios selectivos y hasta dos meses para los medios no selectivos.

Tabla 3.4: Normas de análisis y medios de cultivo empleados para la determinación de microorganismos mediante el recuento en placa

PARÁMETRO	MÉTODO ESTÁNDAR	REFERENCIA	MEDIO DE CULTIVO
Coliformes totales	UNE EN ISO 9308-1	(ISO y AENOR, 2014)	Chromogenic Coliform Agar (CCA)
	Standard Methods 9215B 9215C 9215D	(Eaton et al., 2005)	
<i>Escherichia coli</i>	UNE EN ISO 9308-1	(ISO y AENOR, 2014)	Chromogenic Coliform Agar (CCA)
	Standard Methods 9215B 9215C 9215D 9222D	(Eaton et al., 2005)	Agar Glucuronico triptona y bilis (TBX) Acag Maconkey
	UNE EN ISO 16649-1:2013	(ISO y AENOR, 2013)	Agar TBX
	ISO 16649-2:2001	(ISO, 2001)	Agar TBX
<i>Staphylococcus aureus</i>	UNE EN ISO 6888:2000	(ISO y AENOR, 2000)	Agar Mannitol Agar nutritivo +NaCl (20%)
	Standard Methods 9215C	(Eaton et al., 2005)	
<i>Enterococcus sp.</i> (<i>Enterococcus faecium</i>)	UNE EN ISO 7899-2	(ISO y AENOR, 2001)	Agar Slanetz&Bartley
	Standard Methods 9215B 9215C 9215D	(Eaton et al., 2005)	Agar Bilis Esculina Azida (para <i>E.faecium</i>)
<i>Pseudomonas sp.</i>	UNE EN ISO 16266	(ISO y AENOR, 2008)	Agar Cetrimida
	Standard Methods 9215C	(Eaton et al., 2005)	
Recuento de mesófilas totales	Standard Methods 9215B	(Eaton et al., 2005)	Agar nutritivo

3.2.3.3 Descripción del método de placa difusa y del método del vertido en placa

En el método estandarizado SM9215C se utiliza la metodología de placa difusa y en los métodos estandarizados SM9215B e ISO16649-1:2013 se utiliza la metodología del vertido en placa (tabla 3.4) (Eaton et al., 2005; ISO y AENOR, 2013). Las bacterias crecen en la superficie del medio de cultivo en el caso del método de placa difusa y tanto en la superficie como en el interior del agar en el caso del método del vertido en placa.

En las figuras 3.2 y 3.3 se muestran esquemas e imágenes del método de placa difusa y el método del vertido en placa, respectivamente.

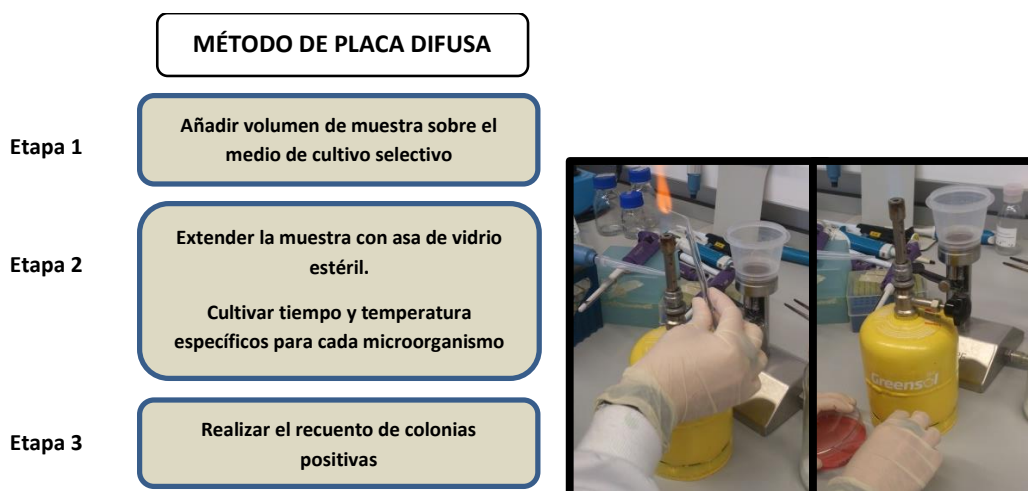


Figura 3.2: Procedimiento e imágenes del análisis mediante el método de placa difusa

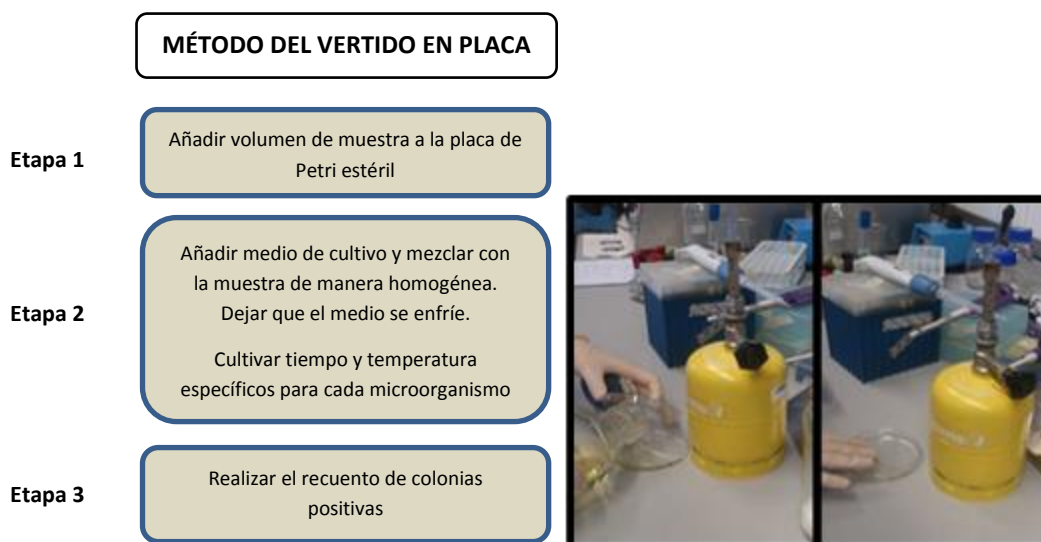


Figura 3.3: Procedimiento e imágenes del análisis mediante el método del vertido en placa

En ambos métodos se procede añadiendo un volumen de muestra inicial o de la muestra diluida (apartado 3.2.2) a las placas en atmósfera estéril proporcionada por un mechero Bunsen. En el método de placa difusa, normalmente se añaden volúmenes de entre 20-200 μl para muestras de agua y entre 20-100 μl para muestras de fangos y suelos. A continuación, la muestra se distribuye mediante un asa de vidrio estéril por la placa que contiene el medio selectivo para la bacteria objeto de estudio. Para finalizar, las placas se introducen en la estufa incubadora el tiempo y temperatura establecidos en el método de análisis estandarizado para la determinación de cada microorganismo y que se muestran en la tabla 3.5.

En el método del vertido en placa, se añade un volumen de muestra de entre 20-1000 μl tanto para muestras de agua como para muestras de fangos o suelos sobre una placa Petri estéril, y a continuación se añade el medio de cultivo, que se encuentra fundido. Se mezclan la muestra y el agar de manera homogénea con movimientos circulares y dejando que el agar

se enfríe y se solidifique. Una vez enfriada la placa se introduce en la estufa incubadora el tiempo y temperatura establecidos (tabla 3.5).

Tabla 3.5: Temperatura y tiempo de incubación de cada medio de cultivo para la determinación de cada microorganismo con los procedimientos de recuento en placa

PARÁMETRO	MEDIO DE CULTIVO	TEMPERATURA/ TIEMPO DE INCUBACIÓN
Coliformes totales	Agar CCA	36±2°C/ 18-24h
<i>Escherichia coli</i>	Agar CCA	36±2°C/ 18-24h
	Agar TBX Ager Macconkey	44±2°C/ 18-24h
<i>Staphylococcus aureus</i>	Agar Mannitol Agar nutritivo +NaCl (20%)	35±2°C/ 24-48h
	Agar Slanetz&Bartley	36±2°C/ 40-48h
<i>Enterococcus sp. y Enterococcus faecium</i>	Agar Bilis Esculina Azida	44±0.5°C/ 2h
	Agar Cetrimida	35±2°C/ 40-48h
<i>Pseudomonas sp.</i>	Agar nutritivo	35±2°C/ 40-48h
Recuento de mesófilas totales	Agar nutritivo	35±2°C/ 40-48h

3.2.3.4 Descripción del método de filtración en membrana

Las normas UNE EN ISO 9308-1:2014, SM9213E, SM9215D, SM9222D, SM9230C, UNE EN ISO 7899 y UNE EN ISO 6888 se basan en el método de filtración en membrana (ISO y AENOR, 2000; ISO y AENOR, 2001; Eaton et al., 2005; ISO y AENOR, 2014) (tabla 3.4). Este método permite gestionar grandes volúmenes de aguas (Eaton et al., 2005; Rodríguez-Chueca, 2013). En muestras de fangos y suelos existe una limitación del método en relación a los sólidos presentes (Astals et al., 2012). En la figura 3.4 se muestra un esquema de los pasos seguidos e imágenes del procedimiento.

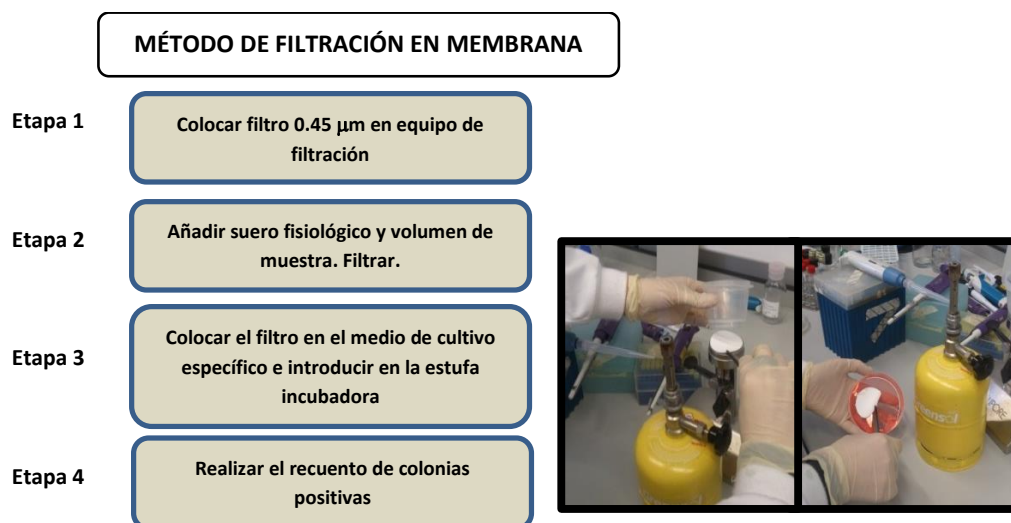


Figura 3.4: Procedimiento e imágenes del análisis mediante el método de filtración en membrana

Consiste en colocar un filtro de 0.45 μm en un equipo de filtración con embudo estéril (tabla 3.2, tabla 3.3). Se hace pasar por el embudo de filtración un pequeño volumen de suero fisiológico para humedecer el filtro y a continuación un volumen determinado de muestra. El filtro se coloca con unas pinzas estériles sobre una placa Petri que contiene el medio de cultivo. Con el objetivo de asegurar que el recuento de colonias en las placas es adecuado (entre 10 y 100 UFC/filtro), se filtran varios volúmenes entre 1-100 mL para muestras de agua y entre 0.1-1 mL para muestras de fangos y suelos. Una vez colocado el filtro, la placa se introduce en la estufa incubadora el tiempo y temperatura requeridos para cada medio de cultivo (tabla 3.5).

3.2.3.5 Recuento de colonias y expresión de los resultados

Tras el periodo de incubación se realiza el recuento de las bacterias que dan una coloración positiva en cada medio. Como ejemplo se muestra la figura 3.5, que corresponde con una imagen de colonias de *Enterococcus* sp. en el medio selectivo correspondiente. A continuación se seleccionan las placas cuyo recuento esté en un rango óptimo de 30-300 UFC/placa. Los resultados de la determinación se expresan como UFC/100ml de muestra, si se analizan muestras de agua, y como UFC/ml (base húmeda) o UFC/g (base seca) cuando las muestras son de fangos o de suelos. Para expresar los resultados en base seca se emplea el parámetro de sólidos totales (ST), que se calcula siguiendo el método de la tabla 3.1. En caso de haber realizado alguna dilución de la muestra inicial se aplica la ecuación 3.1, donde en el caso de muestras de fangos o suelos en vez de 100ml el denominador en 1ml.

Ante el desconocimiento de la concentración bacteriana en la muestra, se siembran y/o filtran varias placas con diferentes volúmenes y diluciones (apartado 3.2.2), por triplicado, con el fin de asegurar un recuento final apropiado.

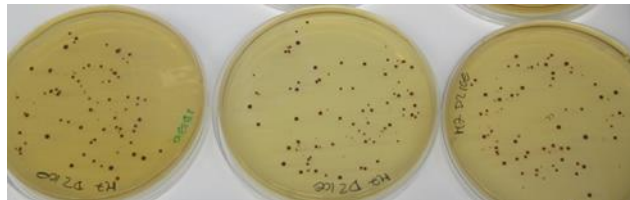


Figura 3.5: Colonias de coloración positiva para el medio Slanetz&Bartley por triplicado

$$\frac{UFC}{100mL} = \frac{UFC}{mL_{muestra\ filtrado}} \cdot 100mL \cdot F_d \quad F_d : \text{Factor de dilución} \quad [\text{Ecuación 3.1}]$$

Por otro lado, la reducción microbiológica se calcula de acuerdo con la ecuación 3.2 y se expresa en unidades logarítmicas.

$$\text{Reducción microbiológica} = \log_{10} \left(\frac{N_t}{N_0} \right) \quad N_t: \text{Recuento tras un periodo } t \quad [\text{Ecuación 3.2}]$$

$N_0 = \text{Recuento inicial}$

3.2.3.6 Repetibilidad y reproducibilidad del recuento y de los análisis en muestras de agua

Para determinar el grado de concordancia asociado al recuento en placa de cada bacteria y cada procedimiento descrito en los apartados 3.2.3.3 y 3.2.3.4, se calcula el coeficiente de variación (CV) asociado al método analítico de muestras reales. Tal y como muestra la ecuación 3.3, el cálculo del coeficiente de variación (CV) se realiza a partir de un valor promedio de los resultados obtenidos (ecuación 3.4) y la desviación estándar de los mismos (ecuación 3.5), determinando así una media de la dispersión de los datos. Se realizan cálculos empleando los medios de cultivo de la tabla 3.4.

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100 \tag{Ecuación 3.3}$$

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N X_i}{N_r} \cdot 100 \quad N_r = \text{Número de réplicas} \tag{Ecuación 3.4}$$

$X_i = \text{Valor de una réplica}$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{N_r - 1}} \tag{Ecuación 3.5}$$

En concreto, los coeficientes determinados se resumen en la tabla 3.6. y se describen a continuación.

Tabla 3.6: Resumen de los coeficientes determinados

	Número de analistas	Número de análisis
Repetibilidad del recuento	1	1
Reproducibilidad del recuento	2	1
Repetibilidad del análisis	1	>5
Reproducibilidad del análisis	2	>5

Repetibilidad del recuento: Variación en el recuento de una placa por el mismo analista en un periodo inferior a 1h. Se calcula de manera cuantitativa con al menos siete réplicas de la misma muestra. Se seleccionan placas que contengan entre 10 y 300 colonias. El CV se calcula con los valores promedio del recuento inicial y segundo recuento transcurrido un tiempo inferior a 1h.

Reproducibilidad del recuento: Variación en el recuento de la misma placa por diferentes analistas. Se calcula de manera cuantitativa con al menos siete réplicas del recuento de la misma placa. Se seleccionan placas que contengan entre 10 y 300 colonias. El CV se calcula con los valores promedio del conjunto de datos de cada analista.

Repetibilidad del análisis: Variación al realizar el mismo análisis de una muestra sucesivas veces en las mismas condiciones. Se calcula de manera cuantitativa con al menos siete réplicas de la misma muestra. Se seleccionan placas que contengan entre 10 y 300 colonias.

El valor promedio y la desviación se calculan a partir de los resultados de concentración microbiológica de cada réplica expresada en unidades logarítmicas (ecuación 3.1).

Reproducibilidad del análisis: Variación al realizar el mismo análisis sucesivas veces por diferentes analistas. Se calcula de manera cuantitativa con al menos seis réplicas de la misma muestra. Se seleccionan placas que contengan entre 10 y 300 colonias. El CV se calcula con los valores promedio del conjunto de datos de cada analista. Este coeficiente se calcula para los métodos de placa difusa y filtración en membrana.

La tabla 3.7 muestra los coeficientes calculados para cada método y cada bacteria.

Tabla 3.7: Coeficientes de variación para los métodos de análisis y las bacterias objeto de estudio

Método de placa difusa				
	Repetibilidad recuento	Reproducibilidad recuento	Repetibilidad análisis	Reproducibilidad análisis
Coliformes totales	1.28%	2.66%	0.98%	4.58%
<i>Escherichia coli</i> (CCA)	0.00%	0.00%	7.83%	0.04%
<i>Escherichia coli</i> (Maconkey)	1.69%	2.56%	5.92%	4.17%
<i>Escherichia coli</i> (TBX)	0.14%	0.07%	0.93%	3.58%
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.75%	0.58%	2.00%	3.27%
<i>Enterococcus sp.</i>	1.75%	0.58%	2.00%	1.66%
<i>Pseudomonas sp.</i>	0.27%	3.05%	1.55%	0.29%
Recuento de aerobias mesófilas totales	0.73%	1.92%	2.70%	2.39%
Método de vertido en placa				
	Repetibilidad recuento	Reproducibilidad recuento	Repetibilidad Análisis	Reproducibilidad análisis
Coliformes totales	0.19%	0.19%	1.82%	-
<i>Escherichia coli</i> (CCA)	2.44%	2.44%	8.67%	-
<i>Escherichia coli</i> (Maconkey)	0.08%	2.11%	3.07%	-
<i>Escherichia coli</i> (TBX)	0.38%	0.76%	3.37%	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.27%	4.70%	3.26%	-
<i>Enterococcus sp.</i>	0.51%	2.50%	2.59%	-
Recuento de mesófilas totales	0.41%	3.29%	1.81%	-
Método de filtración en membrana				
	Repetibilidad recuento	Reproducibilidad recuento	Repetibilidad análisis	Reproducibilidad análisis
Coliformes totales	3.91%	4.26%	1.70%	3.20%
<i>Escherichia coli</i> (CCA)	3.23%	0.00%	6.38%	2.56%
<i>Escherichia coli</i> (Maconkey)	8.15%	4.60%	4.19%	3.59%
<i>Escherichia coli</i> (TBX)	1.12%	0.74%	1.19%	3.06%
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.29%	0.96%	1.97%	3.22%
<i>Enterococcus sp.</i>	1.57%	0.42%	1.11%	6.40%
<i>Pseudomonas sp.</i>	4.27%	4.80%	1.14%	2.04%

Por otro lado, se calcula la desviación entre los diferentes métodos empleados para una misma bacteria (ecuación 3.3). Los resultados se muestran en la tabla 3.8.

Tabla 3.8: Coeficientes de variación de los métodos empleados para cada bacteria objeto de estudio

	Método de placa difusa vs. Método de vertido en placa	Método de placa difusa vs. Método de filtración en membrana	Método de vertido en placa vs. Método de filtración en membrana	Método de placa difusa vs. Método de vertido en placa vs. Método de filtración en membrana
Coliformes totales	2.32%	3.68%	1.37%	2.16%
<i>Escherichia coli</i> (CCA)	2.03%	2.96%	0.94%	1.76%
<i>Escherichia coli</i> (Maconkey)	7.21%	0.58%	7.79%	5.14%
<i>Escherichia coli</i> (TBX)	1.52%	4.18%	2.66%	2.43%
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.36%	2.26%	2.10%	2.52%
<i>Enterococcus</i> sp.	2.35%	3.58%	1.39%	1.85%
<i>Pseudomonas</i> sp.	-	4.35%	1.55%	2.40%
Recuento de aerobias mesófilas totales	5.38%	-	-	-

3.2.4 Procedimiento del método del Número Más Probable (NMP)

3.2.4.1 Consideraciones iniciales

Este procedimiento de análisis se utiliza en las normas SM 9221E, SM 9230B, ISO 7251: 2005 e ISO 16649-3:2005. El método del Número Más Probable (NMP) consiste en realizar pruebas bioquímicas en serie para detectar y cuantificar el microorganismo objeto de estudio. Los resultados se expresan como NMP de los organismos presentes. Este número, basado en fórmulas probabilísticas, es una estimación de la densidad media de microorganismos en la muestra (Eaton et al., 2005). Este método es el recomendado por determinadas normativas para el análisis microbiológico aunque resulta menos reproducible y rápido que otros métodos de análisis (Environmental Protection Agency, 2003; Eaton et al., 2005; Lanao, 2012).

El material fungible, reactivos e instrumentos empleados para el análisis se muestran en las tablas 3.2 y 3.3.

3.2.4.2 Preparación de placas y tubos con los medios de cultivo

Para el método del NMP se emplean diferentes medios líquidos, o caldos de cultivo y medios sólidos en función de la norma. Los medios empleados en función del método se muestran en la tabla 3.9. Los caldos de cultivo se adquieren preparados (Scharlau®) y las placas se preparan tal y como se describe en el apartado 3.2.3.2.

Tabla 3.9: Norma de análisis y medios de cultivo empleados para la determinación de microorganismos mediante el método NMP

PARÁMETRO	MÉTODO	REFERENCIA	MEDIO DE CULTIVO
<i>Escherichia coli</i>	Standard Methods 9221 E ISO 7251:2005	(Eaton et al., 2005; ISO y AENOR, 2005)	Caldo lauril tryptona Caldo EC
	UNE EN ISO 16649- 3:2015	(ISO y AENOR, 2015)	Agua tryptona Caldo Indol
<i>Enterococcus sp.</i> y <i>Enterococcus faecium</i>	Standard Methods 9230B	(ISO y AENOR, 2001) (Eaton et al., 2005)	Caldo glutamato Agar TBX
			Caldo Rothe Azida Agar Bilis Esculina Azida

3.2.4.3 Descripción del método de NMP

Para llevar a cabo el procedimiento se dispone de al menos tres diluciones de la muestra (apartado 3.2.2) y entre tres y cinco réplicas de cada dilución.

El procedimiento consta principalmente de una etapa presuntiva (etapa 1) y otra confirmativa (etapa 2).

En figura 3.6 se muestra un esquema del procedimiento llevado a cabo.

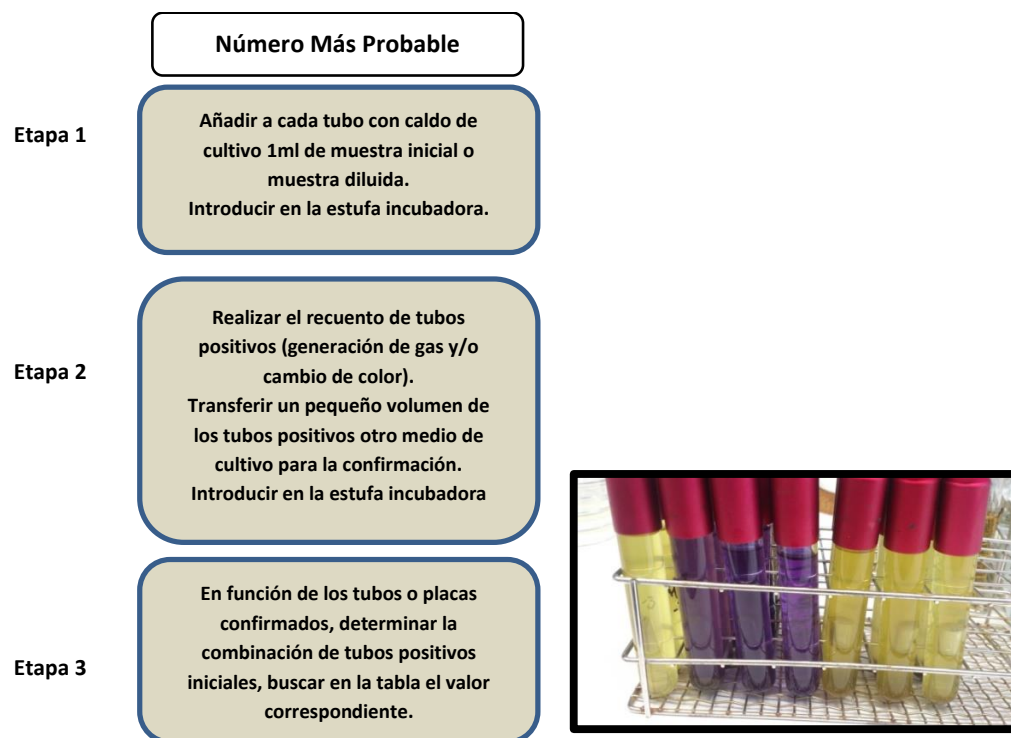


Figura 3.6: Procedimiento e imágenes del análisis mediante la técnica del Número Más Probable

En la etapa 1 se inocula 1 ml de muestra inicial o de una dilución a los tubos que contienen el caldo de cultivo selectivo y se incuban en la estufa. Tras el periodo de incubación, los tubos positivos muestran generación de gas o cambio de color en función del método. La tabla 3.10

muestra los tiempos y temperaturas de incubación para cada medio, así como lo observado en los tubos de los diferentes medios cuando resultan positivos. Los tubos caldo lauril tryptona que son negativos en las primeras 24 horas de incubación, deben mantenerse hasta un máximo de 48 horas en la estufa para su confirmación.

Tabla 3.10: Temperatura y tiempo de incubación en cada medio de cultivo para la determinación de cada microorganismo con el procedimiento del NMP

PARÁMETRO	MEDIO DE CULTIVO	TEMPERATURA/ TIEMPO DE INCUBACIÓN	RESULTADOS POSITIVOS
<i>Escherichia coli</i>	Caldo lauril tryptona	36 ± 2°C/ 18-48h	Generación de gas
	Caldo EC		Generación de gas
	Agua tryptona	44 ± 2°C/ 18-24h	-
	Caldo Indol		Halo rosa
	Caldo glutamato	36 ± 2°C/ 18-24h	Coloración amarilla del caldo
<i>Enterococcus faecium</i>	Agar TBX	44 ± 2°C/ 18-24h	Colonias de coloración verde
	Caldo Rothe Azida	36 ± 2°C/ 40-48h	Turbidez del caldo
	Agar Bilis Esculina Azida	44 ± 0.5°C/ 2h	Colonias con halo negro

A partir de los tubos positivos de la etapa 1, en la etapa 2 se transfiere un pequeño volumen a otros medios de cultivo selectivo. En el caso de los tubos con caldo lauril tryptona de la etapa 1, la confirmación se realiza en caldo EC en primer lugar y a continuación en agua de tryptona y caldo indol. Al igual que con los tubos caldo lauril tryptona, los tubos de caldo EC negativos en las primeras 24 horas, deben incubarse hasta un máximo de 48 horas para su confirmación. Por otro lado, los tubos de caldo glutamato de la etapa 1 se confirman en agar TBX en la etapa 2.

Una vez confirmados o descartados los tubos de la etapa 1, en la etapa 3 se establece una combinación de 3 cifras, una por cada dilución de la muestra disponible, donde cada valor indica el número de tubos positivos.

3.2.4.4 Recuento de colonias y expresión de los resultados

La densidad bacteriana puede estimarse mediante la ecuación 3.6 y la tabla 3.11 usando el número de tubos positivos en las diluciones múltiples. Los valores de la tabla 3.11 se basan en el supuesto de una distribución de Poisson (dispersión aleatoria) donde se establece una combinación de 3 números y cada número de esa combinación indica la cantidad de tubos positivos de cada dilución.

$$NMP/100ml = (NMP/100ml\ tabla) \cdot 10 / v \quad \text{[Ecuación 3.6]}$$

v: volumen de una muestra en la dilución más pequeña

Cuando se analizan muestras de fangos y suelos los resultados se expresan como NMP/ml o NMP/g de muestra en función de si se considera la muestra húmeda o la muestra seca, respectivamente, por lo que el denominador de la ecuación 3.6 es 1 ml. Para expresar los

resultados en base seca se emplea el parámetro de sólidos totales (ST), que se calcula siguiendo el método de la tabla 3.1.

Tabla 3.11: Valores del NMP y límites al 95% de confianza para varias combinaciones de resultados positivos cuando se emplean cinco tubos por dilución (Eaton et al., 2005)

Combinación de tubos positivos			NMP/100mL	Límites de 95% de confianza		Combinación de tubos positivos			NMP/100mL	Límites de 95% de confianza	
				Inferior	Superior					Inferior	Superior
0	0	0	< 1.8	-	6.8	4	0	3	25	9.8	70
0	0	1	1.8	0.090	6.8	4	1	0	17	6.0	40
0	1	0	1.8	0.090	6.9	4	1	1	21	6.8	42
0	1	1	3.6	0.70	10	4	1	2	26	9.8	70
0	2	0	3.7	0.70	10	4	1	3	31	10	70
0	2	1	5.5	1.8	15	4	2	0	22	6.8	50
0	3	0	5.6	1.8	15	4	2	1	26	9.8	70
1	0	0	2.0	0.10	10	4	2	2	32	10	70
1	0	1	4.0	0.70	10	4	2	3	38	14	100
1	0	2	6.0	1.8	15	4	3	0	27	9.9	70
1	1	0	4.0	0.71	12	4	3	1	33	10	70
1	1	1	6.1	1.8	15	4	3	2	39	14	100
1	1	2	8.1	3.4	22	4	4	0	34	14	100
1	2	0	6.1	1.8	15	4	4	1	40	14	100
1	2	1	8.2	3.4	22	4	4	2	47	15	120
1	3	0	8.3	3.4	22	4	5	0	41	14	100
1	3	1	10	3.5	22	4	5	1	48	15	120
1	4	0	10	3.5	22	5	0	0	23	6.8	70
2	0	0	4.5	0.79	15	5	0	1	31	10	70
2	0	1	6.8	1.8	15	5	0	2	43	14	100
2	0	2	9.1	3.4	22	5	0	3	58	22	150
2	1	0	6.8	1.8	17	5	1	0	33	10	100
2	1	1	9.2	3.4	22	5	1	1	46	14	120
2	1	2	12	4.1	26	5	1	2	63	22	150
2	2	0	9.3	3.4	22	5	1	3	84	34	220
2	2	1	12	4.1	26	5	2	0	49	15	150
2	2	2	14	5.9	36	5	2	1	70	22	170
2	3	0	12	4.1	26	5	2	2	94	34	230
2	3	1	14	5.9	36	5	2	3	120	36	250
2	4	0	15	5.9	36	5	2	4	150	58	400
3	0	0	7.8	2.1	22	5	3	0	79	22	220
3	0	1	11	3.5	23	5	3	1	110	34	250
3	0	2	13	5.6	35	5	3	2	140	52	400
3	1	0	11	3.5	26	5	3	3	170	70	400
3	1	1	14	5.6	36	5	3	4	210	70	400
3	1	2	17	6.0	36	5	4	0	130	36	400
3	2	0	14	5.7	36	5	4	1	170	58	400
3	2	1	17	6.8	40	5	4	2	220	70	440
3	2	2	20	6.8	40	5	4	3	280	100	710
3	3	0	17	6.8	40	5	4	4	350	100	710
3	3	1	21	6.8	40	5	4	5	430	150	1100
3	3	2	24	9.8	70	5	5	0	240	70	710
3	4	0	21	6.8	40	5	5	1	350	100	1100
3	4	1	24	9.8	70	5	5	2	540	150	1700
3	5	0	25	9.8	70	5	5	3	920	220	2600
4	0	0	13	4.1	35	5	5	4	1600	400	4600
4	0	1	17	5.9	36	5	5	5	> 1600	700	-
4	0	2	21	6.8	40						

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se emplea el software MiniTab17®. En concreto, se emplea un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, técnica estadística para el estudio del efecto de un factor sobre la media de una variable, que también puede generalizarse para estudiar los posibles efectos de los factores sobre la varianza de la variable. El método consiste en descomponer la variabilidad total observada en unos datos en una serie de términos, asociados a los efectos de cada factor estudiado y a sus posibles interacciones, más una parte residual con la que después se comparan los primeros. En este trabajo de investigación se utiliza el test F de Fisher, donde se calcula F_{ratio} , un cociente entre los Cuadrados Medios del factor y los Cuadrados Medios residuales. Con ello se obtiene un p-valor que es la probabilidad de que el valor F_{ratio} sea “demasiado grande” para ser una F de Fisher ($P(F_{n1,n2} > F_{ratio})$, donde $n1$ y $n2$ son los grados de libertad). Si el p-valor es inferior a 0.05, que es el valor establecido para un nivel de confianza del 95%, se considera que el factor estudiado es significativo (Romero y Zúnica, 2005; Lanao, 2012; Baguer, 2017).

Por otro lado, cuando el test F resulta significativo, para observar de forma sencilla cuáles son las medias que difieren, se establece el intervalo LSD (Least Significance Difference) del test de Fisher. La diferencia entre la media de dos grupos de valores será significativa si la diferencia de los respectivos intervalos LSD no incluye el valor nulo, tal y como se muestra en la figura 3.7 para la diferencia Grupo 1-Grupo 3 (Romero y Zúnica, 2005; Baguer, 2017).

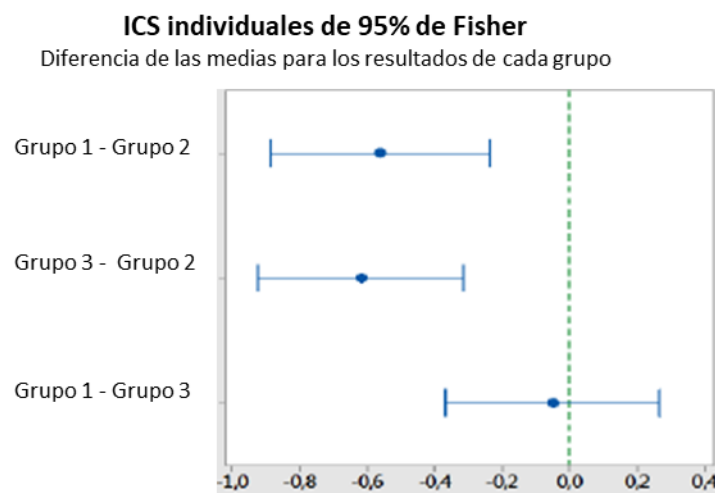


Figura 3.7: Representación del test LSD de Fisher que compara las medias de dos poblaciones

Los resultados de los análisis microbiológicos se expresan en base logarítmica para realizar los cálculos estadísticos y que se aproximen así a una distribución simétrica normal (Lanao, 2012).

3.4 EVALUACIÓN DE LA IDONEIDAD DE MÉTODOS DE CONTROL MICROBIOLÓGICO EN FANGOS

3.4.1 Principales dificultades del análisis en fangos

El fango es una matriz compleja por lo que caracterizarlo mediante diluciones homogéneas en general resulta difícil debido a la falta de técnicas estandarizadas (Guzmán et al., 2007; Sidhu y Toze, 2009; Pascual-Benito et al., 2014). Además, la detección de patógenos en fangos y biosólidos es compleja, costosa y de larga duración debido a la naturaleza de las pruebas analíticas, dificultando la capacidad de determinar con precisión el grado de higienización final (Guzmán et al., 2007). Los métodos estandarizados para la detección y enumeración de indicadores microbiológicos en fangos son limitados, existe una falta de estudios comparables y el debate y establecimiento de una nueva directiva sobre fangos en la Unión Europea no ha avanzado (Mininni et al., 2014). En concreto, la EPA recomienda la utilización del método estandarizado del Número Más Probable para determinar microorganismos en fangos. Sin embargo, en Europa los criterios de calidad recomiendan metodologías basadas en el recuento en placa, donde los resultados se expresan como UFC, unas veces por ml de muestra (base húmeda) y otras por gr de sólido (base seca). Por lo tanto, en matrices como los fangos, donde la composición de sólidos es variable, puede haber una interpretación errónea de los resultados. Se considera de interés la búsqueda de métodos estándar de referencia a nivel mundial que sean sensibles, rápidos, precisos y sencillos que permitan detectar y cuantificar patógenos en biosólidos.

3.4.2 Metodología analítica

En la tabla 3.12 se muestra la relación de metodologías estándar comparadas en este estudio para evaluar la idoneidad del control microbiológico en fangos. En general se trata de métodos normalizados para el análisis de aguas (naturales, potables, residuales) y alimentos, que por su similitud en cuanto a la matriz, parecen los más adecuados para su utilización en fangos. En concreto, se utilizan los procedimientos de recuento en placa (método de placa difusa, método de vertido en placa y método de filtración en membrana) así como el procedimiento del Número Más Probable. Estos métodos se describen en los apartados 3.2.3 y 3.2.4, respectivamente. Se utilizan como indicadores bacterianos las especies *Escherichia coli* y *E.faecium*.

En relación a las condiciones operacionales de cada método empleado, existen diversas ventajas e inconvenientes de cada técnica. La filtración en membrana, presenta como ventaja que conlleva una menor manipulación de la muestra, lo que puede mejorar la reproducibilidad del método. En cambio, el tamaño de diámetro y de poro de los filtros implican un límite de cuantificación inferior a los métodos de vertido en placa y placa difusa. Además, cuando la concentración microbiológica esperada es baja y se manipula la muestra de fango sin diluir, la torta de sólidos que se forma en el filtro conlleva unos tiempos de filtración elevados y existe la posibilidad de que dicha torta dificulte el contacto de los microorganismos con el medio de cultivo, impidiendo por lo tanto su detección (EPA, 2003).

Tabla 3.12: Métodos de referencia para el análisis de *E.coli* y *E.faecium* en diversas matrices

PARÁMETRO	MÉTODO	MATRIZ DE ANÁLISIS	EXPRESIÓN DE RESULTADOS	OBSERVACIONES
<i>Escherichia coli</i>	UNE EN ISO 9308-1 Standard Methods 9215B 9215C 9215D	Aguas destinadas al consumo humano	UFC/ml o UFC/g	-
	Standard Methods 9222 D	Aguas naturales Aguas potables		Metodología recomendada por la EPA para el análisis de fangos
	Standard Methods 9221 E	Aguas naturales Aguas potables Aguas residuales Aguas marinas Fangos y sedimentos	NMP/ml o NMP/g	
	ISO 7251:2005	Leche y productos lácteos		Metodología recomendada por España para el análisis de fangos
	UNE EN ISO 16649-1:2013	Productos consumo humano o alimentos para animales	UFC/ml o UFC/g	-
	ISO 16649-2:2001	Muestras ambientales recogidas en el área de producción y de manipulación de los alimentos	UFC/ml o UFC/g	-
	UNE EN ISO 16649-3:2015		NMP/ml o NMP/g	-
	<i>Enterococcus faecium</i>	UNE EN ISO 7899-2 Standard Methods 9215B 9215C 9215D	Todos los tipos de aguas, especialmente potables y de piscinas	UFC/ml o UFC/g
Standard Methods 9230B		Aguas residuales Alimentos	NMP/ml o NMP/g	-

El método del vertido en placa conlleva, al igual que en la filtración en membrana, una manipulación mínima de la muestra, además de permitir un mayor espacio en la placa para el crecimiento de los microorganismos. Sin embargo, el hecho de tener que añadir el medio de cultivo fundido y aún sin enfriar a la placa sobre la muestra (55°C), puede provocar daños o la muerte de algunos microorganismos presentes por la temperatura. Además, si la concentración microbiológica esperada es baja y se trabaja con la muestra sin diluir, se produce un ensuciamiento del medio debido a la elevada cantidad de sólidos presentes en la muestra y que dificultan el recuento de bacterias.

En relación al método de placa difusa, la principal ventaja respecto a la filtración en membrana es la mayor extensión que se consigue en esas placas, de 90 mm frente a los 45 mm del filtro, lo que permite un mayor recuento de colonias. Sin embargo, cuando la concentración microbiológica esperada es baja y hay que analizar la muestra sin diluir, parte de los sólidos de la muestra quedan adheridos al asa de siembra, lo que repercute en el error del resultado.

Finalmente, en ocasiones, en el método del NMP, la interpretación de los tubos presuntamente positivos puede resultar dificultosa o incluso errónea debido a la turbidez que presentan como consecuencia de adición de la muestra de fango sin diluir, que ensucia

el caldo de cultivo. Además, se observa que la confirmación de *E. faecium* de los tubos presuntamente positivos en las placas de BEA, requiere un mayor tiempo al establecido en la metodología de referencia (2 horas) (tabla 3.5).

A partir de los resultados obtenidos en la determinación de enterococos y *E.coli* en diversas muestras de fangos, aplicando las metodologías incluidas en la tabla 3.12, se realiza un análisis estadístico que permite determinar cuáles de los métodos analíticos estudiados facilitan resultados significativamente similares. Como factor de respuesta se considera la concentración microbiológica. Se utilizan el análisis ANOVA y la representación de los resultados del test LSD F-Fisher tal y como se detalla en apartado 3.3.

3.4.3 Preparación y acondicionamiento de muestras de fango

3.4.3.1 Muestras estériles fortificadas

Se trabaja con muestras estériles fortificadas con *E.faecium*. Las muestras estériles fortificadas son muestras de fango digerido anaerobiamente de las que se eliminan todos los microorganismos presentes mediante el autoclavado de las mismas y posteriormente se añade una concentración conocida de la bacteria objeto de estudio. En concreto, antes de fortificar la muestra se esteriliza en el autoclave a 121°C y 1 atm de presión durante 15 minutos. La fortificación se realiza a partir de un vial con la cepa de *Enterococcus faecium* (American Type Culture Collection, ATCC® 19434™) congelada a -20°C. Se toma un inóculo de la cepa con un asa de siembra y se traspasa a una o varias placas con agar nutritivo. Las placas se introducen en la estufa incubadora el tiempo requerido a la temperatura indicada para este microorganismo (tabla 3.5) y a partir de ese momento se considera que en esas placas hay un cultivo joven y puro, donde las colonias presentan un color crema y son redondas. A partir de las placas se prepara una suspensión bacteriana concentrada transfiriendo las colonias con un asa de siembra a un tubo con suero fisiológico (NaCl 0.9%). En la figura 3.8 se muestran algunas de las etapas del proceso de fortificación.



Figura 3.8: Etapas de la fortificación. a) Cepa de *E.faecium*. b) Placa con un cultivo joven y puro. c) Inoculación en tubo con suero fisiológico

Se realiza la fortificación de las muestras estériles en dos rangos de concentración, uno de ellos aproximadamente con una concentración mayor de 10^4 UFC/ml (4log) y otro con una concentración menor de 10^4 UFC/ml.

La nomenclatura de las muestras y el rango de concentración esperado previamente a su análisis se detallan en la tabla 3.13. En total se dispone de 7 muestras de fango estériles

fortificadas (MEF1-MEF5) que se someten a análisis, siguiendo las diferentes metodologías incluidas en la tabla 3.12.

Tabla 3.13: Nomenclatura de muestras de fango estéril fortificado y rango de concentración estimada de *E.faecium* previamente a su análisis

Nombre muestra	Rango de concentración (log)
MEF1	>4
MEF2	>4
MEF3	>4
MEF4	>4
MEF5	<4

3.4.3.2 Muestras reales

Se dispone de muestras reales de fango que contienen *E.coli*. Las muestras reales de fango proceden de la entrada y la salida de las plantas piloto de digestión anaerobia que se describen en el apartado 5.2.

Se toman muestras en frascos estériles de 500 ml y se conservan refrigeradas hasta su análisis en menos de 12 horas. En la tabla 3.14 se detalla la nomenclatura utilizada para las muestras y el rango de concentración estimada inicialmente.

Tabla 3.14: Nomenclatura de muestras reales de fango y rango de concentración estimada previamente a su análisis

Nombre muestra	Parámetro analizado	Rango de concentración (log)
MR1	<i>Escherichia coli</i>	<4
MR2	<i>Escherichia coli</i>	<4

3.4.4 Resultados e interpretación

Enterococcus faecium

En la tabla 3.15 se muestran los resultados de concentración microbiológica de *E.faecium* (log UFC/ml o NMP/ml) determinada para las muestras estériles fortificadas (MEF1-MEF5).

Tabla 3.15: Resultados del análisis en de *E.faecium* (MEF1-MEF5) en muestras de fango estéril fortificado

Metodología		Unidades	MEF1	MEF2	MEF3	MEF4	MEF5
Recuento en placa	Filtración en membrana	Log UFC/ml	5.0 ± 0.2	4.5 ± 0.2	4.7 ± 0.2	4.3 ± 0.1	3.1 ± 0.2
	Vertido en placa		4.1 ± 0.3	4.8 ± 0.2	4.8 ± 0.1	4.6 ± 0.1	2.9 ± 0.2
	Placa difusa		5.2 ± 0.3	5.1 ± 0.2	5.2 ± 0.1	4.8 ± 0.1	3.3 ± 0.2
Metodología		Unidades	MEF1	MEF2	MEF3	MEF4	MEF5
Número Más Probable		NMP/ml	645 ± 167	99 ± 7	51 ± 17	645 ± 167	<L.D

Tal y como se observa en la tabla 3.15, los resultados obtenidos mediante el método de NMP presentan una mayor variabilidad entre las diferentes muestras y no son comparables a la concentración determinada con los métodos de recuento en placa.

Por otro lado, al comparar los diferentes métodos de recuento en placa, el método de placa difusa es el que proporciona los resultados más elevados en comparación con los valores obtenidos con las otras metodologías (filtración en membrana y vertido en placa). En las muestras estériles fortificadas, la concentración determinada con cualquiera de los procedimientos analíticos es cercana a los valores esperados.

El tratamiento estadístico de datos se realiza empleando como factor de respuesta la concentración microbiológica obtenida mediante los métodos de recuento en placa de la tabla 3.15.

Los p-valores calculados a partir del análisis estadístico de los resultados de concentración de *E.faecium* en las muestras MEF1-MEF5 mediante las diferentes metodologías se encuentran entre p-valor 0.001-0.05. Por lo tanto, se concluye que el tipo método de los de recuento en placa utilizado para el análisis de *Enterococcus* sp. representa un factor significativo con un intervalo de confianza del 95%.

Los intervalos del test LSD F-Fisher obtenidos para las muestras MEF1-MEF5, con las diferentes metodologías se muestran en las figuras 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, y 3.13, respectivamente; se observan diferencias en función de la muestra considerada. Tal y como se muestra en la figura 3.9, el resultado del análisis de *E.faecium* de la muestra MEF1 obtenido mediante el método de vertido en placa es significativamente diferente a los resultados obtenidos con los otros dos métodos de análisis.

Por otro lado, tal y como se observa en las figuras 3.10-3.12, los resultados del análisis de *E.faecium* en las muestras MEF2, MEF3 y MEF4 obtenidos con los diferentes métodos son significativamente diferentes.

Finalmente, tal y como muestra la figura 3.13, los resultados del análisis de *E.faecium* en la muestra MEF5 obtenidos mediante los métodos de placa difusa y vertido en placa son significativamente diferentes.

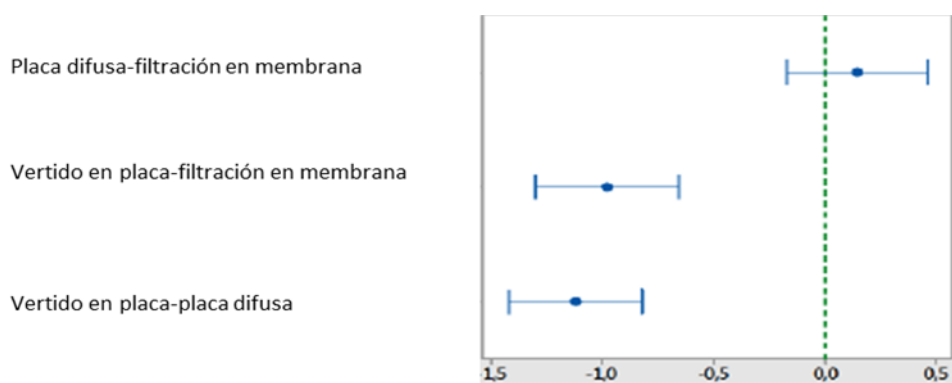


Figura 3.9: Intervalos LSD de los resultados del análisis de *E.faecium* en la muestra MEF1

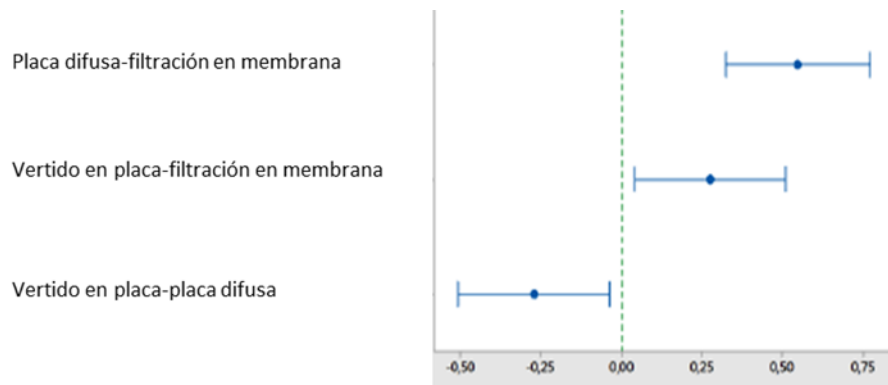


Figura 3.10: Intervalos LSD de los resultados del análisis de *E. faecium* en la muestra MEF2

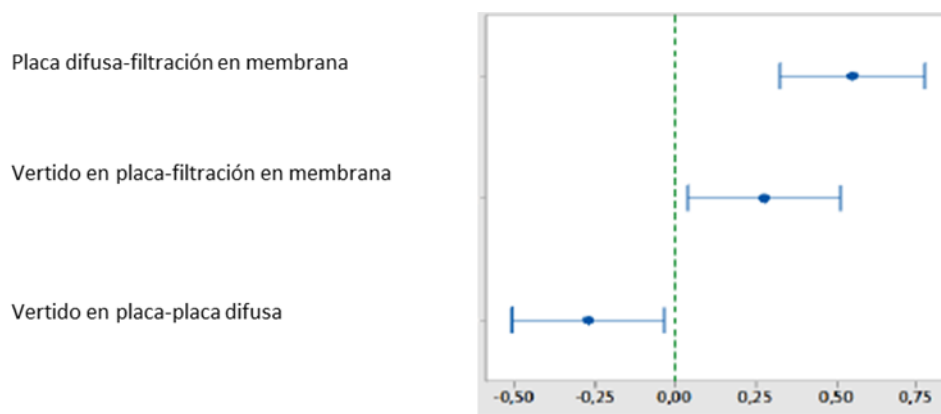


Figura 3.11: Intervalos LSD de los resultados del análisis de *E. faecium* en la muestra MEF3

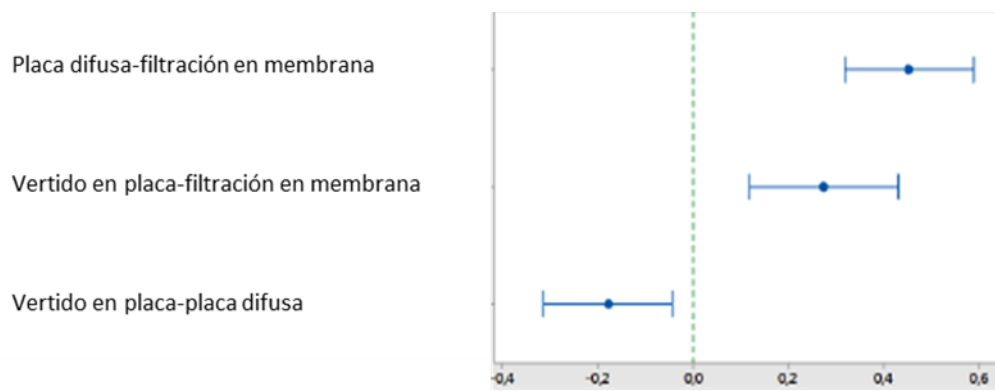


Figura 3.12: Intervalos LSD de los resultados del análisis de *E. faecium* en la muestra MEF4

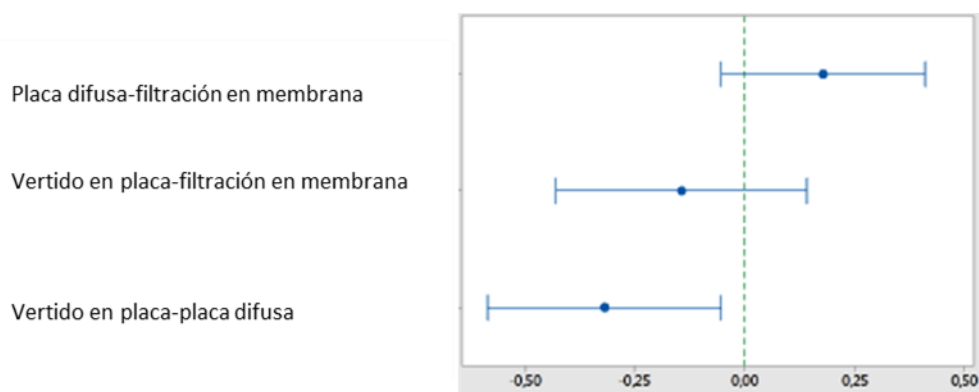


Figura 3.13: Intervalos LSD de los resultados del análisis de *E. faecium* en la muestra MEF5

Por otro lado, se calcula la varianza de los resultados de concentración de cada muestra MEF1-MEF5 obtenidos con cada metodología y se comparan, por pares, para concluir si existen diferencias significativas entre esas varianzas. Los resultados del estudio estadístico de comparación de varianzas de los resultados de concentración de *E. faecium* en todas las muestras para un mismo método, muestran que cuando se utiliza el método de filtración en membrana no hay diferencias significativas en ningún caso (p-valores entre 0.226-0.989). Sin embargo, cuando se comparan las varianzas de los resultados de concentración de *E. faecium* determinados con el método de vertido en placa, sí se obtienen diferencias significativas en algunos casos. Ocurre lo mismo al comparar las varianzas de la concentración microbiológica obtenida en las muestras mediante el método de placa difusa.

Escherichia coli

En la tabla 3.16 se muestran los resultados de concentración microbiológica de *E. coli* (log UFC/ml y NMP/g) determinada en las muestras reales (MR1-MR2).

Tabla 3.16: Resultados del análisis de concentración de *E. coli* (MR1-MR2) en muestras reales de fangos

Metodología		Unidades	Medio de cultivo	MR1	MR2
Recuento en placa	Filtración en membrana	Log UFC/ml	Agar Maconkey	3.0±0.2	2.6±0.1
			Agar TBX	2.9±0.1	2.3±0.2
			Agar CCA	2.9±0.1	2.6±0.1
	Vertido en placa		Agar Maconkey	2.2±0.4	2.5±0.1
			Agar TBX	2.4±0.1	2.6±0.1
			Agar CCA	2.5±0.2	2.4±0.1
	Placa difusa		Agar Maconkey	2.0±0.7	2.7±0.2
			Agar TBX	2.4±0.1	2.6±0.3
			Agar CCA	2.2±0.2	2.3±0.1
Metodología			Medio de cultivo	MR1	MR2
Número Más Probable		NMP/ml	Caldo lauril tryptona		
			Caldo EC	<L.D.	<L.D.
			Agua tryptona		
			Caldo Indol		
			Caldo glutamato Agar TBX	<L.D.	<L.D.

Tal y como se observa en la tabla 3.16, con el método NMP los resultados de concentración de *E.coli* se encuentran por debajo del límite de detección y no son comparables a los resultados obtenidos mediante los métodos de recuento en placa.

Al comparar los resultados obtenidos en el análisis MR1 con los diferentes métodos de recuento en placa, el resultado de concentración más elevado se obtiene mediante el método de filtración en membrana, independientemente del medio de cultivo empleado. Por otro lado, los resultados del análisis de MR2 son muy similares independientemente del método de análisis utilizado.

Para determinar si utilizar un medio de cultivo u otro en el análisis de *E.coli* conlleva obtener resultados de concentración significativamente diferentes, se realiza un tratamiento estadístico de datos empleando como factor de respuesta la concentración microbiológica obtenida mediante las diferentes metodologías de recuento en placa, con los diferentes medios de cultivo (tabla 3.16).

Los p-valores calculados a partir del análisis estadístico de los resultados de concentración de *E.coli* en las muestras MR1 y MR2 con los diferentes medios de cultivo y mediante el método de placa difusa, el método de filtración en membrana y el método de vertido en placa son 0.478, 0.942 y 0.129, respectivamente, mayores de 0.05 en todos los casos. Por lo tanto, se concluye que el medio de cultivo empleado no es un factor significativo con un intervalo de confianza del 95%.

Así mismo, los intervalos del test LSD F-Fisher de los resultados del análisis de *E.coli* en MR1 y MR2 obtenidos mediante los métodos de placa difusa, filtración en membrana y vertido en placa utilizando diferentes medios de cultivo, se muestran en las figuras 3.14, 3.15 y 3.16, respectivamente; se observa que todos los intervalos contienen el valor nulo.

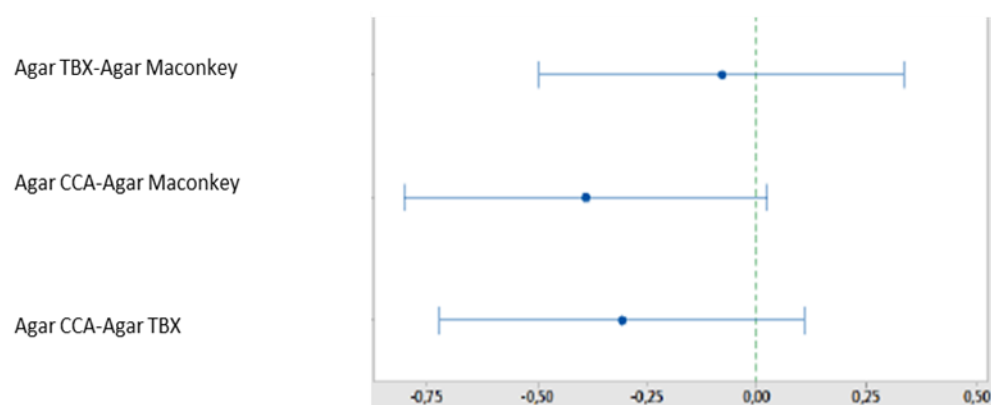


Figura 3.14: Intervalos LSD de los resultados del análisis de *E.coli* mediante el método de placa difusa con diferentes medios de cultivo

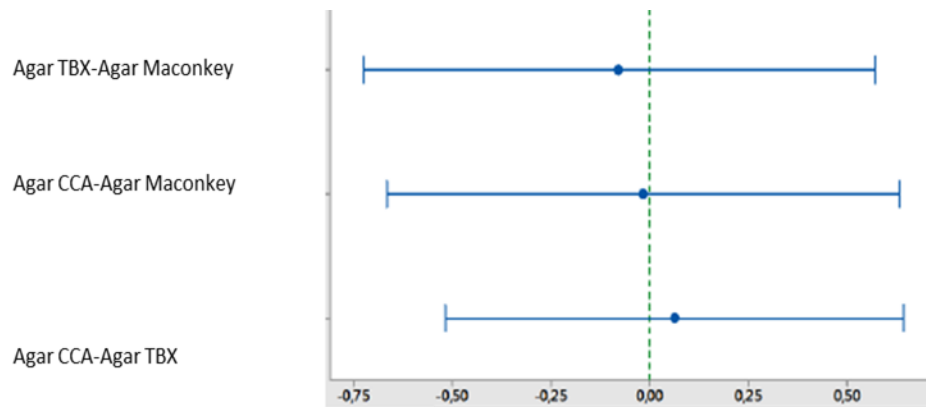


Figura 3.15: Intervalos LSD de los resultados del análisis de *E.coli* mediante el método de filtración en membrana con diferentes medios de cultivo

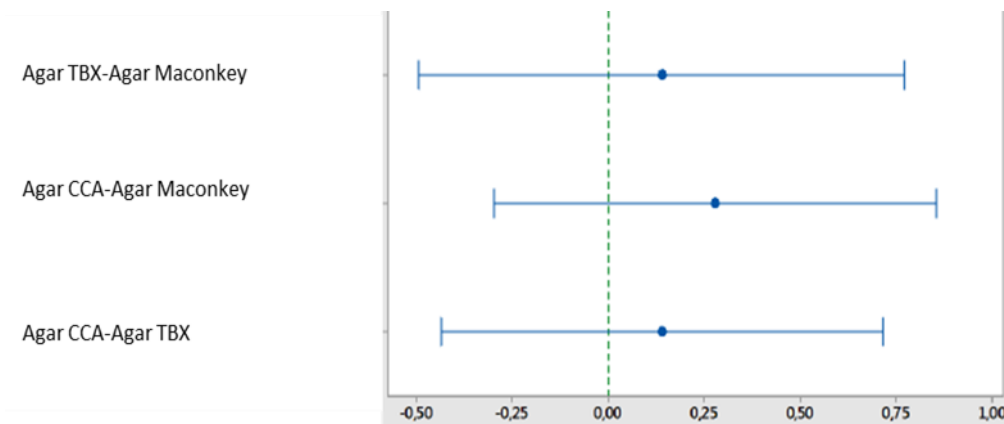


Figura 3.16: Intervalos LSD de los resultados del análisis de *E.coli* mediante el método de vertido en placa con diferentes medios de cultivo

Por otro lado, para determinar si utilizar los diferentes métodos de recuento en placa en el análisis de *E.coli* en las muestras conlleva obtener resultados de concentración significativamente diferentes, se realiza un tratamiento estadístico de datos empleando como factor de respuesta la concentración microbiológica obtenida mediante los diferentes métodos de análisis de la tabla 3.16.

A partir del análisis estadístico de los resultados de concentración de *E.coli* en MR1 mediante las diferentes metodologías se obtiene un p-valor de 0.001. Por lo tanto, el tipo de método de análisis microbiológico de los de recuento en placa empleado representa un factor significativo, con un intervalo de confianza del 95%. Estos resultados concuerdan con estudios que determinan que éstos métodos son en muchos casos no reproducibles debido a la manipulación de la muestra y las características de la matriz (Guzmán et al., 2007).

Los intervalos del test LSD de Fisher para los resultados de concentración de *E.coli* en MR1 comparando las diferentes metodologías se muestran en la figura 3.17.

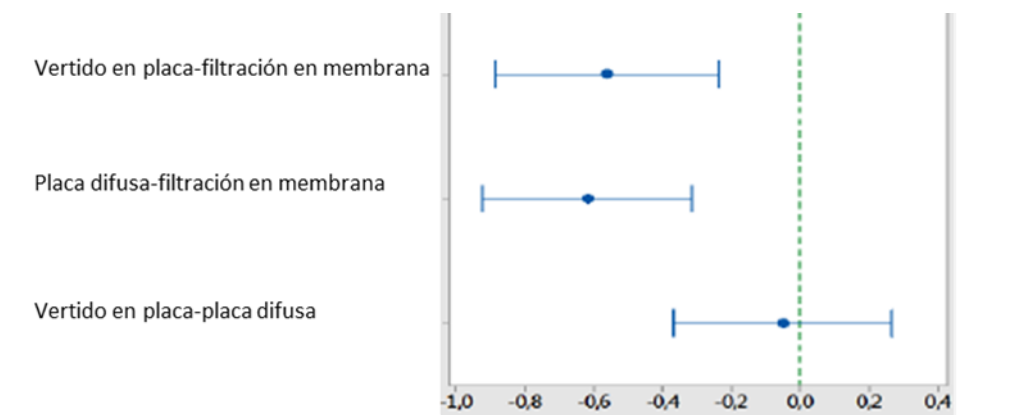


Figura 3.17: Intervalos LSD de los resultados del análisis de *E. coli* en la muestra MR1

Tal y como se observa en la figura 3.17, el resultado de concentración de *E. coli* obtenido mediante el método de filtración en membrana es significativamente diferente a los resultados de concentración determinados con las otras metodologías de análisis de recuento en placa.

Así mismo, se calcula la varianza de los resultados de concentración de cada muestra MR1 y MR2 obtenidas con una misma metodología analítica y se comparan, por pares, para concluir si existen diferencias significativas entre esas varianzas. Los resultados del estudio estadístico de comparación de varianzas determinan que cuando se utilizan los métodos de filtración en membrana y de placa difusa no hay diferencias significativas (p valor 0.731 y p-valor 0.1, respectivamente). Sin embargo, sí existen diferencias significativas con los resultados obtenidos mediante el método de vertido en placa (p valores 0.001). Estas conclusiones concuerdan con las obtenidas a partir de los resultados de *E. faecium* en lo relativo al método de filtración en membrana.

De los resultados obtenidos tras utilizar diferentes metodologías analíticas para determinar *E. faecium* y *E. coli* en fangos, se extraen las siguientes conclusiones y recomendaciones, aplicables a ambas bacterias:

- Se observan diferencias de hasta 3 unidades logarítmicas entre los resultados de concentración microbiológica expresados en UFC/ml y NMP/ml, por lo que los resultados de los análisis realizados mediante los métodos de recuento en placa no son comparables con los obtenidos mediante el método del NMP. Concentraciones bacterianas del orden de 2-3 unidades logarítmicas medidas como UFC/ml, resultan no detectables si se utiliza en método del NMP.
- Como consecuencia de la conclusión anterior, para evaluar la eficacia de un proceso de digestión, se recomienda la utilización de metodologías de recuento en placa, que presentan una mayor sensibilidad ante las bajas concentraciones previsiblemente existentes en el fango tras ser sometido a tratamiento.
- Entre las metodologías de recuento en placa, se observan diferencias significativas entre los resultados obtenidos de cuantificación bacteriana, en función de qué método concreto se utiliza (vertido en placa, placa difusa, filtración en membrana).

- Como consecuencia de la experimentación desarrollada, se aconseja la utilización del método de filtración en membrana, por ser el que presenta una mayor precisión y sensibilidad, tanto en bajas como en altas concentraciones bacteriológicas.
- En general, la presencia de sólidos en gran concentración dificulta el análisis de las muestras mediante metodologías de recuento en placa. Sin embargo, cuando la concentración microbiana es elevada (concentraciones superiores a 4log UFC/ml), se precisa la realización de diluciones seriadas, lo que reduce la concentración de sólidos totales de la muestra a analizar y facilita el análisis desde el punto de vista de homogeneidad y de reproducibilidad. Mayores interferencias se detectan cuando la concentración bacteriana es baja (menor a 4log UFC/ml), ya que los sólidos presentes impiden que los microorganismos entren en contacto con los nutrientes del medio, limitando su crecimiento posterior. Así mismo, la competencia microbiana existente en muestras reales puede dificultar el crecimiento de algunas bacterias en medios selectivos, especialmente si las bacterias se encuentran parcialmente dañadas tras aplicar algún tratamiento al fango.
- En consecuencia, se considera imprescindible establecer criterios de calidad de fangos comunes a nivel internacional, que establezcan no solamente el umbral sino también la metodología específica que debe ser utilizada así como las unidades de concentración en la que deben ser expresados los resultados del control microbiológico.

Capítulo 4.

Estudio del efecto que sobre la calidad microbiológica de efluentes y fangos de depuradora tiene el sistema de tratamiento aplicado en instalaciones a escala real

4.1 SELECCIÓN DE INSTALACIONES OBJETO DE ESTUDIO.....	4-1
4.2 CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA EN LA EDAR 1	4-2
4.2.1 Descripción de la planta de tratamiento, toma de muestras y parámetros de caracterización	4-2
4.2.2 Resultados de caracterización de aguas y fangos a lo largo de la línea de tratamiento	4-5
4.2.3 Estimación del impacto del vertido sobre la calidad microbiológica del cauce receptor.....	4-9
4.3 CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA EN LA EDAR 2	4-11
4.3.1 Descripción de la planta de tratamiento, toma de muestras y parámetros de caracterización	4-11
4.3.2 Resultados de caracterización de aguas y fangos a lo largo de la línea de tratamiento ..	4-15
4.3.3 Estimación del impacto del vertido sobre la calidad microbiológica del cauce receptor....	4-19
4.4 CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA EN LA EDAR 3	4-21
4.4.1 Descripción de la planta de tratamiento, toma de muestras y parámetros de caracterización	4-21
4.4.2 Resultados de caracterización de aguas y fangos a lo largo de la línea de tratamiento ..	4-24
4.4.3 Estimación del impacto del vertido sobre la calidad microbiológica del cauce receptor....	4-28
4.5 CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA EN LA EDAR 4	4-30
4.5.1 Descripción de la planta de tratamiento, toma de muestras y parámetros de caracterización	4-30
4.5.2 Resultados de caracterización de aguas y fangos a lo largo de la línea de tratamiento ..	4-33

4.5.3 Estimación del impacto del vertido sobre la calidad microbiológica del cauce receptor....	4-38
4.6 CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA EN LA EDAR 5	4-40
4.6.1 Descripción de la planta de tratamiento, toma de muestras y parámetros de caracterización	4-40
4.6.2 Resultados de caracterización de aguas y fangos a lo largo de la línea de tratamiento ..	4-44
4.6.3 Estimación del impacto del vertido sobre la calidad microbiológica del cauce receptor....	4-48
4.7 CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA EN LA EDAR 6	4-50
4.7.1 Descripción de la planta de tratamiento, toma de muestras y parámetros de caracterización	4-50
4.7.2 Resultados de caracterización de aguas y fangos a lo largo de la línea de tratamiento ..	4-53
4.7.3 Estimación del impacto del vertido sobre la calidad microbiológica del cauce receptor....	4-54
4.8 ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE PROCESOS E INSTALACIONES Y SU REPERCUSIÓN SOBRE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE AGUAS Y FANGOS	4-56

4.1 SELECCIÓN DE INSTALACIONES OBJETO DE ESTUDIO

El trabajo de investigación se centra en esclarecer con precisión la evolución de gérmenes patógenos en cada una de las etapas de distintos sistemas de depuración. Para ello, Nilsa (Navarra de Infraestructuras Locales, S.A.) sociedad pública adscrita al Gobierno de Navarra y organismo competente en materia de depuración de aguas en la Comunidad Foral, pone a servicio del estudio diversas Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) a escala real para la toma de muestras.

El estudio se desarrolla en un territorio cuyas características fundamentales son: agricultura intensiva con elevadas demandas de agua; núcleos de población cuyas depuradoras urbanas recogen aguas residuales procedentes de industrias agroalimentarias y escorrentías de regadíos; localización en un radio de 80 Km de seis EDARs situadas en pequeños-medianos municipios y con distintos de tratamientos de aguas residuales. En concreto, los tratamientos considerados son: cultivo en suspensión/filtros percoladores, simple/doble etapa en tratamiento secundario, sin/con tratamiento terciario mediante lagunaje/humedal artificial/filtración en arena, sin/con digestión aerobia de fangos.

La composición de las aguas residuales así como las depuradoras seleccionadas son representativas de las existentes en la mayor parte de los municipios pequeños o medianos del territorio español, por lo que aunque el trabajo de investigación se vincula a la Comunidad Foral de Navarra, es de aplicación a otras poblaciones.

4.2 CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA EN LA EDAR 1

4.2.1 Descripción de la planta de tratamiento, toma de muestras y parámetros de caracterización

La EDAR 1 recibe aguas residuales de origen doméstico e industrial asimilables a urbanas, principalmente de la industria vinícola. La población censada es de 7779 habitantes en 2015 y la carga tratada es de aproximadamente 19800 habitantes equivalentes. El caudal industrial es aproximadamente de 7400 m³/año y supone un 60% de la carga orgánica que entra a la EDAR. El cauce receptor del vertido es el río Alhama.

La figura 4.1 muestra el plano esquemático de la planta y una vista real de la misma. En la tabla 4.1 se detallan los datos de diseño de caudal y carga, así como medias anuales de caudal y carga de tratamiento (Nilsa, 2017).



Figura 4.1: Dibujo esquemático de la EDAR 1 y vista real

Tabla 4.1: Caudal y carga de diseño y valores reales medios de tratamiento de la EDAR 1

PARÁMETRO	VALOR
Caudal de diseño (m ³ /d)	1790
Caudal tratado medio (m ³ /d)	1710
Carga de diseño (kg DBO ₅ /d)	915
Carga media tratada (kg DBO ₅ /d)	1700

En la figura 4.2 se detalla el diagrama del tratamiento de depuración así como las dimensiones de algunas de las instalaciones.

Tal y como muestran las figuras 4.1 y 4.2 la depuradora consta de los procesos o etapas que se incluyen a continuación.

Línea de tratamiento de aguas:

- Bombeo de entrada a la planta
- Pretratamiento: Tamiz
- Decantación primaria

- Tratamiento biológico de lecho bacteriano (filtros percoladores) de alta carga
- Decantación secundaria
- Tratamiento biológico de lecho bacteriano (filtros percoladores) de baja carga
- Decantación secundaria

Línea de tratamiento de fangos:

- Espesamiento de fangos

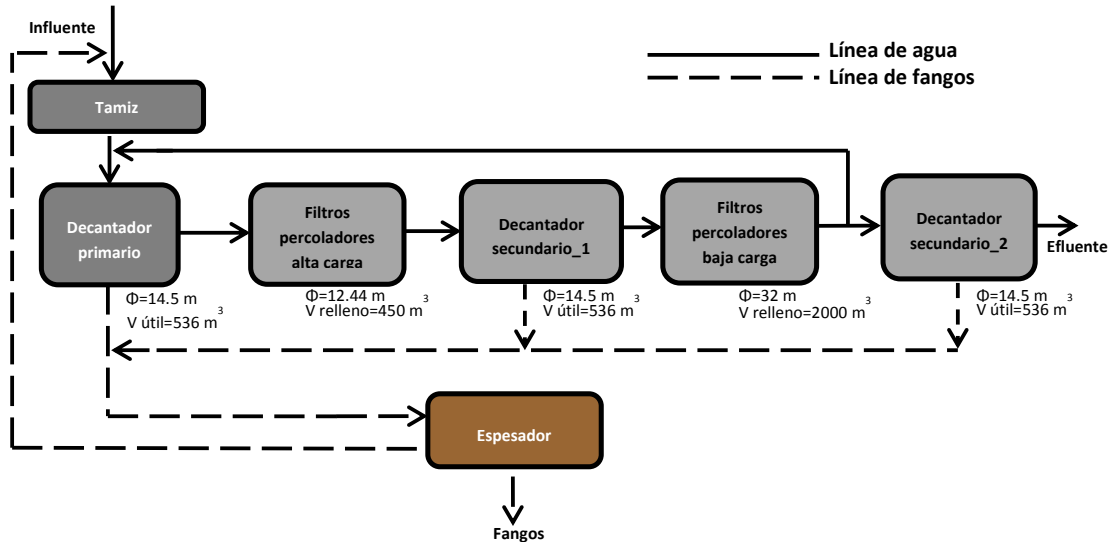


Figura 4.2: Etapas de la EDAR 1

Tal y como muestra la figura 4.2, el sobrenadante del espesador se recircula a cabecera de planta. Por otro lado, parte del agua de salida del filtro percolador de baja carga se recircula a la entrada del decantador primario, a la que se adiciona una pequeña cantidad de coagulante que mejora la decantación a lo largo del proceso y reduce los sólidos presentes en el efluente.

La toma de muestras se realiza en días en los que la planta opera en régimen estacionario, no realizándose aquellos días en los que se detectan incidencias como lluvias intensas, vertidos no controlados, etc. Se realizan 4 campañas de muestreo. En las 3 primeras campañas se toman muestras en puntos a lo largo de la línea de tratamiento de aguas y fangos y en la cuarta campaña se toman muestras en el influente y efluente de la EDAR así como aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la planta. Los días seleccionados y la temperatura promedio de esos días son:

Campaña 1: el 4 de noviembre de 2014 entre las 10:30 y las 11:30h. T° : 12.1°C

Campaña 2: el 26 de mayo de 2015 entre las 11:00 y las 12:00h. T° : 16.5°C

Campaña 3: el 9 de noviembre de 2015 entre las 10:00 y las 11:00h. T° : 16.1°C

Campaña 4: el 18 de mayo de 2016 entre las 10:00 y las 12:00h. T° : 18.3°C

El protocolo para la toma de muestras es el indicado en las norma UNE EN ISO 5667-3:2013 y UNE-EN ISO 5667-13:2011 (ISO y AENOR, 2011; ISO y AENOR, 2013). Se utilizan recipientes

estériles de 150 y 500 ml para el análisis de bacterias y recipientes no estériles para el análisis de parámetros físico-químicos.

Las muestras son líquidas o semisólidas y se transportan refrigeradas hasta su análisis. Se determinan parámetros físico-químicos y parámetros microbiológicos mostrados en las tablas 3.1 y 3.4 respectivamente. En concreto se determina pH, temperatura, oxígeno disuelto, conductividad DQO, COD, SS, ST, turbidez, coliformes totales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Clostridium perfringens* y *Salmonella* spp. Los análisis de bacterias se realizan en un tiempo inferior a 24 horas. Los análisis de *C. perfringens* y *Salmonella* spp. se llevan a cabo en el laboratorio Lacater S.L.

En la figura 4.3 se muestra el esquema de la planta de tratamiento con los puntos de muestreo seleccionados tanto en la línea de aguas como en la de fangos (Mi) y en la figura 4.4 se muestran imágenes de algunos de los puntos de muestreo.

Se analizan 6 muestras de agua (M1-M6 de la figura 4.3) y se estima que se cultivan aproximadamente 270 placas para el recuento de microorganismos, en cada una de las campañas. Por otro lado, se analizan 2 muestras de fangos (M7-M8 de la figura 4.3) y se estima que se cultivan aproximadamente 90 placas para el recuento de microorganismos, en cada una de las campañas.

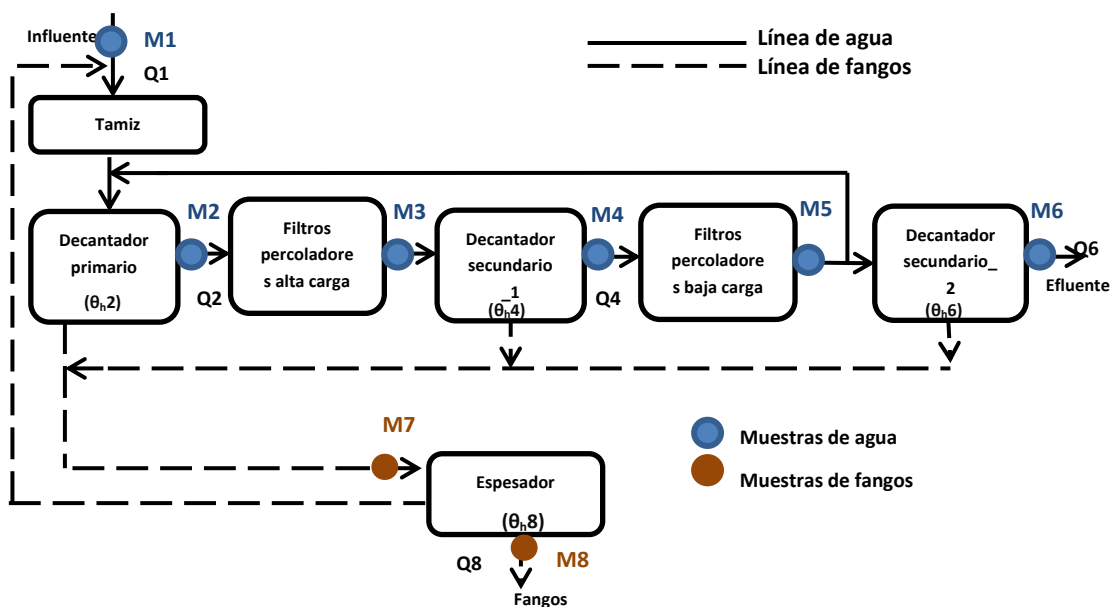


Figura 4.3: Puntos de la toma de muestras (Mi) en las líneas de tratamiento de la EDAR 1
 Q_i : Caudal en el punto i ; $\theta_{h,i}$: tiempo de retención en la instalación i



Figura 4.4: Imágenes de algunos puntos de muestreo. a) Salida filtros percoladores (M5); b) Salida decantador secundario_2 (M6); c) Salida espesador de fangos (M8)

En la figura 4.5 se muestra la ubicación de los puntos de muestreo aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la EDAR 1 que se consideran en la cuarta campaña.



Figura 4.5: Coordenadas de los puntos de muestreo en el río aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la EDAR 1

En la tabla 4.2 se muestran valores medios de caudales (Qi) y tiempos de retención (θ_{hi}) en los procesos incluidos en las líneas de tratamiento (Nilsa, 2017). Por otro lado, a modo de control operacional del funcionamiento de la planta, se realiza un balance de materia para determinar los gramos de fango por habitante equivalente y día tal y como se muestra en la ecuación 4.1.

$$\frac{g \text{ de fango por habitante equivalente}}{\text{día}} : fango \left(\frac{m^3}{\text{semana}} \right) \times \frac{1}{7} \left(\frac{\text{semana}}{\text{días}} \right) 10^3 \frac{l}{m^3} \text{ sequedad} \left(\frac{g}{l} \right) \frac{1}{n^{\circ} (\text{hab equiv})}$$

[ecuación 4.1]

Tabla 4.2: Parámetros operacionales medios de la EDAR 1

PARÁMETRO	VALOR	
Q entrada (m ³ /d)	Q1	1720
Q salida decantador primario (m ³ /d)	Q2	1710
Q salida decantador secundario_1 (m ³ /d)	Q4	1710
Q salida decantador secundario_2 (m ³ /d)	Q6	1710
Q fangos tratados (m ³ /semana)	Q8	80
Sequedad fangos tratados (%)	-	3.75
θ _n decantador primario (h)	θ _{n2}	7
θ _n decantador secundario_1 (h)	θ _{n4}	7
θ _n decantador secundario_2 (h)	θ _{n6}	7
θ _n espesador (d)	θ _{n8}	1
g fango por habitante equivalente y día	-	38.9

Q: Caudal θ_n: Tiempo de residencia

4.2.2 Resultados de caracterización de aguas y fangos a lo largo de la línea de tratamiento

Las tablas 4.3 y 4.4 muestran los resultados de valores promedio de los parámetros físico-químicos determinados en muestras de agua y fangos.

Tal y como se observa en la tabla 4.3, de manera global, la DQO se elimina en la línea de aguas en un 84% y los SS en un 92%.

Tabla 4.3: Resultados promedio de parámetros físico-químicos en muestras de agua de la EDAR 1

	M1	M2	M3	M4	M5	M6
pH	7.7	7.1	7.2	7.4	7.4	7.0
Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	1500	1200	1200	2100	2100	1300
O₂ disuelto (mg/l)	5.1	4.0	4.7	4.7	6.8	6.2
Temperatura (°C)	20.5	18.1	18.0	18.0	17.6	17.4
DQO (mgO₂/l)	630	-	-	-	-	100
COD (mg/l)	105	-	-	-	-	38
SS (mg/l)	270	-	-	-	-	24

Tabla 4.4: Resultados promedio de parámetros físico-químicos en muestras de fangos de la EDAR 1

	M7	M8
pH	7.0	7.0
Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	2100	2300
O₂ disuelto (mg/l)	<1	1.7
Temperatura (°C)	15.3	15.5
Turbidez (UNT)	3400	3600
ST (g/l)	23	26

La tabla 4.5 muestra los resultados de los parámetros microbiológicos obtenidos en muestras de agua, en las tres primeras campañas realizadas y la figura 4.6 muestra los valores promedio de las concentraciones microbiológicas de la tabla 4.5. Los resultados de *Salmonella* spp. no se representan por ser cualitativos.

Tal y como muestran los resultados, a la entrada de la depuradora (M1), la concentración microbiológica varía entre 10^4 - 10^8 UFC/100ml en función del microorganismo analizado. Las concentraciones más elevadas se corresponden con coliformes totales y *Pseudomonas* sp., con 10^7 - 10^8 UFC/100ml, seguidas de *E.coli*, *Enterococcus* sp., *S.aureus* y por último *C.perfringens* con una concentración de 10^4 UFC/100ml en una de las campañas. En concreto, las bacterias presentes en mayor concentración son Gram negativas mientras que las bacterias Gram positivas analizadas, *Enterococcus* sp., *S.aureus* y *C.perfringens* están presentes en concentraciones entre 1 y 3 órdenes de magnitud menor. La reducción neta para cada microorganismo a lo largo de la línea de aguas es de entre 1 y 2 órdenes de magnitud en la mayoría de los casos.

Analizando la evolución a lo largo de la línea de tratamiento, se observa que tras el pretratamiento y la decantación primaria (M2) no hay por lo general disminución en la concentración microbiológica. En este punto se debe considerar la incorporación del agua de retorno del espesador como posible causa de que no disminuya la concentración. El tratamiento biológico en los filtros percoladores de alta carga (M3) consigue reducir en un orden de magnitud la concentración presente en casi todos los casos. Posteriormente, en la decantación secundaria (M4), no se reduce la concentración microbiológica salvo alguna excepción e incluso aumenta en algún caso. Después del tratamiento biológico en los filtros percoladores de baja carga (M5), se observa una reducción de hasta 2 órdenes de magnitud y por último tras la decantación final (M6), la concentración microbiológica se mantiene constante o incluso aumenta 1 orden de magnitud en algunos casos.

Tabla 4.5: Caracterización microbiológica de muestras de agua de la EDAR 1 (UFC/100ml)

	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Coliformes totales						
1ª campaña	1.2 ± 0.2E+07	6.5 ± 0.1E+07	9.6 ± 0.4E+06	1.1 ± 0.1E+07	8.8 ± 3.3E+05	1.7 ± 0.2E+06
2ª campaña	7.3 ± 1.2E+07	5.2 ± 2.1E+07	1.1 ± 0.3E+07	7.0 ± 0.6E+06	8.2 ± 0.8E+05	2.0 ± 0.5E+06
3ª campaña	2.6 ± 0.4E+07	1.1 ± 0.2E+08	1.4 ± 0.0E+07	1.4 ± 0.2E+07	2.9 ± 0.4E+06	3.9 ± 2.0E+06
Escherichia coli						
1ª campaña	5.2 ± 0.8E+06	5.0 ± 1.8E+05	5.0 ± 0.1E+05	1.0 ± 0.6E+06	2.0 ± 1.4E+04	1.5 ± 0.5E+05
2ª campaña	9.0 ± 4.2E+06	4.5 ± 0.7E+06	7.0 ± 2.8E+05	8.0 ± 3.2E+05	1.5 ± 0.7E+04	1.2 ± 0.4E+05
3ª campaña	2.3 ± 0.5E+06	1.5 ± 0.7E+06	5.0 ± 3.0E+05	1.5 ± 0.3E+06	1.3 ± 0.6E+05	1.4 ± 0.9E+04
Staphylococcus aureus						
1ª campaña	2.4 ± 0.5E+05	3.6 ± 1.1E+05	3.8 ± 0.2E+04	2.8 ± 0.3E+04	7.7 ± 1.5E+03	2.0 ± 0.2E+03
2ª campaña	2.7 ± 0.1E+05	1.1 ± 0.1E+05	1.1 ± 0.2E+04	1.6 ± 0.8E+04	4.4 ± 1.1E+03	6.7 ± 3.7E+03
3ª campaña	6.3 ± 1.2E+05	2.0 ± 0.8E+05	3.7 ± 0.7E+04	5.4 ± 0.2E+04	5.4 ± 0.9E+04	1.9 ± 0.3E+04
Enterococcus sp.						
1ª campaña	1.5 ± 0.6E+06	1.3 ± 0.4E+06	4.1 ± 0.2E+05	2.7 ± 0.4 E+05	2.2 ± 0.1E+04	5.1 ± 0.7E+04
2ª campaña	3.9 ± 0.8E+06	2.2 ± 0.2E+06	4.5 ± 0.6E+05	1.1 ± 0.2E+05	5.7 ± 0.7E+03	4.0 ± 1.6E+04
3ª campaña	2.3 ± 0.2E+07	1.2 ± 0.2E+06	4.4 ± 0.1E+05	5.9 ± 0.1E+05	2.9 ± 1.5E+05	4.6 ± 1.2E+04
Pseudomonas sp.						
1ª campaña	4.5 ± 1.1E+07	6.2 ± 1.8E+06	3.5 ± 0.6E+06	8.5 ± 0.5E+06	7.4 ± 1.6E+05	2.7 ± 0.5E+06
2ª campaña	3.9 ± 1.4E+07	3.4 ± 0.7E+07	4.1 ± 2.6E+06	3.7 ± 0.1E+06	3.7 ± 0.2E+06	2.1 ± 0.6E+06
3ª campaña	2.3 ± 0.9E+08	9.4 ± 5.4E+07	6.1 ± 0.1E+06	2.0 ± 0.3E+07	8.7 ± 2.0E+05	6.1 ± 0.9E+06
Clostridium perfringens (esporas)						
1ª campaña	-	-	-	-	-	-
2ª campaña	4.0 ± 0.3E+04	-	-	-	-	1.2 ± 0.3E+04
3ª campaña	1.6 ± 0.3E+05	-	-	-	-	3.0 ± 0.3E+04
Clostridium perfringens (vegetativas)						
1ª campaña	-	-	-	-	-	-
2ª campaña	1.2 ± 0.3E+05	-	-	-	-	5.0 ± 0.3E+03
3ª campaña	7.0 ± 0.3E+04	-	-	-	-	2.0 ± 0.3E+04
Salmonella spp.						
1ª campaña	-	-	-	-	-	-
2ª campaña	Presencia en 50ml	-	-	-	-	No detectado en 50ml
3ª campaña	Presencia en 50ml	-	-	-	-	No detectado en 50ml

≥10⁸ 10⁷ 10⁶ 10⁵ 10⁴ 10³ 10² ≤10¹

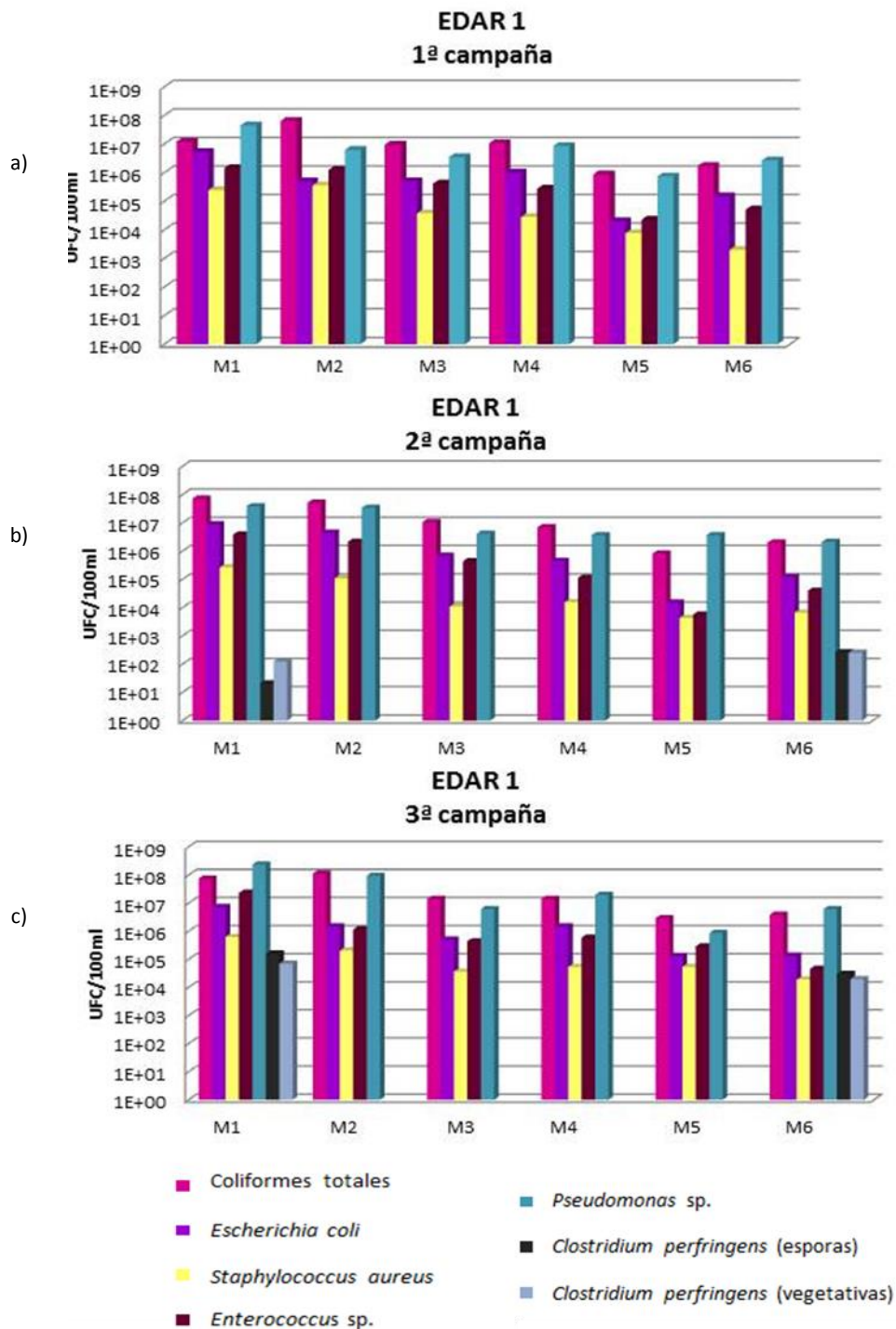


Figura 4.6: Caracterización microbiológica a lo largo de la línea de tratamiento de aguas de la EDAR 1. a) Primera campaña; b) Segunda campaña; c) Tercera campaña

Al comparar los resultados obtenidos para las tres campañas en cada punto de muestreo estudiado, se observa que por lo general la concentración de cada bacteria es del mismo orden en las tres campañas y si existen diferencias son mínimas, de un orden de magnitud. El punto donde menos homogeneidad hay entre campañas es a la salida del tratamiento biológico en el filtro percolador de baja carga. Por otro lado, coliformes totales y *E.coli* son las bacterias en las que se detectan mayores variaciones de concentración en las diferentes campañas para un mismo punto.

Los resultados del análisis de *Salmonella* spp. en la línea de aguas muestran su presencia en el agua bruta, pero sin embargo no se detecta en el efluente de salida debido a que probablemente el ambiente aerobio de los procesos disminuye su concentración hasta niveles no detectables o se transfiere a la línea de tratamiento de fangos.

La tabla 4.6 muestra el valor promedio de los resultados obtenidos del control microbiológico en muestras de fango a la entrada (M7) y la salida del espesador (M8).

Tabla 4.6: Caracterización microbiológica de muestras de fangos en la EDAR 1 (UFC/g)

	M7	M8
Coliformes totales	1.7 ± 1.5E+07	7.3 ± 0.7E+07
<i>Escherichia coli</i>	8.3 ± 7.8E+05	5.1 ± 2.7E+06
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.4 ± 0.1E+05	4.6 ± 4.0E+05
<i>Enterococcus</i> sp.	2.9 ± 1.0E+06	9.1 ± 3.7E+06
<i>Pseudomonas</i> sp.	7.5 ± 1.8E+05	>8.1E+07
<i>Clostridium perfringens</i> (esporas)	1.1 ± 0.3E+05	1.5 ± 0.3E+05
<i>Clostridium perfringens</i> (vegetativas)	7.0 ± 0.3E+06	3.9 ± 0.3E+04
<i>Salmonella</i> spp.	No detectado en 50g	Presencia en 50g

≥10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	≤10 ¹
------------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	------------------

Tal y como se observa en la tabla 4.6, la concentración microbiológica a la entrada de la línea de fangos es de entre 10⁵-10⁷ UFC/g para todas las bacterias analizadas y de entre 10⁴-10⁷ UFC/g a la salida del espesador (M8). Coliformes totales presenta la concentración más alta en las muestras analizadas. Por otro lado, no se detecta *Salmonella* spp. a la entrada del espesador pero si hay presencia en los fangos espesados, por lo que es probable que esta bacteria se transfiera de la línea de tratamiento de aguas a la de fangos, concentrándose en el espesador en el que las condiciones anaerobias favorecen su crecimiento.

4.2.3 Estimación del impacto del vertido sobre la calidad microbiológica del cauce receptor

La tabla 4.7 muestra los resultados obtenidos en el análisis de las muestras de agua de la cuarta campaña, y en el río receptor del efluente de la EDAR, aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido.

Tabla 4.7: Caracterización microbiológica en el influente y efluente de la EDAR 1 y en el cauce aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido (UFC/100ml)

	M1	M6	Aguas arriba	Aguas abajo
Coliformes totales	9.0 ± 0.9E+07	1.9 ± 0.3E+06	2.6 ± 0.6E+03	1.0 ± 0.2E+04
<i>Escherichia coli</i>	8.0 ± 3.0E+06	1.4 ± 0.9E+05	5.0 ± 1.4E+02	9.8 ± 0.8E+03
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.4 ± 0.5E+05	2.2 ± 0.5E+03	3.3 ± 1.1E+02	7.7 ± 6.3E+02
<i>Enterococcus</i> sp.	3.9 ± 0.9E+06	1.7 ± 1.0E+04	5.5 ± 2.4E+01	8.0 ± 3.5E+03
<i>Pseudomonas</i> sp.	6.3 ± 0.6E+06	3.2 ± 1.0E+05	2.3 ± 0.5E+03	3.6 ± 0.7E+03

≥10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	≤10 ¹
------------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	------------------

A partir de los resultados de la tabla 4.7 se calculan las cargas microbiológicas (UFC/d) tanto en el influente y efluente de la EDAR como en el cauce aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido. Los datos tanto del caudal tratado en la EDAR como del río, el día que se toma la muestra son los detallados en la tabla 4.8. El dato de caudal del río receptor se obtiene a través del Sistema Automático de Información Hidrológica de la Cuenca Hidrográfica del Ebro.

Tabla 4.8: Caudales tratados en la EDAR 1 y caudales en el cauce del río

PARÁMETRO	VALOR
Q tratado (m ³ /d)	1351
Q río receptor (m ³ /d)	49075
Distancia EDAR-estación aforo (km)	2.5
Ratio caudal río receptor/caudal tratado EDAR	36

La figura 4.7 muestra la evolución de la carga microbiológica en los diferentes puntos para las bacterias analizadas.

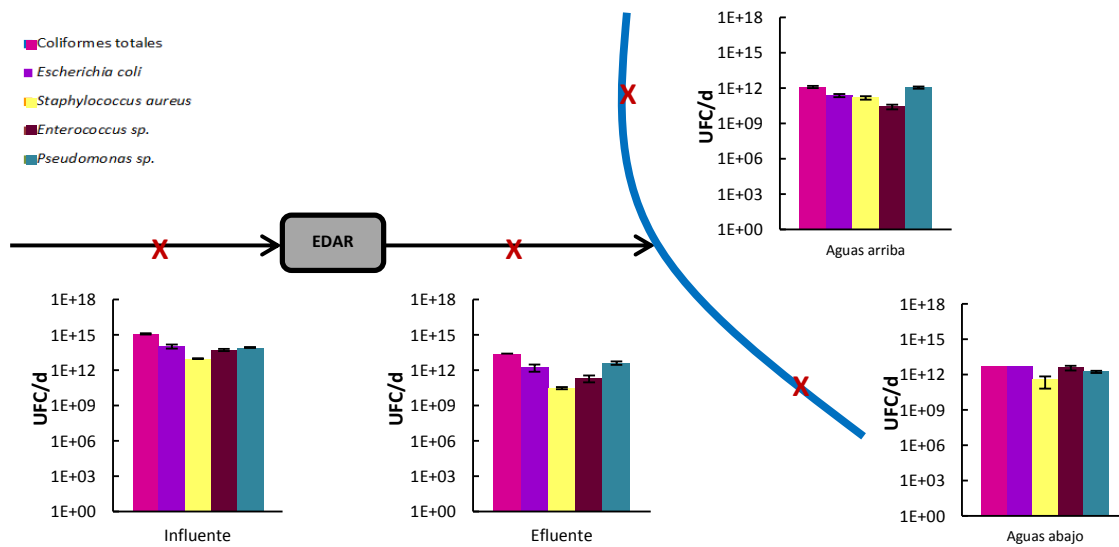


Figura 4.7: Cargas microbiológicas (UFC/d) en el influente y efluente de la EDAR 1 y en el cauce

Tal y como se observa en la figura 4.7, la reducción neta de los microorganismos tras el tratamiento de depuración es de 1-2 órdenes de magnitud. Si se comparan los resultados de carga microbiológica aguas arriba y aguas abajo del vertido de la EDAR, se observa como no existe una influencia destacable de dicho vertido en la calidad microbiológica del cauce receptor en la mayoría de los microorganismos analizados. Únicamente la carga de *Enterococcus sp.* aumenta ligeramente en el río.

4.3 CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA EN LA EDAR 2

4.3.1 Descripción de la planta de tratamiento, toma de muestras y parámetros de caracterización

La EDAR 2 recibe aguas residuales de origen doméstico e industrial asimilables a urbanas. La población censada es de 35388 habitantes en 2015 y la carga tratada es de 82500 habitantes equivalentes. El caudal industrial que llega al influente es aproximadamente de 168000 m³/año proveniente de la industria agrícola y 371000 m³/año proveniente de la industria papelera y supone un 50% de la carga orgánica que entra a la EDAR. El cauce receptor del vertido es el río Ebro.

La figura 4.8 muestra el plano esquemático de la planta y una vista real de la misma. En la tabla 4.9 se detallan los datos de diseño de caudal y carga, así como medias anuales de caudal y carga de tratamiento (Nilsa, 2017).

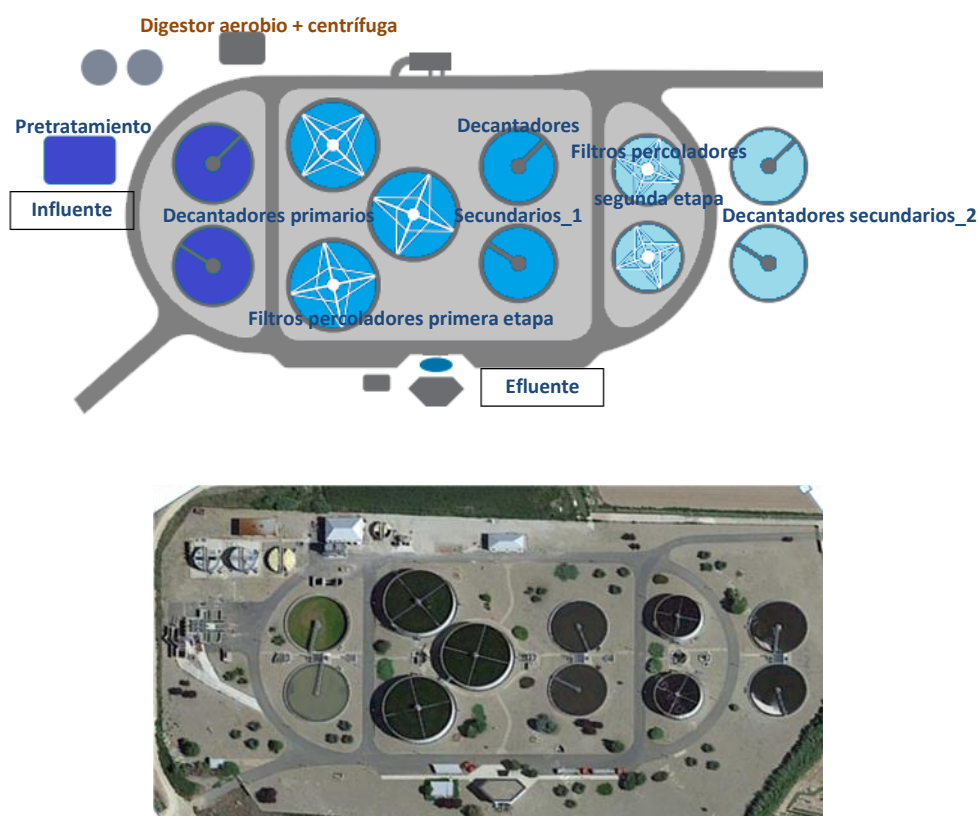


Figura 4.8: Dibujo esquemático de la EDAR 2 y vista real

Tabla 4.9: Caudal y carga de diseño y valores reales medios de tratamiento de la EDAR 2

PARÁMETRO	VALOR
Caudal de diseño (m ³ /d)	22000
Caudal tratado medio (m ³ /d)	22100
Carga de diseño (kg DBO ₅ /d)	6900
Carga media tratada (kg DBO ₅ /d)	5200

En la figura 4.8 se detalla el diagrama del tratamiento de depuración así como las dimensiones de algunas de las instalaciones.

Tal y como muestran las figuras 4.8 y 4.9, la depuradora consta de los procesos o etapas que se incluyen a continuación.

Línea de tratamiento de aguas:

- Bombeo de entrada a la planta
- Pretratamiento: Rejas+tamices+desarenado/desengrasado
- Decantación primaria
- Tratamiento biológico de lecho bacteriano (filtros percoladores) primera etapa
- Decantación secundaria_1
- Tratamiento biológico de lecho bacteriano (filtros percoladores) segunda etapa
- Decantación secundaria_2

Línea de tratamiento de fangos:

- Tratamiento aerobio a temperaturas entre 25-62°C.
- Centrifugación

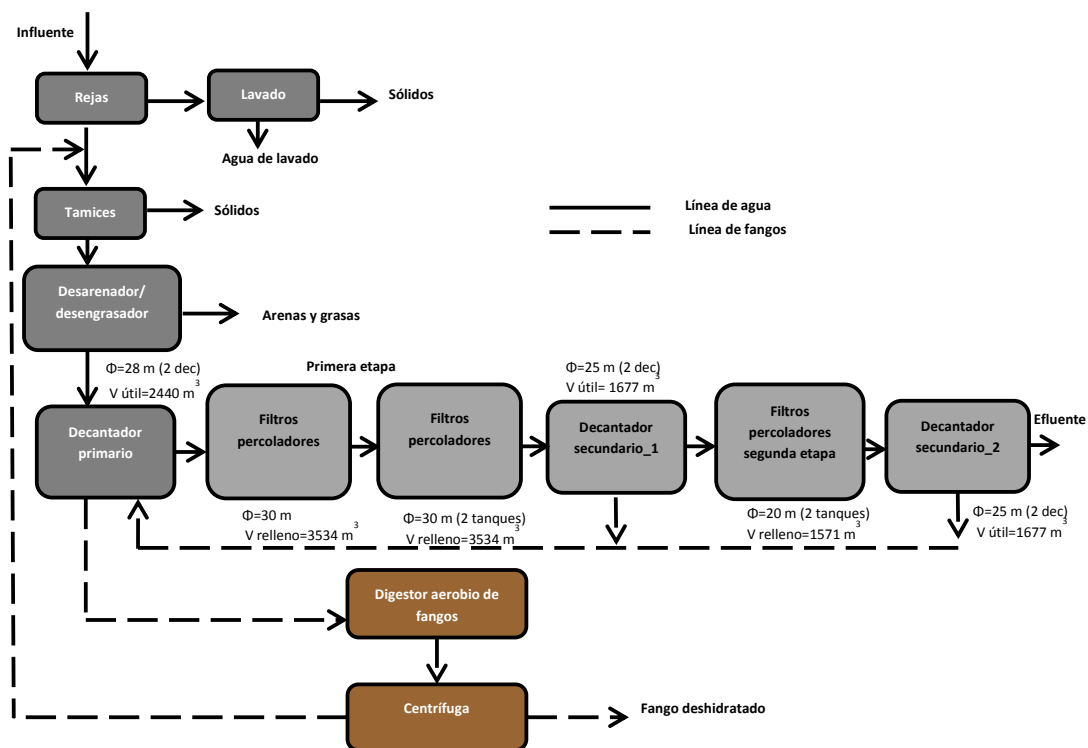


Figura 4.9: Etapas de la EDAR 2

Tal y como se observa en la figura 4.9, el rebose de centrífuga se recicla a las primeras etapas del tratamiento y los fangos tratados se obtienen del decantador primario.

La toma de muestras se realiza en días en los que la planta opera en régimen estacionario, no realizándose aquellos días en los que se detectan incidencias como lluvias intensas, vertidos no controlados, etc. Se realizan 4 campañas de muestreo. En las 3 primeras campañas se toman muestras en puntos a lo largo de la línea de tratamiento de aguas y fangos y en la cuarta campaña se toman muestras en el influente y efluente de la EDAR así como aguas arriba y

aguas abajo del punto de vertido de la planta. Los días seleccionados y la temperatura promedio de esos días son:

Campaña 1: el 21 de enero de 2015 entre las 10:00 y las 12:00h. Tª: 5.9°C

Campaña 2: el 7 abril de 2015 entre las 10:30 y las 12:30h. Tª: 12.7°C

Campaña 3: el 22 de septiembre de 2015 entre las 10:00 y las 12:00h. Tª: 18.9°C

Campaña 4: el 19 de septiembre de 2016 entre las 11:00 y las 12:00h. Tª: 18.8°C

El protocolo para la toma de muestras es el indicado en las norma UNE EN ISO 5667-3:2013 y UNE-EN ISO 5667-13:2011 (ISO y AENOR, 2011; ISO y AENOR, 2013). Se utilizan recipientes estériles de 150 y 500 ml para el análisis de bacterias y recipientes no estériles para el análisis de parámetros físico-químicos. Se determinan parámetros físico-químicos y parámetros microbiológicos mostrados en las tablas 3.1 y 3.4 respectivamente. En concreto se determina pH, temperatura, oxígeno disuelto, conductividad DQO, COD, fósforo, nitratos, nitritos, nitrógeno amoniacal, SS, ST, turbidez, coliformes totales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Clostridium perfringens* y *Salmonella* spp. Los análisis de bacterias se realizan en un tiempo inferior a 24 horas.

En la figura 4.10 se muestra el esquema de la planta de tratamiento con los puntos de muestreo seleccionados tanto en la línea de aguas como en la de fangos (Mi) y en la figura 4.11 se muestran imágenes de algunos de los puntos de muestreo.

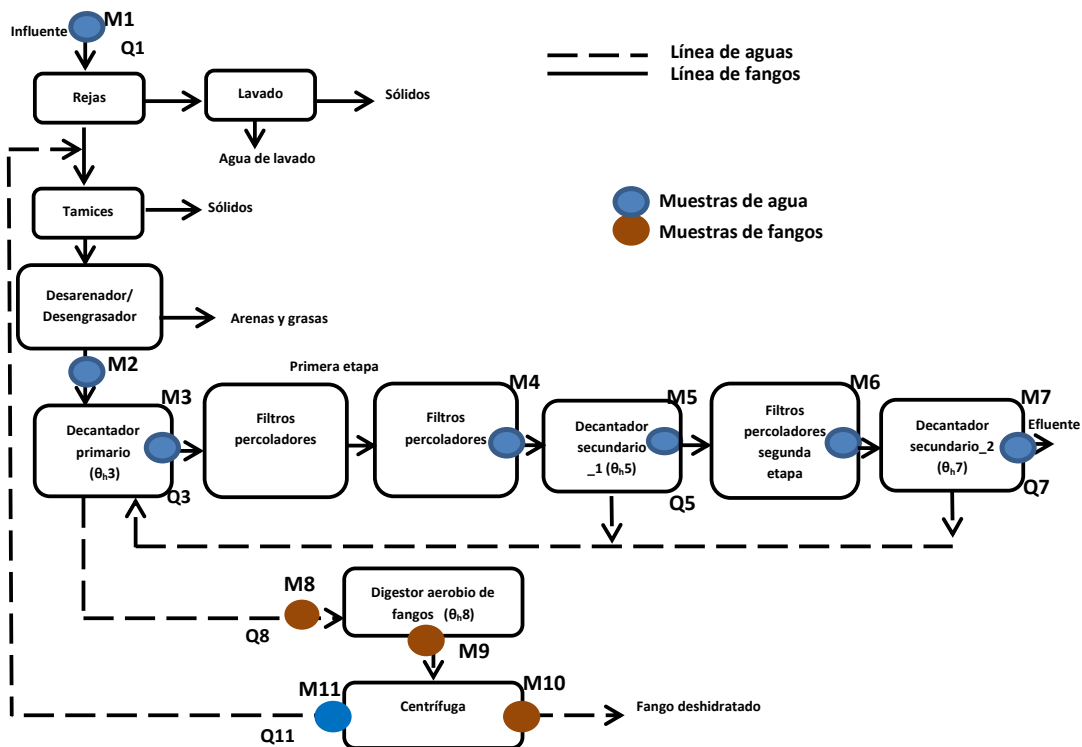


Figura 4.10: Puntos de la toma de muestras (Mi) en las líneas de tratamiento de la EDAR 2

Qi: Caudal en el punto i; θ_{hi} : tiempo de retención en la instalación i

Se analizan 8 muestras de agua (M1-M7 y M11 de la figura 4.10) y se estima que se cultivan aproximadamente 360 placas para el recuento de microorganismos, en cada una de las campañas. Por otro lado, se analizan 2 muestras de fangos (M8-M10 de la figura 4.10) y se estima que se cultivan aproximadamente 90 placas para el recuento de microorganismos, en cada una de las campañas. En el caso de la muestra M10, que es fango deshidratado, se realiza un pretratamiento de la muestra antes de caracterizarla. En concreto, se prepara en el laboratorio una suspensión inicial pesando aproximadamente 10 g de muestra y disolviéndola en 90 ml de agua de dilución estéril. Se agita a 3500 rpm durante 20 min para obtener la muestra inicial de análisis.



Figura 4.11: Imágenes de algunos puntos de muestreo. a) Salida pretratamiento (M2); b) Salida decantador secundario_2 (M7); c) Salida tratamiento aerobio (M9)

En la figura 4.12 se muestra la ubicación de los puntos de muestreo aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la EDAR 2.

Aguas arriba

42°03'13.4"N 1°34'04.1"W



Aguas abajo

42°03'23.0"N 1°34'29.4"W

Figura 4.12: Coordenadas de los puntos de muestreo en el río aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la EDAR 2

En la tabla 4.10 se muestran valores medios de caudales (Q_i) y tiempos de retención ($\theta_{h,i}$) en los procesos incluidos en las líneas de tratamiento (Nilsa, 2017). Por otro lado se realiza un balance de materia para determinar los gramos de fango por habitante equivalente y día tal y como se muestra en la ecuación 4.1 del apartado 4.2.1.

Tabla 4.10: Parámetros operacionales de la EDAR 2

PARÁMETRO		VALOR
Q influente (m^3/d)	Q1	20100
Q salida decantador primario (m^3/d)	Q3	20000
Q salida decantador secundario_1 (m^3/d)	Q5	20000
Q salida decantador secundario_2 (m^3/d)	Q7	20000
Q fangos tratados (m^3/d)	Q8	70
Sequedad fangos tratados (%)	-	3
Qrecirculación centrífuga (m^3/h)	Q11	11
$\theta_{h,decantador\ primario}$ (h)	$\theta_{h,3}$	6
$\theta_{h,decantador\ secundario_1}$ (h)	$\theta_{h,5}$	4
$\theta_{h,filtrros\ percoladores\ y\ decantador\ secundario_2}$ (h)	$\theta_{h,7}$	4
$\theta_{h,digestor\ aerobio}$ (d)	$\theta_{h,8}$	5
g fango por habitante equivalente y día	-	25.4

Q: Caudal

θ_h : Tiempo de residencia

4.3.2 Resultados de caracterización de aguas y fangos a lo largo de la línea de tratamiento

Las tablas 4.11 y 4.12 muestran los valores promedio de los parámetros físico-químicos determinados en muestras de agua y fangos.

Tabla 4.11: Resultados promedio de parámetros físico-químicos en muestras de agua de la EDAR 2

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M11
pH	7.5	7.3	7.5	7.5	7.5	7.5	7.3	7.0
Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	2000	100	2600	2500	2100	2100	2000	-
O ₂ disuelto (mg/l)	3.2	3.0	3.6	5.6	4.8	6.7	6.9	5.4
Temperatura (°C)	17.9	17.1	17.5	17.5	17.6	16.9	17.2	15.8
Turbidez (UNT)	167	215	96	72	27	23	9	216
DQO (mgO ₂ /l)	470	120	270	90	53	55	63	300
COD(mg/l)	63	41	92	33	21	20	23	31
SS (mg/l)	300	515	25	70	15	10	25	100
Nitratos (mg/l)	37	6	9	6	11	31	31	-
Nitritos (mg/l)	48	50	42	59	45	16	18	140
N amoniacal (mg/l)	43	66	153	78	23	3	10	-
Fósforo (mg/l)	2	2	3	2	2	1	2	915

Tabla 4.12: Resultados promedio de parámetros físico-químicos en muestras fangos de la EDAR 2

	M8	M9	M10
pH	5.6	6.5	-
Temperatura (°C)	14.0	-	-
Turbidez (UNT)	8000	8000	-
ST (g/l)	28	26	30 g/100 g muestra
Nitratos (mg/l)	750	-	2300
Nitritos (mg/l)	3300	2100	5000
N amoniacal (mg/l)	171	576	100
Fósforo (mg/l)	150	130	90

Tal y como se observa en la tabla 4.11, los valores obtenidos a lo largo de la línea de tratamiento de agua (M1-M7) en todos los parámetros son similares salvo turbidez, DQO, nitrógeno amoniacal y sólidos en suspensión. En esta depuradora el N-amoniacal es un parámetro que se controla adicionalmente (Comunidad Económica Europea, 1991) debido al posible impacto en el medio receptor. De manera global se obtiene una reducción aproximada de 87% de DQO, 63% de COD, 92% de SS, 16% de nitratos, 63% de nitritos, 77% de nitrógeno amoniacal y 95% de turbidez. La tabla 4.12 muestra elevados valores de nitritos y nitratos en el fango antes del tratamiento aerobio, que se concentran posteriormente en el fango deshidratado.

La tabla 4.13 muestra los resultados de los parámetros microbiológicos obtenidos en muestras de agua, en las tres primeras campañas realizadas. Además se muestran los resultados de la muestra de agua que retorna desde el tratamiento en la centrífuga a la entrada al decantador primario (M11). La figura 4.13 muestra los valores promedio de la concentración microbiológica a lo largo de la línea de tratamiento (M1-M7). Los resultados de *Salmonella* spp. no se representan por ser cualitativos.

Tabla 4.13: Caracterización microbiológica de muestras de agua de la EDAR 2 (UFC/100ml)

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M11
Coliformes totales								
1ª campaña	7.1 ± 0.4E+07	4.5 ± 2.1E+07	4.2 ± 3.4E+07	2.8 ± 0.9E+06	3.4 ± 1.0E+06	8.4 ± 1.3E+05	1.5 ± 0.2E+06	8.4 ± 1.8E+06
2ª campaña	8.3 ± 1.2E+07	4.8 ± 2.0E+07	2.7 ± 1.0E+07	1.5 ± 0.1E+07	1.9 ± 0.3E+07	1.4 ± 0.1E+06	2.6 ± 0.7E+06	4.2 ± 1.4E+06
3ª campaña	1.3 ± 0.4E+08	1.2 ± 0.3E+08	2.2 ± 0.5E+07	2.1 ± 0.4E+07	8.9 ± 1.8E+06	3.6 ± 0.4E+06	2.1 ± 1.1E+06	1.3 ± 0.2E+06
<i>Escherichia coli</i>								
1ª campaña	5.0 ± 3.5E+06	3.0 ± 0.7E+06	1.4 ± 1.1E+06	2.6 ± 1.0E+05	9.0 ± 3.6E+04	1.0 ± 0.1E+04	5.0 ± 2.1E+04	1.0 ± 0.1E+06
2ª campaña	7.0 ± 1.7E+06	1.0 ± 0.1E+06	2.1 ± 0.7E+06	2.1 ± 0.6E+06	2.0 ± 0.1E+05	1.0 ± 0.3E+04	2.0 ± 0.7E+04	2.3 ± 0.7E+06
3ª campaña	1.0 ± 0.3E+07	8.0 ± 2.1E+06	6.9 ± 1.8E+06	8.0 ± 2.1E+05	1.3 ± 0.4E+05	7.0 ± 0.2E+05	8.0 ± 3.1E+04	5.5 ± 1.5E+05
<i>Staphylococcus aureus</i>								
1ª campaña	2.7 ± 0.3E+05	1.1 ± 0.6E+06	6.0 ± 1.4E+05	2.8 ± 1.2E+05	5.7 ± 2.3E+04	7.7 ± 0.7E+04	5.8 ± 2.2E+04	9.9 ± 3.3E+03
2ª campaña	1.8 ± 0.5E+05	1.9 ± 0.2E+05	1.9 ± 1.1E+05	1.9 ± 0.5E+05	2.1 ± 0.5E+04	1.8 ± 1.1E+04	2.0 ± 0.4E+04	2.5 ± 0.9E+04
3ª campaña	2.3 ± 0.5E+04	3.3 ± 0.7E+04	1.6 ± 0.2E+05	2.0 ± 0.4E+04	1.7 ± 0.4E+04	2.2 ± 0.5E+04	1.3 ± 0.8E+04	3.2 ± 1.2E+04
<i>Enterococcus sp.</i>								
1ª campaña	2.8 ± 0.9E+06	2.2 ± 0.4E+06	1.2 ± 0.1E+06	7.0 ± 4.6E+05	9.3 ± 2.0E+04	1.5 ± 0.5E+04	4.2 ± 1.1E+04	1.1 ± 0.9E+05
2ª campaña	3.9 ± 0.5E+06	3.5 ± 1.8E+06	1.4 ± 0.6E+06	1.4 ± 0.5E+06	1.4 ± 0.7E+05	1.0 ± 0.2E+04	1.5 ± 0.3E+04	6.4 ± 2.3E+04
3ª campaña	1.7 ± 0.6E+06	1.9 ± 0.3E+06	1.6 ± 0.3E+06	2.1 ± 1.5E+05	3.3 ± 0.2E+05	2.1 ± 0.7E+04	1.6 ± 0.7E+04	3.2 ± 1.1E+04
<i>Pseudomonas sp.</i>								
1ª campaña	4.0 ± 0.1E+07	1.7 ± 0.1E+07	4.2 ± 1.9E+07	1.4 ± 0.3E+06	1.6 ± 0.2E+05	2.4 ± 0.8E+05	3.2 ± 0.8E+05	3.2 ± 0.4E+06
2ª campaña	4.1 ± 0.0E+07	5.4 ± 4.0E+07	1.1 ± 0.1E+07	2.9 ± 0.2E+06	6.8 ± 3.5E+06	2.3 ± 1.1E+05	4.8 ± 3.4E+05	1.6 ± 0.7E+06
3ª campaña	8.3 ± 1.4E+07	4.7 ± 0.6E+07	4.2 ± 0.2E+07	1.1 ± 0.1E+07	8.3 ± 0.1E+06	3.7 ± 0.1E+06	2.5 ± 0.5E+06	6.2 ± 2.6E+05
<i>Clostridium perfringens</i> (esporas)								
1ª campaña	8.0 ± 0.3E+04	-	-	-	-	-	1.0 ± 0.3E+04	8.8 ± 0.3E+05
2ª campaña	4.0 ± 0.3E+04	-	-	-	-	-	2.0 ± 0.3E+03	5.4 ± 0.3E+05
3ª campaña	9.0 ± 0.3E+04	-	-	-	-	-	3.0 ± 0.3E+04	1.4 ± 0.3E+09
<i>Clostridium perfringens</i> (vegetativas)								
1ª campaña	4.3 ± 0.3E+04	-	-	-	-	-	1.0 ± 0.3E+04	7.6 ± 0.3E+05
2ª campaña	1.0 ± 0.3E+04	-	-	-	-	-	1.0 ± 0.3E+03	4.6 ± 0.3E+05
3ª campaña	1.0 ± 0.3E+05	-	-	-	-	-	4.0 ± 0.3E+04	1.0 ± 0.3E+09
<i>Salmonella spp.</i>								
1ª campaña	No detectado en 50ml	-	-	-	-	-	No detectado en 50ml	No detectado en 50ml
2ª campaña	Presencia en 50ml	-	-	-	-	-	No detectado en 50ml	Presencia en 50ml
3ª campaña	Presencia en 50ml	-	-	-	-	-	Presencia en 50ml	Presencia en 50ml

$\geq 10^8$ 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 $\leq 10^1$

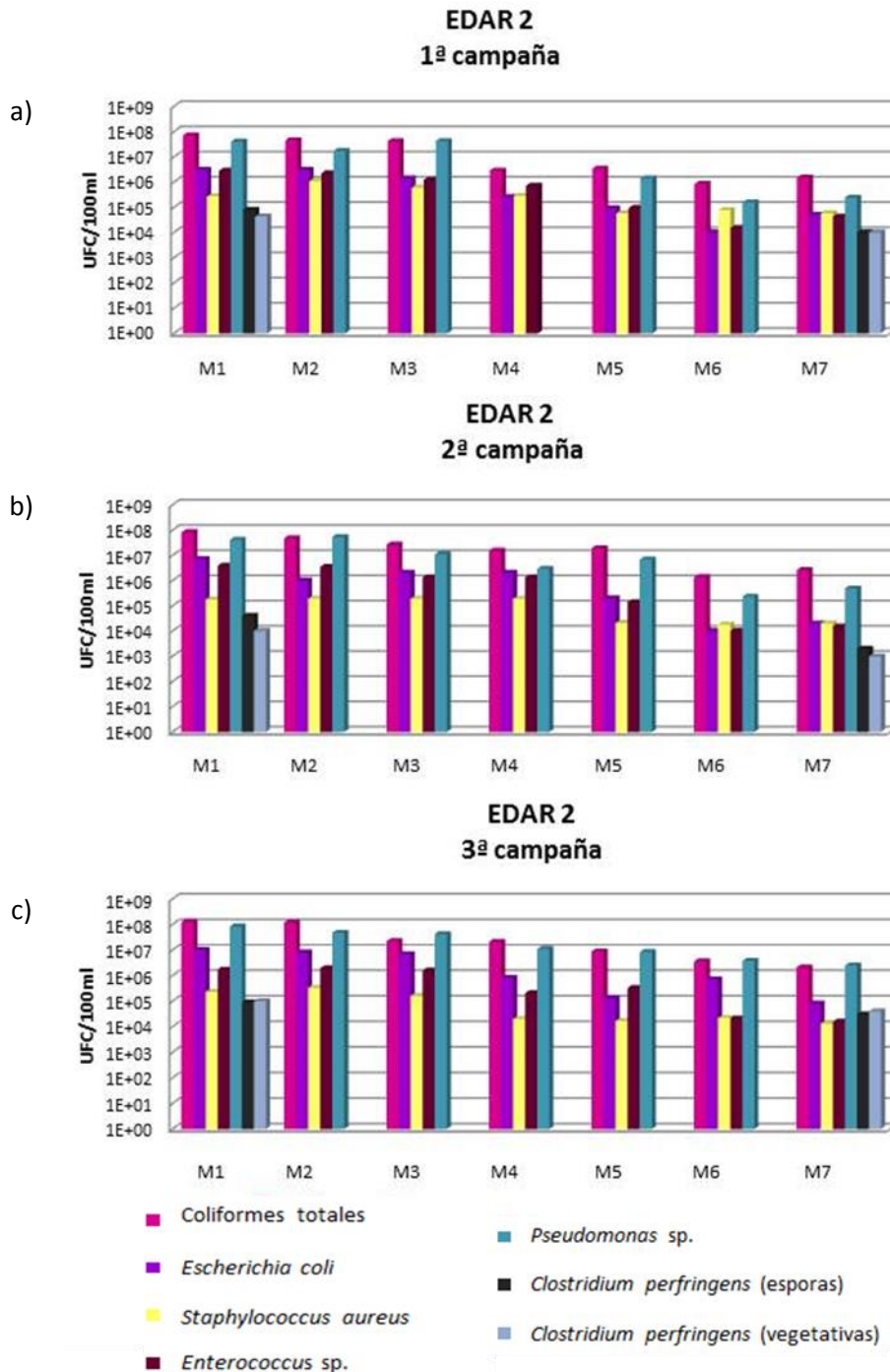


Figura 4.13: Caracterización microbiológica a lo largo de la línea de tratamiento de aguas de la EDAR 2. a) Primera campaña; b) Segunda campaña; c) Tercera campaña

Tal y como muestran los resultados, a la entrada de la depuradora (M1) la concentración microbiológica varía entre 10^4 - 10^8 UFC/100ml en función del microorganismo analizado. Las concentraciones más elevadas se corresponden con coliformes totales y *Pseudomonas sp.*, con 10^7 - 10^8 UFC/100ml, seguidas de *E.coli*, *Enterococcus sp.*, *S.aureus* y *C.perfringens*. En concreto, las bacterias presentes en mayor concentración son Gram negativas mientras que las bacterias Gram positivas analizadas, *Enterococcus sp.*, *S.aureus* y *C.perfringens* están presentes en concentraciones en general entre 1 y 4 órdenes de magnitud menor.

La reducción neta para cada microorganismo a lo largo de la línea de aguas es de entre 1 y 2 órdenes de magnitud en la mayoría de los casos, pudiendo llegar a veces a una reducción de la concentración microbiológica de hasta 3 órdenes de magnitud.

Analizando la evolución a lo largo de la línea de tratamiento se observa que en las primeras etapas del tratamiento la concentración microbiológica prácticamente no varía (M2, M3). A la salida del tratamiento biológico en los filtros percoladores de la primera etapa (M4), tiene lugar una reducción de la concentración de 1 orden de magnitud en al menos una campaña para todos los microorganismos. Después de la decantación secundaria (M5), la concentración se reduce 1 orden de magnitud en dos de las tres campañas.

A la salida del tratamiento biológico en los filtros percoladores de baja carga (M6), la concentración se mantiene o se reduce 1 orden de magnitud en algunos casos. Finalmente, tras la decantación final (M7) no se observa ninguna reducción microbiológica.

Al comparar los resultados obtenidos para las tres campañas en cada punto de muestreo estudiado, se observa por lo general que la concentración de cada bacteria es similar en las tres campañas y si existen diferencias son mínimas, de un orden de magnitud y puntualmente de dos órdenes de magnitud, concretamente de *S.aureus* en M2. Los puntos donde menos homogeneidad hay entre campañas son en la salida del tratamiento biológico en el filtro de media carga y a la salida de la decantación secundaria (M4 y M5).

Los resultados de *Salmonella* spp. en la línea de tratamiento de aguas muestran que se detecta *Salmonella* spp. tanto a la entrada de la planta como en el efluente y en el agua que retorna desde la centrífuga a cabecera de planta (M11). Los resultados se relacionan con el aporte continuo de esta bacteria que puede persistir en el ambiente en condiciones favorables.

La tabla 4.14 muestra el valor promedio de los resultados obtenidos del control microbiológico en muestras de fango a la entrada y salida del tratamiento aerobio (M8 y M9) y en el fango tras la centrifugación (M10).

Tabla 4.14: Caracterización microbiológica de muestras de fangos de la EDAR 2 (UFC/g)

		M8	M9	M10
Coliformes totales		2.1 ± 1.5E+08	4.4 ± 3.4E+07	5.1 ± 0.7E+06
<i>Escherichia coli</i>		5.8 ± 2.9E+06	3.8 ± 2.0E+06	4.8 ± 1.6E+05
<i>Staphylococcus aureus</i>		2.2 ± 1.0E+06	9.1 ± 7.0E+05	1.3 ± 0.6E+05
<i>Enterococcus</i> sp.		5.2 ± 4.0E+06	3.9 ± 2.0E+06	8.5 ± 1.0E+05
<i>Pseudomonas</i> sp.		1.1 ± 0.8E+08	1.9 ± 1.0E+07	5.0 ± 0.1E+06
<i>Clostridium perfringens</i> (esporas)		2.7 ± 0.3E+06	1.8 ± 0.3E+04	-
<i>Clostridium perfringens</i> (vegetativas)		1.6 ± 0.3E+06	1.2 ± 0.3E+04	-
<i>Salmonella</i> spp.	1ª campaña	No detectado en 50g		
	2ª campaña	Presencia en 50g		
	3ª campaña	Presencia en 50g	Presencia en 50g	No detectado en 50g

$\geq 10^8$	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	$\leq 10^1$
-------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	-------------

Tal y como se observa en la tabla 4.14, la concentración microbiológica a la entrada de la línea de fangos es de entre 10^6 - 10^8 UFC/g. Se detectan coliformes totales y *Pseudomonas* sp. en mayor concentración en la mayoría de los puntos de muestreo. Por otro lado, se detecta *Salmonella* spp. en la entrada y la salida del tratamiento aerobio (M8 y M9). Globalmente todas las bacterias se reducen en la línea de fangos entre 1 y 2 órdenes de magnitud.

Analizando la evolución de cada microorganismo en cada una de las etapas, se observa que tanto la digestión (M9) como la deshidratación (M10) reducen la concentración bacteriana en casi todos los casos un orden de magnitud.

El tratamiento de digestión no elimina la *Salmonella* spp. y se puede observar además que debido a su carácter anaerobio se detecta en el agua de salida de la línea de fangos.

4.3.3 Estimación del impacto del vertido sobre la calidad microbiológica del cauce receptor

La tabla 4.15 muestra los resultados obtenidos en el análisis de las muestras de agua de la cuarta campaña y en el río receptor del efluente de la EDAR, aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido.

Tabla 4.15: Caracterización microbiológica en el influente y efluente de la EDAR 2 y en el cauce aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido (UFC/100ml)

	M1	M7	Aguas arriba	Aguas abajo
Coliformes totales	3.0 ± 0.5E+08	1.2 ± 0.9E+06	4.9 ± 1.1E+04	4.1 ± 3.4E+04
<i>Escherichia coli</i>	9.3 ± 1.2E+07	<1.0E+04	1.4 ± 0.1E+03	7.0 ± 0.7E+03
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.7 ± 0.7E+04	5.0 ± 2.1E+03	7.9 ± 5.6E+02	7.0 ± 0.6E+02
<i>Enterococcus</i> sp.	4.0 ± 1.7E+06	5.6 ± 4.8E+03	3.3 ± 0.5E+02	1.2 ± 0.5E+02
<i>Pseudomonas</i> sp.	7.6 ± 0.1E+07	8.3 ± 2.2E+05	1.1 ± 0.1E+04	2.0 ± 0.3E+04

$\geq 10^8$	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	$\leq 10^1$
-------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	-------------

A partir de los resultados de la tabla 4.15 se calculan las cargas microbiológicas (UFC/d) tanto en el influente y efluente de la EDAR como en el cauce aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido. Los datos tanto del caudal tratado en la EDAR como del río, el día que se toma la muestra son los detallados en la tabla 4.16. El dato de caudal del río receptor se obtiene a través del Sistema Automático de Información Hidrológica de la Cuenca Hidrográfica del Ebro.

Tabla 4.16: Caudales tratados en la EDAR 2 y caudales en el cauce del río

PARÁMETRO	VALOR
Q tratado (m^3/d)	21830
Q río receptor (m^3/d)	16070400
Distancia EDAR-estación aforo (km)	3.5
Ratio caudal río receptor/caudal tratado EDAR	736

La figura 4.14 muestra la evolución de la carga microbiológica en los diferentes puntos para las bacterias analizadas.

Tal y como se observa en la figura 4.14, la reducción promedio neta de los microorganismos tras el tratamiento de depuración es de hasta 4 órdenes de magnitud. Si se comparan los resultados de carga microbiológica aguas arriba y aguas abajo del vertido de la EDAR, se

observa como apenas existe influencia destacable de dicho vertido en la calidad microbiológica del cauce receptor.

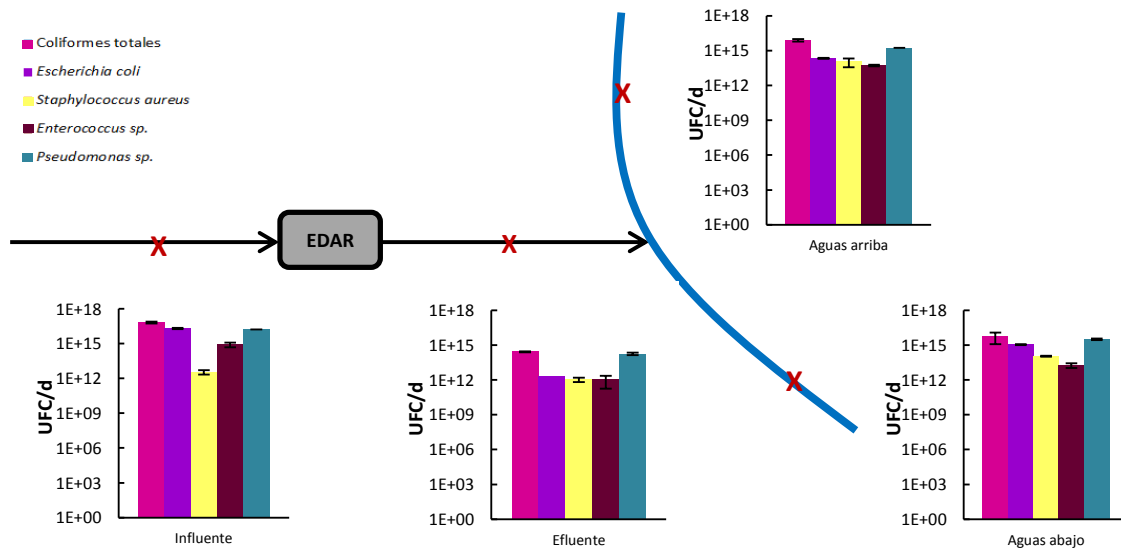


Figura 4.14: Cargas microbiológicas (UFC/d) en el influente y efluente de la EDAR 2 y en el cauce

4.4 CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA EN LA EDAR 3

4.4.1 Descripción de la planta de tratamiento, toma de muestras y parámetros de caracterización

La EDAR 3 recibe aguas residuales de origen doméstico e industrial asimilables a urbanas. La población censada es de 3192 habitantes en 2015 y la carga tratada es de 4300 habitantes equivalentes. El caudal industrial es aproximadamente de 4600 m³/año y supone la gran mayoría de la carga orgánica que entra a la EDAR. El cauce receptor del vertido es el río Huecha.

La figura 4.15 muestra el plano esquemático de la planta y una vista real de la misma. En la tabla 4.17 se detallan los datos de diseño de caudal y carga, así como medias anuales de caudal y carga de tratamiento (Nilsa, 2017).

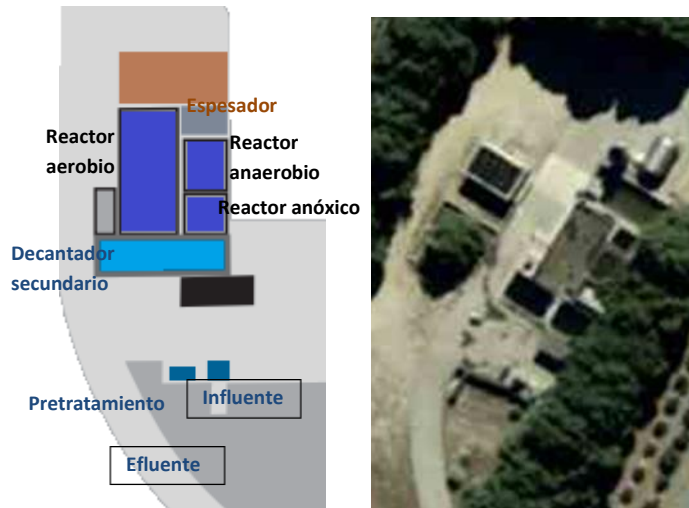


Figura 4.15: Dibujo esquemático de la EDAR 3 y vista real

Tabla 4.17: Caudal y carga de diseño y valores reales medios de tratamiento de la EDAR 3

PARÁMETRO	VALOR
Caudal de diseño (m ³ /d)	1800
Caudal tratado medio (m ³ /d)	528
Carga de diseño (kg DBO ₅ /d)	336
Carga media tratada (kg DBO ₅ /d)	290

En la figura 4.14 se detalla el diagrama del tratamiento de depuración así como las dimensiones de algunas de las instalaciones.

Tal y como muestran las figuras 4.15 y 4.16, la depuradora consta de los procesos o etapas que se incluyen a continuación.

Línea de tratamiento de agua:

- Bombeo de entrada
- Tamiz
- Tratamiento biológico en suspensión anaerobio/anóxico/aerobio

-Decantación secundaria

Línea de tratamiento de fangos:

-Espesamiento de fangos

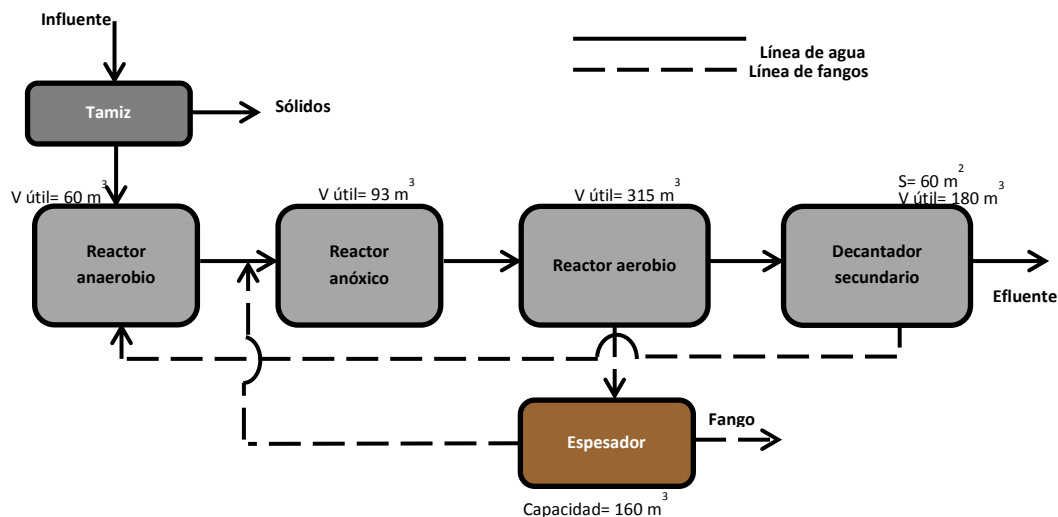


Figura 4.16: Etapas de las EDAR 3

Tal y como se observa en la figura 4.16, los fangos de salida del decantador secundario se reciclan a la entrada del reactor anaerobio. Por otro lado, el agua que sale del espesador se recicla al reactor anóxico.

La toma de muestras se realiza en días en los que la planta opera en régimen estacionario, no realizándose aquellos días en los que se detectan incidencias como lluvias intensas, vertidos no controlados, etc. Se realizan 4 campañas de muestreo. En las 3 primeras campañas se toman muestras en puntos a lo largo de la línea de tratamiento de aguas y fangos y en la cuarta campaña se toman muestras en el influente y efluente de la EDAR así como aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la planta. Los días seleccionados son:

Campaña 1: el 15 diciembre de 2014 entre las 10:00 y las 11:00h. Tª: 8.7°C

Campaña 2: el 12 de mayo de 2015 entre las 13:30 y las 14:30h. Tª: 24.3°C

Campaña 3: el 6 de octubre de 2015 entre las 10:30 y las 11:00h. Tª: 21.1°C

Campaña 4: el 25 de octubre de 2016 entre las 11:00 y las 12:00h. Tª: 17.8°C

El protocolo para la toma de muestras es el indicado en las norma UNE EN ISO 5667-3:2013 y UNE-EN ISO 5667-13:2011 (ISO y AENOR, 2011; ISO y AENOR, 2013). Se utilizan recipientes estériles de 150 y 500ml para el análisis de bacterias y recipientes no estériles para el análisis de parámetros físico-químicos. Las muestras son líquidas o semisólidas y se transportan refrigeradas hasta su análisis. Se determinan parámetros físico-químicos y parámetros microbiológicos mostrados en las tablas 3.1 y 3.4 respectivamente. En concreto se determina pH, temperatura, oxígeno disuelto, conductividad DQO, COD, fósforo, nitritos, nitratos, nitrógeno amoniacal, SS, ST, turbidez, coliformes totales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*

aureus, *Enterococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Clostridium perfringens* y *Salmonella* spp. Los análisis de bacterias se realizan en un tiempo inferior a 24 horas.

En la figura 4.17 se muestra el esquema de la planta de tratamiento con los puntos de muestreo seleccionados tanto en la línea de aguas como en la de fangos (Mi) y en la figura 4.18 se muestran imágenes de algunos de los puntos de muestreo.

Se analizan 3 muestras de agua (M1, M4 y M6 de la figura 4.17) y se estima que se cultivan aproximadamente 140 placas para el recuento de microorganismos, en cada una de las campañas. Por otro lado, se analizan 4 muestras de fangos (M2, M3 y M5) y se estima que se cultivan aproximadamente 190 placas para el recuento de microorganismos, en cada una de las campañas.

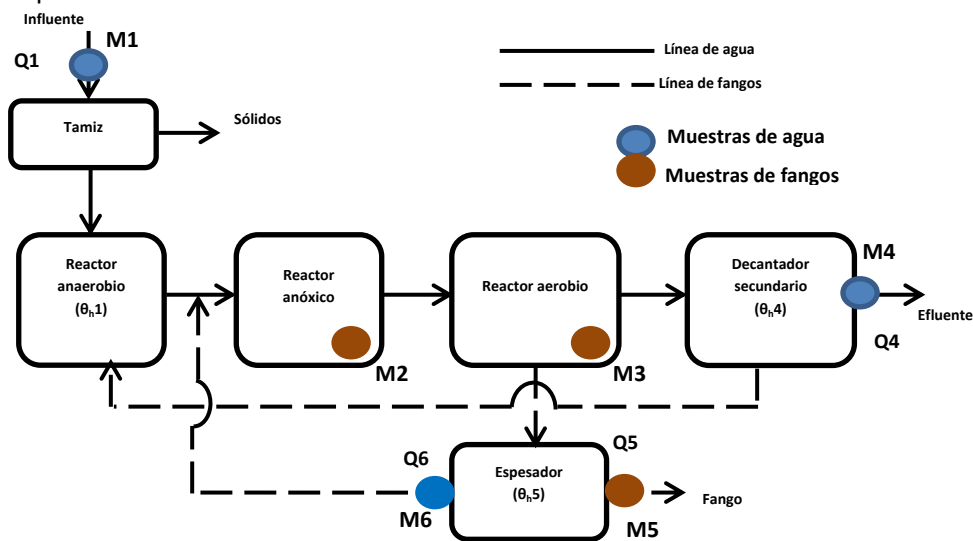


Figura 4.17: Puntos de la toma de muestras (Mi) en las líneas de tratamiento de la EDAR 3
 Qi: Caudal en el punto i; θ_i : tiempo de retención en la instalación i



Figura 4.18: Imágenes de algunos puntos de muestreo. a) Entrada (M1); b) Efluente (M4);
 c) Salida del espesador (M5)

En la figura 4.19 se muestra la ubicación de los puntos de muestreo aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la EDAR 3.



Figura 4.19: Coordenadas de los puntos de muestreo en el río aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la EDAR 3

En la tabla 4.18 se muestran valores medios de caudales (Q_i) y tiempos de retención ($\theta_{h,i}$) en los procesos incluidos en las líneas de tratamiento (Nilsa, 2017). Por otro lado, se realiza un balance de materia para determinar los gramos de fango por habitante equivalente y día tal y como se muestra en la ecuación 4.1 del apartado 4.2.1.

Tabla 4.18: Parámetros operacionales de la EDAR 3

PARÁMETRO	VALOR	
Q influente (m^3/d)	Q1	540
Q reactor anóxico, reactor de fangos y decantador secundario (m^3/d)	Q4	530
Q fangos producidos ($m^3/semana$)	Q5	50
Sequedad fangos tratados (%)	-	3.5
Q recirculación del espesador al reactor (m^3/d)	Q6	250
θ_h reactor anóxico (h)	θ_{h1}	7
θ_h decantador secundario (h)	θ_{h4}	8
θ_h espesador (h)	θ_{h5}	12
g fango por habitante equivalente y día	-	40

Q: Caudal θ_h : Tiempo de residencia

4.4.2 Resultados de caracterización de aguas y fangos a lo largo de la línea de tratamiento

Las tablas 4.19 y 4.20 muestran los resultados de valores promedio de los parámetros físico-químicos determinados en muestras de las líneas de tratamiento de aguas y muestras de los reactores de fangos y de la línea de tratamiento de fangos.

Tal y como se observa en la tabla 4.19 el proceso de depuración elimina aproximadamente un 97% de fósforo, un 77% de nitratos, 44% de nitritos y un 98% de nitrógeno amoniacal en la línea de tratamiento de agua. Así mismo se eliminan SS en un 92%, 94% de turbidez, 97% de DQO y 98% de COD.

Tabla 4.19: Resultados promedio de parámetros físico-químicos en muestras de agua de la EDAR 3

	M1	M4	M6
pH	7.3	7.3	7.0
Conductividad ($\mu S/cm$)	3100	1900	1100
O ₂ disuelto (mg/l)	4.1	5.7	3.0
Temperatura (°C)	20.7	20.6	20.0
DQO (mgO ₂ /l)	1200	36	600
COD (mg/l)	360	9	41
Turbidez (UNT)	135	9	22
SS (mg/l)	260	22	80
Nitratos (mg/l)	104	24	-
Nitritos (mg/l)	45	25	33
N amoniacal (mg/l)	52	<5	21
Fósforo (mg/l)	8	0,3	11

En las muestras de los reactores biológicos y de la línea de tratamiento fangos (tabla 4.20), los parámetros analizados muestran que en la caracterización de los cultivos en suspensión se obtienen valores similares de turbidez, conductividad y sólidos totales.

Tabla 4.20: Resultados promedio de parámetros físico-químicos en muestras de fangos de la EDAR 3

	M2	M3	M5
pH	7.0	6.7	7.0
Conductividad (µS/cm)	1600	1400	1200
Oxígeno disuelto (mg/l)	1.6	4.7	-
Temperatura (°C)	15.0	14.4	-
Turbidez (UNT)	600	786	9570
ST (g/l)	6.0	6.5	20.8
Nitritos (mg/l)	-	-	15
N amoniacal (mg/l)	20	2	170
Fósforo (mg/l)	-	-	56

La tabla 4.21 muestra los resultados de los parámetros microbiológicos obtenidos en muestras de agua, en las tres primeras campañas realizadas.

Tabla 4.21: Caracterización microbiológica de muestras de agua de la EDAR 3 (UFC/100ml)

		M1	M4	M6
Coliformes totales	1ª campaña	2.0 ± 1.5E+07	6.0 ± 3.0E+05	5.7 ± 2.4E+05
	2ª campaña	1.9 ± 0.8E+08	7.3 ± 1.5E+05	1.2 ± 0.1E+06
	3ª campaña	2.0 ± 0.1E+08	3.3 ± 0.7E+06	2.4 ± 0.8E+06
<i>Escherichia coli</i>	1ª campaña	3.4 ± 1.8E+06	1.1 ± 0.5E+05	1.2 ± 0.1E+05
	2ª campaña	2.5 ± 1.6E+07	3.0 ± 2.6E+04	1.0 ± 0.1E+06
	3ª campaña	4.5 ± 1.5E+07	1.0 ± 0.1E+05	2.9 ± 1.6E+05
<i>Staphylococcus aureus</i>	1ª campaña	1.1 ± 0.2E+06	8.9 ± 5.0E+03	<1.0E+03
	2ª campaña	1.0 ± 0.4E+06	9.8 ± 3.4E+02	1.2 ± 0.1E+06
	3ª campaña	2.2 ± 1.0E+05	8.5 ± 1.1E+03	9.0 ± 0.1E+03
<i>Enterococcus sp.</i>	1ª campaña	5.7 ± 0.6E+06	5.9 ± 0.3E+04	<1.0E+03
	2ª campaña	8.1 ± 2.9E+06	3.8 ± 0.4E+04	3.7 ± 0.1E+06
	3ª campaña	6.9 ± 0.9E+06	2.2 ± 0.9E+04	1.7 ± 0.2E+05
<i>Pseudomonas sp.</i>	1ª campaña	1.9 ± 0.5E+07	3.0 ± 0.8E+05	1.4 ± 0.4E+05
	2ª campaña	1.4 ± 0.3E+08	1.7 ± 0.2E+05	3.8 ± 0.1E+07
	3ª campaña	2.4 ± 0.2E+08	1.9 ± 1.0E+06	2.1 ± 0.1E+06
<i>Clostridium perfringens</i> (esporas)	1ª campaña	2.0 ± 0.3E+04	6.0 ± 0.3E+03	-
	2ª campaña	1.1 ± 0.3E+06	4.0 ± 0.3E+03	-
	3ª campaña	5.0 ± 0.3E+05	6.0 ± 0.3E+04	-
<i>Clostridium perfringens</i> (vegetativas)	1ª campaña	2.5 ± 0.3E+04	1.0 ± 0.3E+03	-
	2ª campaña	1.0 ± 0.3E+05	2.0 ± 0.3E+03	-
	3ª campaña	5.0 ± 0.3E+05	3.0 ± 0.3E+04	-
<i>Salmonella spp.</i>	1ª campaña	No detectado en 50ml	No detectado en 50 ml	-
	2ª campaña	No detectado en 50ml	No detectado en 50 ml	-
	3ª campaña	Presencia en 50ml	Presencia en 50ml	-



La figura 4.20 muestra los valores promedio de la concentración microbiológica de la tabla 4.21 a lo largo de la línea de tratamiento de aguas (M1-M4). Los resultados de *Salmonella spp.* no se representan por ser cualitativos.

Tal y como muestran los resultados, a la entrada de la depuradora (M1), la concentración microbiológica varía entre 10⁴-10⁸ UFC/100ml en función del microorganismo. Las concentraciones más elevadas se corresponden con coliformes totales y *Pseudomonas sp.*, con

10^7 - 10^8 UFC/100ml seguidas de *E.coli*, *Enterococcus sp.*, *S.aureus* y por último *C.perfringens* 10^4 - 10^6 UFC/100ml. En concreto, las bacterias presentes en mayor concentración son Gram negativas mientras que las bacterias Gram positivas analizadas, *Enterococcus sp.*, *S.aureus* y *C.perfringens* están presentes en concentraciones entre 1 y 3 órdenes de magnitud menor. Las diferencias en los rangos de concentración microbiológica observadas entre ambos grupos podrían deberse tanto a su abundancia como a la persistencia de cada grupo de bacterias en el agua residual bruta. La reducción neta para cada microorganismo a lo largo de la línea de aguas es de entre 1 y 3 órdenes de magnitud y puntualmente puede llegar a 4 órdenes de magnitud.

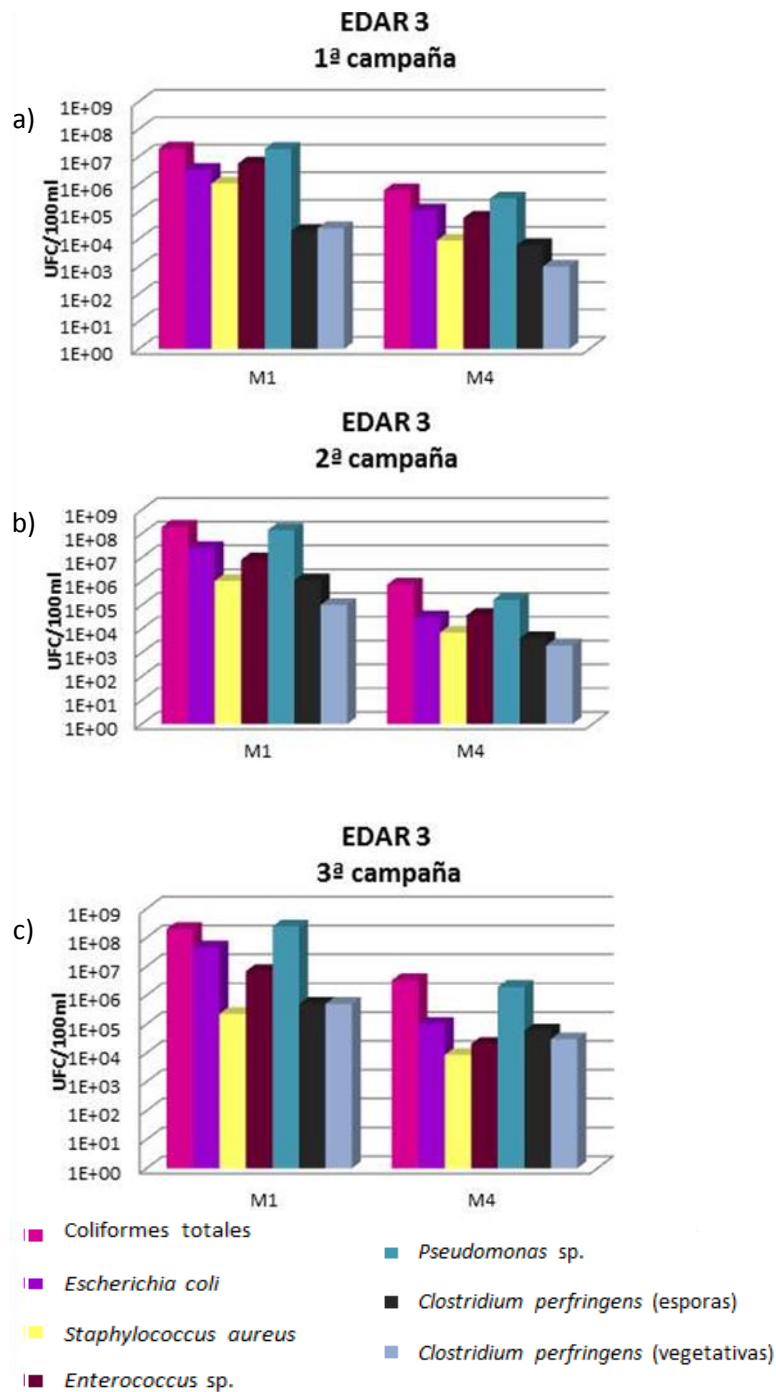


Figura 4.20: Caracterización microbiológica a lo largo de la línea de tratamiento de aguas de la EDAR 3. a) Primera campaña; b) Segunda campaña; c) Tercera campaña

Analizando la línea de tratamiento se observa que en el efluente (M4) la concentración microbiológica es de entre 10^2 - 10^6 UFC/100ml. Por otro lado, la concentración en M6 es inferior a la determinada en M2 (tabla 4.22) con una concentración entre 10^3 - 10^7 UFC/100ml. Al comparar los resultados obtenidos para las tres campañas en cada punto de muestreo estudiado, se observa por lo general que la concentración de cada bacteria pueden variar hasta dos órdenes de magnitud entre una campaña y otra. Las variaciones entre campañas pueden relacionarse con la temperatura a la que se realizan los muestreos, que difiere en función de la época del año, siendo las concentraciones algo menores en la segunda campaña coincidiendo con mayores temperaturas. Por otro lado *E.coli*, *S.aureus* y *C.perfringens* son las bacterias en las que se detectan mayores variaciones de concentración en las diferentes campañas para un mismo punto. Los resultados del análisis de *Salmonella* spp. en la línea de aguas muestran que en la campaña en la que se detecta esta bacteria a la entrada de planta se detecta también a la salida por lo que el tratamiento no consigue eliminar su presencia por debajo de los límites de detección.

La tabla 4.22 muestra el valor promedio de los resultados obtenidos del control microbiológico en muestras de fango en el reactor anóxico (M2), aerobio (M3) y a la salida del espesador (M5). La concentración microbiológica en los reactores es de entre 10^4 - 10^8 UFC/g y no varía notablemente entre campañas.

Tabla 4.22: Caracterización microbiológica de muestras de fangos de la EDAR 3 (UFC/g)

		M2	M3	M5
Coliformes totales	1ª campaña	$1.2 \pm 0.1E+08$	$3.6 \pm 0.3E+08$	$7.5 \pm 0.4E+07$
	2ª campaña	$2.7 \pm 0.2E+08$	$1.3 \pm 0.2E+08$	$7.4 \pm 0.5E+07$
	3ª campaña	$1.9 \pm 0.1E+08$	$9.7 \pm 1.1E+07$	$>1.5E+06$
<i>Escherichia coli</i>	1ª campaña	$2.9 \pm 0.1E+06$	$6.8 \pm 0.2E+06$	$1.4 \pm 0.6E+06$
	2ª campaña	$2.3 \pm 0.1E+07$	$1.1 \pm 0.1E+06$	$1.0 \pm 0.2E+06$
	3ª campaña	$6.7 \pm 6.3E+06$	$7.7 \pm 3.6E+06$	$>1.7E+05$
<i>Staphylococcus aureus</i>	1ª campaña	$2.2 \pm 0.9E+06$	$1.5 \pm 0.8E+06$	$2.1 \pm 0.9E+06$
	2ª campaña	$1.4 \pm 0.3E+06$	$7.1 \pm 0.3E+05$	$1.2 \pm 0.2E+06$
	3ª campaña	$1.4 \pm 0.1E+06$	$5.0 \pm 0.9E+05$	$1.4 \pm 0.5E+06$
<i>Enterococcus</i> sp.	1ª campaña	$1.2 \pm 0.1E+07$	$5.7 \pm 0.4E+06$	$9.6 \pm 5.9E+06$
	2ª campaña	$8.5 \pm 1.9E+06$	$3.7 \pm 2.1E+06$	$3.7 \pm 1.2E+06$
	3ª campaña	$8.1 \pm 0.2E+06$	$3.6 \pm 0.7E+06$	$3.2 \pm 0.4E+07$
<i>Pseudomonas</i> sp.	1ª campaña	$3.5 \pm 0.4E+07$	$1.8 \pm 0.3E+07$	$2.1 \pm 0.3E+07$
	2ª campaña	$8.0 \pm 4.3E+07$	$3.8 \pm 1.7E+07$	$3.8 \pm 0.9E+07$
	3ª campaña	$2.2 \pm 0.2E+08$	$6.4 \pm 2.2E+07$	$>1.5E+08$
<i>Clostridium perfringens</i> (esporas)	1ª campaña	$3.0 \pm 0.3E+06$		
	2ª campaña	$1.5 \pm 0.3E+04$	-	-
	3ª campaña	$7.0 \pm 0.3E+06$		
<i>Clostridium perfringens</i> (vegetativas)	1ª campaña	$2.0 \pm 0.3E+06$		
	2ª campaña	$1.2 \pm 0.3E+04$	-	-
	3ª campaña	$1.0 \pm 0.3E+06$		
<i>Salmonella</i> spp.	1ª campaña	No detectado en 50g		
	2ª campaña	No detectado en 50g		
	3ª campaña	Presencia en 50g		

$\geq 10^8$	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	$\leq 10^1$
-------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	-------------

4.4.3 Estimación del impacto del vertido sobre la calidad microbiológica del cauce receptor

La tabla 4.23 muestra los resultados obtenidos en el análisis de las muestras de agua de la cuarta campaña y en el río receptor del efluente de la EDAR, aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido.

Tabla 4.23: Caracterización microbiológica en el influente y efluente de la EDAR 3 y en el cauce aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido (UFC/100ml)

	M1	M4	Aguas arriba	Aguas abajo
Coliformes totales	1.1 ± 0.2E+08	1.3 ± 0.6E+06	3.0 ± 0.5E+05	1.5 ± 0.1E+05
<i>Escherichia coli</i>	2.1 ± 1.0E+07	4.9 ± 3.2E+05	1.1 ± 0.7E+04	8.5 ± 7.3E+03
<i>Staphylococcus aureus</i>	5.5 ± 5.0E+03	1.7 ± 1.6E+03	5.8 ± 2.9E+02	2.6 ± 2.2E+03
<i>Enterococcus sp.</i>	3.2 ± 0.4E+06	2.9 ± 1.4E+04	6.7 ± 0.7E+02	1.1 ± 0.6E+03
<i>Pseudomonas sp.</i>	3.0 ± 0.4E+07	2.8 ± 1.0E+05	4.9 ± 0.9E+04	3.0 ± 1.0E+04



A partir de los resultados de la tabla 4.23 se calculan las cargas microbiológicas (UFC/d) tanto en el influente y efluente de cada EDAR como en puntos aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido. Los datos tanto del caudal tratado en la EDAR como del río el día que se toma la muestra son los detallados en la tabla 4.24. El dato de caudal del río receptor se obtiene a partir del Sistema Automático de Información Hidrológica de la Cuenca Hidrográfica del Ebro.

Tabla 4.24: Caudales tratados en la EDAR 3 y caudales en el cauce del río

PARÁMETRO	VALOR
Q tratado (m ³ /d)	529
Q río receptor (m ³ /d)	79920
Distancia EDAR-estación aforo (km)	0,2
Ratio caudal río receptor/caudal tratado EDAR	151

La figura 4.21 muestra la evolución de la carga microbiológica en los diferentes puntos para las bacterias analizadas.

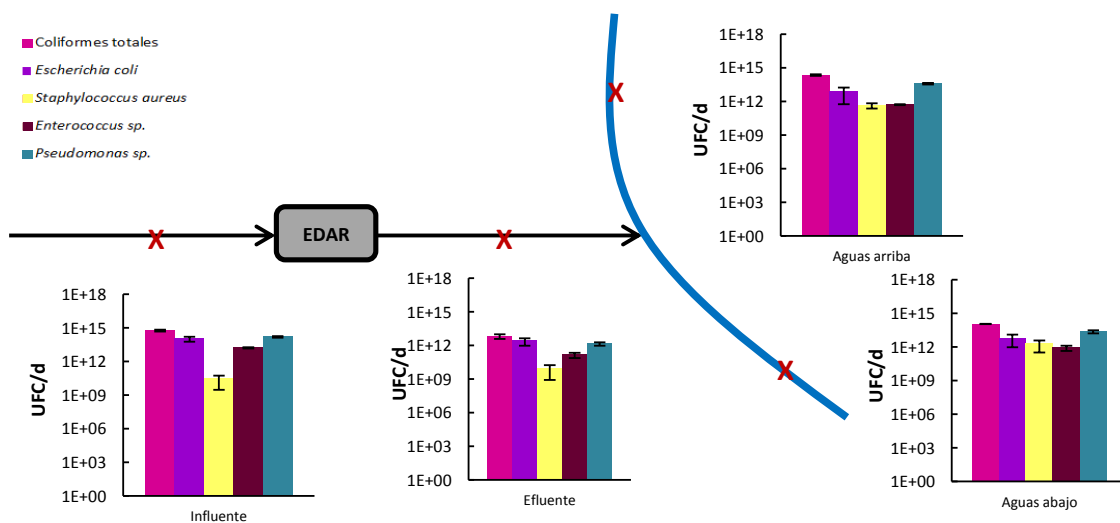


Figura 4.21: Cargas microbiológicas (UFC/d) en el influente y efluente de la EDAR 3 y en el cauce

Tal y como se observa en la figura 4.21, la reducción neta de los microorganismos tras el tratamiento de depuración es de entre 1-2 órdenes de magnitud. Si se comparan los resultados de carga microbiológica aguas arriba y aguas abajo del vertido de la EDAR se observa como apenas existe influencia destacable de dicho vertido en la calidad microbiológica del cauce receptor.

4.5 CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA EN LA EDAR 4

4.5.1 Descripción de la planta de tratamiento, toma de muestras y parámetros de caracterización

La EDAR 4 recibe aguas residuales de origen doméstico y de origen industrial de empresas conserveras y de manipulación de alimentos vegetales y asimilables a urbanas que en época de campaña pueden llegar a duplicar la carga tratada. La población censada es de 2443 habitantes en 2015 y la carga tratada es de 15900 habitantes equivalentes. El caudal industrial es aproximadamente de 112000 m³/año, lo que puede suponer un 70% de la carga orgánica que entra en la EDAR. El cauce receptor del vertido es el río Ebro.

La figura 4.22 muestra el plano esquemático de la planta y una vista real de la misma. En la tabla 4.25 se detallan los datos de diseño de caudal y carga, así como medias anuales de caudal y carga de tratamiento (Nilsa, 2017).

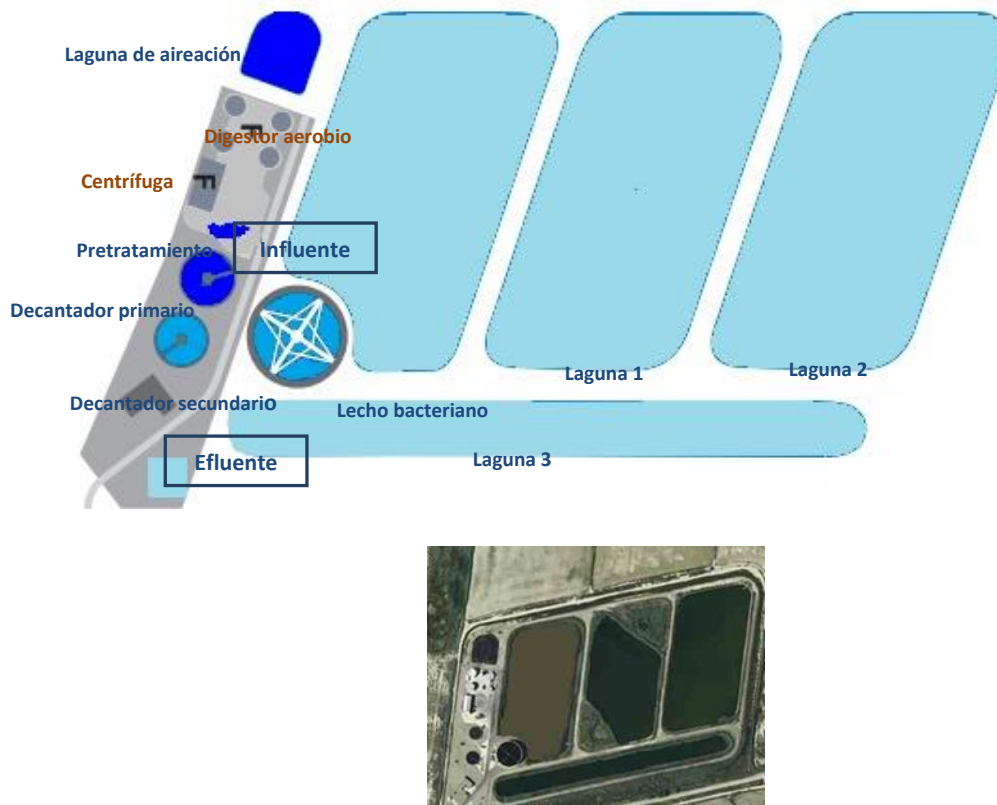


Figura 4.22: Dibujo esquemático de la EDAR 4 y vista real

Tabla 4.25: Caudal y carga de diseño y valores reales medios de tratamiento de la EDAR 4

PARAMETRO	VALOR
Caudal de diseño (m ³ /d)	3500
Caudal tratado medio (m ³ /d)	3000
Carga de diseño (kg DBO ₅ /d)	3000
Carga media tratada (kg DBO ₅ /d)	2600

En la figura 4.23 se detalla el diagrama del tratamiento de depuración así como las dimensiones de algunas de las instalaciones.

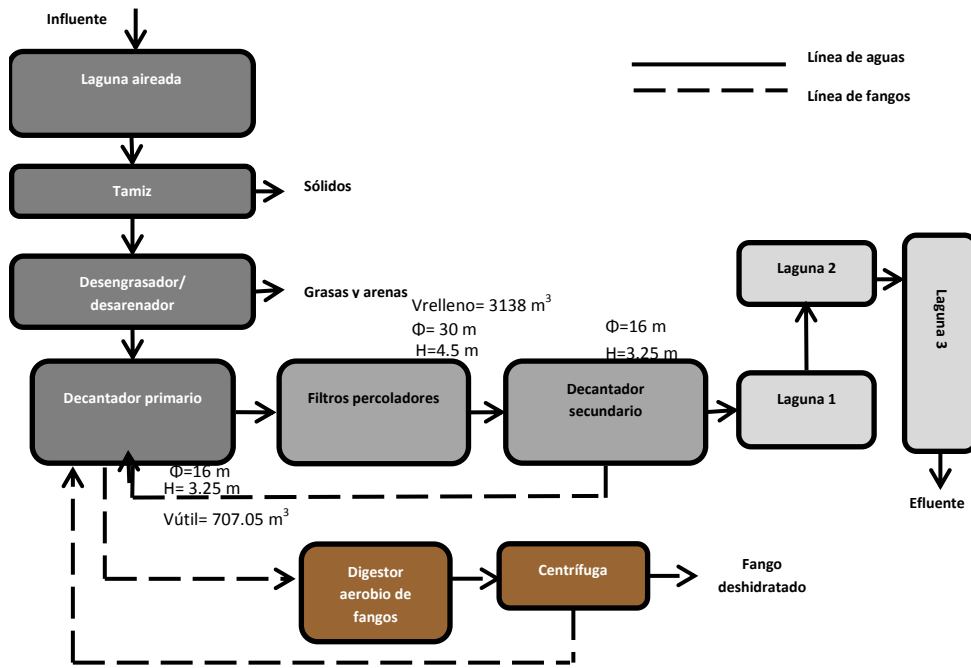


Figura 4.23: Etapas de la EDAR 4

Tal y como muestran las figuras 4.22 y 4.23, la depuradora consta de los procesos o etapas que se incluyen a continuación.

Línea de tratamiento de aguas:

- Laguna aireada
- Bombeo de entrada a la planta
- Pretratamiento: tamiz+desengrasado/desarenado
- Decantación primaria
- Tratamiento biológico de lecho bacteriano (filtros percoladores)
- Decantación secundaria
- Tratamiento terciario mediante lagunaje aerobio

Línea de tratamiento de fangos:

- Tratamiento aerobio a temperaturas entre 35-60°C.
- Centrifugación

La toma de muestras se realiza en días en los que la planta opera en régimen estacionario, no realizándose aquellos días en los que se detectan incidencias como lluvias intensas, vertidos no controlados, etc. Se realizan 4 campañas de muestreo. En las 3 primeras campañas se toman muestras en puntos a lo largo de la línea de tratamiento de aguas y fangos y en la cuarta campaña se toman muestras en el influente y efluente de la EDAR así como aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la planta. Los días seleccionados son:

Campaña 1: el 2 de diciembre de 2014 entre las 10:00 y las 12:00h. Tª: 10.3°C

Campaña 2: el 20 de abril de 2015 entre las 11:00 y las 12:30h. Tª: 14.6°C

Campaña 3: el 29 de septiembre de 2015 entre las 10:00 y las 11:00h. Tª: 17.8°C

Campaña 4: el 22 de mayo de 2017 entre las 10: 00h y las 11:00h. Tª: 22.9°C

El protocolo para la toma de muestras es el indicado en las norma UNE EN ISO 5667-3:2013 y UNE-EN ISO 5667-13:2011 (ISO y AENOR 2011; ISO y AENOR 2013). Se utilizan recipientes estériles de 150 y 500 ml para el análisis de bacterias y recipientes no estériles para el análisis de parámetros físico-químicos. Las muestras son líquidas, semisólidas o sólidas y se transportan refrigeradas hasta su análisis. Se determinan parámetros físico-químicos y parámetros microbiológicos mostrados en las tablas 3.1 y 3.4 respectivamente. En concreto se determina pH, temperatura, oxígeno disuelto, conductividad DQO, COD, fósforo, nitritos, nitratos, nitrógeno amoniacal, SS, ST, turbidez, coliformes totales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Clostridium perfringens* y *Salmonella* spp. Los análisis de bacterias se realizan en un tiempo inferior a 24 horas.

En la figura 4.24 se muestra el esquema de la planta de tratamiento con los puntos de muestreo seleccionados tanto en la línea de aguas como en la de fangos (Mi) y en la figura 4.25 se muestran imágenes de algunos de los puntos de muestreo.

Se analizan 7 muestras de agua (M1-M6 y M10 de la figura 4.24). Considerando sus respectivas diluciones (3 al menos), se estima que se cultivan aproximadamente 320 placas para el recuento de microorganismos, en cada una de las campañas. Por otro lado, se analizan 3 muestras de fangos (M7-M9 de la figura 4.24) y se estima que se cultivan aproximadamente 140 placas para el recuento de microorganismos, en cada una de las campañas. En el caso de M9, que es fango deshidratado, se realiza un pretratamiento de la muestra antes de caracterizarla. En concreto, se prepara en el laboratorio una suspensión inicial pesando aproximadamente 10 g de muestra y disolviéndola en 90 ml de agua de dilución estéril. Se agita a 3500 rpm durante 20 min para obtener la muestra inicial de análisis.

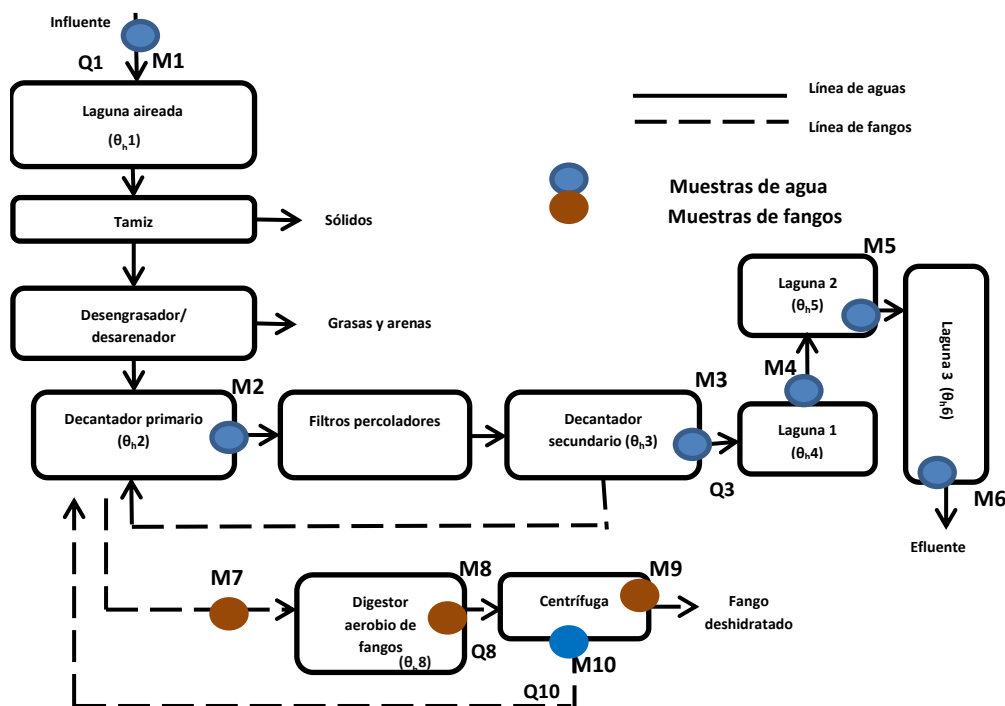


Figura 4.24: Puntos de la toma de muestras (Mi) en las líneas de tratamiento de la EDAR 4
 Q_i : Caudal en el punto i; $\theta_{h,i}$: tiempo de retención en la instalación i



Figura 4.25: Imágenes de algunos puntos de muestreo. a) Salida decantador secundario (M3); b) Salida laguna 2 (M5); c) Salida centrífuga de fangos (M9)

En la figura 4.26 se muestra la ubicación de los puntos de muestreo aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la EDAR 4.



Figura 4.26: Coordenadas de los puntos de muestreo en el río aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la EDAR 4

En la tabla 4.26 se muestran valores medios de caudales (Q_i) y tiempos de retención (θ_{hi}) en los procesos incluidos en las líneas de tratamiento (Nilsa, 2017). Por otro lado, se realiza un balance de materia para determinar los gramos de fango por habitante equivalente y día tal y como se muestra en la ecuación 4.1 del apartado 4.2.1.

Tabla 4.26: Parámetros operacionales de la EDAR 4

PARÁMETRO	VALOR
Q influente (m^3/d)	Q1 3060
Q salida decantador secundario (m^3/d)	Q3 3000
Q fangos tratados ($m^3/semana$)	Q8 400
Sequedad fangos tratados (%)	- 3
Q recirculación de centrífuga a decantador primario (m^3/d)	Q10 75
θ_h laguna aireada (h)	θ_{h1} 8
θ_h decantación primaria (h)	θ_{h2} 5
θ_h decantador secundario (h)	θ_{h3} 5
θ_h lagunas1 (d)	θ_{h4} 4
θ_h lagunas2 (d)	θ_{h4} 4
θ_h lagunas3 (d)	θ_{h4} 2
θ_h digestor aerobio (d)	θ_{h8} 6
g fango por habitante equivalente y día	- 32

Q: Caudal

θ_h : Tiempo de residencia

4.5.2 Resultados de caracterización de aguas y fangos a lo largo de la línea de tratamiento

Las tablas 4.27 y 4.28 muestran los resultados promedio de los parámetros físico-químicos determinados en muestras de la línea de tratamiento de aguas y fangos.

Tabla 4.27: Resultados promedio de parámetros físico-químicos en muestras de agua de la EDAR 4

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M10
pH	7.3	7.3	7.5	7.5	7.3	7.7	7.3
Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	1900	2000	1900	2200	2700	950	1000
O₂ disuelto (mg/l)	4.1	3.1	6.6	2.9	5.2	4.1	3.8
Temperatura (°C)	15.4	16.3	17.4	15.6	15.4	17.5	14.3
DQO (mgO₂/l)	770	520	66	32	46	63	450
COD (mg/l)	230	100	27	16	15	14	60
Turbidez (UNT)	150	213	31	7.8	2.4	2.2	220
SS (mg/l)	180	80	35	50	35	20	10
Nitratos (mg/l)	10	10	14	20	17	14	-
Nitritos (mg/l)	30	0	14	13	41	49	-
N amoniacal (mg/l)	100	83	14	23	16	14	1200
Fósforo (mg/l)	6	4	3	3	5	3	-

Tal y como se observa en la tabla 4.27, de manera global, el COD se reduce en un 94%, DQO en un 91%, SS en un 85%, nitratos y nitritos aumentan en la línea de aguas y el nitrógeno amoniacal se reduce en un 86% a lo largo del proceso.

Tabla 4.28: Resultados promedio de parámetros físico-químicos en muestras de fangos de la EDAR 4

	M7	M8	M9
pH	7.3	7.3	7.3
Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	3800	3800	14500
Turbidez (UNT)	3600	3600	-
ST (mg/l)	26	22	20 g/100 g muestra
N amoniacal (mg/l)	500	1100	2900

En la tabla 4.28 se observa que los valores de pH son iguales y sólidos totales son similares a la entrada y la salida del tratamiento aerobio (M7 y M8). Por otro lado, se obtienen resultados elevados de concentración de nitrógeno amoniacal en los fangos tras el tratamiento de deshidratación (M9).

La tabla 4.29 muestra los resultados de los parámetros microbiológicos obtenidos en muestras de agua, en las tres primeras campañas realizadas.

La figura 4.27 muestra los valores promedio de las concentraciones microbiológicas (M1-M6) de la tabla 4.29. Los resultados de *Salmonella* spp. no se representan por ser cualitativos.

Tal y como muestran los resultados, a la entrada de la depuradora (M1), la concentración microbiológica varía entre 10^3 - 10^8 UFC/100ml en función del microorganismo. Las concentraciones más elevadas se corresponden con coliformes totales y *Pseudomonas* sp., con 10^7 - 10^8 UFC/100ml, seguidas de *E.coli*, *Enterococcus* sp., *S.aureus* y por último *C.perfringens* con una concentración de 10^3 - 10^5 UFC/100ml. En concreto, las bacterias presentes en mayor concentración son Gram negativas mientras que las bacterias Gram positivas analizadas, *Enterococcus* sp., *S.aureus* y *C.perfringens* están presentes en concentraciones hasta 5 órdenes de magnitud menor.

Tabla 4.29: Caracterización microbiológica de muestras de agua de la EDAR 4 (UFC/100ml)

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M10
Coliformes totales	2.2 ± 0.4E+08	1.2 ± 0.3E+08	2.1 ± 0.1E+07	1.9 ± 0.3E+06	1.9 ± 0.1E+05	2.6 ± 0.5E+04	2.6 ± 0.3E+06
1ª campaña	5.4 ± 3.2E+07	2.1 ± 0.2E+08	3.9 ± 1.6E+06	1.2 ± 0.2E+05	3.7 ± 3.3E+03	1.4 ± 0.2E+04	3.8 ± 1.7E+06
2ª campaña	1.8 ± 0.2E+08	7.9 ± 4.1E+06	3.7 ± 1.9E+06	8.2 ± 4.0E+03	7.8 ± 3.3E+03	3.3 ± 2.2E+04	5.0 ± 2.6E+05
3ª campaña	3.0 ± 2.9E+06	2.0 ± 1.4E+06	8.0 ± 1.4E+05	<1.0E+04	2.0 ± 0.3E+03	1.0 ± 0.1E+03	6.0 ± 0.7E+04
Escherichia coli	3.8 ± 2.0E+06	1.8 ± 0.7E+06	<1.0E+03	2.0 ± 0.7E+03	<2.0E+01	<1.0E+02	7.7 ± 0.4E+05
1ª campaña	7.0 ± 2.1E+06	7.0 ± 1.8E+05	9.0 ± 2.7E+04	1.0 ± 0.3E+02	<2.0E+01	<2.0E+01	1.0 ± 0.4E+05
2ª campaña	1.3 ± 0.5E+06	1.3 ± 0.1E+06	1.1 ± 0.7E+05	6.2 ± 2.5E+03	3.5 ± 1.4E+03	1.2 ± 0.5E+03	3.0 ± 1.2E+03
3ª campaña	4.5 ± 1.1E+07	>3.0E+05	2.0 ± 0.7E+03	1.2 ± 0.5E+03	2.0 ± 0.7E+02	2.4 ± 0.8E+02	8.7 ± 4.7E+05
Staphylococcus aureus	1.6 ± 0.8E+06	8.0 ± 0.6E+04	4.9 ± 0.2E+04	3.5 ± 0.7E+03	4.8 ± 2.3E+02	1.1 ± 0.2E+03	3.1 ± 0.4E+05
1ª campaña	4.8 ± 0.3E+06	2.8 ± 0.8E+06	1.6 ± 0.2E+05	>3.0E+02	1.5 ± 0.4E+02	2.5 ± 0.7E+02	8.4 ± 1.4E+04
2ª campaña	1.3 ± 0.3E+07	2.1 ± 0.1E+06	5.0 ± 1.3E+03	<1.0E+02	<5.0E+00	<5.0E+00	1.4 ± 0.4E+05
3ª campaña	3.3 ± 1.3E+06	2.0 ± 0.4E+05	3.3 ± 1.3E+04	1.6 ± 0.3E+02	8.0 ± 3.1E+01	2.0 ± 0.7E+01	2.0 ± 1.4E+04
Pseudomonas sp.	3.0 ± 0.1E+08	2.4 ± 0.3E+08	1.5 ± 0.1E+07	6.2 ± 5.4E+06	6.2 ± 1.3E+04	1.3 ± 0.1E+04	3.9 ± 0.2E+06
1ª campaña	5.0 ± 1.6E+07	6.9 ± 1.7E+07	2.1 ± 1.1E+06	1.0 ± 0.2E+04	4.7 ± 0.9E+03	8.8 ± 0.2E+03	9.3 ± 2.4E+05
2ª campaña	3.7 ± 0.3E+07	1.4 ± 0.4E+06	3.2 ± 1.2E+06	7.6 ± 0.4E+04	1.6 ± 0.1E+03	3.4 ± 0.9E+03	1.2 ± 0.5E+06
3ª campaña	5.0 ± 0.3E+03	-	1.4 ± 0.3E+03	-	-	<1.0E+02	-
Clostridium perfringens (esporas)	1.0 ± 0.3E+04	-	-	-	-	<1.0E+03	-
1ª campaña	1.0 ± 0.3E+05	-	-	-	-	<1.0E+03	-
2ª campaña	4.7 ± 0.3E+03	-	1,1 ± 0.3E+03	-	-	<1.0E+02	-
3ª campaña	6.0 ± 0.3E+04	-	-	-	-	<1.0E+03	-
1ª campaña	2.5 ± 0.3E+04	-	-	-	-	<1.0E+03	-
Salmonella spp.	No detectado en 50ml	No detectado en 50ml	No detectado en 50ml	No detectado en 50ml	No detectado en 50ml	No detectado en 50ml	No detectado en 50ml
2ª campaña	Presencia en 50ml	-	-	-	-	No detectado en 50ml	-
3ª campaña	Presencia en 50ml	-	-	-	-	No detectado en 50ml	-

≥10⁸
10⁷
10⁶
10⁵
10⁴
10³
10²
≤10¹

todos los casos. Posteriormente, en el tratamiento terciario aerobio la concentración de microorganismos se reduce hasta una concentración cercana a 10^3 UFC/100ml en muchos casos en la primera laguna (M4). En la segunda laguna (M5) la reducción es similar a la laguna anterior, disminuyendo la concentración hasta dos órdenes de magnitud. Finalmente, a la salida del tratamiento después de la tercera laguna (M6), la concentración microbiológica de la mayoría de las bacterias es similar a la etapa anterior e incluso aumenta en el caso de coliformes totales en dos de las campañas y *S.aureus* en una de las campañas.

Al comparar los resultados obtenidos para las tres campañas en cada punto de muestreo estudiado, se observa por lo general que la concentración de cada bacteria puede tener variaciones entre campañas de 1-2 órdenes de magnitud, o incluso 3 órdenes (tabla 4.29). En concreto, *E.coli* y *Enterococcus* sp. son las bacterias en las que se detectan mayores variaciones de la concentración en las diferentes campañas para un mismo punto de muestreo. Por otro lado, M3 (salida de decantación secundaria) es donde menos homogeneidad hay entre campañas. La variación de concentración entre campañas está relacionada con la temperatura y la radiación solar en el momento de la toma de muestras. Se observa que la menor concentración tras el tratamiento terciario en M6 se determina cuando las temperaturas son mayores y en los meses del año en los que la radiación solar también es mayor, aumentando la efectividad del tratamiento terciario.

Los resultados del análisis de *Salmonella* spp. en la línea de tratamiento de aguas muestran que se detecta a la entrada de la planta pero no se detecta a la salida del tratamiento debido probablemente a la efectividad del tratamiento terciario que reduce su concentración por debajo del límite de detección o puede que se transfiera a la línea de fangos y prolifere en esas etapas.

La tabla 4.30 muestra el valor promedio de los resultados obtenidos del control microbiológico en muestras de fango a la entrada y la salida del tratamiento aerobio (M7 y M8) y en el fango tras la deshidratación (M9).

Tal y como se observa en la tabla 4.30 la concentración microbiológica a la entrada de la línea de fangos es de entre 10^5 - 10^{10} UFC/g. La mayor concentración detectada se corresponde con coliformes totales y *Pseudomonas* sp. Por otro lado, se detecta *Salmonella* spp. en todos los casos a la entrada del tratamiento aerobio lo que indica que es probable que se hayan transferido desde la línea de aguas a la línea de tratamiento de fangos. La concentración detectada a la entrada y a la salida del digestor (M7 y M8) es del mismo orden de magnitud en casos como *S.aureus* en todas las campañas o se reduce hasta cuatro órdenes de magnitud como en el caso de coliformes totales en la tercera campaña. Por otro lado, hay menos uniformidad entre campañas que en la línea de aguas, ya que se observan variaciones de hasta 4 órdenes de magnitud. Se detecta *Salmonella* spp. en el fango deshidratado de manera que el tratamiento aerobio no resulta efectivo en la eliminación de esta bacteria.

Tabla 4.30: Caracterización microbiológica de muestras de fangos de la EDAR 4 (UFC/g)

		M7	M8	M9
Coliformes totales	1ª campaña	>3.0E+08	1.7 ± 0.7E+08	1.9 ± 0.1E+08
	2ª campaña	4.1 ± 0.7E+07	1.9 ± 0.3E+07	5.0 ± 0.4E+06
	3ª campaña	1.2 ± 0.1E+08	<3.5E+04	5.6 ± 2.9E+04
<i>Escherichia coli</i>	1ª campaña	>5.5E+07	1.1 ± 0.2E+06	4.2 ± 0.7E+06
	2ª campaña	3.1 ± 1.3E+06	7.8 ± 3.7E+05	3.3 ± 1.4E+05
	3ª campaña	4.6 ± 2.7E+06	<3.5E+04	2.8 ± 1.2E+04
<i>Staphylococcus aureus</i>	1ª campaña	7.0 ± 2.7E+05	9.6 ± 4.5E+05	1.2 ± 0.5E+06
	2ª campaña	6.1 ± 1.3E+05	5.7 ± 1.8E+05	5.1 ± 2.8E+05
	3ª campaña	1.8 ± 0.8E+06	1.1 ± 0.6E+06	4.0 ± 0.2E+05
<i>Enterococcus sp.</i>	1ª campaña	6.8 ± 1.1E+07	5.4 ± 0.9E+06	1.0 ± 0.6E+07
	2ª campaña	1.4 ± 0.6E+07	6.4 ± 2.3E+06	5.8 ± 1.6E+06
	3ª campaña	>8.1E+06	<3.5E+03	7.3 ± 2.0E+04
<i>Pseudomonas sp.</i>	1ª campaña	>3.0E+10	7.0 ± 2.2E+07	2.0 ± 0.1E+08
	2ª campaña	2.6 ± 0.8E+07	1.8 ± 0.8E+06	1.8 ± 1.3E+06
	3ª campaña	8.8 ± 1.3E+07	<3.5E+04	5.6 ± 0.8E+04
<i>Clostridium perfringens</i> (esporas)	1ª campaña	4.0 ± 0.3E+05	-	2.0 ± 0.3E+05
	2ª campaña	1.5 ± 0.3E+06	-	2.8 ± 0.3E+06
	3ª campaña	1.0 ± 0.3E+07	-	2.0 ± 0.3E+07
<i>Clostridium perfringens</i> (vegetativas)	1ª campaña	4.0 ± 0.3E+05	-	3.6 ± 0.3E+05
	2ª campaña	1.9 ± 0.3E+06	-	1.9 ± 0.3E+06
	3ª campaña	2.0 ± 0.3E+07	-	9.0 ± 0.3E+07
<i>Salmonella spp.</i>	1ª campaña	Presencia en 50ml	-	Presencia en 50g
	2ª campaña	Presencia en 50ml	-	Presencia en 50g
	3ª campaña	Presencia en 50ml	-	Presencia en 50g



4.5.3 Estimación del impacto del vertido sobre la calidad microbiológica del cauce receptor

La tabla 4.31 muestra los resultados obtenidos en el análisis de las muestras de agua de la cuarta campaña y en el río receptor del efluente de la EDAR, aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido.

Tabla 4.31: Caracterización microbiológica en el influente y efluente de la EDAR 4 y en el cauce aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido (UFC/100ml)

	M1	M6	Aguas arriba	Aguas abajo
Coliformes totales	3.0 ± 0.9E+08	1.1 ± 0.2E+04	2.6 ± 0.3E+03	3.1 ± 0.1E+03
<i>Escherichia coli</i>	2.7 ± 0.4E+07	1.5 ± 0.2E+02	5.0 ± 0.8E+01	5.0 ± 0.8E+01
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.3 ± 2.2E+04	9.4 ± 0.9E+02	4.2 ± 1.6E+02	1.4 ± 0.5E+02
<i>Enterococcus sp.</i>	5.3 ± 1.1E+06	3.2 ± 1.7E+01	7.5 ± 2.1E+02	1.5 ± 0.3E+03
<i>Pseudomonas sp.</i>	3.3 ± 1.2E+08	8.4 ± 2.2E+03	9.0 ± 2.3E+02	9.0 ± 1.4E+02



A partir de los resultados de la tabla 4.31 se calculan las cargas microbiológicas (UFC/d) tanto en el influente y efluente de la EDAR como en el cauce aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido. Los datos tanto del caudal tratado en la EDAR como del río, el día que se toma la muestra son los detallados en la tabla 4.32. El dato de caudal del río receptor se obtiene a través del Sistema Automático de Información Hidrológica de la Cuenca Hidrográfica del Ebro.

Tabla 4.32: Caudales tratados en la EDAR 4 y caudales en el cauce del río

PARÁMETRO	VALOR
Q tratado (m ³ /d)	2249
Q río receptor (m ³ /d)	2937600
Distancia EDAR-estación aforo (km)	15
Ratio caudal río receptor/caudal tratado EDAR	1306

La figura 4.28 muestra la evolución de la carga microbiológica en los diferentes puntos para las bacterias analizadas.

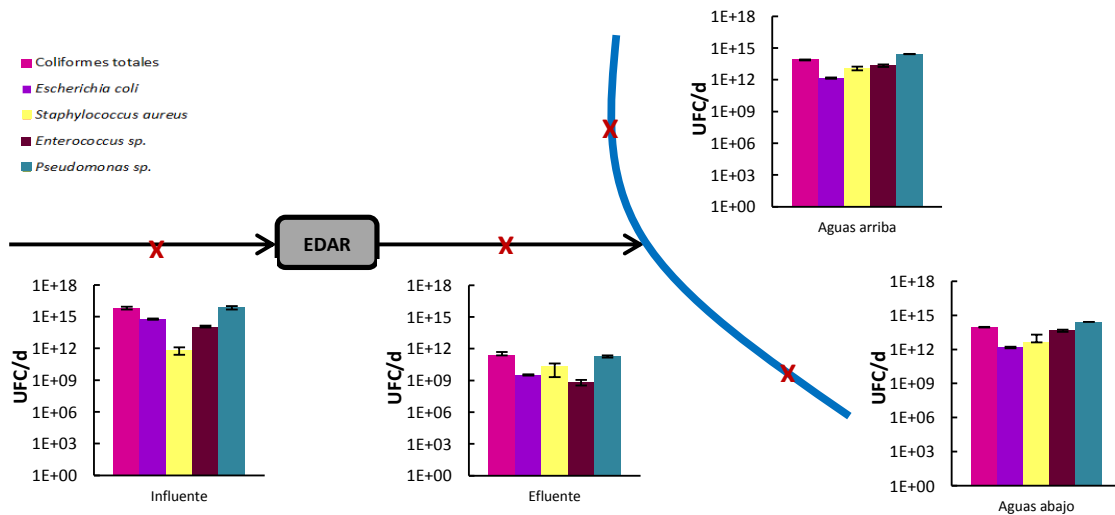


Figura 4.28: Cargas microbiológicas (UFC/d) en el influente y efluente de la EDAR 4 y en el cauce

Tal y como se observa en la figura 4.28, la reducción neta de los microorganismos tras el tratamiento de depuración es de 1-5 órdenes de magnitud. Si se comparan los resultados de carga microbiológica aguas arriba y aguas abajo del vertido de la EDAR, se observa como apenas existe influencia destacable de dicho vertido en la calidad microbiológica del cauce receptor.

4.6 CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA EN LA EDAR 5

4.6.1 Descripción de la planta de tratamiento, toma de muestras y parámetros de caracterización

La EDAR 5 recibe aguas residuales de origen urbano e industrial que proceden de un polígono de 13744 m² en el que las actividades principales son talleres de carpintería, mecánicos, elaboración de conservas vegetales y bodegas vinícolas. La población censada es de 1097 habitantes en 2015 y la carga tratada es de 5000 habitantes equivalentes. El caudal industrial es aproximadamente de 37000 m³/año y supone un 78% de la carga orgánica que entra en la EDAR. El cauce receptor del vertido es el río Queilés.

La figura 4.29 muestra el plano esquemático de la planta y una vista real de la misma y en la tabla 4.33 se detallan los datos de diseño de caudal y carga, así como medias anuales de caudal y carga de tratamiento (Nilsa, 2017).

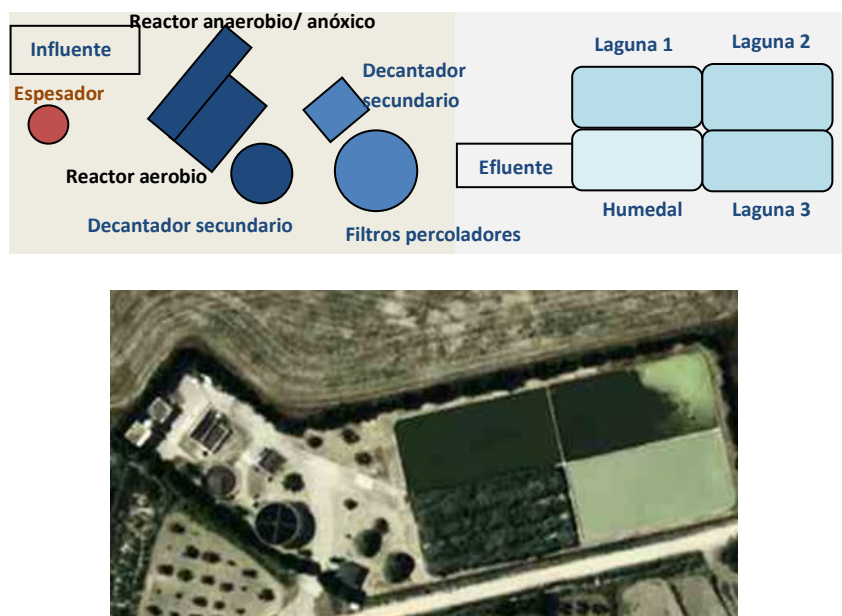


Figura 4.29: Dibujo esquemático de la EDAR 5 y vista real

Tabla 4.33: Caudal y carga de diseño y valores reales medios de tratamiento de la EDAR 5

PARÁMETRO	VALOR
Q diseño (m ³ /d)	690
Q tratado (m ³ /d)	600
Carga de diseño (kg DBO ₅ /d)	440
Carga tratamiento (kg DBO ₅ /d)	320

En la figura 4.30 se detalla el diagrama del tratamiento de depuración así como las dimensiones de algunas de las instalaciones.

Tal y como muestran las figuras 4.29 y 4.30, la depuradora consta de los procesos o etapas que se incluyen a continuación.

Línea de tratamiento de aguas:

- Bombeo de entrada a la planta
- Tratamiento biológico en suspensión anaerobio/anóxico/aerobio
- Decantación secundaria
- Tratamiento biológico de lecho bacteriano (filtros percoladores)
- Decantación secundaria
- Tratamiento terciario mediante lagunaje aerobio + humedal

Línea de tratamiento de fangos:

- Espesamiento de fangos

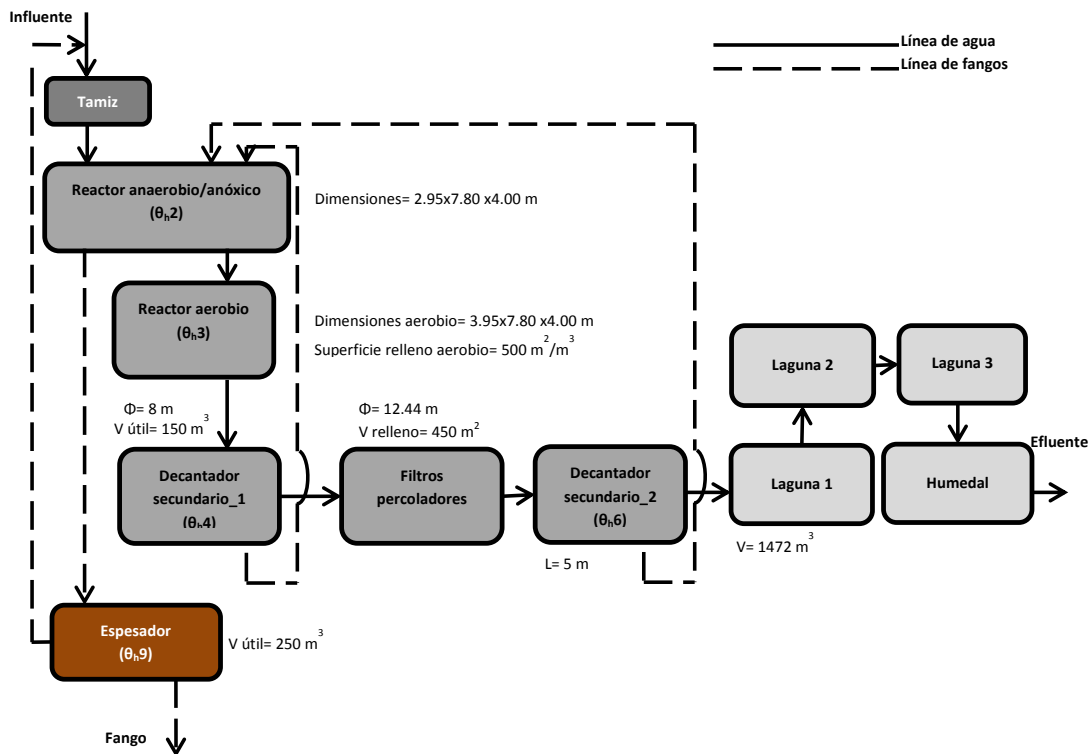


Figura 4.30: Etapas de la EDAR 5

Tal y como se observa en la figura 4.30, los fangos de salida del decantador secundario se reciclan al reactor anaerobio/anóxico. Por otro lado, el agua que sale del espesador se recicla a la entrada de planta.

La toma de muestras se realiza en días en los que la planta opera en régimen estacionario, no realizándose aquellos días en los que se detectan incidencias como lluvias intensas, vertidos no controlados, etc. Se realizan 4 campañas de muestreo. En las 3 primeras campañas se toman muestras en puntos a lo largo de la línea de tratamiento de aguas y fangos y en la cuarta campaña se toman muestras en el influente y efluente de la EDAR así como aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la planta. Los días seleccionados son:

Campaña 1: el 25 de noviembre de 2014 entre las 11:00 y las 12:00h. Tª: 14.4°C

Campaña 2: el 10 febrero de 2015 entre las 10:00 y las 11:00h. Tª: 3.8°C

Campaña 3: el 17 de noviembre de 2015 entre las 10:00 y las 11:00h. Tª: 9.0°C

Campaña 4: el 7 de junio de 2016 entre las 11:00 y las 12:00h. Tª: 24.4°C

El protocolo para la toma de muestras es el indicado en las norma UNE EN ISO 5667-3:2013 y UNE-EN ISO 5667-13:2011 (ISO y AENOR, 2011; ISO y AENOR, 2013). Se utilizan recipientes estériles de 150 y 500 ml para el análisis de bacterias y recipientes no estériles para el análisis de parámetros físico-químicos. Las muestras son líquidas o semisólidas y se transportan refrigeradas hasta su análisis. Se determinan parámetros físico-químicos y parámetros microbiológicos mostrados en las tablas 3.1 y 3.4 respectivamente. En concreto se determina pH, temperatura, oxígeno disuelto, conductividad DQO, COD, fósforo, nitritos, nitratos, nitrógeno amoniacal, SS, ST, turbidez, coliformes totales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Clostridium perfringens* y *Salmonella spp.* Los análisis de bacterias se realizan en un tiempo inferior a 24 horas.

En la figura 4.31 se muestra el esquema de la planta de tratamiento con los puntos de muestreo seleccionados tanto en la línea de aguas como en la de fangos (Mi) y en la figura 4.32 se muestran imágenes de algunos de los puntos de muestreo.

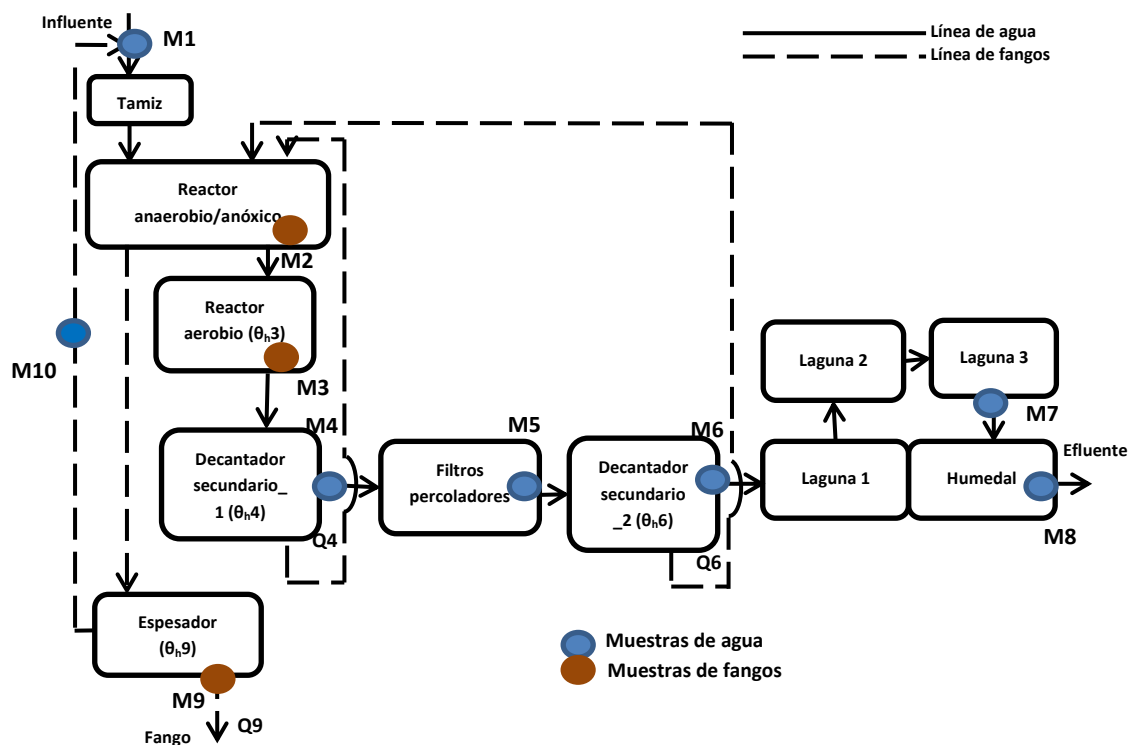


Figura 4.31: Puntos de la toma de muestras (Mi) en las líneas de tratamiento de la EDAR 5

Qi: Caudal en el punto i; θ_{ri} : tiempo de retención en la instalación i

Se analizan 7 muestras de agua (M1, M4-M8, M10 de la figura 4.31) y se estima que se cultivan aproximadamente 320 placas para el recuento de microorganismos, en cada una de las campañas. Por otro lado, se analizan 3 muestras de (M2, M3 y M9 de la figura 4.31) y se estima

que se cultivan aproximadamente 140 placas para el recuento de microorganismos, en cada una de las campañas.

En la tabla 4.34 se muestran valores medios de caudales (Q_i) y tiempos de retención (θ_{hi}) en los procesos incluidos en las líneas de tratamiento (Nilsa, 2017). Por otro lado, se realiza un balance de materia para determinar los gramos de fango por habitante equivalente y día tal y como se muestra en la ecuación 4.1 del apartado 4.2.1.

En la figura 4.33 se muestra la ubicación de los puntos de muestreo aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la EDAR 5.



Figura 4.32: Imágenes de algunos puntos de muestreo. a) Entrada (M1); b) Reactor aerobio (M3); c) Efluente (M8)

Tabla 4.34: Parámetros operacionales de la EDAR 5

PARÁMETRO		VALOR
Q salida decantador secundario_1 (m^3/d)	Q4	600
Q salida decantador secundario_2 (m^3/d)	Q6	600
Q fangos tratados ($m^3/semana$)	Q9	125
Sequedad fangos tratados (%)	-	3.75
θ_h reactor anaerobio/anóxico (h)	$\theta_{h,2}$	4
θ_h reactor aerobio (h)	$\theta_{h,3}$	5
θ_h decantador secundario_1(h)	$\theta_{h,4}$	6
θ_h decantador secundario_2 (h)	$\theta_{h,6}$	2
θ_h espesador (d)	$\theta_{h,9}$	<1
g fango por habitante equivalente y día	-	26

Q: Caudal

θ_h : Tiempo de residencia

Aguas arriba
41°58'40.9"N 1°40'39.2"W



Aguas abajo
41°58'58.1"N 1°40'49.3"W

Figura 4.33: Coordenadas de los puntos de muestreo en el río aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la EDAR 5

4.6.2 Resultados de caracterización de aguas y fangos a lo largo de la línea de tratamiento

Las tablas 4.35 y 4.36 muestran los resultados de valores promedio de los parámetros físico-químicos determinados en muestras de las líneas de tratamiento de aguas y muestras de los reactores de fangos y de la línea de tratamiento de fangos.

Tabla 4.35: Resultados promedio de parámetros físico-químicos en muestras de agua de la EDAR 5

	M1	M4	M5	M6	M7	M8	M10
pH	7.7	7.2	7.6	7.4	7.5	7.4	6.8
Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	1300	1500	1300	1300	1300	1100	1600
O₂ disuelto (mg/l)	4.4	2.5	7.4	7.9	5.2	5.5	3.7
Temperatura (°C)	11.4	8.5	8.7	6.8	5.9	6.3	10.5
DQO (mgO₂/l)	670	120	190	210	100	45	700
COD (mg/l)	84	19	18	19	14	14	55
Turbidez (UNT)	270	10	6	10	3	4	40
SS (mg/l)	390	320	340	160	60	40	180
Nitratos (mg/l)	40	50	130	80	20	90	50
Nitritos (mg/l)	11	9	48	24	30	13	9
N amoniacal (mg/l)	193	62	38	42	24	19	89
Fósforo (mg/l)	5	1	1	<1	2	2	-

Tabla 4.36: Resultados promedio de parámetros físico-químicos en muestras de fangos de la EDAR 5

	M2	M3	M9
pH	7.0	7.3	7.0
Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	1600	1700	1600
O₂ disuelto (mg/l)	<1	3.8	-
Temperatura (°C)	9.5	10.3	-
Turbidez (UNT)	580	950	-
ST (g/l)	5.1	4.3	10.4
N amoniacal (mg/l)	119	70	-
Fósforo (mg/l)	14	10	-

Tal y como se observa en la tabla 4.35, el proceso de depuración elimina aproximadamente un 60% de fósforo, un 90% de N amoniacal y SS, 92% de turbidez, 91% de DQO y 83% de COD. Por otro lado, los valores de nitratos y nitritos fluctúan a lo largo de la línea de aguas.

En las muestras de fangos (tabla 4.36), los parámetros analizados muestran valores similares de conductividad, fósforo y sólidos totales. Por otro lado, nitrógeno amoniacal muestra valores muy diferentes entre M2 y M3 en relación con los procesos biológicos que tienen lugar en cada reactor.

La tabla 4.37 muestra los resultados de los parámetros microbiológicos obtenidos en muestras de agua en las tres primeras campañas realizadas.

La figura 4.34 muestra los valores promedio de las concentraciones microbiológicas (M1-M8) de la tabla 4.37. Los resultados de *Salmonella* spp. no se representan por ser cualitativos.

Tal y como muestran los resultados a la entrada de la depuradora (M1), la concentración microbiológica varía entre 10^5 - 10^8 UFC/100ml en función del microorganismo. Las concentraciones más elevadas se corresponden con coliformes totales y *Pseudomonas* sp., con 10^7 - 10^8 UFC/100ml seguidas de *E.coli*, *Enterococcus* sp. y por último *S.aureus* y *C. perfringens* con una concentración de 10^5 UFC/100ml. En concreto, las bacterias presentes en mayor

concentración son Gram negativas mientras que las bacterias Gram positivas analizadas, *Enterococcus* sp., *S.aureus* y *C.perfringens* están presentes en concentraciones hasta 3 órdenes de magnitud menor. La reducción neta para cada microorganismo a lo largo de la línea de aguas es de entre 1 y 5 órdenes de magnitud. Por otro lado, el agua que retorna desde el espesador tiene una concentración entre 10^5 - 10^8 UFC/100ml, similar a la concentración en M1 y en M2 (tabla 4.38).

Analizando la evolución a lo largo de la línea de tratamiento se observa que a la salida del proceso de tratamiento biológico de cultivo en suspensión y decantación posterior (M4), se alcanza una reducción entre 1 y 3 órdenes de magnitud. Después del tratamiento biológico en los filtros percoladores (M5) y decantación posterior (M6), no se reduce la concentración excepto en una de las campañas para coliformes totales, *E.coli* y *S.aureus*. Respecto al tratamiento terciario cabe destacar que en las tres lagunas aerobias (M7) se observa una reducción de hasta 4 órdenes de magnitud, siendo en la mayoría de los casos la reducción de la concentración bacteriana de 3 órdenes de magnitud. Por el contrario, a la salida del tratamiento en el humedal (M8) se observa un aumento de la concentración entre 1-2 órdenes de magnitud.

Al comparar los resultados obtenidos para las tres campañas en cada punto de muestreo estudiado, se observa que a la entrada de la planta para todas las bacterias y en el caso de *Enterococcus* sp. y *S.aureus* en casi todos los puntos hay bastante homogeneidad entre campañas. Sin embargo, hay variaciones en la concentración microbiológica de hasta 3-4 órdenes de magnitud por ejemplo en M4 para *E.coli*, *S.aureus* en M6, *Enterococcus* sp. y *E.coli* en M7 o coliformes totales, *Enterococcus* sp. y *E.coli* en M8. Por otro lado, coliformes totales y *Pseudomonas* sp. son las bacterias en las que se detectan mayores variaciones de la concentración en las diferentes campañas para un mismo punto de muestreo.

Los resultados del análisis de *Salmonella* spp. en la línea de aguas muestran presencia de esta bacteria a la salida de la EDAR, lo que puede deberse al aporte continuo de esta bacteria, que prolifera en zonas de la línea de tratamiento de aguas y puede persistir en puntos en los que las condiciones son más favorables.

Tabla 4.37: Caracterización microbiológica de muestras de agua de la EDAR 5 (UFC/100ml)

	M1	M4	M5	M6	M7	M8	M10
Coliformes totales							
1ª campaña	2.0 ± 1.2E+08	4.0 ± 1.2E+06	3.7 ± 2.3E+06	3.9 ± 1.4E+06	2.4 ± 0.3E+03	1.1 ± 0.3E+05	1.6 ± 0.5E+08
2ª campaña	4.0 ± 1.8E+07	1.6 ± 0.7E+06	6.2 ± 4.0E+05	2.2 ± 1.2E+05	1.3 ± 1.1E+03	2.9 ± 0.8E+03	1.9 ± 1.2E+07
3ª campaña	1.5 ± 0.4E+08	2.6 ± 0.3E+07	1.3 ± 0.2E+07	1.9 ± 0.2E+07	>3.0E+05	1.7 ± 0.2E+06	3.3 ± 0.4E+08
<i>Escherichia coli</i>							
1ª campaña	1.6 ± 1.1E+07	2.8 ± 1.5E+05	1.3 ± 0.7E+05	1.6 ± 0.6E+05	7.0 ± 2.1E+01	<1.0E+04	4.0 ± 2.1E+06
2ª campaña	4.0 ± 2.3E+06	6.0 ± 5.0E+04	2.6 ± 1.2E+04	6.7 ± 1.3E+04	3.0 ± 2.8E+01	3.2 ± 2.1E+02	1.8 ± 0.6E+06
3ª campaña	2.0 ± 0.4E+07	1.9 ± 1.4E+07	3.0 ± 0.4E+05	8.5 ± 0.7E+05	>3.0E+05	1.0 ± 0.1E+05	1.6 ± 0.2E+07
<i>Staphylococcus aureus</i>							
1ª campaña	9.4 ± 1.2E+05	<3.0E+04	1.5 ± 1.1E+06	1.2 ± 0.4E+06	<1.0E+03	1.0 ± 0.3E+04	6.3 ± 1.9E+05
2ª campaña	2.2 ± 0.6E+05	4.6 ± 0.6E+04	2.6 ± 0.5E+04	<1.0E+04	6.6 ± 0.5E+03	1.2 ± 0.3E+04	3.9 ± 0.3E+05
3ª campaña	2.7 ± 1.3E+05	2.0 ± 0.2E+04	1.5 ± 0.1E+04	9.0 ± 5.0E+03	6.6 ± 1.9E+03	2.0 ± 0.2E+04	4.5 ± 1.3E+05
<i>Enterococcus sp.</i>							
1ª campaña	7.9 ± 1.1E+06	<5.0E+04	2.0 ± 0.3E+04	2.8 ± 0.5E+04	5.8 ± 1.0E+01	3.7 ± 0.6E+02	1.1 ± 0.6E+06
2ª campaña	5.3 ± 0.6E+06	3.6 ± 0.1E+04	2.6 ± 1.0E+04	2.3 ± 0.1E+04	4.6 ± 0.5E+01	6.5 ± 2.4E+01	8.0 ± 1.3E+05
3ª campaña	5.1 ± 0.5E+06	5.3 ± 0.9E+05	1.2 ± 0.1E+05	3.8 ± 0.4E+05	4.2 ± 0.4E+04	5.8 ± 0.1E+05	1.6 ± 0.8E+06
<i>Pseudomonas sp.</i>							
1ª campaña	1.4 ± 0.3E+08	4.3 ± 2.1E+06	2.9 ± 0.9E+06	1.7 ± 0.4E+06	<1.0E+03	<1.0E+03	>1.5E+08
2ª campaña	2.1 ± 0.8E+07	9.9 ± 3.0E+04	2.8 ± 0.1E+05	1.0 ± 0.3E+05	7.9 ± 2.9E+03	1.3 ± 0.1E+04	9.1 ± 3.1E+06
3ª campaña	5.0 ± 1.3E+07	5.5 ± 0.1E+05	>3.0E+06	4.6 ± 1.1E+06	>3.0E+05	1.1 ± 0.1E+05	4.6 ± 0.8E+07
<i>Clostridium perfringens</i> (esporas)							
1ª campaña	6.3 ± 0.3E+07	-	-	-	-	3.0 ± 0.3E+04	-
2ª campaña	5.0 ± 0.3E+05	-	-	-	-	<1.0E+03	-
3ª campaña	2.0 ± 0.3E+05	-	-	-	-	5.0 ± 0.3E+03	-
<i>Clostridium perfringens</i> (vegetativas)							
1ª campaña	7.0 ± 0.3E+06	-	-	-	-	5.0 ± 0.3E+04	-
2ª campaña	5.0 ± 0.3E+05	-	-	-	-	<1.0E+03	-
3ª campaña	9.0 ± 0.3E+05	-	-	-	-	9.0 ± 0.3E+03	-
<i>Salmonella spp.</i>							
1ª campaña	No detectado en 50ml	-	-	-	-	No detectado en 50ml	-
2ª campaña	No detectado en 50ml	-	-	-	-	Presencia en 50ml	-
3ª campaña	No detectado en 50ml	-	-	-	-	Presencia en 50ml	-

≥10⁸
10⁷
10⁶
10⁵
10⁴
10³
10²
10¹

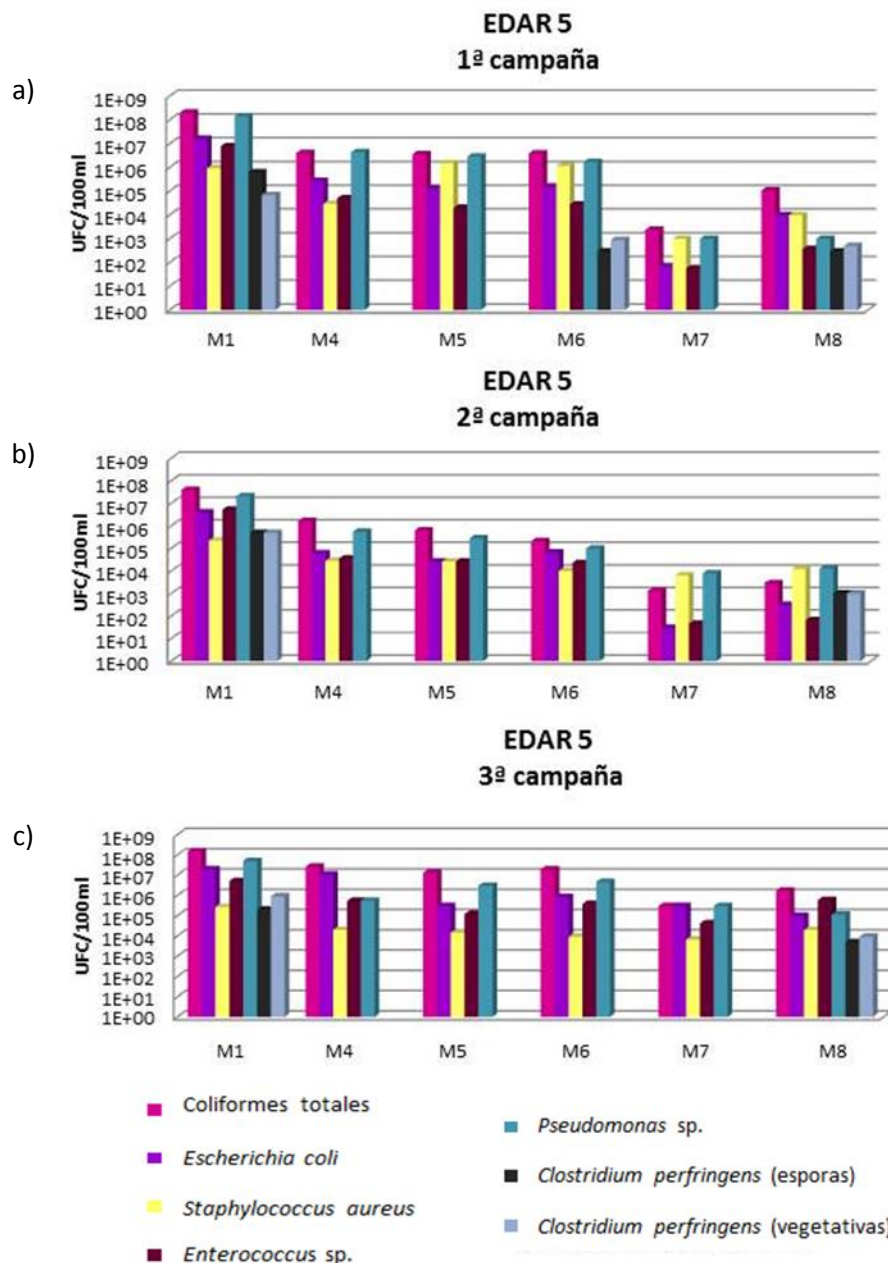


Figura 4.34: Caracterización microbiológica a lo largo de la línea de tratamiento de aguas de la EDAR 5. a) Primera campaña; b) Segunda campaña; c) Tercera campaña

La tabla 4.38 muestra los resultados de los parámetros microbiológicos determinados en muestras de fango en los reactores (M2 y M3) y a la salida del espesador (M9).

Tal y como se observa en la tabla 4.38, la concentración microbiológica en el tratamiento biológico en suspensión está entre 10^5 - 10^9 UFC/g (M2 y M3). Además, se detecta *Salmonella* spp. en M2. Por otro lado, los fangos espesados muestran una concentración bacteriana entre 10^6 - 10^9 UFC/g. Considerando la concentración y evolución de cada bacteria se puede determinar que la concentración de las bacterias es mayor en el reactor biológico anaerobio (M2) que en el aerobio (M3). Esto concuerda con que la mayoría de las bacterias analizadas son anaerobias o anaerobias facultativas. Por otra parte, es destacable la elevada concentración en los fangos espesados (M9) de coliformes totales, *Pseudomonas* sp. en todas

campañas y *E.coli* en M3 y *Enterococcus* sp. en M3 y M9 en la segunda campaña, donde alcanzan 10^8 UFC/g.

Tabla 4.38: Caracterización microbiológica de muestras de fangos de la EDAR 5 (UFC/g)

		M2	M3	M9
Coliformes totales	1ª campaña	$2.6 \pm 0.8E+08$	$3.7 \pm 1.8E+08$	$2.4 \pm 0.8E+08$
	2ª campaña	$9.2 \pm 4.1E+08$	$8.2 \pm 0.1E+08$	$1.2 \pm 0.5E+08$
	3ª campaña	$5.2 \pm 0.6E+09$	$6.9 \pm 0.8E+09$	$>4.0E+08$
<i>Escherichia coli</i>	1ª campaña	$1.0 \pm 0.5E+07$	$4.1 \pm 2.8E+06$	$6.0 \pm 3.2E+06$
	2ª campaña	$2.9 \pm 1.7E+07$	$1.7 \pm 1.0E+08$	$6.0 \pm 3.6E+06$
	3ª campaña	$9.7 \pm 1.4E+07$	$9.9 \pm 1.4E+07$	$>7.3E+07$
<i>Staphylococcus aureus</i>	1ª campaña	$1.9 \pm 0.6E+06$	$2.2 \pm 0.7E+06$	$4.6 \pm 1.4E+06$
	2ª campaña	$3.4 \pm 0.3E+07$	$7.3 \pm 0.1E+07$	$1.7 \pm 0.1E+07$
	3ª campaña	$1.7 \pm 0.1E+06$	$1.2 \pm 0.3E+06$	$2.6 \pm 0.8E+06$
<i>Enterococcus</i> sp.	1ª campaña	$5.0 \pm 0.9E+06$	$4.2 \pm 0.8E+05$	$8.8 \pm 1.5E+06$
	2ª campaña	$1.6 \pm 0.1E+08$	$9.0 \pm 1.2E+08$	$1.1 \pm 0.2E+08$
	3ª campaña	$2.6 \pm 0.2E+07$	$1.3 \pm 0.1E+07$	$1.3 \pm 0.6E+07$
<i>Pseudomonas</i> sp.	1ª campaña	$1.4 \pm 0.3E+08$	$1.5 \pm 0.1E+08$	$2.9 \pm 0.7E+08$
	2ª campaña	$>3.0E+08$	$8.0 \pm 0.2E+08$	$>3.0E+08$
	3ª campaña	$7.4 \pm 3.9E+08$	$4.8 \pm 0.3E+08$	$1.0 \pm 0.2E+09$
<i>Clostridium perfringens</i> (esporas)	1ª campaña	$3.0 \pm 0.3E+07$	-	-
	2ª campaña	$9.5 \pm 0.3E+05$	-	-
	3ª campaña	$1.9 \pm 0.3E+06$	$4.0 \pm 0.3E+06$	$2.0 \pm 0.3E+07$
<i>Clostridium perfringens</i> (vegetativas)	1ª campaña	$1.1 \pm 0.3E+08$	-	-
	2ª campaña	$1.3 \pm 0.3E+06$	-	-
	3ª campaña	$1.9 \pm 0.3E+06$	$1.0 \pm 0.3E+06$	$3.1 \pm 0.3E+06$
<i>Salmonella</i> spp.	1ª campaña	Presencia en 50g	-	-
	2ª campaña	No detectado en 50g	-	-
	3ª campaña	No detectado en 50g	No detectado en 50g	No detectado en 50g

$\geq 10^8$	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	$\leq 10^1$
-------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	-------------

Se observan variaciones de concentración entre campañas de 1-2 órdenes de magnitud en bacterias como *E.coli*, *Enterococcus* sp. y *C.perfringens*.

4.6.3 Estimación del impacto del vertido sobre la calidad microbiológica del cauce receptor

La tabla 4.39 muestra los resultados obtenidos en el análisis de las muestras de agua de la cuarta campaña y en el río receptor del efluente de la EDAR, aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido.

A partir de los resultados de la tabla 4.39 se calculan las cargas microbiológicas (UFC/d) tanto en el influente y efluente de la EDAR como en el cauce aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido. Los datos tanto del caudal tratado en la EDAR como del río, el día que se toma la muestra son los detallados en la tabla 4.40. El dato de caudal del río receptor se obtiene a través del Sistema Automático de Información Hidrológica de la Cuenca Hidrográfica del Ebro.

Tabla 4.39: Caracterización microbiológica en el influente y efluente de la EDAR 5 y en el cauce aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido (UFC/100ml)

	M1	M8	Aguas arriba	Aguas abajo
Coliformes totales	1.4 ± 0.2E+08	2.6 ± 0.8E+04	1.9 ± 0.4E+04	1.7 ± 0.4E+04
<i>Escherichia coli</i>	1.4 ± 0.7E+07	<1.0E+03	9.3 ± 0.7E+02	1.2 ± 0.8E+04
<i>Staphylococcus aureus</i>	5.0 ± 1.4E+04	6.3 ± 4.4E+03	4.8 ± 1.7E+02	9.8 ± 3.5E+02
<i>Enterococcus sp.</i>	1.9 ± 0.9E+06	1.7 ± 0.5E+02	5.4 ± 2.0E+02	4.0 ± 1.5E+02
<i>Pseudomonas sp.</i>	1.6 ± 0.4E+07	6.0 ± 1.4E+03	<1.0E+03	2.0 ± 0.5E+03



Tabla 4.40: Caudales tratados en la EDAR 5 y caudales en el cauce del río

PARÁMETRO	VALOR
Q tratado (m ³ /d)	366
Q río receptor (m ³ /d)	62726
Distancia EDAR-estación aforo (km)	15
Ratio caudal río receptor/caudal tratado EDAR	171

La figura 4.35 muestra la evolución de la carga microbiológica en los diferentes puntos para las bacterias analizadas.

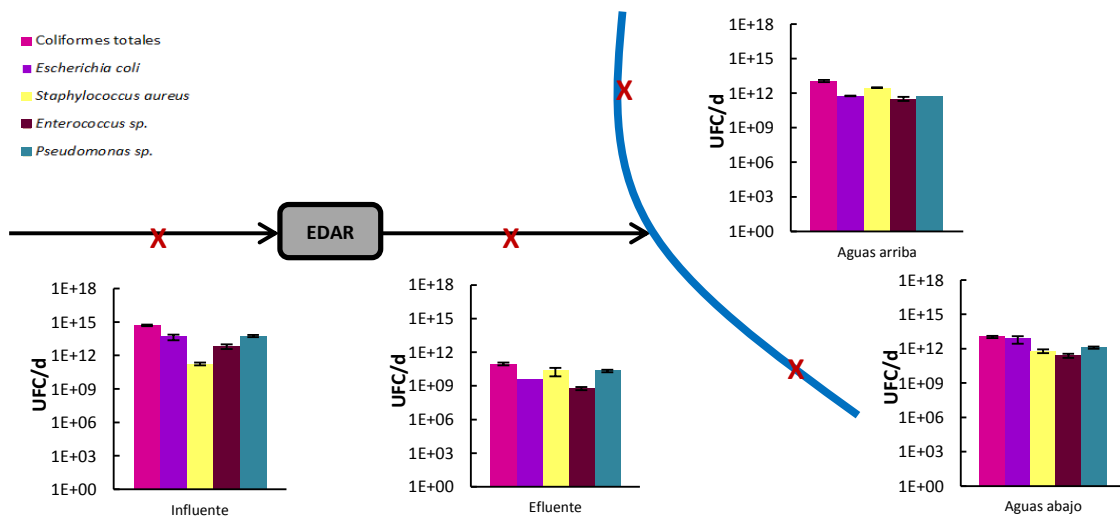


Figura 4.35: Cargas microbiológicas (UFC/d) en el influente y efluente de la EDAR 5 y en el cauce

Tal y como se observa en la figura 4.35, la reducción neta de los microorganismos tras el tratamiento de depuración es de entre <1-4 órdenes de magnitud. Si se comparan los resultados de carga microbiológica aguas arriba y aguas abajo del vertido de la EDAR, se observa como apenas existe influencia destacable de dicho vertido en la calidad microbiológica del cauce receptor.

4.7 CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA EN LA EDAR 6

4.7.1 Descripción de la planta de tratamiento, toma de muestras y parámetros de caracterización

La EDAR 6 recibe aguas residuales de origen doméstico. La población censada es de 227 habitantes en 2015 y la carga tratada es de 200 habitantes equivalentes. El cauce receptor del vertido es el río Eska.

La figura 4.36 muestra una vista real de la misma y en la tabla 4.41 se detallan el caudal y la carga de diseño y de tratamiento (Nilsa, 2017)



Figura 4.36: Dibujo esquemático de la EDAR 6 y vista real

Tabla 4.41: Caudal y carga de diseño y valores reales medios de tratamiento de la EDAR 6

PARÁMETRO	VALOR
Q diseño (m ³ /d)	243
Q tratado (m ³ /d)	197
Carga de diseño (kg DBO ₅ /d)	40
Carga tratamiento (kg DBO ₅ /d)	12

En la figura 4.37 se detalla el diagrama del tratamiento de depuración así como las dimensiones de algunas de las instalaciones.

Tal y como muestran las figuras 4.36 y 4.37, la depuradora consta de los procesos o etapas que se incluyen a continuación.

Línea de tratamiento de agua:

- Decantador tanque Imhoff
- Tratamiento biológico de lecho bacteriano (filtros percoladores)
- Decantación secundaria
- Tratamiento terciario mediante filtro de arena

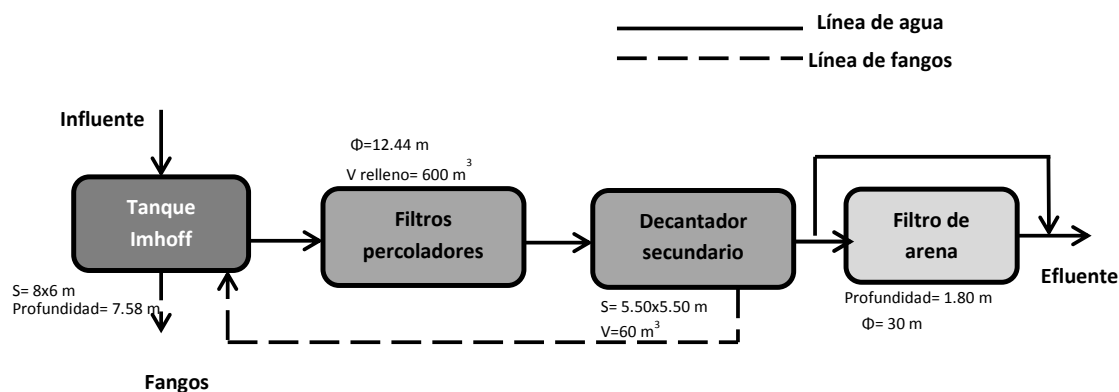


Figura 4.37: Etapas de la EDAR 6

La toma de muestras se realiza en días en los que la planta opera en régimen estacionario, no realizándose aquellos días en los que se detectan incidencias como lluvias intensas, vertidos no controlados, etc. Se realizan 2 campañas de muestreo. En la primera campaña se toman muestras en puntos a lo largo de la línea de tratamiento de aguas. En la segunda campaña se toman muestras en el influente y efluente de la EDAR así como aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la planta. Los días seleccionados son:

Campaña 1: el 15 de junio de 2015 entre las 11:00 y las 12:00h. T^a: 14.2°C

Campaña 2: el 6 de septiembre de 2017 entre las 10:00 y las 11:00h. T^a: 24.5°C

El protocolo para la toma de muestras es el indicado en las norma UNE EN ISO 5667-3:2013 y UNE-EN ISO 5667-13:2011 (ISO y AENOR, 2011; ISO y AENOR, 2013). Se utilizan recipientes estériles de 150 y 500 ml para el análisis de bacterias y recipientes no estériles para el análisis de parámetros físico-químicos. Las muestras son líquidas y se transportan refrigeradas hasta su análisis. Se determinan parámetros físico-químicos y parámetros microbiológicos mostrados en las tablas 3.1 y 3.4 respectivamente. En concreto se determina pH, temperatura, oxígeno disuelto, conductividad DQO, SS, coliformes totales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Clostridium perfringens* y *Salmonella* spp. Los análisis de bacterias se realizan en un tiempo inferior a 24 horas.

En la figura 4.38 se muestra el esquema de la planta de tratamiento con los puntos de muestreo seleccionados en la línea de aguas (Mi) y en la figura 4.39 se muestran imágenes de algunos de los puntos de muestreo. En la tabla 4.42 se muestran valores medios de caudales (Q₄ y Q_F) y tiempos de retención (θ_{h4}) en los procesos incluidos en las líneas de tratamiento (Nilsa, 2017).

Se analizan 5 muestras de agua (M1-M5 de la figura 4.38) y se estima que se cultivan aproximadamente 270 placas para el recuento de microorganismos, en cada una de las campañas.

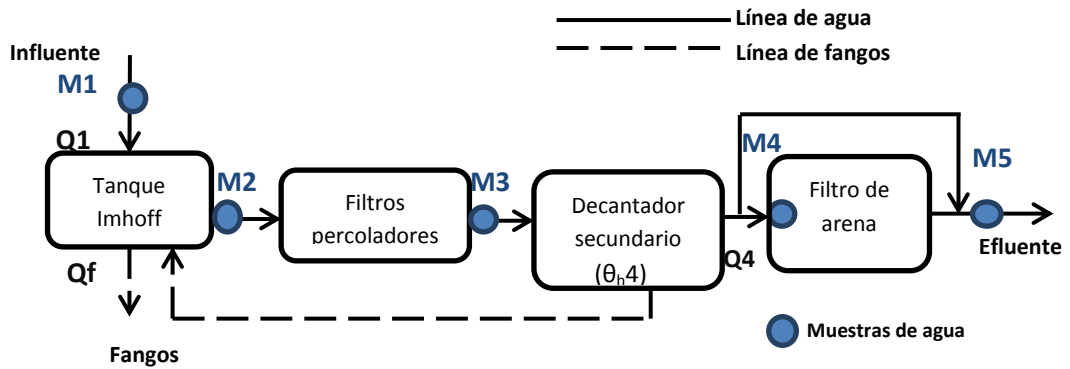


Figura 4.38: Puntos de la toma de muestras (Mi) en la línea de tratamiento de la EDAR 6
 Qi: Caudal en el punto i



Figura 4.39: Imágenes de algunos puntos de muestreo. a) Tanque Imhoff (M2); b) Entrada filtro arena (M4); c) Salida filtro de arena (M5)

Tabla 4.42: Parámetros operacionales de la planta

PARÁMETRO	VALOR
Q salida decantador (m ³ /d)	Q4 156
Q fangos tratados /sequedad (m ³ /año)	QF 60
Seguedad fangos (%)	- 3.5
θ_h decantador secundario (h)	$\theta_{h,4}$ 9
g fango por habitante equivalente y día	- 32

Q: Caudal θ_h : Tiempo de residencia

En la figura 4.40 se muestra la ubicación de los puntos de muestreo aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la EDAR 6.



Figura 4.40: Coordenadas de los puntos de muestreo en el río aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de la EDAR 6

Por otro lado, se realiza un balance de materia para determinar los gramos de fango por habitante equivalente y día tal y como se muestra en la ecuación 4.1 del apartado 4.2.1.

4.7.2 Resultados de caracterización de aguas y fangos a lo largo de la línea de tratamiento

La tabla 4.43 muestra los resultados de valores promedio de los parámetros físico-químicos determinados en muestras de la línea de tratamiento de aguas.

Tal y como se observa en la tabla 4.43, los valores de conductividad, DQO y sólidos en suspensión del agua de entrada a la EDAR son mucho menores que en las demás EDARs caracterizadas y se obtiene una eliminación de DQO del 95%.

Tabla 4.43: Resultados promedio de parámetros físico-químicos en muestras de agua de la EDAR 6

	M1	M2	M3	M4	M5
pH	7.5	7.5	8.0	8.0	8.0
Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	530	480	410	400	370
O ₂ disuelto (mg/l)	5.0	-	-	-	4.1
Temperatura (°C)	21.0	21.5	18.1	20.3	17.8
DQO (mgO ₂ /l)	128	-	-	-	7
SS (mg/l)	4	-	-	-	4

La tabla 4.44 muestra los resultados de los parámetros microbiológicos obtenidos en muestras de agua, en la primera campaña realizada.

Tabla 4.44: Caracterización microbiológica de muestras de agua de la EDAR 6 (UFC/100ml)

	M1	M2	M3	M4	M5
Coliformes totales	$1.7 \pm 0.3\text{E}+08$	$4.3 \pm 0.7\text{E}+07$	$3.5 \pm 1.2\text{E}+06$	$1.4 \pm 0.1\text{E}+06$	$1.6 \pm 1.5\text{E}+04$
<i>Escherichia coli</i>	$2.6 \pm 0.5\text{E}+07$	$7.1 \pm 1.0\text{E}+06$	$1.2 \pm 0.1\text{E}+06$	$7.8 \pm 5.0\text{E}+04$	$1.5 \pm 0.1\text{E}+04$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$7.3 \pm 0.3\text{E}+05$	$<1.0\text{E}+05$	$<1.0\text{E}+04$	$<1.0\text{E}+04$	$8.4 \pm 0.1\text{E}+02$
<i>Enterococcus sp.</i>	$1.1 \pm 0.3\text{E}+06$	$4.1 \pm 0.6\text{E}+05$	$1.1 \pm 0.3\text{E}+03$	$<1.0\text{E}+04$	$<2.0\text{E}+02$
<i>Pseudomonas sp.</i>	$1.6 \pm 0.2\text{E}+08$	$2.1 \pm 0.7\text{E}+06$	$7.0 \pm 2.5\text{E}+04$	$2.9 \pm 0.3\text{E}+04$	$2.0 \pm 0.8\text{E}+03$
<i>Clostridium perfringens</i> (esporas)	$1.1 \pm 0.3\text{E}+04$	-	-	-	$<1.0\text{E}+03$
<i>Clostridium perfringens</i> (vegetativas)	$1.0 \pm 0.3\text{E}+03$	-	-	-	$<1.0\text{E}+03$
<i>Salmonella spp.</i>	No detectado en 50ml	-	-	-	No detectado en 50ml

$\geq 10^8$	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	$\leq 10^1$
-------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	-------------

La figura 4.41 muestra los valores promedio de las concentraciones microbiológicas de la tabla 4.44. Los resultados de *Salmonella spp.* no se representan por ser cualitativos.

Tal y como muestran los resultados a la entrada de la depuradora (M1), la concentración microbiológica varía entre 10^3 - 10^8 UFC/100ml en función del microorganismo. Las concentraciones más elevadas se corresponden con coliformes totales y *Pseudomonas sp.*, con 10^8 UFC/100ml seguidas de *E.coli*, *Enterococcus sp.*, *S.aureus* y por último *C.perfringens*. con una concentración de 10^3 - 10^4 UFC/100ml. En concreto, las bacterias presentes en mayor concentración son Gram negativas mientras que las bacterias Gram positivas analizadas, *Enterococcus sp.*, *S.aureus* y *C.perfringens* están presentes en concentraciones entre 1 y 5 órdenes de magnitud menor.

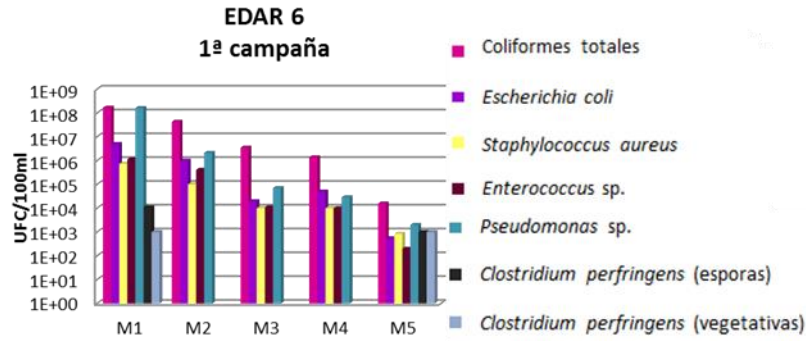


Figura 4.41 Caracterización microbiológica de la EDAR 6 a lo largo de la línea de tratamiento de aguas en la primera campaña

La reducción neta para cada microorganismo a lo largo de la línea de aguas es de entre 1 y 5 órdenes de magnitud.

Analizando la evolución a lo largo de la línea de tratamiento se observa que a la salida del tanque Imhoff (M2) la reducción de la concentración microbiológica es de entre 1 y 2 órdenes de magnitud. Después de los filtros percoladores (M3) la concentración microbiológica se reduce hasta 2 órdenes de magnitud. Tras la decantación secundaria, a la entrada del filtro de arena (M4), sólo se reduce la concentración de *E.coli*. Finalmente, a la salida del filtro de arena (M5), la concentración de *E.coli* se mantiene y el resto de bacterias se reducen en al menos un orden.

Los resultados del análisis de *Salmonella* spp. muestran que no se detecta esta bacteria ni a la entrada ni a la salida de la EDAR.

4.7.3 Estimación del impacto del vertido sobre la calidad microbiológica del cauce receptor

La tabla 4.45 muestra los resultados obtenidos en el análisis de las muestras de agua de la cuarta campaña y en el río receptor del efluente de la EDAR, aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido.

Tabla 4.45: Caracterización microbiológica en entrada y salida de la EDAR 6 y en el cauce aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido (UFC/100ml)

	M1	M8	Aguas arriba	Aguas abajo
Coliformes totales	$1.8 \pm 0.4E+07$	$5.1 \pm 3.0E+03$	$3.4 \pm 0.3E+03$	$4.5 \pm 1.0E+03$
<i>Escherichia coli</i>	$2.5 \pm 2.2E+06$	$<1.0E+02$	$1.7 \pm 0.4E+02$	$1.6 \pm 1.3E+02$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$1.7 \pm 0.1E+04$	$2.9 \pm 1.0E+01$	$1.9 \pm 0.7E+02$	$3.0 \pm 1.1E+02$
<i>Enterococcus</i> sp.	$3.1 \pm 0.8E+05$	$<1.0E+01$	$1.2 \pm 0.4E+02$	$2.3 \pm 0.1E+02$
<i>Pseudomonas</i> sp.	$1.5 \pm 0.7E+06$	$4.0 \pm 1.9E+02$	$9.2 \pm 4.3E+02$	$2.0 \pm 1.0E+03$

$\geq 10^8$	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	$\leq 10^1$
-------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	-------------

A partir de los resultados de la tabla 4.45 se calculan las cargas microbiológicas (UFC/d) tanto en el influente y efluente de la EDAR como en el cauce aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido. Los datos tanto del caudal tratado en la EDAR como del río el día que se toma la

muestra son los detallados en la tabla 4.46. El dato de caudal del río receptor se obtiene a través del Sistema Automático de Información Hidrológica de la Cuenca Hidrográfica del Ebro.

La figura 4.42 muestra la evolución de la carga microbiológica en los diferentes puntos para las bacterias analizadas.

Tabla 4.46: Caudales tratados en la EDAR 6 y caudales en el cauce del río

PARÁMETRO	VALOR
Q tratado (m ³ /d)	200
Q río receptor (m ³ /d)	275616
Distancia EDAR-estación aforo (km)	7.8
Ratio caudal río receptor/caudal tratado EDAR	95

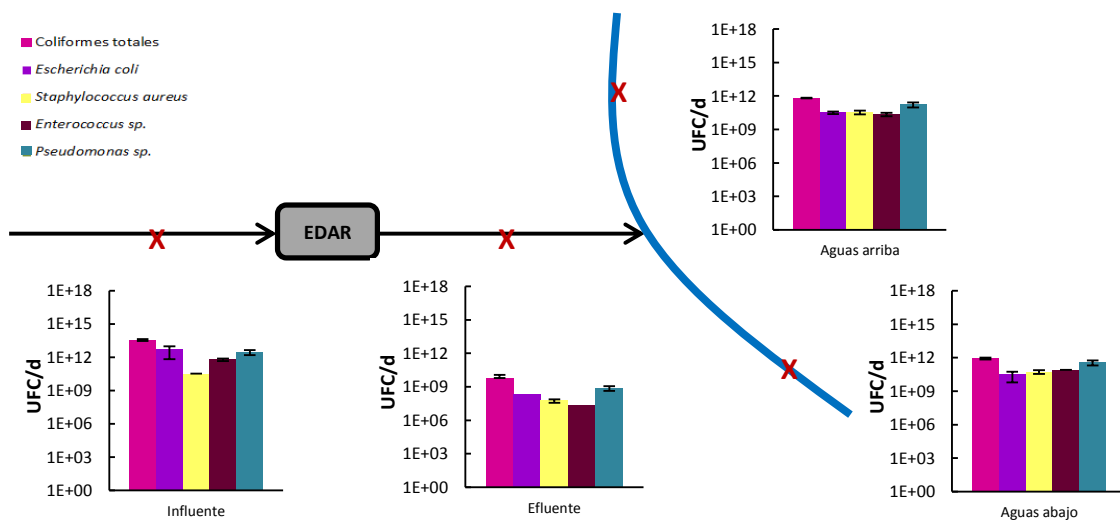


Figura 4.42: Cargas microbiológicas (UFC/d) en el influente y efluente de la EDAR 6 y en el cauce

Tal y como se observa en la figura 4.42, la reducción neta de los microorganismos tras el tratamiento de depuración es de entre 3-4 órdenes de magnitud. Si se comparan los resultados de carga microbiológica aguas arriba y aguas abajo del vertido de la EDAR, se observa como apenas existe influencia destacable de dicho vertido en la calidad microbiológica del cauce receptor.

El Real Decreto 817/2015, en su propósito de realizar un control adicional de las masas de agua del registro de zonas protegidas, establece requisitos en relación a las masas de agua en las que se ubiquen zonas declaradas como aguas de baño. En concreto, el río al que se vierte el efluente de la EDAR 6 debe cumplir los límites microbiológicos establecidos en el RD 1341/2007, relativo a las masas de agua declaradas como aguas de baño. En base a los resultados de la tabla 4.45 en la salida de la EDAR y aguas abajo del punto de vertido de la depuradora, se observa que el impacto del efluente no supone un empeoramiento de la calidad del cauce del río y que las concentraciones de *E.coli* y *Enterococcus sp.* están por debajo del límite más restrictivo de la normativa.

4.8 ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE PROCESOS E INSTALACIONES Y SU REPERCUSIÓN SOBRE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE AGUAS Y FANGOS

En la tabla 4.47 se resumen los datos de habitantes equivalentes, la relación entre caudal del río receptor y caudal tratado en cada EDAR, así como, los principales procesos presentes en cada una de las instalaciones objeto de estudio.

Tabla 4.47. Habitantes equivalentes, relación entre caudal del río receptor y caudal tratado en la EDAR y principales procesos presentes en las instalaciones

	HABITANTES EQUIVALENTES	RATIO CAUDAL RÍO RECEPTOR/ CAUDAL TRATADO EDAR	PROCESOS
EDAR 1	19800	36	Filtros percoladores-2 etapas
EDAR 2	82500	736	Filtros percoladores-2 etapas
EDAR 3	4300	151	Cultivo en suspensión
EDAR 4	15900	1306	Filtros percoladores y lagunaje
EDAR 5	5000	171	Cultivo en suspensión, filtros percoladores, lagunaje y humedal
EDAR 6	200	95	Tanque Imhoff, filtros percoladores, filtración arena

Las figuras 4.43 y 4.44 muestran los valores promedio de la reducción de cada bacteria, expresado en unidades logarítmicas, en cada una de las etapas seleccionadas para las EDARs objeto de estudio. En la figura 4.45 se incluye la reducción global alcanzada en cada EDAR para cada bacteria.

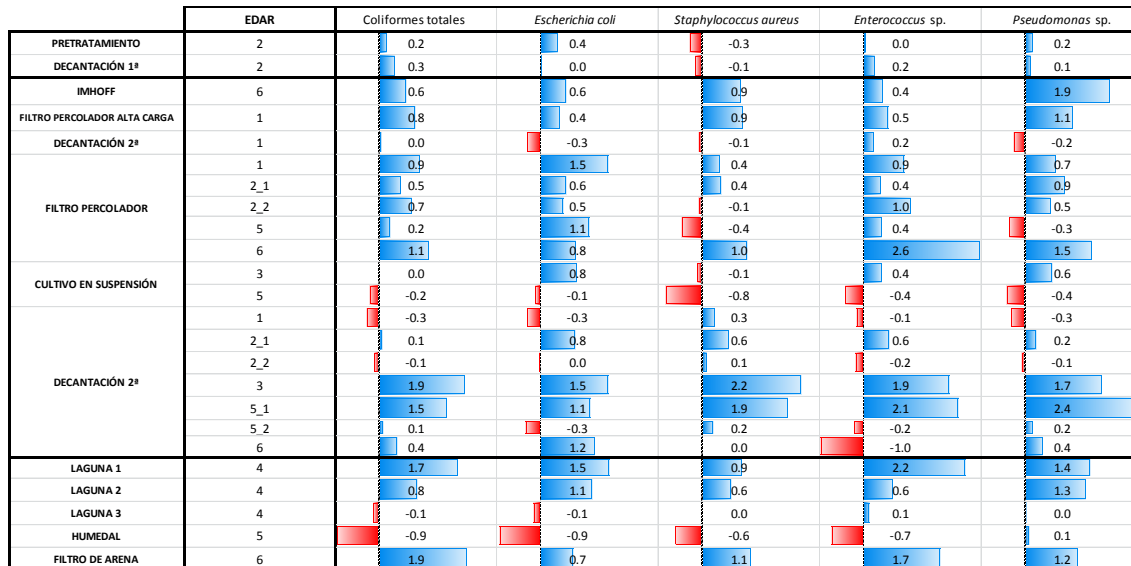


Figura 4.43: Reducción microbiológica a la salida de cada etapa

Tal y como muestra la figura 4.43, las etapas de lagunas 1 y 2 de la EDAR 4, las etapas de decantación secundaria después del cultivo en suspensión (EDAR 3 y EDAR 5) y el filtro percolador de la EDAR 6 muestran los mejores resultados de eliminación para las bacterias analizadas. Por el contrario, el humedal y la decantación secundaria tras los filtros percoladores son las etapas en las que se obtienen peores resultados de eliminación para las

bacterias estudiadas, observándose incluso un aumento de la concentración. En cuanto a la reducción de cada bacteria tras cada etapa, *S. aureus* es la que muestra los peores resultados.

	EDAR	Coliformes totales	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
TRATAMIENTO PRIMARIO	1	-0.4	0.5	0.2	0.5	0.2
	2	0.5	0.4	-0.4	0.3	0.3
	4	0.3	0.5	1.2	0.7	0.5
FILTRO PERCOLADOR ALTA CARGA + DECANTACIÓN	1	0.8	0.1	0.8	0.8	0.8
FILTRO PERCOLADOR + DECANTACIÓN	1	0.6	1.2	0.7	0.8	0.4
	2_1	0.5	1.3	1.0	0.9	1.1
	2_2	0.6	0.5	0.0	0.9	0.5
	4	0.9	1.5	1.2	1.5	0.8
	5	0.3	0.8	-0.2	0.2	-0.2
	6	1.5	2.0	1.0	1.6	1.9
FILTRO PERCOLADOR DOBLE ETAPA	1	1.5	1.4	1.5	1.5	1.2
	2	1.2	1.8	1.0	1.8	1.6
CULTIVO SUSPENSIÓN + DECANTACIÓN	3	1.9	2.4	2.2	2.3	2.3
	5	1.3	1.0	1.1	1.8	1.9
CULTIVO SUSPENSIÓN + FILTRO PERCOLADOR	5	1.6	1.7	0.9	2.0	1.8
TRATAMIENTO 3º LAGUNAJE	4	2.5	2.5	1.5	3.0	2.8
	5	2.4	2.4	1.1	2.1	1.8
TRATAMIENTO 3º LAGUNAJE + HUMEDAL	5	1.5	1.5	0.6	1.4	1.9

Figura 4.44: Reducción microbiológica a la salida de cada proceso

	EDAR	Coliformes totales	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Clostridium perfringens</i> (esporas)	<i>Clostridium perfringens</i> (vegetativas)
TRATAMIENTO GLOBAL 1º+2º	1	1.1	1.9	1.7	2.1	1.4	0.6	1.0
	2	1.7	2.2	0.6	2.1	1.9	0.9	0.7
	3	1.9	2.4	2.2	2.3	2.3	1.3	1.4
	4	1.3	2.0	2.3	2.3	1.2	-	-
	5	1.6	1.7	0.9	2.0	1.8	-	-
	6	2.1	2.5	1.9	2.0	3.7	-	-
TRATAMIENTO GLOBAL 1º+2º+3º (Lagunaje)	4	3.8	4.5	3.8	5.3	4.1	1.6	1.6
	5	4.0	4.1	2.0	4.1	3.6	-	-
TRATAMIENTO GLOBAL 1º+2º+3º (Lagunaje-Humedal)	5	3.1	3.2	1.5	3.4	3.7	2.5	2.3
TRATAMIENTO GLOBAL 1º+2º+3º (Filtro de arena)	6	4.0	3.2	2.9	3.7	4.9	1.0	0.0

Figura 4.45: Reducción microbiológica global en las EDARs

En la figura 4.44 se observa que en la mayoría de los procesos la eliminación microbiológica resulta positiva. Los procesos terciarios son donde mayores valores de reducción se obtienen, seguidos de aquellos procesos que incluyen una etapa de cultivo en suspensión. Así mismo, se observa la similitud en el comportamiento de todas las bacterias en lo referente a la reducción en cada proceso.

En la figura 4.45 se observa que la mayor reducción global ocurre en las EDARs que incluyen el tratamiento terciario de lagunaje o de filtro de arena como son las EDAR 4, EDAR 5 y EDAR 6. Por el contrario, si se considera el humedal, la reducción global es menor.

En relación al impacto de la concentración microbiológica de las instalaciones en el cauce receptor, la figura 4.46 muestra la carga microbiológica de cada bacteria seleccionada para el estudio en el influente, el efluente y aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido para cada EDAR.

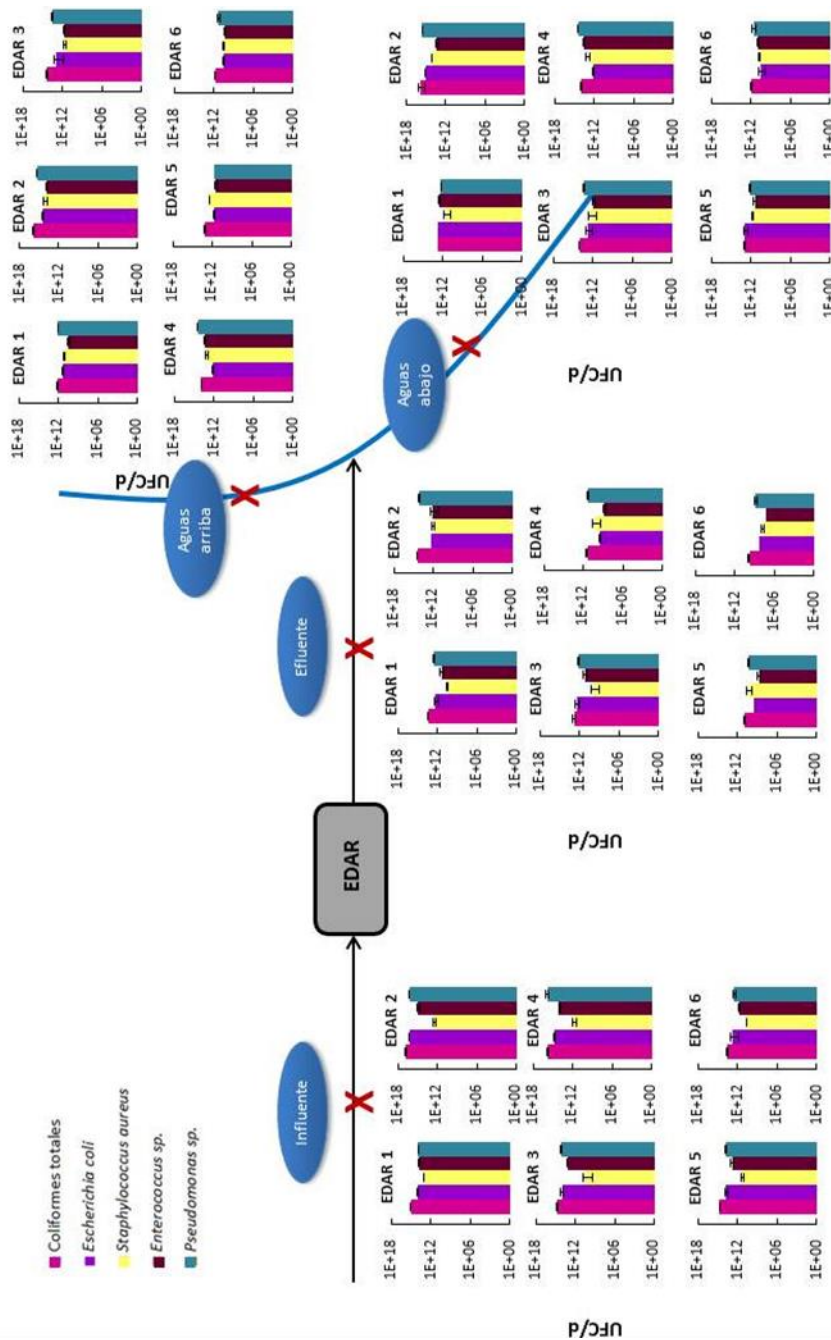


Figura 4.46: Carga microbiológica de las bacterias estudiadas en el influente y efluente de las EDARs así como aguas arriba y aguas abajo del punto de vertido de cada EDAR

De los resultados obtenidos en el control microbiológico de las EDARs estudiadas y mostrados en los apartados 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 y 4.7, así como de resultados del impacto sobre el cauce receptor (figura 4.46), se extraen las siguientes interpretaciones y conclusiones:

1. La contaminación microbiológica presente en el influente de todas las EDARs es prácticamente constante, independientemente del origen de las aguas residuales brutas, de la estación del año considerada o del caudal de tratamiento, en concordancia con otros autores (Manaia et al., 2010). Todas las aguas residuales tratadas tienen origen urbano con un aporte industrial de hasta el 30% en caudal y hasta un 80% en carga orgánica. Se trata de contaminación de origen humano y animal.

2. Si una EDAR consta de tratamiento primario y secundario en la línea de aguas, la contaminación microbiológica experimenta una reducción global en el proceso de depuración de entre 1-2 órdenes de magnitud. Si además también incluye tratamiento terciario, la reducción global puede ser de hasta 5 ó 7 órdenes de magnitud. El grupo de investigación Calidad y Tratamiento de aguas realizó previamente análisis en algunas de las depuradoras estudiadas en este trabajo (EDAR 2, EDAR 3 y EDAR 4) y se obtuvieron concentraciones a la salida de las EDARs similares (Marín et al., 2015; Mosteo et al., 2013). Por otro lado, se observa una reducción global de concentración microbiológica de 1-2 órdenes de magnitud habitualmente en la línea de fangos.
3. La etapa de tratamiento biológico en cultivo en suspensión muestra una mayor eficacia de reducción de la concentración microbiológica que el tratamiento biológico con filtros percoladores. En concreto, en el proceso de cultivos en suspensión en reactores en serie (anóxico-anaerobio-aerobio) se reduce la concentración microbiológica entre uno y cuatro órdenes de magnitud. Sin embargo, tras el proceso de filtros percoladores, tanto de alta carga como de baja carga, en ocasiones no se reduce la concentración microbiológica y la máxima reducción alcanzada es de dos órdenes de magnitud. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores que justifican que los procesos de nitrificación-desnitrificación favorecen la eliminación biológica, la competición con la microflora de los reactores y la sedimentación (George et al., 2002; Manaia et al., 2010; Orruño et al., 2014). También se debe tener en cuenta la edad del fango generado con cada tratamiento y el efecto que ello pueda tener en la reducción de las bacterias analizadas (Sobrados et al., 2010).
4. La etapa de decantación secundaria que va después de la etapa de cultivo en suspensión reduce en torno a dos unidades logarítmicas la concentración microbiológica presente. Por el contrario, la etapa de decantación secundaria tras los filtros percoladores no reduce de manera considerable de la concentración microbiológica, al igual que la etapa de decantación primaria, siendo la máxima reducción alcanzada en estas etapas de un orden de magnitud. Estas diferencias se deben a las características de los fango generados en los tratamientos biológicos y su capacidad de formar agregados, a la menor competencia entre microorganismos en las etapas de decantación o a que las diferencias de tiempos de retención hacen que algunos microorganismos vuelvan a la fase líquida en lugar de decantar y trasladarse a la línea de tratamiento de fangos.
5. En el tratamiento de doble etapa de cultivo en suspensión y filtros percoladores la reducción se produce mayoritariamente en la primera etapa. Por otro lado, en el tratamiento de doble etapa de filtros percoladores, la concentración microbiológica es muy similar a la salida de cada una de las etapas. Estos resultados concuerdan con los determinados por algunos autores a la salida de bioreactores secuenciales (George et al., 2002).
6. El tratamiento terciario mediante lagunaje reduce la concentración microbiológica hasta cuatro órdenes de magnitud, alcanzando las mayores eliminaciones a mayor tiempo de exposición del agua a la radiación solar. La irradiación solar juega un doble papel en la eliminación de agentes patógenos mediante lagunaje: incrementando la temperatura del agua y originando elevadas concentraciones de oxígeno disuelto como subproducto de las actividad fotosintética de las microalgas (Salas et al., 2007a). Por otro lado, el uso del humedal como tratamiento terciario no reduce la concentración microbiológica en ningún

caso, llegando incluso a aumentar la concentración un orden de magnitud. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios (George et al., 2002).

7. En general en las etapas de deshidratación de fangos, como son el espesamiento y la centrifugación, se observan resultados diferentes: en algunos casos la concentración microbiológica en el fango y en el sobrenadante es del mismo orden de magnitud, mientras que en otros casos hay diferencias entre ambas fases de hasta cuatro órdenes de magnitud dependiendo del microorganismo considerado. Estos resultados conllevan a plantearse la importancia en este proceso de la naturaleza hidrofóbica o hidrofílica de las bacterias, el tiempo de retención del fango en el momento en el que se tomó la muestra o el tratamiento biológico de la línea de aguas (filtros percoladores o cultivo en suspensión) que afecta a la edad del fango (Sobrados et al., 2010). La fracción de bacterias asociadas a partículas puede variar de un tipo de agua a otra, además de verse influenciada por la eficiencia de eliminación bacteriana. En concreto, algunos autores muestran resultados donde enterococos parecen tener mayor afinidad que *E.coli* con la fracción sedimentable de las partículas presentes con tamaño mayor que 5 μm en aguas de río (George et al., 2002; Sinclair et al., 2009; Lucas et al., 2014). Por otro lado, si se observan los tiempos de retención hidráulica para la EDAR 1, la EDAR 3 y la EDAR 5 (tablas 4.2, 4.18 y 4.34 respectivamente), la EDAR 3 tiene el menor tiempo de espesamiento. Finalmente, la EDAR 5 muestra menores concentraciones en el agua que retorna del espesador a la línea de agua y podría asociarse a la concentración de ST determinada.

La elevada concentración microbiológica determinada, tanto en los reactores de cultivos en suspensión como en las muestras agua que retornan a la línea de tratamiento de aguas, y especialmente en M11 de la EDAR 2 (tabla 4.13) y M10 de la EDAR 5 (tabla 4.37), conllevan una elevada aportación microbiológica a la línea de tratamiento de aguas al recircular el sobrenadante de esas etapas e indica que en ocasiones las bacterias no son eliminadas a lo largo de la depuración si no que se trasladan a la línea de fangos, donde se acumulan e incluso pueden proliferar.

8. El tratamiento de fangos mediante digestión aerobia a temperaturas entre 25-62°C, produce resultados dispares en cuanto a la eliminación de la concentración microbiana. En concreto, la concentración a la salida del digester es en algunos casos del mismo orden de magnitud que a la entrada del mismo como para *E.coli* en la EDAR 2 o *S.aureus* en la EDAR 4 (tablas 4.14 y 4.30), mientras que en otros casos la concentración es entre 1 y 3 órdenes de magnitud inferior tras la etapa de digestión, dependiendo del microorganismo considerado, como por ejemplo para algunas bacterias en la EDAR 4 (tabla 4.30).
9. Al clasificar las bacterias analizadas en Gram positivas y Gram negativas, se observan concentraciones similares para cada grupo de bacterias en la línea de tratamiento de aguas. En concreto, la concentración de coliformes totales y *Pseudomonas* sp. es similar a lo largo del tratamiento, siendo ambas bacterias Gram negativas. Así mismo, la concentración de *Enterococcus* sp. y *S.aureus* y *C.perfringens* muestra similitudes en los rangos de concentración a lo largo la línea de tratamiento, siendo ambas Gram positivas. Por otro lado, se observan diferencias en los rangos de concentración de las bacterias Gram positivas y las bacterias Gram negativas que se determinan cuantitativamente. Concretamente, *Pseudomonas* sp. y coliformes totales se encuentran en concentraciones hasta 5 órdenes de magnitud superiores a las bacterias Gram positivas analizadas. Las diferencias en los rangos de concentración microbiológica observadas entre ambos

grupos podrían deberse tanto a su abundancia en el origen del vertido como a la persistencia de cada grupo de bacterias en el agua residual bruta. Considerando la naturaleza de cada microorganismo, las bacterias coliformes indican contaminación reciente mientras que la presencia de *Enterococcus* sp. y *C.perfringens* indica que existe contaminación fecal antigua. Por otro lado, la elevada concentración de *Pseudomonas* sp. se debe a su origen ambiental. Otros estudios determinan concentraciones similares a las detectadas en este trabajo además de una relación entre las bacterias analizadas y la presencia de patógenos en aguas residuales brutas (George et al., 2002; Reinoso et al., 2008; Manaia et al., 2010; Madoux-Humery et al., 2013; Lucas et al., 2014; Naidoo y Olaniran, 2014; Marín et al., 2015; Gómez et al., 2016).

En cuanto a los resultados obtenidos en la línea de tratamiento de fangos, no se observan diferencias en los rangos de concentración determinados de bacterias Gram positivas y Gram negativas salvo en la EDAR 2, donde los resultados son similares a los determinados en la línea de tratamiento de aguas (tabla 4.14). Esto puede relacionarse con la capacidad de adaptación y supervivencia de cada microorganismo en estos procesos. Por ejemplo, *Pseudomonas* sp. es una bacteria aerobia presente en menor concentración en los fangos procedentes de los reactores anaerobios o anóxicos mientras que *C.perfringens* y *Salmonella* spp. aparecen con mayor frecuencia en estas condiciones.

10. Desde el punto de vista de la evolución de concentración microbiológica a lo largo de la línea de depuración, el comportamiento de todas las bacterias estudiadas es muy similar a pesar de tener características diferentes y de observar diferencias destacables entre las bacterias que son Gram positivas y las Gram negativas en los rangos de concentración detectadas. Por ello, se puede considerar el análisis de una bacteria indicadora (por ejemplo *E.coli*) para el estudio de la evolución del conjunto de bacterias a lo largo de la EDAR. Sin embargo, si se desea información más rigurosa sobre el origen y las características de las aguas residuales y los vertidos, es necesario realizar una caracterización microbiológica más completa de las aguas.
11. La presencia de *Salmonella* spp. varía en función de la EDAR considerada: en algunos casos se detecta a la entrada de planta pero no en el agua a la salida, lo que indica su reducción a lo largo del tratamiento (EDAR 1, EDAR 2 y EDAR 3) o su paso a la línea de tratamiento de fangos (EDAR 4). En otros casos se detecta tanto a la entrada como a la salida de la EDAR, lo que puede indicar que el proceso de depuración no reduce eficazmente la concentración por debajo de los límites detectables o bien un aporte continuo de este patógeno capaz de persistir en el ambiente en condiciones favorables. También se detecta este patógeno en otros puntos como en el cultivo en suspensión en condiciones anaerobias, espesador, digestor aerobio y centrifuga por lo que puede suponerse que esta bacteria se concentra en etapas donde las condiciones anaerobias favorecen su crecimiento. Algunos autores relacionan la presencia de *E.coli* como indicativa de posible existencia de *Salmonella* spp. (Koivunen et al., 2003; Reinoso et al., 2008) aunque no se puede constatar con los resultados obtenidos. Otros estudios no detectaron este patógeno después del tratamiento terciario (Koivunen et al., 2003) al contrario de lo observado en este caso para el agua de salida del humedal en la EDAR 5.
12. Para una misma EDAR, no se observan diferencias notables en los resultados de concentración microbiológica para las diferentes campañas. Aun así, en algunas etapas, se observa cierta tendencia a conseguir una mayor reducción bacteriana al aumentar la

temperatura ambiente, relacionando este hecho con el aumento de la predación por parte de los protozoos con la temperatura (Koivunen et al., 2003). Otros autores determinaron densidades más bajas de *E.coli* en invierno (Lucas et al., 2014; Szylak-Szylowski et al., 2016). Algunos autores como Lalancette (2014) establecen relaciones entre la supervivencia de *E.coli* y patógenos como *Cryptosporidium* con las variaciones estacionales, lo que incluye además de la temperatura parámetros como la radiación solar, las precipitaciones o ciclos de sequía. Por otro lado, algunos estudios muestran correlaciones entre parámetros en efluentes de EDAR como DQO y amonio con las concentraciones de *E.coli* y enterococos intestinales (Ouattara et al., 2014).

13. La elevada concentración microbiológica detectada en todas las depuradoras en relación a los parámetros microbiológicos analizados, tanto de la línea de tratamiento de aguas como la de fangos, indica sin lugar a dudas la presencia de gérmenes potencialmente patógenos de diversa naturaleza, como bacterias, virus y protozoos, que podrían suponer un riesgo para la salud pública. Algunos estudios determinan que estos microorganismos no muestran un comportamiento similar al de las bacterias analizadas en este estudio o que su comportamiento no se asemeja en función del origen del agua analizada o la etapa del proceso de tratamiento (Reinoso et al., 2008; Lalancette et al., 2014; Qiu et al., 2015). Por ello, es necesario analizar, además de las bacterias indicadoras, otros microorganismos con carácter patógeno, a pesar de la dificultad que presentan estos análisis, o intentar establecer correlaciones más precisas entre microorganismos, cuyo control pueda realizarse de manera sencilla y rápida.
14. De los resultados obtenidos tras el control microbiológico de aguas de entrada y salida de las EDARs así como de las aguas superficiales naturales receptoras de los vertidos, pertenecientes a la cuenca hidrográfica del Ebro, se puede concluir que debido a la gran carga microbiológica ya presente actualmente en los tramos medidos de las aguas superficiales receptoras de dichos vertidos urbanos, el impacto de los mismos se considera prácticamente despreciable, por ser la contaminación microbiológica de la misma magnitud que en los cauces receptores.

Capítulo 5.

Estudio a escala piloto del efecto que sobre la calidad microbiológica de fangos tiene el proceso de digestión aplicado

5.1 ANTECEDENTES.....	5-1
5.2 ENSAYOS A ESCALA PILOTO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA MESÓFILA Y TERMÓFILA.....	5-2
5.2.1 Descripción de las plantas.....	5-2
5.2.2 Toma de muestras de fangos y parámetros de caracterización	5-4
5.2.3 Puesta en marcha y control operacional de plantas	5-4
5.2.3.1 Control en periodo de transición	5-4
5.2.3.2 Control en periodo estacionario	5-5
5.2.4 Control de calidad de fangos: resultados e interpretación	5-7
5.2.4.1 Caracterización físico-química.....	5-7
5.2.4.2 Caracterización microbiológica.....	5-15
5.3 ENSAYO A ESCALA PILOTO DE DIGESTIÓN AEROBIA TERMÓFILA AUTOSOSTENIDA ..	5-21
5.3.1 Descripción de la planta	5-21
5.3.2 Toma de muestras de fangos y parámetros de caracterización	5-22
5.3.3 Puesta en marcha y control operacional de planta	5-23
5.3.3.1 Control en periodo transitorio.....	5-23
5.3.3.2 Control en periodo estacionario	5-23
5.3.4 Control de calidad de fangos: resultados e interpretación	5-25
5.3.4.1 Caracterización físico-química.....	5-25
5.3.4.2 Caracterización microbiológica.....	5-29
5.4 ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE PROCESOS.....	5-33
5.4.1 Análisis de variables operacionales	5-33
5.4.2 Grado de cumplimiento de criterios de calidad del fango tratado.....	5-36

5.1 ANTECEDENTES

Nilsa (Navarra de Infraestructuras Locales, S.A) pone a disposición del estudio tres plantas piloto diseñadas y construidas dentro de un trabajo de investigación desarrollado en el marco de un convenio de colaboración (2005-2007) entre el Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas (CEDEX) y Nilsa, denominado “Estudio para el establecimiento de criterios de estabilización e higienización de fangos procedentes de una estación de aguas residuales”, cuyo objetivo principal fue profundizar en el concepto de estabilización de los fangos y valorar la higienización de los mismos mediante el seguimiento de poblaciones de *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens*. Los principales resultados y conclusiones de ese proyecto están publicados en el libro “Criterios para aplicación de fangos de depuradora en suelos: estabilidad e higienización” y son objeto de continuación este trabajo, evaluando el comportamiento de otras bacterias para llegar a conclusiones más amplias y de carácter más general.

Las plantas piloto están ubicadas en las instalaciones de la EDAR 2 que es objeto de estudio en el capítulo 4. Los tratamientos aplicados al fango en las plantas son: digestión anaerobia mesófila, digestión anaerobia termófila y digestión aerobia termofila. Las tres plantas están situadas a pie de EDAR, operan en las mismas fechas y el fango de alimentación es el obtenido en la EDAR, por lo que los tratamientos tienen lugar en condiciones lo más próximas posible a la escala real y esto permite realizar estudios comparativos reproducibles.

Debido a que las plantas no se utilizan desde 2007, la primera tarea a realizar es la completa inspección, instalación, adquisición y sustitución de piezas y equipos deteriorados y verificar su funcionamiento.

5.2 ENSAYOS A ESCALA PILOTO DE DIGESTIÓN ANAEROBIA MESÓFILA Y TERMÓFILA

5.2.1 Descripción de las plantas

Tanque de alimentación

El fango de alimentación a las dos plantas piloto de digestión se almacena en un tanque de políéster de 2.35 m de diámetro. Posee un sistema de agitación/aireación que funciona de forma intermitente controlado por un autómatas. La carga de los digestores se realiza una vez al día.

Digestores

Las plantas piloto anaerobias están diseñadas para trabajar en régimen de mezcla continua. Este tipo de digestores mantiene una agitación completa y continua del fango para conseguir un mejor contacto entre la biomasa y el sustrato a tratar. En estas condiciones el tiempo de retención de sólidos (STR) es igual al tiempo de retención hidráulico (TRH) (Sobrados et al., 2010).

Los digestores son iguales y de acero inoxidable con un material aislante para minimizar pérdidas de temperatura a través de las paredes del digestor tal y como se muestra en la figura 5.1. Además están recubiertas con láminas de aluminio para protegerlas de las inclemencias climatológicas. El diámetro de los tanques es de 1.30 m y la altura de 3 m, con un volumen útil de aproximadamente 2.75 m³. Uno de ellos opera en rango de temperatura mesófilo y el otro en rango termófilo.



Figura 5.1: Plantas piloto anaerobias situadas en la EDAR 2

Agitación

Cada tanque cuenta con una agitación mecánica que funciona en continuo. La agitación se realiza mediante una barra de acero inoxidable, girada por un motor, en la que se acoplan dos hélices. Los agitadores están acoplados a los digestores mediante un sistema de cierre hidráulico para evitar que se produzcan fugas del biogás producido o que entre aire del exterior.

Sistema de calentamiento

Cada digestor cuenta con una recirculación en continuo del fango que es llevada a cabo por una bomba de desplazamiento volumétrico. La recirculación sale por la parte inferior del tanque, pasa a través de un intercambiador de calor y retorna al digestor por la parte superior. El sistema mantiene la temperatura interior del digestor y aporta una agitación adicional a la mecánica.

Para calentar el agua de los intercambiadores se utiliza una caldera eléctrica. El paso del agua caliente a los intercambiadores se regula mediante electroválvulas cuyo tiempo de apertura es controlado por el autómatas según la demanda de calor de cada digestor.

Entrada del fango

La entrada del fango de alimentación a los digestores se lleva a cabo a través de la recirculación, en un punto anterior a su paso por el intercambiador de calor, para que el fango fresco, que se encuentra a temperatura ambiente, se caliente antes de entrar al digestor. La alimentación se realiza mediante una bomba temporizada que impulsa el fango desde el depósito de poliéster al digestor. El caudal diario de fango que se alimenta a la planta se controla variando el tiempo de funcionamiento de la bomba de carga desde el ordenador de control de la planta piloto.

Salida del fango

La salida se realiza por rebose a través de un tubo sumergido unos 20 cm en el fango que hace las veces de sello hidráulico. El fango digerido es recogido en unos depósitos de poliéster (figura 5.1), donde se mide su volumen diariamente para controlar el caudal de fango alimentado a cada reactor.

Circuito de salida de biogás

La salida de biogás desde la cúpula del digestor tiene lugar a través de un tubo de acero inoxidable. Esta salida se genera debido a la diferencia de presiones entre la cúpula y el otro extremo del tubo, que se encuentra a presión atmosférica, de forma que los digestores trabajan a presión constante. El biogás se hace pasar a través de un circuito para eliminar el agua condensada que contiene antes de ser medido mediante un caudalímetro másico.

Sensores

En las plantas piloto se miden el caudal de biogás y la temperatura. El caudal producido en las plantas se mide mediante unos caudalímetros de flujo másico y la medida de la temperatura se realiza mediante un sensor de temperatura Pt-100 instalado en el interior de cada uno de los digestores. El sensor está conectado a un transmisor que envía la señal al autómatas.

Monitorización, control y adquisición de datos

Las plantas piloto cuentan con un sistema ESCADA para la monitorización, control y adquisición de datos que facilita su operación y control (Sobrados et al., 2010). Este sistema cuenta fundamentalmente con un ordenador de control y un autómatas. La programación del autómatas consiste en la implementación de las siguientes tareas: adquisición del valor de temperatura de ambos digestores, apertura y cierre de las electroválvulas para la carga de los digestores, temporización de la bomba de alimentación de los digestores, temporización de la

aireación/agitación del tanque de poliéster y control de la temperatura de los digestores mediante un set-point.

5.2.2 Toma de muestras de fangos y parámetros de caracterización

El punto de toma de muestras del fango digerido se ubica en la tubería de recirculación de cada digestor y las muestras se toman antes de la carga diaria de fango fresco a los digestores.

Se realiza un control diario del proceso mediante la toma de muestras y el análisis de parámetros físico-químicos del fango fresco o de carga y el fango digerido. Se emplean frascos de 500 ml y los análisis se realizan a lo largo de ese día. Se determinan pH, ST, SV, FV, DQO de la muestra filtrada, N-NH₄, alcalinidad de bicarbonatos, alcalinidad total, alcalinidad a ácidos grasos volátiles (AGV), carga orgánica alimentada y carga orgánica eliminada. La metodología seguida para la determinación de los parámetros físico-químicos se referencia en el apartado 3.1 del capítulo 3. Por otro lado, se calculan la carga orgánica alimentada y la carga orgánica eliminada mediante las ecuaciones 5.1 y 5.2.

$$\text{Carga orgánica alimentada} = Q \left(\frac{l}{\text{día}} \right) x [SV]_{\text{alimentados}} \left(\frac{g}{l} \right) 10^{-3} \frac{kg}{g} x \frac{1}{V_{\text{tanque}}(m^3)}$$

[ecuación 5.1]

$$\text{Carga orgánica eliminada} = Q \left(\frac{l}{\text{día}} \right) x [SV]_{\text{eliminados}} \left(\frac{g}{l} \right) 10^{-3} \frac{kg}{g} x \frac{1}{V_{\text{tanque}}(m^3)}$$

[ecuación 5.2]

Una vez alcanzado el estado estacionario para determinados tiempos de retención hidráulico (TRH) se toman muestras del fango de alimentación o carga y del fango digerido para el análisis de parámetros microbiológicos. En concreto se analizan coliformes totales, *E.coli*, *S.aureus*, *Pseudomonas* sp., *Enterococcus* sp., *Salmonella* spp. y recuento de mesófilas totales siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo 3 (apartado 3.2). La toma de muestras para la caracterización microbiológica se realiza con frascos estériles de 500 ml y las muestras se conservan refrigeradas hasta su análisis en menos de 12 horas. El análisis de cada bacteria en cada muestra se realiza por triplicado. Teniendo en cuenta que se analizan 3 muestras, y considerando sus respectivas diluciones (3 al menos), se estima que se cultivan aproximadamente 160 placas para el recuento de microorganismos, en cada toma de muestras.

5.2.3 Puesta en marcha y control operacional de plantas

5.2.3.1 Control en periodo de transición

Este periodo es el que tiene lugar inicialmente, al poner en marcha las plantas piloto por primera vez, y posteriormente entre un periodo estacionario y otro hasta alcanzar los TRH seleccionados. En concreto, el periodo de transición corresponde al tiempo de crecimiento necesario hasta que la población de la biomasa en el digestor se ajusta a la nueva concentración de carga. Durante este periodo transitorio, la producción de biogás crece en

cada ciclo hasta el nuevo periodo de estabilidad. En estos ciclos, el proceso no es capaz de convertir a metano toda la materia orgánica introducida con la carga del digestor y se produce una sobrecarga. La mayor velocidad de producción de biogás se debe a la presencia de un sustrato más fácilmente biodegradable de manera que la producción está limitada por la cinética de la biomasa metanogénica. Tras este periodo, la curva de producción de biogás está limitada por la cinética de la hidrólisis de un sustrato más lentamente biodegradable (Sobrados et al., 2010). Para obtener un proceso de digestión estable todos los parámetros medidos diariamente (temperatura, flujo de fango, pH, DQO, sólidos totales y volátiles, nitrógeno amoniacal y ácidos grasos volátiles) deben mantenerse constantes.

En el caso de la planta que opera en condiciones termófilas (55-58°C), se necesitan generalmente hasta 10 meses para estabilizar el proceso desde su puesta en marcha, mientras que la planta que opera en condiciones mesófilas (35-38°C) requiere menores tiempos hasta su estabilización (Sobrados et al., 2010).

5.2.3.2 Control en periodo estacionario

Se considera que un digestor alcanza un régimen estacionario cuando se mantienen todas las condiciones de operación constantes durante un tiempo superior a tres veces el tiempo de retención. En concreto, los TRH seleccionados en cada digestor son los que se muestran en la tabla 5.1.

Tabla 5.1: Periodos estacionarios en las plantas anaerobias

	TRH en anaerobio mesófilo (d)	TRH en anaerobio termófilo (d)
Estacionario 1	20	15
Estacionario 2	15	10
Estacionario 3	12	7
Estacionario 4	10	5

En los periodos de régimen estacionario se utiliza como parámetro de control la concentración de los sólidos inorgánicos, que son la diferencia entre los sólidos totales y los volátiles. Este parámetro tiene que presentar valores similares en el fango de carga y en el fango digerido, es decir, no se tienen que observar modificaciones de su concentración. De esta manera se supone un funcionamiento mecánico correcto del sistema, una agitación y mezcla correcta, así como la ausencia de decantación y acumulación en el reactor.

Las figuras 5.2, 5.3, 5.4 y 5.5 muestran la evolución de los sólidos inorgánicos en el fango de alimentación y en los digestores en cada Estacionario.

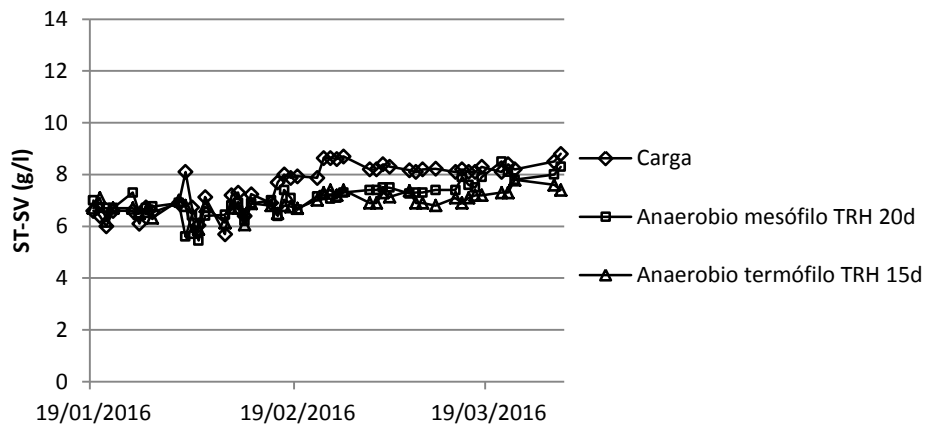


Figura 5.2: Evolución de la concentración de sólidos inorgánicos (ST-SV) en el fango de alimentación y en los digestores anaerobios en el Estacionario 1

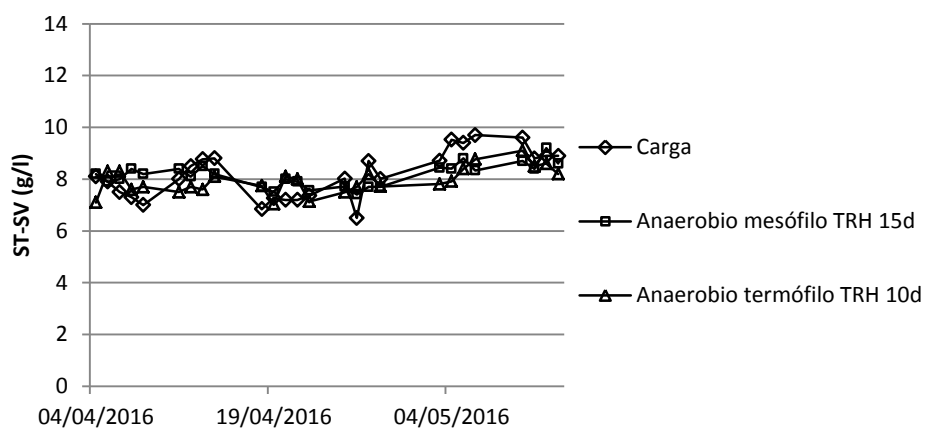


Figura 5.3: Evolución de la concentración de sólidos inorgánicos (ST-SV) en el fango de alimentación y en los digestores anaerobios en el Estacionario 2

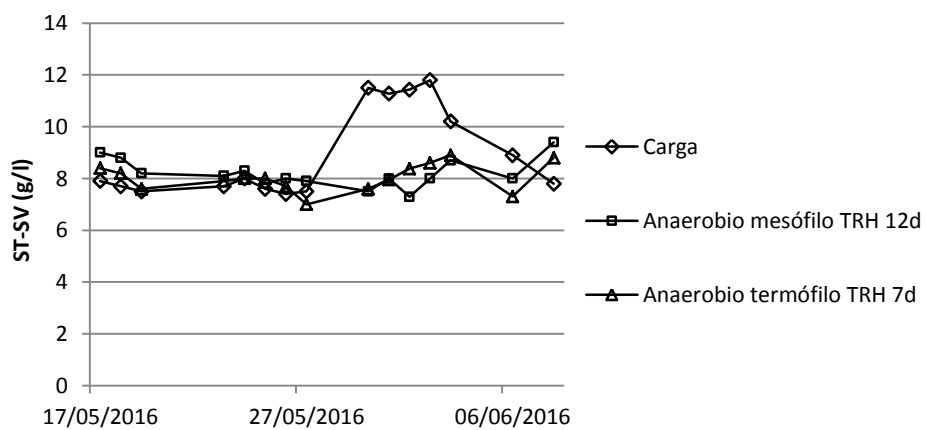


Figura 5.4: Evolución de la concentración de sólidos inorgánicos (ST-SV) en el fango de alimentación y en los digestores anaerobios en el Estacionario 3

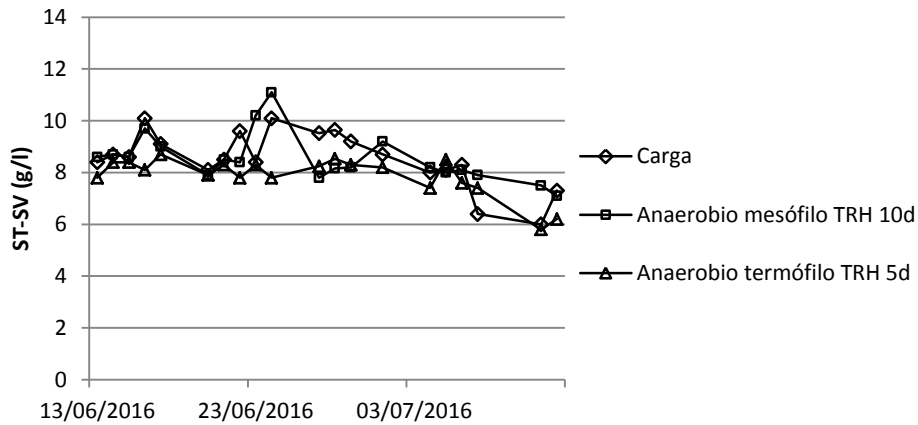


Figura 5.5: Evolución de la concentración de sólidos inorgánicos (ST-SV) en el fango de alimentación y en los digestores anaerobios en el Estacionario 4

Tal y como muestran las figuras 5.2, 5.3, 5.4 y 5.5 los sólidos inorgánicos evolucionan de manera similar en el fango de carga y el fango digerido en cada periodo estacionario considerado, indicando un correcto funcionamiento de los reactores.

5.2.4 Control de calidad de fangos: resultados e interpretación

5.2.4.1 Caracterización físico-química

Eliminación de materia orgánica

Para evaluar la eliminación de materia orgánica en cada estacionario se realiza el seguimiento de la concentración de sólidos volátiles y de la fracción volátil en el fango fresco y en los digestores. La fracción volátil se calcula como la división entre sólidos volátiles y sólidos totales y se expresa en porcentaje. Además, la eliminación de volátiles es indicador del biogás que se va a producir. Las figuras 5.6, 5.7, 5.8 y 5.9 muestran la concentración de sólidos volátiles, en el fango de alimentación y en los digestores, en cada Estacionario y en las figuras 5.10, 5.11, 5.12 y 5.13 se muestran los valores de fracción volátil, en el fango de alimentación y en los digestores, en cada Estacionario.

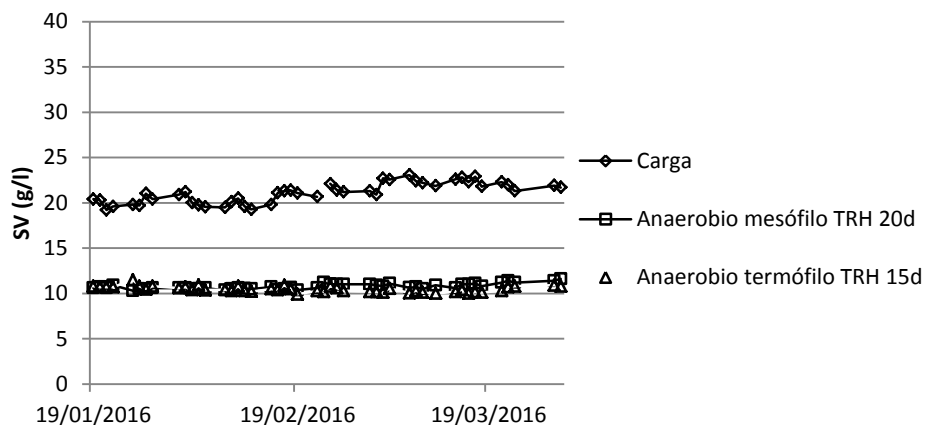


Figura 5.6: Concentración de sólidos volátiles en el fango de alimentación y los digestores durante el Estacionario 1

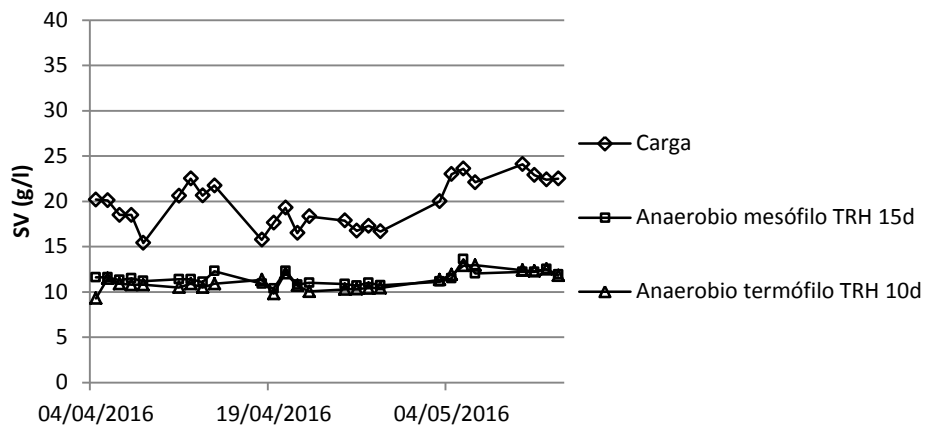


Figura 5.7: Concentración de sólidos volátiles en el fango de alimentación y los digestores durante el Estacionario 2

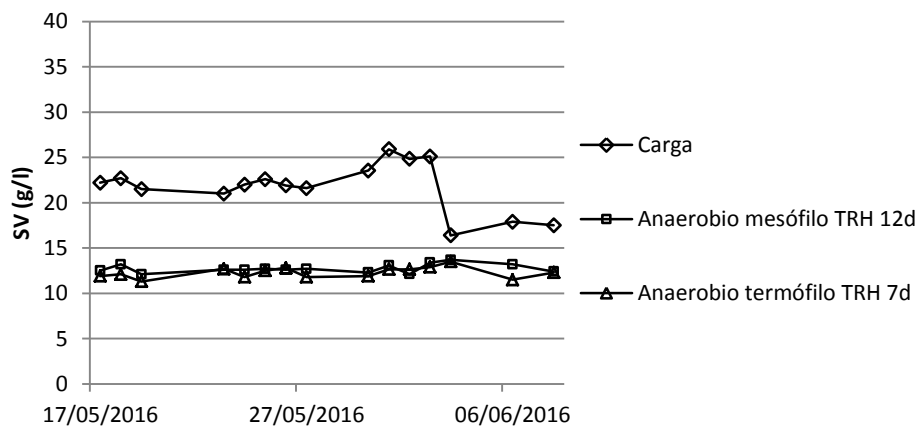


Figura 5.8: Concentración de sólidos volátiles en el fango de alimentación y los digestores durante el Estacionario 3

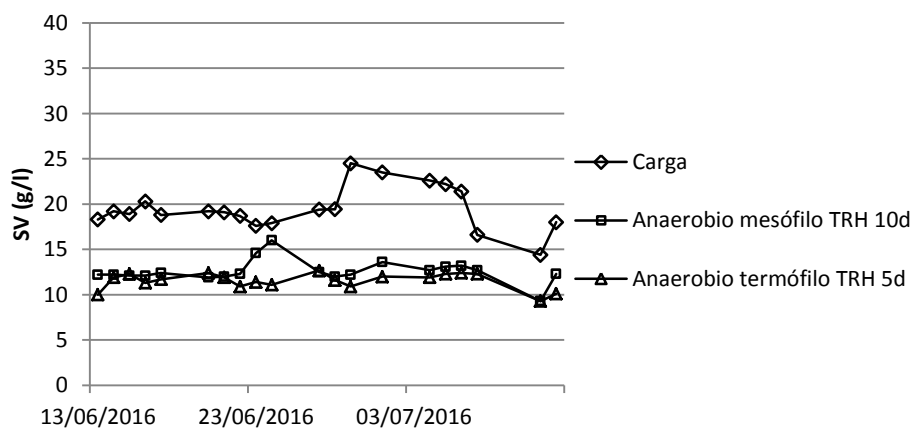


Figura 5.9: Concentración de sólidos volátiles en el fango de alimentación y los digestores durante el Estacionario 4

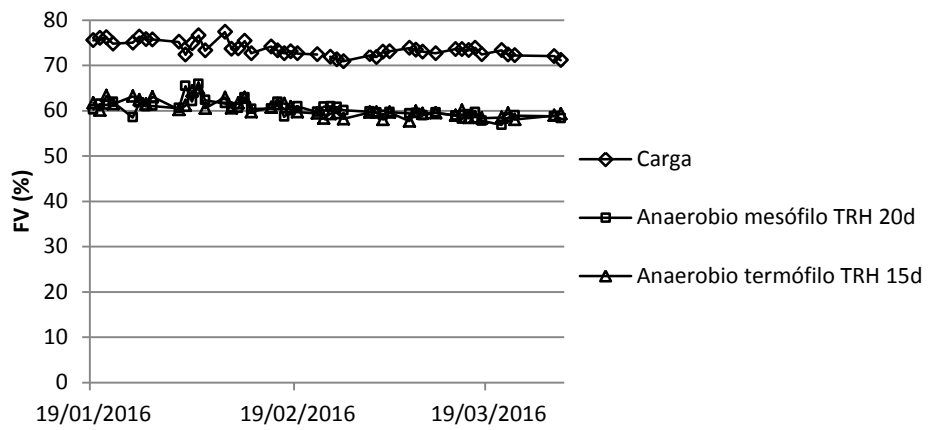


Figura 5.10: Fracción volátil en el fango de alimentación y en los digestores durante el Estacionario 1

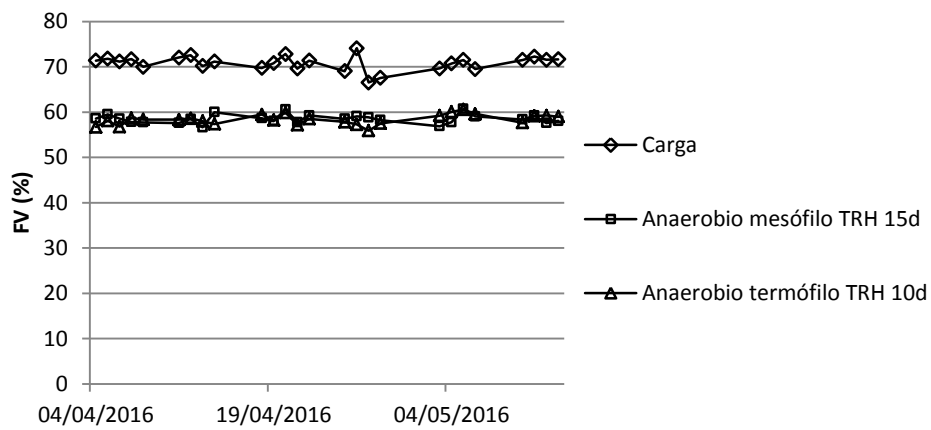


Figura 5.11: Fracción volátil en el fango de alimentación y en los digestores durante el Estacionario 2

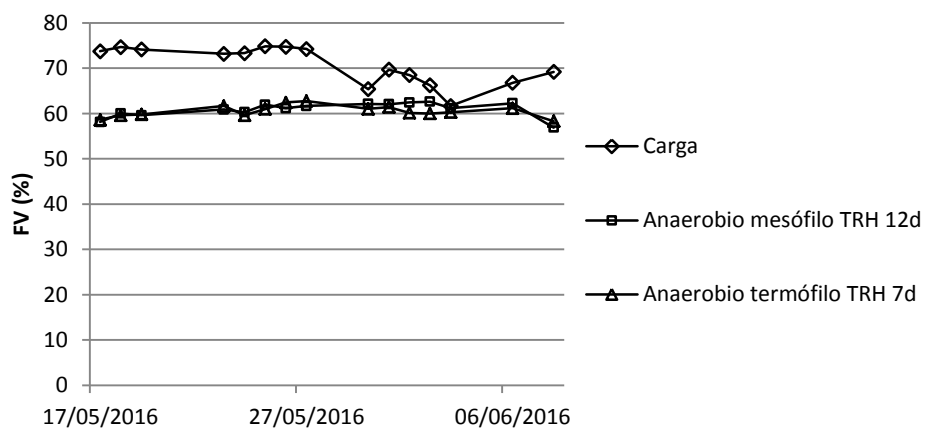


Figura 5.12: Fracción volátil en el fango de alimentación y en los digestores durante el Estacionario 3

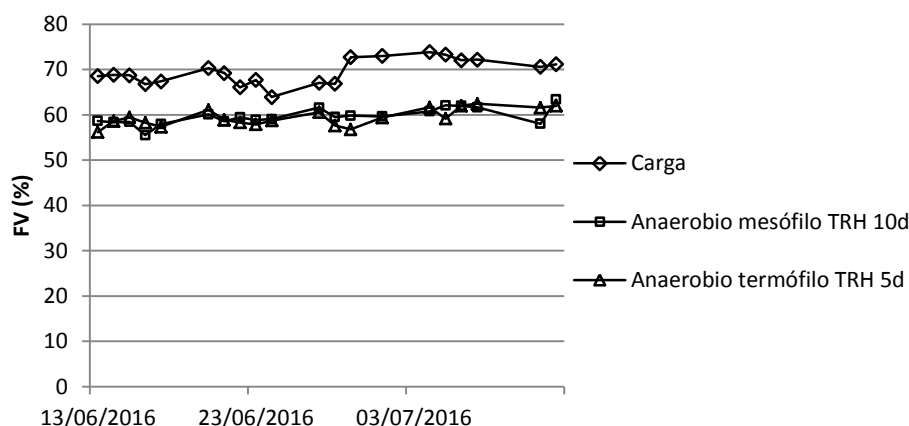


Figura 5.13: Fracción volátil en el fango de alimentación y en los digestores durante el Estacionario 4

Tal y como muestran las figuras 5.6-5.13, la concentración de SV y la fracción volátil en ambos digestores, se mantienen similares entre sí, lo que indica que la concentración eliminada en ambos digestores es similar aunque los tiempos de retención sean diferentes en el reactor mesófilo y el termófilo en cada Estacionario. Además, los resultados muestran que el rendimiento de eliminación no disminuye al bajar el tiempo de retención. Por otro lado, una mayor FV en el fango de carga generalmente se asocia a una mayor biodegradabilidad del mismo y se obtiene un mayor rendimiento de eliminación de materia orgánica. Es decir, cuanto más biodegradable es el fango de carga, mayor es el rendimiento de eliminación de materia orgánica en el digestor, con independencia del tiempo de retención al que se trabaje en el rango estudiado (Sobrados et al., 2010).

Las tablas 5.2, 5.3, 5.4 y 5.5 muestran los resultados del control de diversos parámetros físico-químicos determinados en el fango de carga y en el fango digerido, en cada periodo estacionario.

Tabla 5.2: Resultados de parámetros físico-químicos de control en el tratamiento anaerobio. Estacionario 1

Parámetro	Carga	Anaerobio mesófilo TRH 20d	Anaerobio termófilo TRH 15d
pH	6.1±0.2	7.3±0,1	7.6±0.1
Temperatura (°C)	-	35.4±0.8	54.4±1,5
Sólidos totales (g/l)	28.6±2	17.8±1	17.3±0.5
Sólidos volátiles (SV) (g/l)	21.1±1.1	10.8±0.3	10.5±0.3
Fracción volátil (FV)(%)	73.6±2	60.3±1,7	60.3±1.8
DQO filtrada (mg/l)	5200±900	700±110	3000±390
N-NH ₃ (mg/l)	230±60	550±29	670±34
Alcalinidad bicarbonatos (mgCaCO ₃ /l)	-	4700±260	4400±320
Alcalinidad total (mgCaCO ₃ /l)	-	6500±240	6200±300
Alcalinidad AGV (mgCaCO ₃ /l)	-	1800±120	1900±170
Carga orgánica alimentada (kgSV/m ³ d)	-	1.05	1.31
Carga orgánica eliminada (kgSV/m ³ d)	-	0.54	0.69
Rendimiento eliminación SV (%)	-	51.4/48.6	52.7/49.9

Tabla 5.3: Resultados de parámetros físico-químicos de control en el tratamiento anaerobio. Estacionario 2

Parámetro	Carga	Anaerobio mesófilo TRH 15d	Anaerobio termófilo TRH 10d
pH	5.8±0.2	7.3±0.1	7.6±0.1
Temperatura (°C)	-	35.8±0.6	54.9±0.7
Sólidos totales (g/l)	28.1±3	19.7±1	19.1±1
Sólidos volátiles (SV) (g/l)	19.8±3	11.5±1	11.1±1
Fracción volátil (FV) (%)	70.8±2	58.5±1.0	58.3±1.1
DQO filtrada (mg/l)	6400±630	870±100	3100±340
N-NH ₃ (mg/l)	240±26	540±25	650±39
Alcalinidad bicarbonatos (mgCaCO ₃ /l)	-	4700±210	4200±260
Alcalinidad total (mgCaCO ₃ /l)	-	6400±320	6000±250
Alcalinidad AGV (mgCaCO ₃ /l)	-	1800±170	1800±280
Carga orgánica alimentada (kgSV/m ³ d)	-	1.31	1.93
Carga orgánica eliminada (kgSV/m ³ d)	-	0.55	0.84
Rendimiento eliminación SV (%)	-	41.9/41.2	43.5/43.1

Tabla 5.4: Resultados de parámetros físico-químicos de control en el tratamiento anaerobio. Estacionario 3

Parámetro	Carga	Anaerobio mesófilo TRH 12d	Anaerobio termófilo TRH 7d
pH	5.8±0.2	7.3±0.1	7.6±0.1
Temperatura (°C)	-	36.1±0.3	54.6±2.5
Sólidos totales (g/l)	30.8±4	20.9±1	20.3±1
Sólidos volátiles (SV) (g/l)	21.8±3	12.7±1	12.3±1
Fracción volátil (FV) (%)	70.7±4	60.9±1.7	60.5±1.3
DQO filtrada (mg/l)	6200±750	760±111	3100±420
N-NH ₃ (mg/l)	260±48	550±18	680±42
Alcalinidad bicarbonatos (mgCaCO ₃ /l)	-	4300±170	3900±240
Alcalinidad total (mgCaCO ₃ /l)	-	6200±150	5900±160
Alcalinidad AGV (mgCaCO ₃ /l)	-	1900±110	2000±170
Carga orgánica alimentada (kgSV/m ³ d)	-	1.89	2.98
Carga orgánica eliminada (kgSV/m ³ d)	-	0.80	1.31
Rendimiento eliminación SV (%)	-	42.3/40.4	44.0/42.6

Al comparar los resultados de la caracterización físico-química del fango con estudios realizados previamente en las mismas plantas de digestión, se determina que los valores obtenidos son similares (Huete, 2007; Sobrados et al., 2010). Por otro lado, otros autores también obtienen resultados de caracterización similares en muestras de fango digerido en las condiciones estudiadas (Guzmán et al., 2007; Pandey y Soupir, 2011).

Tabla 5.5: Resultados de parámetros físico-químicos de control en el tratamiento anaerobio. Estacionario 4

Parámetro	Carga	Anaerobio mesófilo TRH 10d	Anaerobio termófilo TRH 5d
pH	6.1±0.2	7.3±0.1	7.4±0.2
Temperatura (°C)	-		
Sólidos totales (g/l)	28.0±3	21.2±2	19.4±2
Sólidos volátiles (SV) (g/l)	19.5±2	12.6±1	11.5±1
Fracción volátil (FV) (%)	69.5±3	59.7±2	59.4±2
DQO filtrada (mg/l)	6100±900	720±97	3000±570
N-NH ₃ (mg/l)	290±52	530±100	610±59
Alcalinidad bicarbonatos (mgCaCO ₃ /l)	-	3700±200	3200±280
Alcalinidad total (mgCaCO ₃ /l)	-	5600±190	5300±240
Alcalinidad AGV (mgCaCO ₃ /l)	-	1900±99	2100±210
Carga orgánica alimentada (kgSV/m ³ d)	-	1.90	3.78
Carga orgánica eliminada (kgSV/m ³ d)	-	0.69	1.53
Rendimiento eliminación SV (%)	-	36.3/34.9	40.5/40.3

La elevada DQO filtrada y el bajo pH en el fango de carga pueden ser indicativos de que tenga lugar una prehidrólisis durante su almacenamiento. Además la DQO del fango generado en condiciones termófilas es siempre superior a la DQO del fango obtenido en condiciones mesófilas, debido a una mayor solubilización y rotura del fango a mayores temperaturas, que genera materia orgánica soluble no biodegradable.

Otros parámetros como el nitrógeno amoniacal y el pH también tienen valores superiores en condiciones termófilas. En nitrógeno amoniacal es el originado durante la metabolización de los compuestos nitrogenados. Debido a que las cinéticas catalíticas de los microorganismos termófilos son más rápidas que las de los microorganismos mesófilos, en los digestores termófilos se da una mayor metabolización del material nitrogenado, y como consecuencia se produce más nitrógeno amoniacal (Gavala et al., 2003; Song et al., 2004). Además, se debe tener en cuenta que la temperatura y el pH afectan al equilibrio entre la forma tóxica y no tóxica del amoníaco (Scaglia et al., 2014). El pH suele ser superior en el fango de digestores termófilos anaerobios respecto a los mesófilos y el mayor pH junto con la mayor temperatura favorecen el desplazamiento del equilibrio amonio/amoniaco hacia la formación de amoníaco libre (Kim et al., 2002).

Por otro lado, la alcalinidad a bicarbonatos indica la capacidad de tamponamiento del reactor y la alcalinidad a hidrogenocarbonatos es proporcional a los ácidos grasos volátiles e indica si existe acumulación de los mismos.

Tal y como muestran los resultados de las tablas 5.2-5.5 para cada Estacionario, el rendimiento medio de eliminación de SV está aproximadamente entre un 35 y un 51% en el digestor mesófilo y entre un 40 y un 53% en el termófilo. Estos valores se calculan por un lado considerando los resultados de carga orgánica alimentada y eliminada a diario y por otro lado

a partir del promedio de los cálculos de rendimientos diarios. Tal y como muestran las tablas 5.2-5.5 los resultados obtenidos son muy similares.

Por lo tanto, salvo en el caso de la DQO, los valores del resto de parámetros controlados son similares en condiciones mesófilas y termófilas y con ello se deduce una mayor cinética de degradación en el rango termófilo de temperaturas, al obtener resultados similares a menores tiempos de retención.

Producción de biogás

Se realizan medidas diarias en continuo de la producción de biogás en cada digestor y se evalúa esa producción de biogás comparándola con la materia orgánica eliminada durante el tratamiento. La figura 5.14 muestra los valores de caudal de biogás (l/h) en el digestor mesófilo en intervalos de tiempo concretos del Estacionario 1, el Estacionario 2 y el Estacionario 3.

Por otro lado, la figura 5.15 muestra los valores de biogás (l/h) producidos en el digestor termófilo en intervalo de tiempo concretos de los Estacionarios 1, 2 y 3.

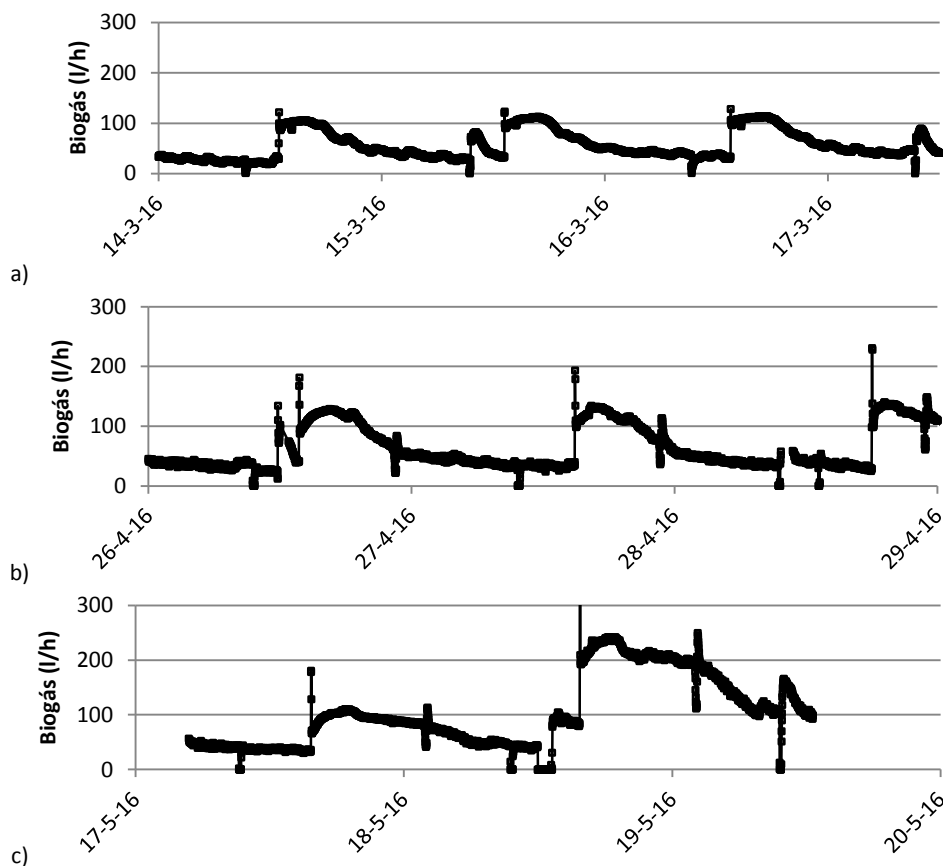


Figura 5.14: Producción de biogás en el digestor anaerobio mesófilo a) TRH 20 días; b) TRH 15 días; c) TRH 12 días

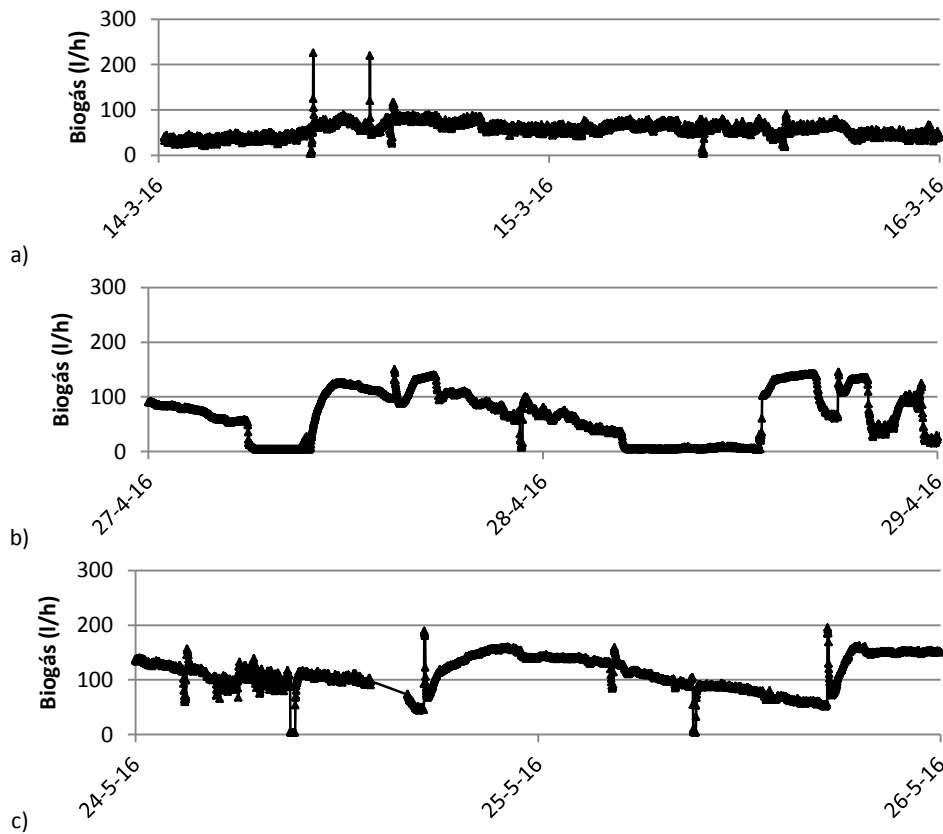


Figura 5.15: Producción de biogás en el digester anaerobio termófilo a) TRH 15 días; b) TRH 10 días; c) TRH 7 días

Con el fin de comprobar el correcto seguimiento del funcionamiento de las plantas, se determinan, en los tres primeros Estacionarios, los valores promedio de producción de biogás, así como el ratio de biogás por g de SV eliminado y el % de metano por g de SV eliminado, que se muestran en la tabla 5.6. Se consideran unos ratios aceptables si L biogás/g SV eliminado se encuentra entre 0.8-1.1 y el ratio L CH₄/g SV eliminado da valores en torno a 0.7 (Sobrados et al., 2010).

Tabla 5.6: Resultados de producción de biogás y ratios de control de los digestores para cada Estacionario

Parámetro	Estacionario 1		Estacionario 2		Estacionario 3	
	Mesófilo	Termófilo	Mesófilo	Termófilo	Mesófilo	Termófilo
Producción biogás (l/d)	1710	1730	1920	2130	1770	2790
L biogás/g SV eliminado	1.14	1.10	1.13	0.90	0.80	0.86
L CH₄/g SV eliminado	0.75	0.70	0.78	0.65	0.54	0.57

Los resultados indican que el biogás generado por gramo de materia orgánica eliminada (Lbiogás/g SV eliminado) es constante independientemente del rendimiento de eliminación de materia volátil con valores entre 0.8 y 1.1, de manera que cada gramo de SV eliminado genera una cantidad de biogás constante que depende únicamente de la composición del fango (Huete, 2007).

5.2.4.2 Caracterización microbiológica

Las tablas 5.7, 5.8, 5.9 y 5.10 muestran los valores de la concentración, en base húmeda, de las bacterias analizadas en la carga o fango alimentado y el fango digerido en el reactor anaerobio mesófilo y el anaerobio termófilo en cada Estacionario.

Tal y como muestran los resultados de las tablas 5.7, 5.8, 5.9 y 5.10, en el fango de alimentación o carga, la concentración microbiológica varía entre 10^3 - 10^6 UFC/ml en función del microorganismo analizado, siendo el recuento de mesófilas totales entre 10^6 - 10^8 UFC/ml (tabla 5.10). Al contrario de lo que ocurre en los resultados obtenidos en los análisis detallados en el capítulo 4, no se observan diferencias destacables de concentración entre bacterias Gram positivas y las bacterias Gram negativas. La reducción neta para cada microorganismo en el tratamiento de digestión es de hasta 3 órdenes de magnitud en condiciones mesófilas y de hasta 5 órdenes de magnitud en condiciones termófilas, observándose la menor concentración a mayores tiempos de retención para la mayoría de las bacterias.

Por otro lado, se observa una variabilidad en la contaminación microbiológica presente tanto en la carga como en el fango tratado en unas mismas condiciones.

Tabla 5.7: Caracterización microbiológica en la carga y los digestores anaerobios durante el Estacionario 1 (UFC/ml)

	Carga	Anaerobio mesófilo TRH 20 d	Anaerobio termófilo TRH 15 d
Coliformes totales	9.2 ± 0.7E+05	2.3 ± 1.2E+03	<1.0E+01
	1.7 ± 0.5E+05	1.2 ± 0.8E+03	5.8 ± 2.1E+02
	1.6 ± 0.2E+06	-	1.8 ± 0.8E+02
	2.0 ± 0.1E+05	-	2.5 ± 1.6E+02
<i>Escherichia coli</i>	1.6 ± 0.6E+05	6.3 ± 2.1E+02	<1.0E+01
	1.9 ± 0.8E+04	4.2 ± 2.0E+02	2.6 ± 1.4E+02
	1.5 ± 0.7E+05	-	7.0 ± 0.7E+01
	2.3 ± 1.2E+04	-	1.3 ± 0.5E+02
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.7 ± 0.9E+04	2.5 ± 0.6E+04	8.3 ± 1.4E+03
	9.3 ± 2.1E+03	8.3 ± 0.8E+03	1.8 ± 0.9E+03
	1.0 ± 0.8E+03	-	1.8 ± 1.1E+03
	4.6 ± 1.2E+03	-	6.3 ± 1.3E+02
<i>Enterococcus sp.</i>	1.2 ± 0.6E+05	3.8 ± 0.1E+03	<1.0E+01
	1.5 ± 0.2E+04	2.3 ± 1.2E+03	<5.0E+00
	8.7 ± 0.6E+04	-	<1.0E+01
	4.6 ± 2.3E+04	-	<1.0E+01
<i>Pseudomonas sp.</i>	8.3 ± 0.6E+04	1.5 ± 0.6E+02	1.0 ± 0.9E+04
	2.7 ± 0.2E+05	2.1 ± 0.8E+04	5.0 ± 2.1E+02
	2.2 ± 1.4E+05	-	1.1 ± 1.0E+03
	1.1 ± 0.4E+05	-	5.5 ± 2.1E+01
Recuento de mesófilas totales	1.7 ± 0.4E+06	3.0 ± 0.7E+05	1.1 ± 0.5E+05
	2.7 ± 0.6E+07	4.6 ± 0.4E+06	2.3 ± 0.3E+06
	8.7 ± 1.0E+07	-	1.1 ± 0.4E+05
	3.3 ± 0.5E+07	-	1.1 ± 0.9E+03

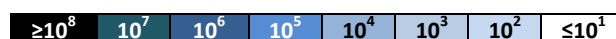


Tabla 5.8: Caracterización microbiológica en la carga y los digestores anaerobios durante el Estacionario 2 (UFC/ml)

	Carga	Anaerobio mesófilo TRH 15 d	Anaerobio termófilo TRH 10 d
	Coliformes totales	$4.0 \pm 1.8E+05$ $1.3 \pm 0.4E+06$	$7.8 \pm 2.9E+02$ $5.6 \pm 1.0E+02$
<i>Escherichia coli</i>	$5.1 \pm 1.9E+04$ $1.1 \pm 0.9E+05$	$2.5 \pm 1.8E+02$ $5.0 \pm 1.2E+02$	$1.4 \pm 0.5E+02$ $2.8 \pm 1.3E+02$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$1.7 \pm 0.6E+04$ $6.0 \pm 0.7E+04$	$1.7 \pm 0.2E+04$ $4.4 \pm 0.2E+04$	$9.9 \pm 0.4E+03$ $5.0 \pm 1.1E+04$
<i>Enterococcus sp.</i>	$1.3 \pm 0.2E+05$ $2.0 \pm 0.1E+05$	$8.2 \pm 1.1E+03$ $4.9 \pm 3.2E+03$	$<1.0E+01$ $2.9 \pm 0.6E+02$
<i>Pseudomonas sp.</i>	$3.5 \pm 0.7E+04$ $2.3 \pm 1.1E+05$	$2.9 \pm 0.7E+02$ $2.1 \pm 0.4E+02$	$5.0 \pm 1.2E+01$ $6.0 \pm 2.1E+01$
Recuento de mesófilas totales	$1.2 \pm 0.6E+06$ $1.6 \pm 0.9E+06$	$1.6 \pm 1.3E+05$ $1.5 \pm 0.9E+05$	$3.0 \pm 0.4E+04$ $1.3 \pm 0.6E+05$

$\geq 10^8$ 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 $\leq 10^1$

Tabla 5.9: Caracterización microbiológica en la carga y los digestores anaerobios durante el Estacionario 3 (UFC/ml)

	Carga	Anaerobio mesófilo TRH 12 d	Anaerobio termófilo TRH 7 d
	Coliformes totales	$1.3 \pm 0.2E+06$	$2.9 \pm 0.6E+03$
<i>Escherichia coli</i>	$2.0 \pm 0.9E+05$	$2.2 \pm 0.2E+03$	$2.1 \pm 0.7E+01$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$1.3 \pm 0.1E+04$	$3.3 \pm 0.6E+04$	$1.7 \pm 0.5E+04$
<i>Enterococcus sp.</i>	$6.3 \pm 0.6E+04$	$7.6 \pm 2.6E+03$	$<1.0E+01$
<i>Pseudomonas sp.</i>	$2.3 \pm 0.4E+05$	$5.0 \pm 1.3E+03$	$<1.0E+01$
Recuento de mesófilas totales	$5.0 \pm 0.3E+06$	$3.0 \pm 1.2E+05$	$3.1 \pm 0.6E+05$

$\geq 10^8$ 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 $\leq 10^1$

Tabla 5.10: Caracterización microbiológica en la carga y los digestores anaerobios durante el Estacionario 4 (UFC/ml)

	Carga	Anaerobio mesófilo TRH 10 d	Anaerobio termófilo TRH 5 d
	Coliformes totales	$1.1 \pm 0.4E+06$ $6.5 \pm 0.6E+05$	$7.4 \pm 2.0E+03$ $6.9 \pm 1.3E+03$
<i>Escherichia coli</i>	$1.7 \pm 0.4E+05$ $4.1 \pm 0.7E+04$	$2.9 \pm 0.3E+03$ $2.6 \pm 2.8E+03$	$2.3 \pm 0.6E+03$ $1.1 \pm 0.4E+02$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$4.7 \pm 2.8E+03$ $8.8 \pm 0.6E+03$	$7.9 \pm 1.5E+03$ $1.9 \pm 0.6E+02$	$4.5 \pm 1.1E+03$ $5.4 \pm 0.8E+03$
<i>Enterococcus sp.</i>	$1.1 \pm 0.2E+05$ $8.4 \pm 2.7E+04$	$7.8 \pm 1.1E+03$ $6.3 \pm 1.3E+03$	$<1.0E+01$ $<1.0E+01$
<i>Pseudomonas sp.</i>	$3.0 \pm 0.8E+05$ $8.5 \pm 2.0E+04$	$1.1 \pm 0.6E+03$ $7.9 \pm 1.1E+02$	$1.6 \pm 0.6E+02$ $5.0 \pm 0.4E+02$
Recuento de mesófilas totales	$1.8 \pm 0.3E+07$ $1.6 \pm 0.4E+08$	$8.1 \pm 1.3E+05$ $6.3 \pm 0.6E+06$	$1.4 \pm 0.3E+06$ $1.2 \pm 0.7E+05$

$\geq 10^8$ 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 $\leq 10^1$

En base a los resultados obtenidos en el tratamiento en condiciones mesófilas (tablas 5.7-5.10), la figura 5.16 muestra los resultados, en base logarítmica, de la concentración microbiológica de las bacterias indicadoras tras el tratamiento de digestión a los diferentes TRH. Por otro lado, la figura 5.17 muestra los valores de reducción de cada bacteria, expresados en unidades logarítmicas.

Tal y como muestra la figura 5.16, la concentración del recuento de mesófilas totales se encuentra entre 5 y 7 unidades logarítmicas de UFC/ml de muestra. Por otro lado, *Pseudomonas* sp. es la bacteria que se detecta en menor concentración para los TRH estudiados. Para los TRH de 20, 15 y 12 días los valores de concentración de *S. aureus* y *Enterococcus* sp. son superiores a los de coliformes totales y *E.coli*, siendo estas últimas bacterias Gram negativas.

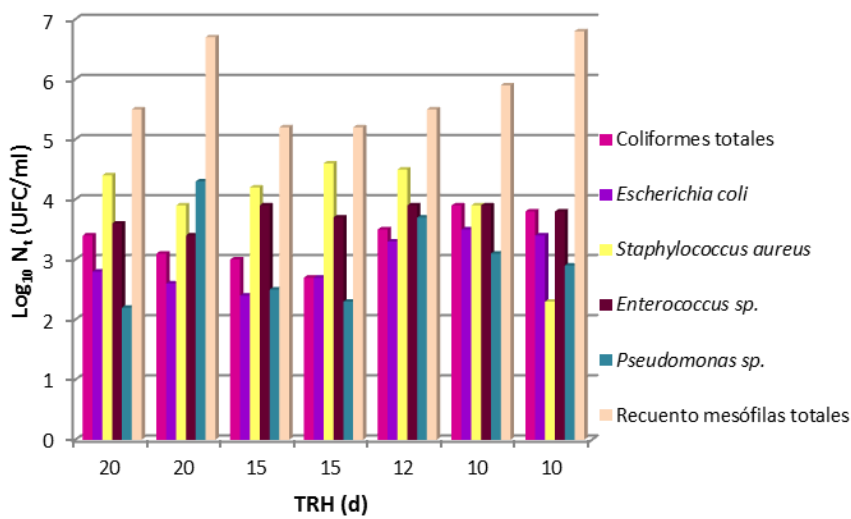


Figura 5.16: Concentración microbiológica del fango digerido en el tratamiento anaerobio mesófilo

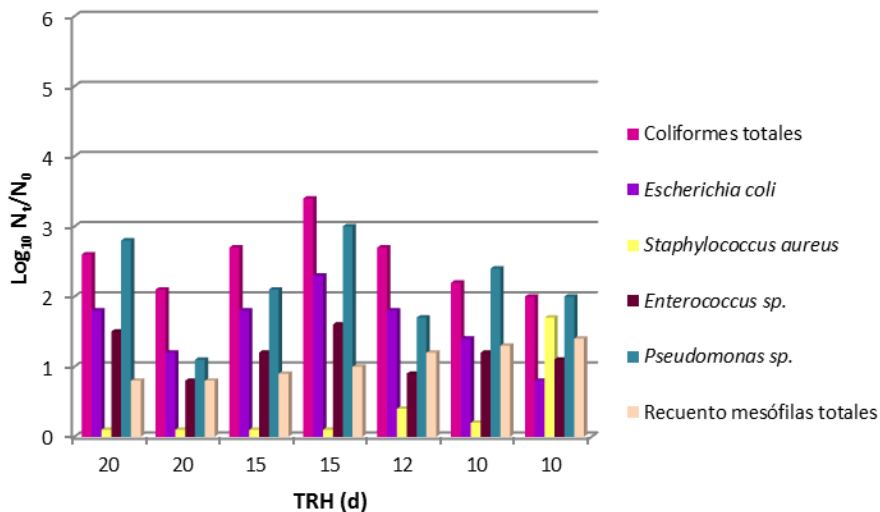


Figura 5.17: Reducción de la concentración microbiológica en el fango digerido en el tratamiento anaerobio mesófilo

Tal y como muestran los resultados de la figura 5.17, el tratamiento mesófilo permite alcanzar una reducción de la concentración microbiológica de hasta 3 unidades logarítmicas. La mayor

reducción se observan para *E.coli* y *Pseudomonas sp.*, con eliminaciones superiores a 2 unidades logarítmicas en muchos casos mientras que la reducción de *S.aureus* es en general inferior a una unidad logarítmica.

Por otro lado, la tabla 5.11 muestra el resultado del análisis de *Salmonella spp.* en el Estacionario 2.

Tabla 5.11: Resultados del análisis de *Salmonella spp.* en el fango digerido mediante tratamiento anaerobio mesófilo en el Estacionario 2

Parámetro	Carga	Anaerobio mesófilo TRH 15d
<i>Salmonella spp.</i>	-	Ausencia en 25 ml

Tal y como muestra la tabla, 5.11, no se detecta *Salmonella spp.* en el fango digerido.

En relación a los resultados obtenidos en el tratamiento de fangos en condiciones termófilas (tablas 5.7-5.10), la figura 5.18 muestra los resultados, en base logarítmica, de la concentración microbiológica de las bacterias indicadoras tras el tratamiento de digestión a los diferentes TRH. Por otro lado, la figura 5.19 muestra los valores de reducción de cada bacteria, expresados en unidades logarítmicas.

Tal y como muestra la figura 5.18, la concentración del recuento de mesófilas totales se encuentra entre 3 y 6 unidades logarítmicas de UFC/ml de muestra. Por otro lado, *Enterococcus sp.* es la bacteria que se detecta en menor concentración para los TRH estudiados, mientras que *S.aureus* es la bacteria que se detecta en mayor concentración en comparación con el resto de bacterias analizadas. No se observa ninguna relación entre la concentración de bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas tal y como ocurre en el fango digerido mediante tratamiento anaerobio mesófilo (figura 5.16).

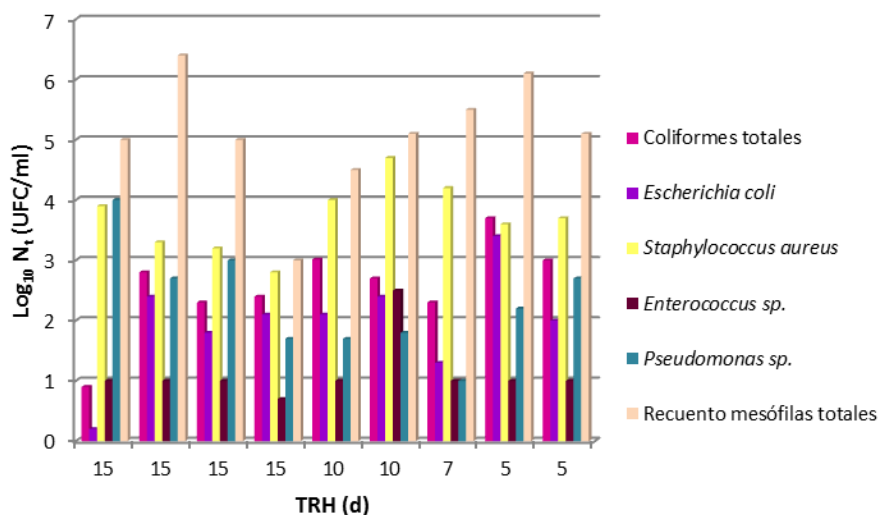


Figura 5.18: Concentración microbiológica del fango digerido en el tratamiento anaerobio termófilo

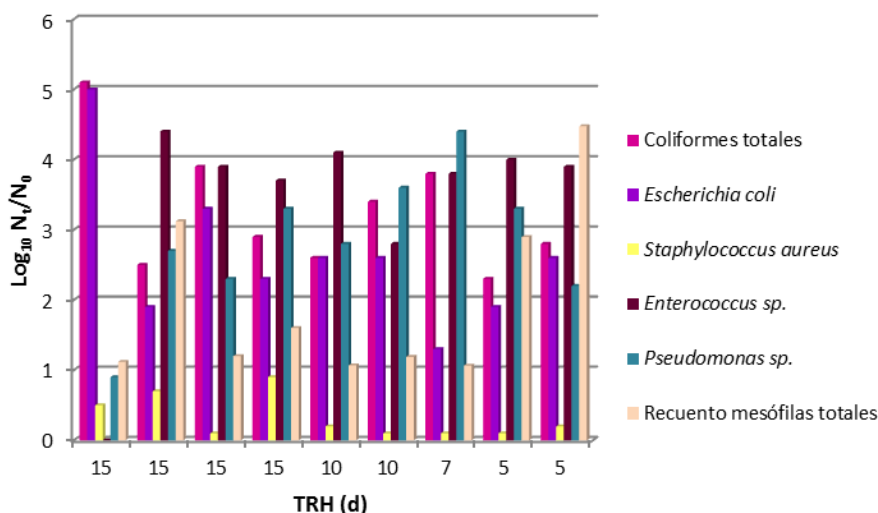


Figura 5.19: Reducción microbiológica en el fango digerido en el tratamiento anaerobio termófilo

Tal y como muestran los resultados de la figura 5.19, en general la reducción promedio de concentración es similar para todos TRH estudiados, siendo en algunos casos de hasta 4 unidades logarítmicas. La mayor reducción se observa para *Enterococcus sp.*, con una eliminación superior a 3 unidades logarítmicas en muchos casos.

Por otro lado, la tabla 5.12 muestra el resultado del análisis de *Salmonella spp* en el Estacionario 2.

Tal y como muestra la tabla 5.12, no se detecta *Salmonella spp.* en el fango digerido.

Tabla 5.12: Resultados del análisis de *Salmonella spp.* en el fango digerido mediante tratamiento anaerobio termófilo

Parámetro	Carga	Anaerobio termófilo TRH 10d
<i>Salmonella spp.</i>	-	Ausencia en 25 ml

En relación al efecto que algunos parámetros puedan tener en la reducción microbiológica durante el tratamiento anaerobio, Orzi et al. (2015) determinan que el amonio tiene un efecto significativo en la reducción de bacterias en los tratamientos anaerobios termófilos, pero bastante inferior en condiciones mesófilas. Algunos autores determinan que la reducción bacteriana está relacionada con la producción de amoniaco así como con la competición por los substratos entre las bacterias analizadas y la microflora (Smith S.R. et al., 2005; Hibbing et al., 2010; Pandey y Soupir, 2011; Scaglia et al., 2014; Moynihan et al., 2015; Orzi et al., 2015). Otros autores encuentran que el tratamiento de higienización afecta de diferente manera a las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Ottoson et al., 2008; Salsali et al., 2008; Scaglia et al., 2014). En concreto, Scaglia et al (2014) concluyen que en el tratamiento anaerobio termófilo, la temperatura y la concentración de amoniaco son los factores que afectan en mayor medida al proceso de saneamiento del fango, mientras que en el tratamiento anaerobio mesófilo, influyen notablemente la producción de metano y el pH. Smith S.R. et al (2005) sugieren que la mezcla eficiente y la estabilización de materia orgánica son los factores principales que controlan la inactivación en condiciones mesofílicas. Así mismo, otros autores

relacionan el descenso de bacterias en el tratamiento de digestión con otros factores como los nutrientes disponibles o los ácidos grasos volátiles (Sahlström, 2003; Smith S.R. et al., 2005; Pandey y Soupir, 2011).

5.3 ENSAYO A ESCALA PILOTO DE DIGESTIÓN AEROBIA TERMÓFILA AUTOSOSTENIDA

5.3.1 Descripción de la planta

Tanque de alimentación

La alimentación del fango a la planta piloto se realiza desde un tanque de almacenamiento de acero inoxidable de 7.8 m³ útiles. El tanque lleva asociada una bomba de desplazamiento para recircular el fango y mantenerlo agitado. El fango se aspira de la parte inferior del tanque y se devuelve al mismo mediante impulsión. En el retorno del fango al tanque existe una reducción del diámetro de la tubería para obtener un mejor grado de agitación.

Digestor

La planta de digestión aerobia termófila autosostenida (ATAD), es un tanque completamente agitado de acero inoxidable, cuyo volumen útil para tratar el fango es aproximadamente 10 m³ (figura 5.20), con una altura interior de 2.77 m y un diámetro interior de 2.23 m. El digestor se carga dejando una altura libre de 1 m, que sirve para el almacenamiento de las espumas generadas. Para minimizar las pérdidas de calor, la superficie de acero del digestor se recubre con una capa de 10 cm de material aislante sobre la que se dispone una chapa de aluminio para proteger el aislante de las inclemencias climatológicas. El digestor está cerrado en la parte superior por una cubierta abovedada, por la que se permite el acceso al interior y unas tapas abatibles, para controlar el correcto funcionamiento del sistema de aireación y la producción de espumas.



Figura 5.20: Planta piloto ATAD situada en la EDAR 2

Agitación

El sistema consta de una bomba, situada en el exterior del digestor, que aspira fango de la parte inferior y lo vuelve a introducir al interior del reactor horizontalmente a gran velocidad. Dicha bomba es de tipo desplazamiento volumétrico y el caudal se regula mediante un variador de frecuencia. La geometría de la tubería de salida crea, por efecto venturi, una aspiración de aire de forma perpendicular al flujo de fango a través de un tubo vertical que sube por encima de la altura del fango dentro del tanque. De esta forma se consiguen dos efectos simultáneamente: dentro del digestor se crean condiciones de mezcla completa y

además tiene lugar la aireación. El tubo vertical conectado a la aspiración de aire del venturi se construye según el diseño patentado por Nilsa (patente española 200500284). Mediante este diseño, además de airear, se puede controlar el nivel de espumas para la correcta operación del digestor por adecuación del caudal de aire externo, ya que el sistema permite disminuir el caudal de aire frío procedente del exterior cuando tiene lugar una alta generación de espumas. Además, el sistema permite recircular parte de los gases de la cúpula del digestor para mejorar la eficiencia de la transferencia de oxígeno en el interior del mismo.

Entrada y salida de fango

Tanto el llenado como el vaciado del digestor se realiza en discontinuo. El control se realiza desde el autómata instalado para este fin. La alimentación del fango fresco se lleva a cabo desde el tanque de almacenamiento y el fango digerido se recoge en otro tanque. Para realizar la carga y descarga del fango debe cumplirse que el digestor alcance la temperatura mínima seleccionada y que la duración del tratamiento sin carga ni descarga de fango supere el tiempo de operación (Sobrados et al., 2010).

El proceso de carga y descarga se lleva a cabo automáticamente según las siguientes fases:

- Descarga de fango: Se extrae del reactor el volumen de fango tratado correspondiente al tiempo de retención hidráulico (TRH) elegido.
- Carga de fango: Se introduce el fango crudo en el reactor y se mezcla con el contenido restante del ciclo anterior, produciéndose un descenso en la temperatura interior por estar el fango crudo a una temperatura mucho menor.
- Calentamiento de fango: El fango se mantiene sin carga ni descarga en el digestor, a una temperatura superior a 55°C, durante al menos 20 horas.

Sensores

Se miden la temperatura, el potencial de oxidación-reducción y la altura del tanque mediante sondas. En concreto, las sondas de temperatura y potencial de oxidación-reducción se introducen en el interior mediante una lanza de acero hueca desde el techo y la sonda de altura por presión se sitúa en una brida en el fondo del digestor.

Monitorización, control y adquisición de datos

Todas las señales de los sensores están conectadas con el autómata programable de la planta piloto. Las medidas quedan registradas en un histórico y la obtención de los datos para este trabajo de investigación se realiza mediante el ordenador.

5.3.2 Toma de muestras de fangos y parámetros de caracterización

La toma de muestras se realiza en la recirculación del digestor y en la tubería de carga antes de la carga diaria.

Se realiza control diario del proceso mediante la toma de muestras y el análisis de parámetros físico-químicos del fango fresco o carga y del fango digerido. Se emplean frascos de 500 ml y los análisis se realizan a lo largo de ese día. Se determinan pH, ST, SV, FV, DQO soluble, N-NH₄, carga orgánica alimentada y carga orgánica eliminada. La metodología seguida para la

determinación de los parámetros físico-químicos se referencia en el apartado en el apartado 3.1 del capítulo 3. Por otro lado, se calcula la carga orgánica alimentada y la carga orgánica eliminada siguiendo las ecuaciones 5.1 y 5.2 del apartado 5.2.2.

Una vez alcanzado el estado estacionario para determinados TRH, se toman muestras del fango de carga y del fango digerido para el análisis de parámetros microbiológicos. En concreto se analizan coliformes totales, *E.coli*, *S.aureus*, *Pseudomonas sp.*, *Enterococcus sp.*, *Salmonella spp.* y recuento de mesófilas totales siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo 3 (apartado 3.2). La toma de muestras para la caracterización microbiológica se realiza con frascos estériles de 500 ml y las muestras se conservan refrigeradas hasta su análisis en menos de 12 horas. El análisis de cada bacteria en cada muestra se realiza por triplicado. Teniendo en cuenta que se analizan 2 muestras, y considerando sus respectivas diluciones (3 al menos), se estima que se cultivan aproximadamente 110 placas para el recuento de microorganismos, en cada toma de muestras.

5.3.3 Puesta en marcha y control operacional de planta

5.3.3.1 Control en periodo transitorio

La puesta en marcha del tratamiento en el ATAD consiste en llenar el digestor de fango y mantenerlo agitado y aireado hasta que se frena su calentamiento por una reducción en la disponibilidad de sustrato. El descenso se produce cuando la oxidación de materia orgánica no puede contrarrestar las pérdidas de calor del proceso. Durante el descenso de temperatura se alimenta el digestor.

5.3.3.2 Control en periodo estacionario

Al igual que en las plantas anaerobias (apartado 5.2), se considera que un digestor alcanza un régimen estacionario cuando se mantienen todas las condiciones de operación constantes. En concreto, para el tratamiento de digestión aerobia termófila de los fangos los TRH seleccionados son los que se muestran en la tabla 5.13.

Tabla 5.13: Periodos estacionarios en la planta aerobia

	TRH en ATAD (d)
Estacionario 1	5
Estacionario 2	10
Estacionario 3	15

En los periodos de régimen estacionario se utiliza como parámetro de control la concentración de los sólidos inorgánicos, como la diferencia entre los sólidos totales y los volátiles. Este parámetro tiene que presentar valores similares en el fango de carga y en el fango digerido, es decir, no se tienen que observar modificaciones destacables en su concentración. De esta manera, al igual que en los ensayos de digestión anaerobia, se supone un funcionamiento mecánico correcto del sistema, una agitación y mezcla correcta, así como la ausencia de decantación y acumulación en el reactor.

Las figuras 5.21, 5.22 y 5.23 muestran la evolución de los sólidos inorgánicos en el fango de alimentación y en el digestor, correspondiente a cada Estacionario.

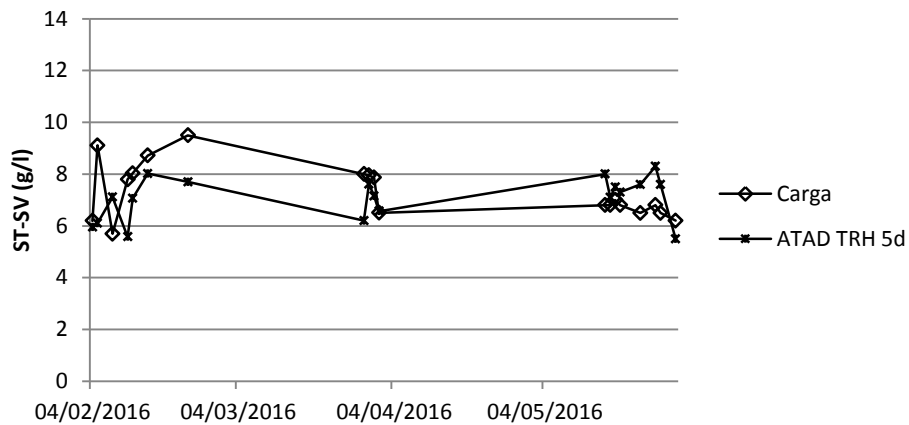


Figura 5.21: Evolución de la concentración de sólidos inorgánicos (ST-SV) en el fango de alimentación y en el ATAD en el Estacionario 1

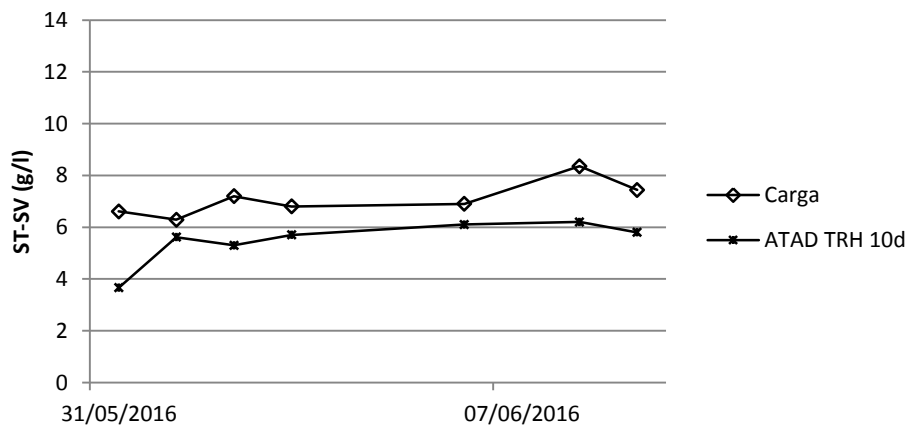


Figura 5.22: Evolución de la concentración de sólidos inorgánicos (ST-SV) en el fango de alimentación y en el ATAD en el Estacionario 2

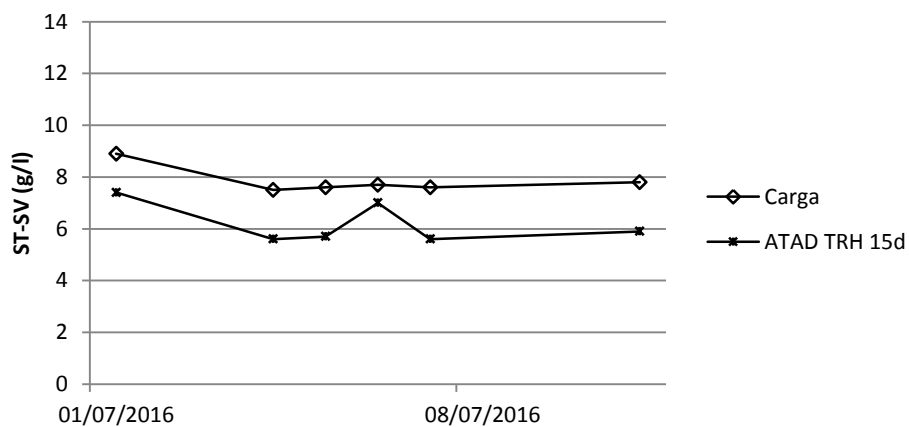


Figura 5.23: Evolución de la concentración de sólidos inorgánicos (ST-SV) en el fango de alimentación y en el ATAD en el Estacionario 3

Tal y como muestran las figuras 5.21, 5.22 y 5.23 los sólidos inorgánicos evolucionan de manera similar en el fango fresco o de carga y el fango digerido en cada TRH considerado, indicando un correcto funcionamiento de la planta.

5.3.4 Control de calidad de fangos: resultados e interpretación

5.3.4.1 Caracterización físico-química

Eliminación de materia orgánica

Para evaluar la eliminación de materia orgánica en cada estacionario se realiza el seguimiento de la concentraciones de sólidos volátiles y de la fracción volátil en el fango fresco y en los digestores. La fracción volátil se calcula como la división entre sólidos volátiles y sólidos totales y se expresa en porcentaje. Las figuras 5.24, 5.25 y 5.26 muestran la concentración de sólidos volátiles, tanto del fango de alimentación como del fango en el ATAD, para cada Estacionario y en las figuras 5.27, 5.28 y 5.29 se muestran los valores de fracción volátil.

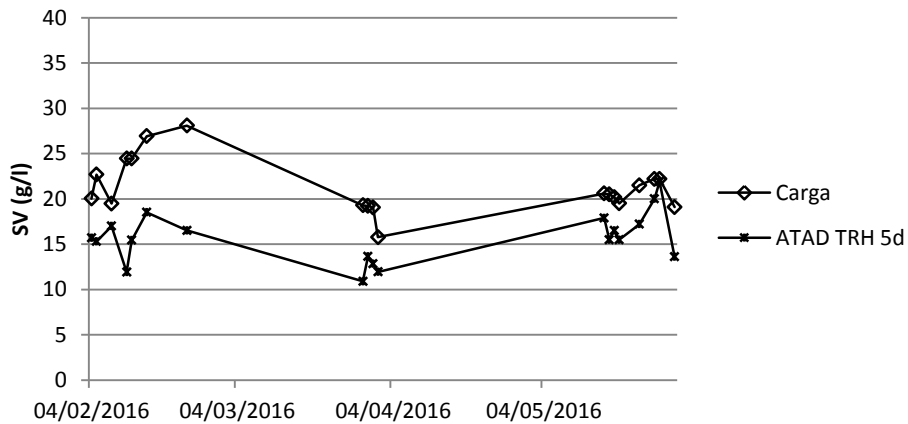


Figura 5.24: Concentración de sólidos volátiles en el fango de alimentación y en el ATAD durante el Estacionario 1

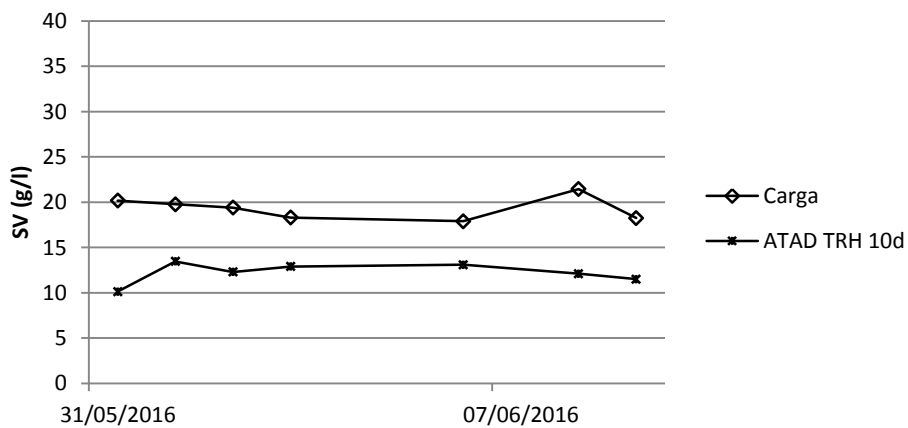


Figura 5.25: Concentración de sólidos volátiles en el fango de alimentación y en el ATAD durante el Estacionario 2

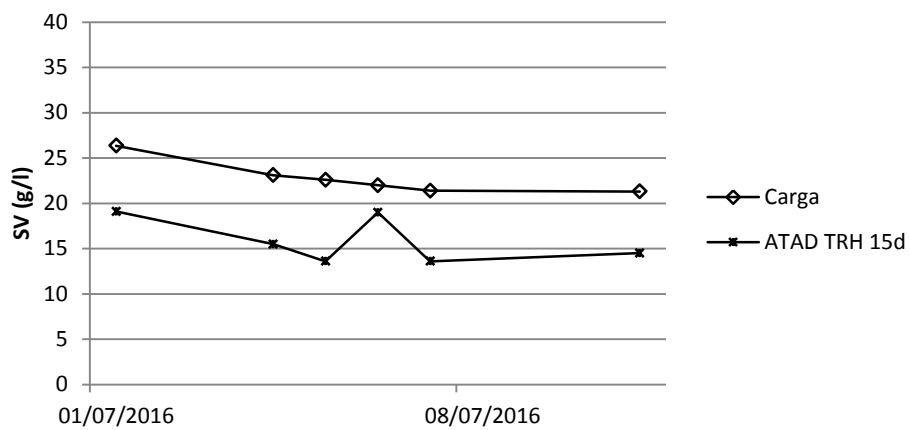


Figura 5.26: Concentración de sólidos volátiles en el fango de alimentación y en el ATAD durante el Estacionario 3

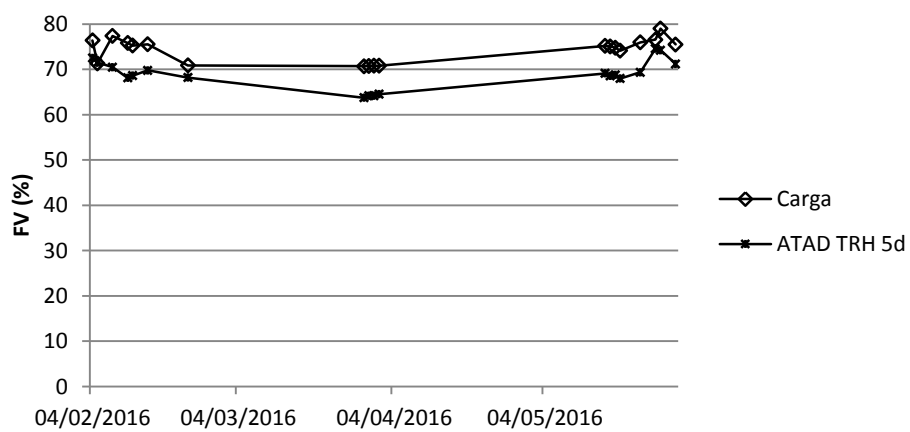


Figura 5.27: Fracción volátil en el fango de alimentación y en el ATAD durante el Estacionario 1

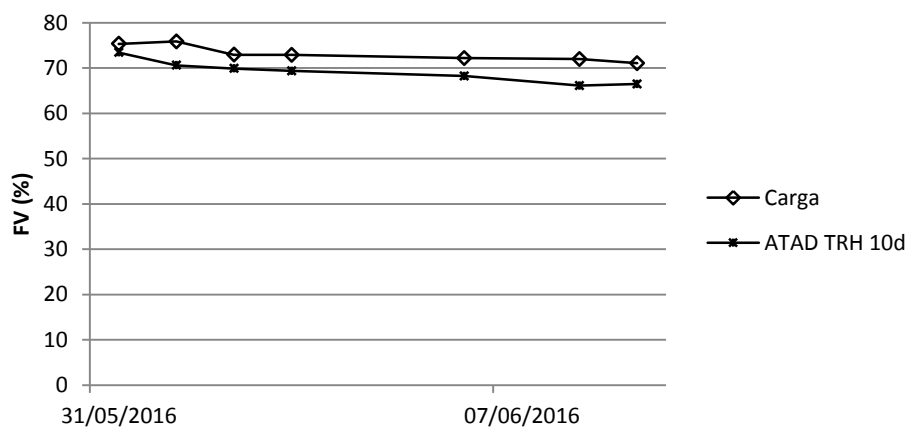


Figura 5.28: Fracción volátil en el fango de alimentación y en el ATAD durante el Estacionario 2

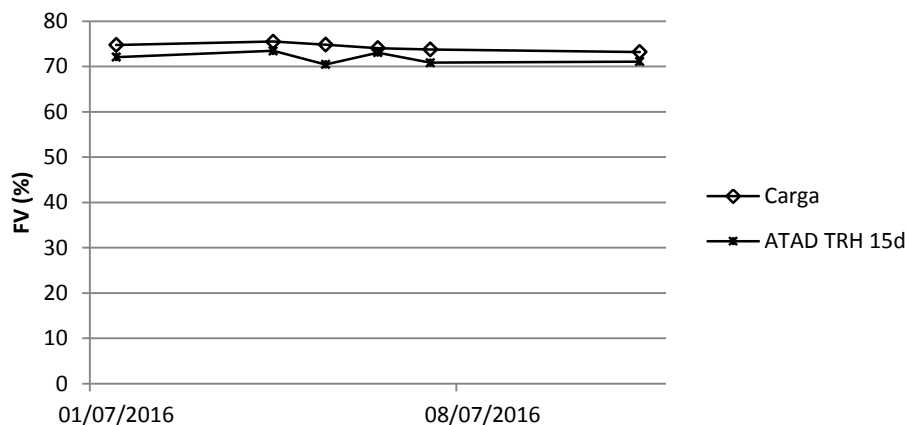


Figura 5.29: Fracción volátil en el fango de alimentación y en el ATAD durante el Estacionario 3

Las tablas 5.14, 5.15 y 5.16 muestran los resultados de control de diversos parámetros físico-químicos determinados en el fango de alimentación y en el fango digerido, en cada Estacionario.

Tal y como se observa en las tablas 5.14, 5.15 y 5.16, la concentración de SV en el fango tratado es mayor que los valores obtenidos en condiciones anaerobias, en relación a los menores rendimientos de eliminación obtenidos. Los resultados obtenidos en el ATAD en los diferentes Estacionarios concuerdan con estudios previos realizados en la planta (Sobrados et al., 2010). Por otro lado, la degradación biológica es más rápida en condiciones aerobias que en condiciones anaerobias, siendo 3 veces más rápida la tasa de crecimiento y hasta 10 veces más rápida la tasa de mortalidad en el ATAD (Sobrados et al., 2010).

Tabla 5.14: Resultados de parámetros físico-químicos de control en el ATAD. Estacionario 1

Parámetro	Carga	ATAD TRH 5d
pH	5.6±0.2	7.8±0.6
Temperatura (°C)	-	59.0±4.7
Sólidos totales (g/l)	29±4	23±4
Sólidos volátiles (g/l)	21±3	16±3
Fracción volátil (%)	74±2.6	69±3.1
DQO filtrada (mg/l)	5200±970	3500±870
N-NH ₃ (mg/l)	190±70	335±81
Carga orgánica alimentada (kgSV/m ³ d)	-	1.64
Carga orgánica eliminada (kgSV/m ³ d)	-	0.39
Rendimiento eliminación SV (%)	-	23.8/26.9

Tabla 5.15: Resultados de parámetros físico-químicos de control en el ATAD. Estacionario 2

Parámetro	Carga	ATAD TRH 10d
pH	5.6±0.1	8.3±0.2
Temperatura (°C)	-	58.4±2.3
Sólidos totales (g/l)	26±2	18±2
Sólidos volátiles (g/l)	19±1	12±1
Fracción volátil (%)	73±1.8	69±2.5
DQO filtrada (mg/l)	5500±1400	3700±880
N-NH ₃ (mg/l)	165±42	300±55
Carga orgánica alimentada (kgSV/m ³ d)	-	0.74
Carga orgánica eliminada (kgSV/m ³ d)	-	0.27
Rendimiento eliminación SV (%)	-	36.5/36.5

Tabla 5.16: Resultados de parámetros físico-químicos de control en el ATAD. Estacionario 3

Parámetro	Carga	ATAD TRH 15d
pH	5.7±0.1	8.1±0.4
Temperatura (°C)	-	61.2±2.1
Sólidos totales (g/l)	31±2	22±3
Sólidos volátiles (g/l)	23±2	14±3
Fracción volátil (%)	74±0.8	72±1.2
DQO filtrada (mg/l)	8200±740	4800±170
N-NH ₃ (mg/l)	330±85	270±41
Carga orgánica alimentada (kgSV/m ³ d)	-	0.62
Carga orgánica eliminada (kgSV/m ³ d)	-	0.24
Rendimiento eliminación SV (%)	-	38.7/35.3

Finalmente, el rendimiento de eliminación es proporcional al tiempo de retención e inversamente proporcional a la carga alimentada.

Calentamiento

Se realizan medidas diarias en continuo de la temperatura en el digestor y se evalúa la generación de calor comparándola con el calor teórico generado a partir de la materia volátil eliminada durante el tratamiento. La figura 5.30 muestra los valores de temperatura en un intervalo de tiempo concreto correspondientes al Estacionario 1 y al Estacionario 2.

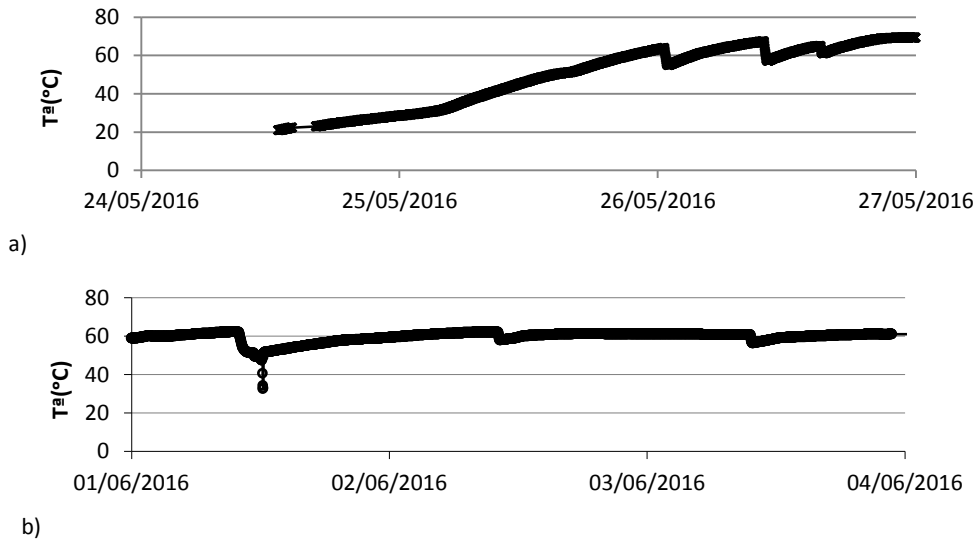


Figura 5.30: Perfil de temperaturas a) TRH 5 días; b) TRH 10 días

Con el fin de comprobar el correcto seguimiento del funcionamiento de las plantas, en dos de los Estacionarios se calcula el calentamiento medio del digestor de dos formas diferentes, por un lado a partir de las medidas de temperatura del sensor y por otro lado, a partir de los datos de eliminación de SV (tablas 5.13, 5.14) considerando un poder energético del fango durante la digestión aerobia de aproximadamente 5.5 Kcal/g SV eliminado (Sobrados et al., 2010). Los resultados, expresados en °C/d, se muestran en la tabla 5.17.

Tabla 5.17: Resultados de producción de biogás y ratios de control de los digestores para cada Estacionario

Parámetro	Estacionario 1 TRH 5d	Estacionario 2 TRH 10d
Calentamiento medio (°C/d)	9.5	6.7
Calentamiento a partir de SV eliminado (°C/d)	5.5	3.9

La diferencia entre el calentamiento esperado y el medido se debe principalmente a las principales pérdidas de energía en el digestor, por conducción por paredes o por evaporación, al salir los gases del ATAD saturados de vapor de agua.

5.3.4.2 Caracterización microbiológica

Las tablas 5.18, 5.19 y 5.20 muestran el valor promedio de la concentración, en base húmeda, de las bacterias analizadas en la carga y el fango digerido en el ATAD, en cada régimen Estacionario.

Tal y como muestran los resultados de las tablas 5.18, 5.19 y 5.20, en el fango de alimentación o carga, la concentración microbiológica varía entre 10^3 - 10^6 UFC/ml en función del microorganismo analizado. Al contrario de lo que ocurre en los resultados obtenidos en los análisis detallados en el capítulo 4, no se observan diferencias destacables de concentración entre bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas. La reducción neta para cada microorganismo en el tratamiento de digestión puede alcanzar los 5 órdenes de magnitud.

Tabla 5.18: Caracterización microbiológica en la carga y el digestor aerobio en el Estacionario 1 (UFC/ml)

	Carga	ATAD TRH 5d
Coliformes totales	1.6 ± 0.5E+06	1.0 ± 0.3E+02
<i>Escherichia coli</i>	2.0 ± 0.5E+05	7.0 ± 1.1E+01
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.5 ± 0.8E+04	1.3 ± 0.6E+04
<i>Enterococcus sp.</i>	1.0 ± 0.5E+05	5.0 ± 0.9E+01
<i>Pseudomonas sp.</i>	6.6 ± 1.6E+05	1.1 ± 0.8E+02
Recuento de mesófilas totales	8.1 ± 0.5E+06	2.2 ± 0.4E+05

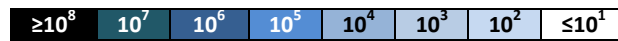


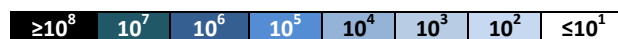
Tabla 5.19: Caracterización microbiológica en la carga y el digestor aerobio en el Estacionario 2 (UFC/ml)

	Carga	ATAD TRH 10d
Coliformes totales	2.5 ± 0.9E+06	3.5 ± 1.7E+01
<i>Escherichia coli</i>	4.1 ± 0.5E+05	1.0 ± 0.7E+01
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.3 ± 0.2E+04	5.7 ± 0.2E+03
<i>Enterococcus sp.</i>	1.1 ± 0.1E+05	<1.0E+01
<i>Pseudomonas sp.</i>	1.4 ± 0.6E+05	1.0 ± 0.5E+01
Recuento de mesófilas totales	3.0 ± 0.4E+06	1.0 ± 0.3E+05



Tabla 5.20: Caracterización microbiológica en la carga y el digestor aerobio en el Estacionario 3 (UFC/ml)

	Carga	ATAD TRH 15d
Coliformes totales	6.2 ± 3.5E+05	1.0 ± 0.3E+03
	6.9 ± 0.4E+03	1.3 ± 0.6E+03
<i>Escherichia coli</i>	2.5 ± 1.4E+05	1.0 ± 0.4E+03
	3.3 ± 2.0E+03	1.3 ± 1.0E+02
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.7 ± 0.4E+03	1.0 ± 0.6E+03
	2.2 ± 1.1E+03	1.7 ± 0.7E+03
<i>Enterococcus sp.</i>	1.0 ± 0.4E+05	<1.0E+01
	3.5 ± 2.1E+03	<1.0E+01
<i>Pseudomonas sp.</i>	1.4 ± 0.1E+05	<1.0E+01
	5.6 ± 1.5E+04	1.0 ± 0.3E+02
Recuento de mesófilas totales	9.4 ± 0.3E+06	3.0 ± 0.5E+04
	9.3 ± 0.4E+05	1.3 ± 0.2E+05



Por otro lado, se observa una variabilidad en la contaminación microbiológica presente tanto en la carga como en el fango tratado en unas mismas condiciones.

En relación a los resultados obtenidos en el tratamiento (tablas 5.18-5.20), la figura 5.31 muestra los resultados en base logarítmica de la concentración microbiológica de las bacterias indicadoras a los diferentes TRH. Por otro lado, la figura 5.32 muestra el valor de reducción de cada bacteria, expresado en unidades logarítmicas.

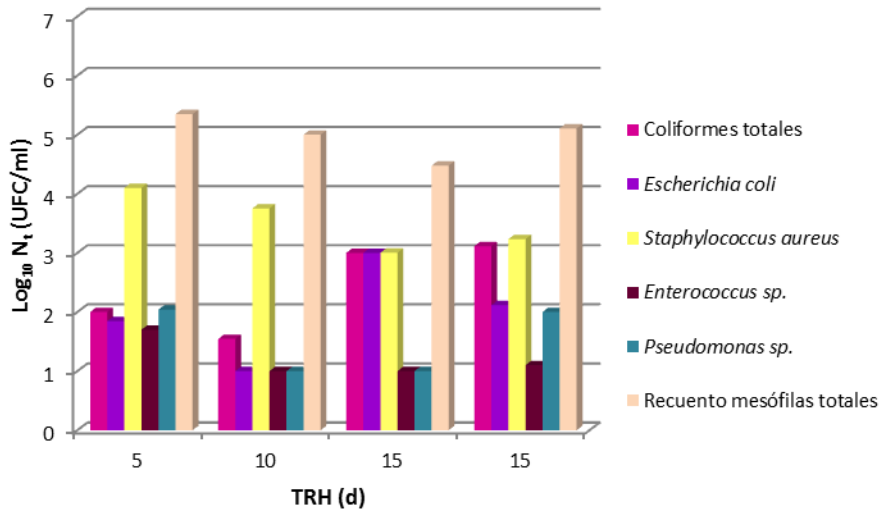


Figura 5.31: Concentración microbiológica del fango digerido en el ATAD

Tal y como muestra la figura 5.31, la concentración de mesófilas totales se encuentra en todos los casos entre 4 y 5 unidades logarítmicas UFC/ml. Por otro lado, coliformes totales y *S.aureus* son las bacterias que se detectan en mayor concentración para los TRH estudiados y *Enterococcus sp.* es la bacteria detectada en menor concentración.

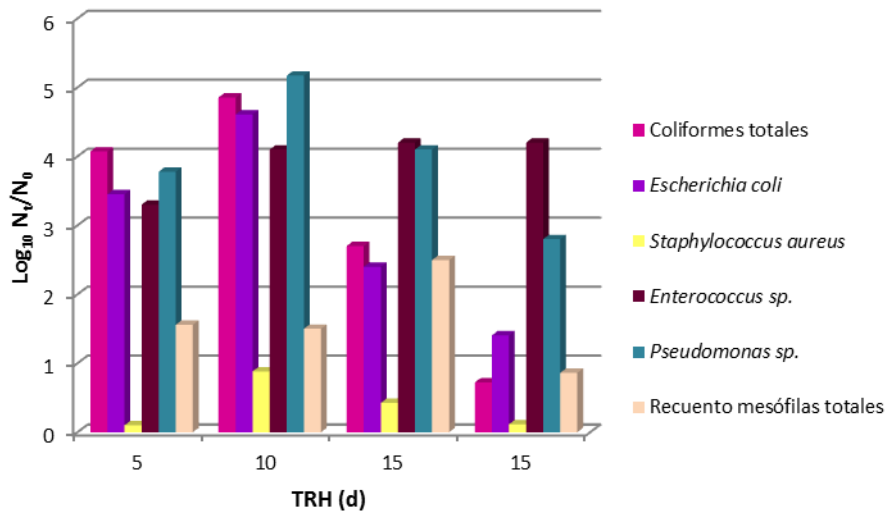


Figura 5.32: Reducción microbiológica en el ATAD

Tal y como muestran los resultados de la figura 5.32, la reducción microbiológica promedio puede alcanzar hasta 3 unidades logarítmicas en muchos casos. En cuanto a la reducción de cada bacteria, los mayores valores se observan para coliformes totales, *Pseudomonas sp.* y *Enterococcus sp.* Por otro lado, la reducción de concentración de *S.aureus* es inferior a una unidad logarítmica, en todos los casos.

La tabla 5.21 muestra el resultado del análisis de *Salmonella spp.*, en el Estacionario 1. Tal y como se observa, no se detecta en ninguna de las muestras.

Tabla 5.21: Resultados del análisis de *Salmonella* spp. en el fango digerido en el ATAD en el Estacionario 1

Parámetro		Carga	ATAD TRH 5d
<i>Salmonella</i> spp.	-	Ausencia en 25ml	Ausencia en 25ml

5.4 ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE PROCESOS

5.4.1 Análisis de variables operacionales

Las variables operacionales seleccionadas para conocer su influencia sobre la reducción microbiológica son la temperatura, el tipo de tratamiento y el TRH. Con el fin de establecer si estos parámetros son significativos en la reducción de *Enterococcus* sp. y *E.coli*, se realiza un análisis estadístico de los resultados basados en el análisis ANOVA y en el test LSD de Fisher, descritos en el apartado 3.3. Se selecciona un nivel de confianza del 95%.

Efecto de la temperatura y tipo de tratamiento de digestión

A partir del análisis estadístico de los datos de reducción de *Enterococcus* sp. y *E.coli* obtenidos tras la aplicación de los diferentes tratamientos de digestión, se deduce que la reducción microbiológica varía significativamente en función del tratamiento aplicado. En concreto, se obtienen unos p-valores de 0.001 en todos casos.

En las figuras 5.33 y 5.34 se muestran los intervalos del test LSD de Fisher obtenidos a partir de los resultados de reducción de *Enterococcus* sp. y *E.coli*, respectivamente, conseguidos a través de los diferentes tratamientos de digestión. Tal y como se observa en dichas figuras, ninguno de los intervalos contiene el valor nulo.

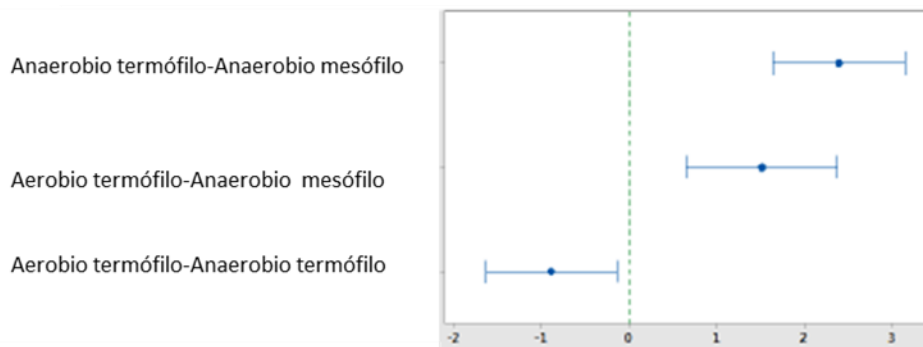


Figura 5.33: Intervalos LSD de los resultados de reducción de *Enterococcus* sp. para los diferentes tratamientos



Figura 5.34: Intervalos LSD de los resultados de reducción de *E.coli* para los diferentes tratamientos

Para observar en mayor detalle la diferencia entre la reducción microbiológica alcanzada con cada tratamiento, las figuras 5.35 y 5.36 muestran los intervalos de reducción de *Enterococcus* sp. y *E.coli*, respectivamente. Tal y como muestra la figura 5.35, la mayor reducción de

Enterococcus sp. tiene lugar mediante los tratamientos termófilos, y en concreto el valor promedio es mayor en el digestor que opera en condiciones anaerobias. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios (Sahlström et al., 2008). Por el contrario, Bagge et al. (2005) no encuentran diferencias significativas en condiciones termófilas y mesófilas anaerobias para la eliminación de la misma bacteria en fangos.

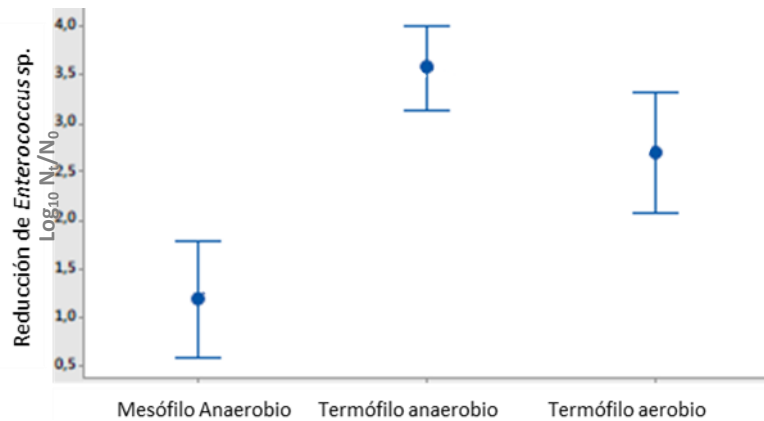


Figura 5.35: Intervalos de reducción de *Enterococcus* sp. para diferentes tratamientos

Por otro lado, tal y como muestra la figura 5.36, la mayor reducción de *E.coli* se consigue con el tratamiento de digestión aerobia termófila, al igual que determinan otros autores (Lloret et al., 2012).

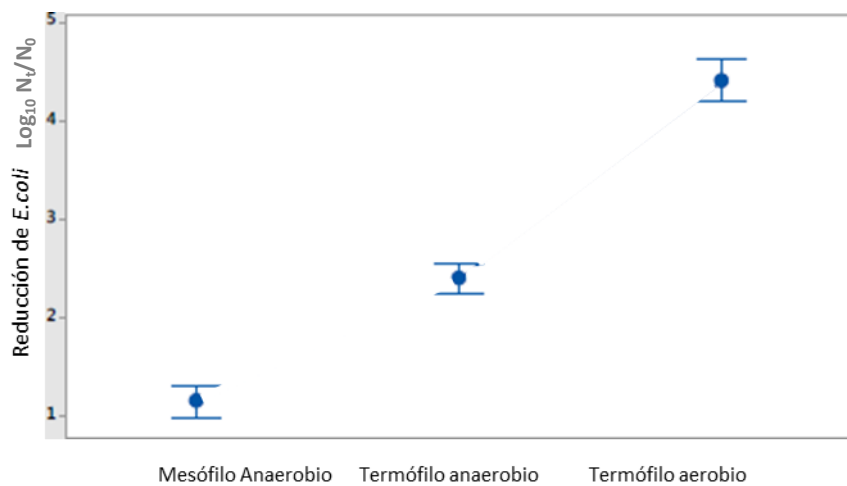


Figura 5.36: Intervalos de reducción de *E.coli* para diferentes tratamientos

En base a los resultados obtenidos, se puede afirmar que la temperatura influye en la reducción de la concentración microbiológica. En concreto, la temperatura destruye patógenos al afectar a la composición de la membrana celular y también puede favorecer el efecto de otros factores químicos como la toxicidad del amoníaco o los ácidos grasos volátiles (Orzi et al., 2015). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio mediante tratamiento termófilo son algo inferiores a los mostrados por otros autores (Sahlström, 2003; Salsali et al., 2008; Sidhu y Toze, 2009; Scaglia et al., 2014; Orzi et al., 2015).

Efecto del tiempo de retención hidráulico

A partir de los resultados de reducción de *Enterococcus* sp. obtenidos con los diferentes tratamientos de digestión para los TRH estudiados (incluidos en los apartados 5.2.3.2 y 5.3.3.2), se lleva a cabo un análisis estadístico de los datos. Se concluye que el TRH no es un factor significativo, de manera que la reducción microbiológica alcanzada es independiente de este parámetro, en los intervalos estudiados. En concreto, se obtienen unos p-valores de 0.452, 0.419 y 0.379 en el tratamiento anaerobio mesófilo, anaerobio termófilo y aerobio termófilo, respectivamente, siendo $p\text{-valor} > 0.05$ en todos los casos. En las figuras 5.37 y 5.38 se muestran los intervalos del test LSD de Fisher obtenidos a partir de los valores de reducción de esta bacteria, en el tratamiento anaerobio mesófilo y el tratamiento anaerobio termófilo, respectivamente. Se observa que todos los intervalos contienen el valor nulo. Este resultado concuerda con otros estudios en los que se observa que la correcta digestión e higienización del fango es independiente del TRH a partir de un valor mínimo de 2 horas y que el incremento del TRH no aumenta de forma proporcional la reducción de patógenos (Popat et al., 2010; Pandey y Soupir, 2011; Scaglia et al., 2014; Maspolim et al., 2015). Popat et al. (2010) sugieren que los tiempos especificados por la EPA de al menos 20h en tratamientos termófilos, son excesivos (EPA, 2003).

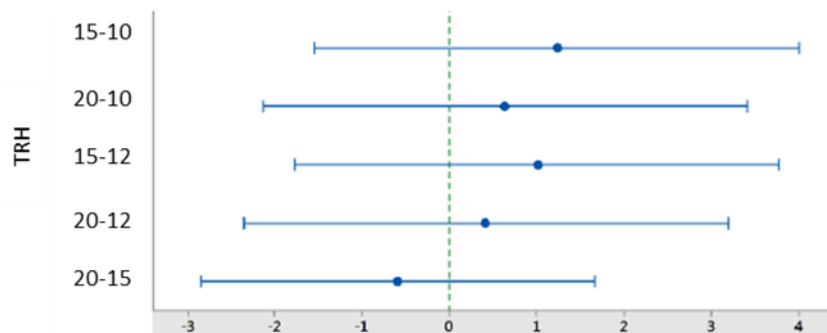


Figura 5.37: Intervalos LSD de los resultados de reducción de *Enterococcus* sp. en el tratamiento anaerobio mesófilo para los diferentes TRH

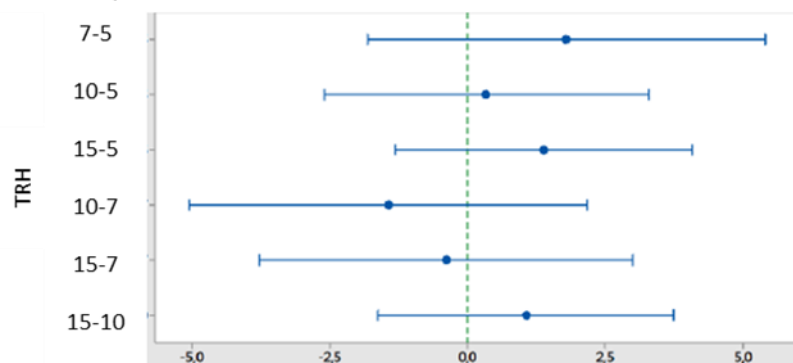


Figura 5.38: Intervalos LSD de los resultados de reducción de *Enterococcus* sp. en el tratamiento anaerobio termófilo para los diferentes TRH

Del mismo modo, el análisis ANOVA de los resultados de reducción de *E.coli*, obtenidos con los diferentes tratamientos de digestión para varios TRH establecidos, confirma igualmente que este parámetro no es significativo. En concreto, los p-valores obtenidos son 0.379, 0.183, 0.185 con el tratamiento anaerobio mesófilo, anaerobio termófilo y aerobio termófilo,

respectivamente. En las figuras 5.39 y 5.40 se muestran los intervalos del test LSD de Fisher obtenidos a partir de la reducción de *E.coli* en el tratamiento anaerobio termófilo y el tratamiento aerobio termófilo, respectivamente y se observa que, todos los intervalos contienen el valor nulo, corroborando lo mencionado previamente. Estos resultados concuerdan con lo determinado por otros autores utilizando la misma bacteria como indicador microbiológico (Orzi et al., 2015).

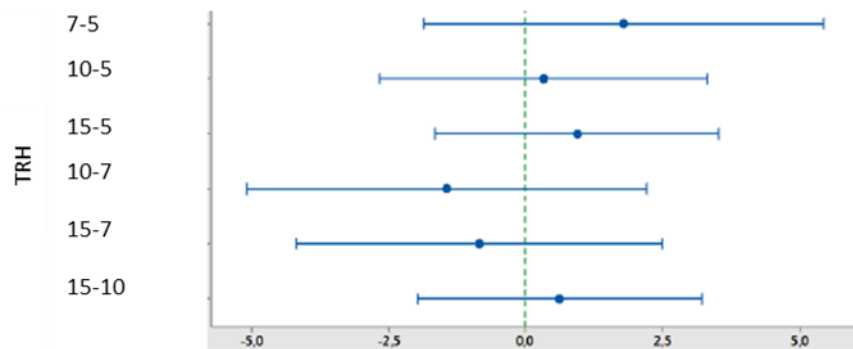


Figura 5.39: Intervalos LSD de los resultados de reducción de *E.coli* en el tratamiento anaerobio termófilo para los diferentes TRH

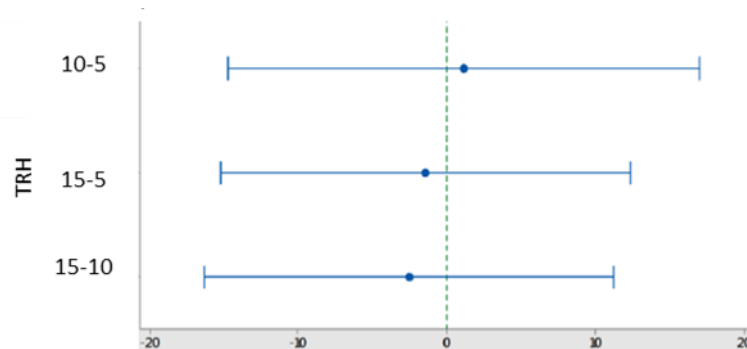


Figura 5.40: Intervalos LSD de los resultados de reducción de *E.coli* en el tratamiento aerobio termófilo para los diferentes TRH

5.4.2 Grado de cumplimiento de criterios de calidad del fango tratado

Para determinar si los fangos tratados en este trabajo de investigación en las plantas piloto objeto de estudio cumplen con los criterios de higienización europeos, se compara la concentración de *E.coli* y *Salmonella* spp. determinada en el fango tratado, con los criterios descritos en el capítulo 2 (UE 2000, 2003, 2010). Las tablas 5.22 y 5.23 muestran el grado de cumplimiento de dichos criterios de calidad de los fangos tratados mediante los distintos procesos, convencionales y avanzados.

Tal y como se muestra en la tabla 5.22, el fango tratado mediante digestión anaerobia mesófila cumple con los criterios de calidad establecidos para los fangos tratados mediante un tratamiento convencional.

Tabla 5.22: Grado de cumplimiento de los criterios de calidad microbiológica de los fangos digeridos en las plantas piloto mediante un tratamiento convencional

INDICADOR MICROBIOLÓGICO	REFERENCIA	CRITERIO DE CALIDAD		DIAGNÓSTICO SEGÚN TRATAMIENTO
		VALOR	UNIDADES	Digestión anaerobia mesófila
<i>E.coli</i>	Documento de trabajo, UE, 2000	Reducción 2log	UFC/ml	CUMPLE
	Propuesta de directiva, UE, 2003	$<5 \cdot 10^5$	UFC/g	CUMPLE
	Documento de trabajo UE 2010	$<5 \cdot 10^5$	UFC/ml	CUMPLE
<i>Salmonella spp.</i>	Documento de trabajo UE 2010	Ausencia	50 ml	CUMPLE

Tabla 5.23: Grado de cumplimiento de los criterios de calidad microbiológica de los fangos digeridos en las plantas piloto mediante un tratamiento avanzado

INDICADOR MICROBIOLÓGICO	REFERENCIA	CRITERIO DE CALIDAD		DIAGNÓSTICO SEGÚN TRATAMIENTO	
		VALOR	UNIDADES	Digestión anaerobia termófila	Digestión aerobia termófila
<i>E.coli</i>	Documento de trabajo, UE, 2000	Reducción 6log	UFC/ml	NO CUMPLE	NO CUMPLE
		$<5 \cdot 10^2$	UFC/ml	FANGO HIGIENIZADO	FANGO HIGIENIZADO
	Propuesta de directiva, UE, 2003	Reducción 99.99% (4log)	UFC/g	NO CUMPLE	FANGO HIGIENIZADO
		$<1 \cdot 10^3$	UFC/g	NO CUMPLE	NO CUMPLE
Documento de trabajo UE 2010	$<5 \cdot 10^5$	UFC/ml	FANGO HIGIENIZADO	FANGO HIGIENIZADO	
<i>Salmonella spp.</i>	Documento de trabajo, UE, 2000	Ausencia	25 ml	FANGO HIGIENIZADO	FANGO HIGIENIZADO
	Propuesta de directiva, UE, 2003	Ausencia	25 ml	FANGO HIGIENIZADO	FANGO HIGIENIZADO
	Documento de trabajo UE 2010	Ausencia	25 ml	FANGO HIGIENIZADO	FANGO HIGIENIZADO

Por otro lado y tal y como se muestra en la tabla 5.23, el fango tratado mediante digestión anaerobia termófila o digestión aerobia termófila se puede considerar higienizado en términos de concentración teniendo en cuenta los criterios más recientes, establecidos en el 2010. Sin embargo, en relación a la reducción de la concentración de *E.coli* que debe alcanzarse para considerar que el fango está higienizado, la digestión anaerobia termófila no cumple ninguno de los criterios establecidos. Esto puede deberse a que la concentración inicial de esta bacteria en el fango es inferior a la requerida para alcanzar esos valores de reducción (Carballa et al., 2009; Astals et al., 2012; Levantesi et al., 2015).

Capítulo 6.

Estudio del aprovechamiento agrícola de fangos de EDAR

6.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	6-1
6.1.1 Selección de cultivos	6-1
6.1.2 Selección de suelos	6-2
6.1.3 Características del fango y aplicación al terreno	6-4
6.1.4 Toma de muestras, acondicionamiento y parámetros de control.....	6-4
6.2 RESULTADOS E INTERPRETACIÓN.....	6-7
6.2.1 Aplicación del fango en suelo arcilloso	6-7
6.2.2 Aplicación del fango en suelo arenoso	6-11
6.3 ESTUDIO COMPARATIVO	6-15

6.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

6.1.1 Selección de cultivos

Para que la aplicación de los fangos sea sostenible, es fundamental considerar las necesidades de los cultivos así como las posibles necesidades de almacenamiento y operatividad en la introducción al suelo (Sobrados et al., 2010). En este trabajo de investigación se utilizan dos cultivos, el maíz y el girasol que tienen diferentes necesidades nutricionales e hídricas y cuyas plantaciones se muestran en las figuras 6.1 y 6.2.



Figura 6.1: Cultivo de maíz



Figura 6.2: Cultivo de girasol

MAÍZ (*Zea mays*)

Es uno de los cereales de mayor importancia a nivel mundial (Bernal y Gondar, 2008; López-Bellido et al., 2009). Se adapta ampliamente a diversas condiciones, pero a su vez es muy exigente en cuanto a la fertilización física del suelo. Entre las características físicas más importantes se encuentran (Bonilla, 2009):

- Capacidad de retención de agua. Es fundamental para asegurar un suministro continuo entre riegos.
- Sensibilidad a la salinidad del suelo. Este cultivo soporta una salinidad del suelo de hasta 1,7 dS/m a 20 °C.
- Aireación. El maíz es muy sensible a la asfixia radicular, limitación de la capacidad de respirar de las plantas a través de las raíces, por lo que no tolera suelos apelmazados.
- Temperatura. El maíz se muestra especialmente sensible durante la germinación, nascencia e inicio de la vegetación. Requiere un mínimo de 12°C de temperatura del suelo para la germinación.
- Requerimientos de agua. Presenta un coeficiente hídrico muy bajo, aproximadamente 300 kg de agua por un kg de sustancia seca producida, pero debe satisfacer perfectamente las exigencias hídricas. El consumo hídrico se estima en unos 5000-6000 m³/ha para el desarrollo de todo el ciclo de cultivo.

En la tabla 6.1 se presentan las cantidades de los principales nutrientes consumidos por el maíz, que varían ligeramente según la referencia consultada (López-Bellido et al., 2009).

La extracción más fuerte de nutrientes se produce a partir de las 4-5 semanas, pudiendo asimilar el nitrógeno tanto en forma nítrica como amoniacal. Una parte importante de los nutrientes extraídos son destinados a partes de la planta que no siempre se retiran del campo,

por lo que existen importantes diferencias entre la extracción total de nutrientes y la exportación en los granos (López-Bellido et al., 2009).

Tabla 6.1: Extracción y exportación real de nutrientes principales del maíz

NUTRIENTES	EXPORTACIÓN EN GRANOS (Kg/Tn grano)	EXTRACCIÓN TOTAL (Kg/Tn grano)
Nitrógeno	15.5-19.1	24.7-30.0
Fósforo (P ₂ O ₅)	7.0-12.3	10.2-12.3
Potasio (K ₂ O)	4.5-5.4	20.7-25.2

Este cultivo se siembra en este estudio a principios del mes de mayo y se recoge en el mes de febrero.

GIRASOL (*Helianthus annuus*)

Tiene gran capacidad de adaptación a diferentes condiciones climáticas y edáficas. Su crecimiento se regula por la disponibilidad de agua y nutrientes, además de otros factores como temperatura y radiación a lo largo del ciclo. Entre las propiedades y características de este cultivo se encuentran:

- Temperatura. Las temperaturas altas favorecen el cuajado y maduración de los frutos.
- Requerimientos de agua y humedad. Es un cultivo que puede desarrollarse con buenos rendimientos en condiciones de secano, siempre que las precipitaciones anuales superen los 400 mm y no se concentren en invierno, ya que aprovecha el agua de forma eficiente en condiciones de escasez. El cultivo antecesor, las labranzas y los barbechos condicionan el almacenaje de agua en el suelo y resultan de gran importancia.
- Responde bien al riego, siendo las necesidades totales en general entre 3000-4000 m³/ha.

En la tabla 6.2 se presentan los principales nutrientes consumidos por el girasol por tonelada de grano producido (López-Bellido et al., 2009).

Tabla 6.2: Requerimientos de nutrientes del girasol

NUTRIENTES	(Kg/Tn pipa comercial)
Nitrógeno	30-40
Fósforo (P ₂ O ₅)	15-20
Potasio (K ₂ O)	30-40

Este cultivo se siembra en este estudio a principios del mes de mayo y se recoge en octubre.

6.1.2 Selección de suelos

Para poder llevar a cabo una agricultura productiva y sostenible, se necesitan terrenos fértiles, entendiéndose por fertilidad del suelo a su capacidad para suministrar todos y cada uno de los nutrientes que necesitan las plantas en cada momento, en la cantidad necesaria y de forma asimilable para llevar a cabo los procesos fisiológicos y metabólicos que les permiten desarrollarse (García et al., 2009). Los nutrientes son diversos y se clasifican como

macronutrientes (carbono, hidrógeno, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio y calcio), que suponen el 99% de la masa y micronutrientes (hierro, manganeso, zinc, cobre, boro, níquel y cloro), que son necesarios en muy pequeñas cantidades y son catalizadores de numerosas reacciones del metabolismo vegetal aunque se consideran tóxicos a partir de determinadas concentraciones.

La zona objeto de estudio se encuentra en el término municipal de Úcar, en la Comunidad Foral de Navarra.

El clima de la zona es de transición entre mediterráneo y atlántico. Se caracteriza por ser templado-frío, lleno de contrastes y que varía de un año a otro. La temperatura media anual es de 12.4 °C. Los cambios de invierno a primavera y de verano a otoño son bruscos. La media de temperaturas máximas es de 27.1 °C en agosto, el mes más cálido; la media de las mínimas es de 1.1 °C en enero, el mes más frío. El total de precipitaciones a lo largo del año es de un promedio de 772.5 l/m². Anualmente llueve unos 132 días, que se concentran sobre todo en invierno (Larraya, 2011).

Los dos suelos objeto de estudio son terrenos de 4 hectáreas cada uno, distanciados entre sí 887 metros y se muestran en la figura 6.3.



Figura 6.3: Imágenes del suelo arcilloso y el suelo arenoso (Google maps)

La diferencia entre ambos suelos es la textura, siendo en uno arcillosa (contenido en arcilla superior al 30%) y en otro arenosa (contenido en arcilla inferior al 10%). La textura es una propiedad que influye sobre el laboreo, la compacidad, disponibilidad de agua útil sobre las plantas, disponibilidad de nutrientes o penetración de raíces. Algunas de las características propias de cada textura se muestran en la tabla 6.3.

Tabla 6.3: Características de los suelos de textura arcillosa y de textura arenosa

CARACTERÍSTICAS	
Suelo arenoso	Baja compacidad
	Alta infiltración
	Facilidad para laboreo
	Alta capacidad retención agua disponible
Suelo arcilloso	Alta compacidad
	Baja infiltración
	Dificultad para laboreo
	Dificulta penetración de raíces
	Alta capacidad de intercambio térmico

Ambos suelos presentan una ligera pendiente, más pronunciada en el suelo arcilloso. Cada campo se cultiva con un tipo de cultivo diferente, aunque previamente los dos han estado cultivados con maíz. Durante la campaña objeto de estudio se cultiva girasol en el suelo de textura arenosa y se cultiva maíz en el suelo de textura arcillosa.

La forma de riego de ambos campos es por aspersión. Cada aspersor está separado unos 18 m del siguiente y cubren toda la superficie cultivable. El agua de riego proviene del Canal de Navarra que se encuentra a 1.45 km del suelo arenoso y a menos de 500 m del suelo arcilloso.

6.1.3 Características del fango y aplicación al terreno

Los fangos aplicados en los suelos provienen de una EDAR de Navarra que trata unos 490 m³/semana de fango mediante digestión aerobia termófila autosostenida. La principal diferencia entre los fangos aplicados en los dos suelos es el tiempo que permanecen almacenados antes de su aplicación. El fango aplicado en la superficie arcillosa permanece dos meses hasta su esparcimiento en el suelo y el fango aplicado en la superficie arenosa se aplica en 24 horas desde su transporte desde la planta de tratamiento.

Los fangos se aplican al suelo en el mes de mayo de 2016. La recogida de cultivos anterior a la aplicación del fango se realiza en el mes de febrero. Previamente a la aplicación del fango el suelo se rompe y airea con un rotocultor. Se aplican 25 toneladas de fango en cada campo.

La aplicación de los fangos se realiza mediante una distribución en superficie con una abonadora agrícola. Una vez cubierta la superficie de cultivo, se labra, con el fin de enterrar y remover los primeros centímetros de la superficie de cultivo con los fangos. Dos días después del acondicionamiento y preparación del suelo, se procede a la siembra de los cultivos correspondientes en cada campo por medio de una sembradora agrícola.

6.1.4 Toma de muestras, acondicionamiento y parámetros de control

Las muestras objeto de estudio son: muestras de suelos sin abonar, muestras de fangos de EDAR antes de añadir al suelo y muestras de suelo abonado con fangos. Además se toman muestras de agua de riego para su caracterización.

La toma de muestras se realiza en días en los que las condiciones climatológicas son favorables entre mayo de 2016 y febrero de 2017. Previamente a la aplicación del fango al suelo se toman muestras tanto del suelo y como del fango antes de mezclarlos. A continuación, una vez abonados los suelos y sembrados los cultivos, se realizan dos muestreos sucesivos después de 3 y 5 semanas, tomando muestras del suelo abonado y del agua de riego. Finalmente, se toman muestras del suelo abonado tras la recogida del cultivo (24 semanas en el suelo arenoso y 42 semanas en el suelo arcilloso). Las figura 6.4 muestra imágenes de uno de los suelos antes de la aplicación del fango y de uno los muestreos realizados y la figura 6.5 muestra la línea temporal de las muestras tomadas y la nomenclatura de las mismas.

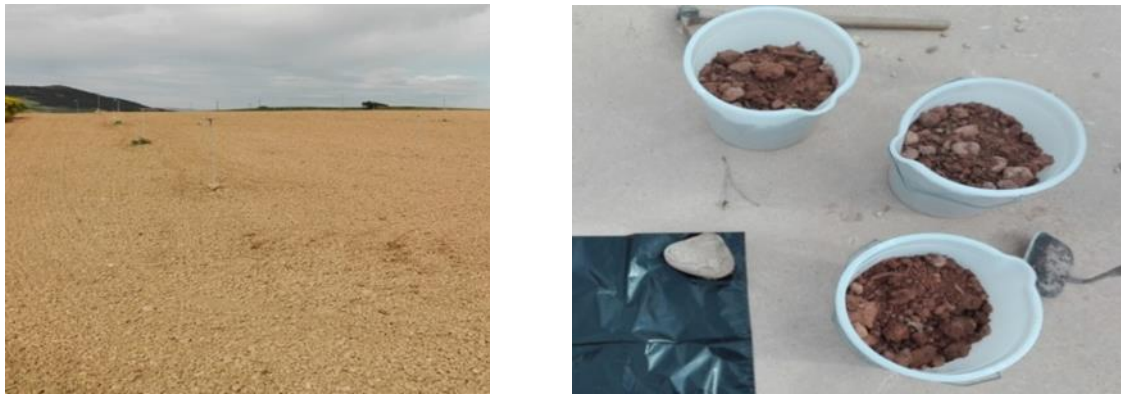


Figura 6.4: Imágenes de los suelos y la toma de muestras. a) Suelo arenoso antes de abonar; b) Toma de muestra de suelo arcilloso

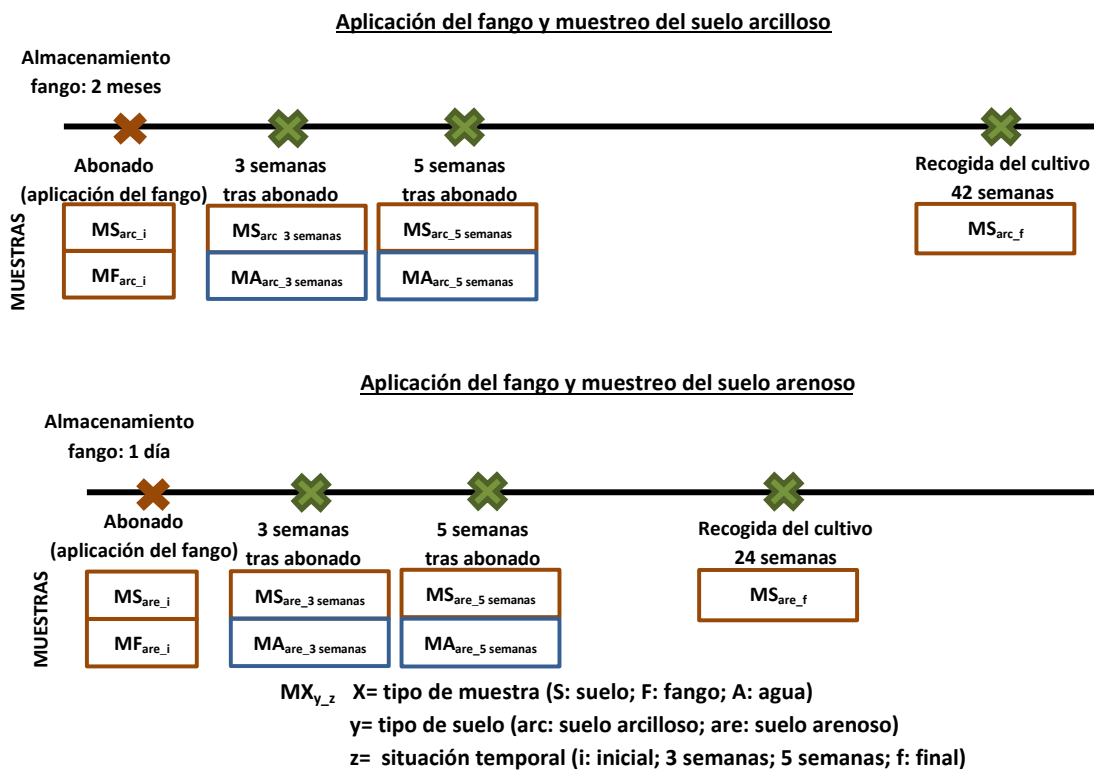


Figura 6.5: Línea temporal de la toma de muestras

Las muestras tanto de suelo sin abonar como de suelo abonado se toman mediante un muestreo sistemático y considerando que los sistemas de riego por aspersión delimitan un cuadrado de aproximadamente 18 m x 18 m. Las parcelas se dividen en polígonos y en cada polígono se recoge con una azada una porción de suelo a unos 15 cm de profundidad. Cada porción es acumulada en un cubo hasta completar el muestreo total del suelo objeto de estudio (3 hectáreas). El contenido de los cubos se deposita sobre una superficie aislada y de toda la mezcla se selecciona una porción significativa de las muestras por el método de cuarteos. Este método consiste en homogeneizar el material, aplanarlo hasta obtener un espesor y diámetro uniformes, dividir la pila en cuatro partes iguales y seleccionar partes diagonalmente opuestas. La mezcla vuelve a homogeneizarse, aplanarse, cuartearse y seleccionar sucesivamente hasta obtener el tamaño de muestra requerido, en este caso 500 g.

Por otro lado, la muestra inicial de fango que se toma antes de añadir al suelo se toma de manera aleatoria en recipientes estériles de 500 ml y las muestras de agua se toman en la boca de riego que está en cada uno de los suelos también en recipientes estériles de 500 ml (Carter, 1993; ISO y AENOR, 2011, 2013).

Las muestras de suelo, fango y suelo abonado requieren un pretratamiento previo a su caracterización que consiste en pasar la muestra sucesivamente por dos tamices, uno de 5 mm de grosor y otro de 2 mm de grosor. A continuación se prepara una suspensión inicial con 10 g de muestra y 90 ml de agua de dilución estéril y se agita a 3500 rpm durante 20 min, obteniéndose una muestra como la que se observa en la figura 6.6 (Carter, 1993).

Se utilizan recipientes estériles de 150 y 500 ml para el análisis de bacterias y recipientes no estériles para el análisis de parámetros físico-químicos. Las muestras se transportan refrigeradas hasta su análisis. Las bacterias se analizan en un tiempo inferior a 24 horas.



Figura 6.6: Suspensión inicial de las muestras sólidas tras el pretratamiento

En todas las muestras recogidas se analizan parámetros físico-químicos y microbiológicos detallados en las tablas 3.1 y 3.4 del capítulo 3, respectivamente. En concreto se determinan pH, temperatura, conductividad, DQO, COD, y ST así como coliformes totales, *E.coli*, *S. aureus*, *Enterococcus*, sp., *Pseudomonas* sp. y recuento de mesófilas totales en todas las muestras recogidas. Además, en algunas muestras también se determina proteína bruta, fósforo, potasio asimilable, metales (Ca, Fe, Mg, Cd, Cu, Ni, Pb, Zn, Hg y Cr), *C. perfringens* y *Salmonella* spp. El análisis de *C.perfringens* y *Salmonella* spp. se lleva a cabo en el laboratorio ANALIZA Control de Calidad S.L.

En el caso del análisis microbiológico, considerando sus respectivas diluciones (3 al menos), se estima que se cultivan entre 110 y 160 placas para el recuento de microorganismos, en cada uno de los muestreos.

6.2 RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

6.2.1 Aplicación del fango en suelo arcilloso

Resultados del análisis de suelos y fangos

Los resultados de la caracterización de suelos y fangos previa al abonado se muestran en las tablas 6.4 y 6.5.

La tabla 6.4 muestra los resultados promedio de los parámetros físico-químicos determinados en el suelo arcilloso antes del abonado y en el fango que se va a adicionar al suelo (MS_{arc_i} y MF_{arc_i} de la figura 6.5).

Tabla 6.4: Caracterización físico-química del suelo arcilloso antes de ser abonado y del fango con el que se va a abonar

	Unidades	MS_{arc_i}	MF_{arc_i}
pH	-	7.1	6.7
Temperatura	°C	18.0	16.0
Conductividad	$\mu S/cm$	4200	10600
DQO	mgO_2/l	800	5400
COD	mg/l	11.6	534
ST	g/g	0.85	25.3
Proteína bruta (N orgánico)	%	0.86	25.92
Fósforo	mg/kg	9.78	13.25
Potasio asimilable	mg/kg	200	349
Ca	mg/g	152.634	35.56
Fe	mg/g	22.145	6.951
Mg	mg/g	7.386	1.895
Cd	mg/g	<MCD ¹	<MCD
Cu	mg/g	<MCD	0.136
Ni	mg/g	0.030	0.042
Pb	mg/g	<MCD	<MCD
Zn	mg/g	0.046	0.619
Hg	mg/g	<MCD	<MCD
Cr	mg/g	<MCD	<MCD

Tal y como se muestra en la tabla 6.4, el suelo arcilloso presenta una alta concentración de minerales como Ca, Fe y Mg (MS_{arc_i}). Por otro lado, en el fango es elevada la concentración de proteína bruta, fósforo, potasio así como la cantidad de materia orgánica (MF_{arc_i}). La concentración de aquellos metales limitados en la legislación vigente (RD 1310/1990), en concreto Cd, Cu, Pb, Zn, Hg y Cr están por debajo de los límites establecidos, tanto en el suelo como en el lodo (tabla 2.3).

La tabla 6.5 muestra los resultados promedio de la caracterización microbiológica del suelo y el fango por separado, antes de mezclarse.

Tal y como muestran los resultados de caracterización microbiológica de la tabla 6.5, el recuento de mesófilas totales es de 10^7 UFC/g de muestra seca en el suelo y la concentración promedio de cada bacteria analizada es superior a 10^2 UFC/g de muestra seca, siendo la mayor

¹ Límite de detección del equipo

concentración la de coliformes totales (MS_{arc_i}). Por otro lado, en los fangos el recuento de mesófilas totales es de 10^7 UFC/g de muestra seca, el valor promedio de concentración de cada bacteria analizada son superiores a 10^3 UFC/g de muestra seca y la mayor concentración se corresponde con *Enterococcus* sp. (MF_{arc_i}). No se detecta *Salmonella* spp. en las muestras recogidas de suelo y fango.

Tabla 6.5: Caracterización microbiológica (UFC/g seco) de las muestras iniciales del suelo arcilloso y el fango con el que se va a abonar el suelo

	MS_{arc_i}	MF_{arc_i}
Coliformes totales	$1.3 \pm 0.5E+06$	$3.7 \pm 0.7E+03$
<i>Escherichia coli</i>	$2.0 \pm 1.1E+03$	$2.2 \pm 1.0E+03$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$2.1 \pm 0.9E+04$	$1.9 \pm 1.2E+05$
<i>Enterococcus</i> sp.	$1.3 \pm 1.2E+03$	$1.0 \pm 0.4E+06$
<i>Pseudomonas</i> sp.	$1.1 \pm 0.6E+02$	$9.4 \pm 0.8E+03$
<i>Clostridium perfringens</i>	$1.0 \pm 0.4E+03$	$2.2 \pm 0.4E+05$
Recuento mesófilas totales	$4.1 \pm 0.2E+07$	$1.2 \pm 0.2E+07$
<i>Salmonella</i> spp.	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g

$\geq 10^8$	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	$\leq 10^1$
-------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	-------------

La evolución de los resultados del análisis de suelo arcilloso abonado con el transcurso del tiempo muestra en las tablas 6.6 y 6.7 (parámetros físico químicos y microbiológicos, respectivamente).

Tabla 6.6: Evolución temporal de los valores de parámetros físico-químicos en el suelo arcilloso

	Unidades	$MS_{arc_3semanas}$	$MS_{arc_5semanas}$
pH	-	7.0	6.8
Temperatura	°C	13	18
Conductividad	$\mu S/cm$	8960	9810
DQO	mgO_2/l	850	14000
COD	mg/l	11.2	25.7
ST	g/g	0.87	0.84
Proteína bruta	%	0.87	0.8
Fósforo	mg/kg	8.5	22.1
Potasio asimilable	mg/kg	214	210
Ca	mg/g	-	134.89
Fe	mg/g	-	21.463
Mg	mg/g	-	7.430
Cd	mg/g	-	<MCD
Cu	mg/g	-	<MCD
Ni	mg/g	-	0.030
Pb	mg/g	-	<MCD
Zn	mg/g	-	0.051
Hg	mg/g	-	<MCD
Cr	mg/g	-	<MCD

Si se comparan los resultados de las tablas 6.4 y 6.6, no se observan diferencias físico-químicas apreciables tras tres semanas de la aplicación del fango ($MS_{arc_3semanas}$). Sin embargo, sí se observa que tras cinco semanas se produce un incremento destacable de la materia orgánica y del fósforo, así como una disminución notable de la concentración de calcio en el suelo ($MS_{arc_5semanas}$). La concentración máxima de metales establecida en el RD1310/1990 se encuentra por debajo de los límites exigidos. Se debe prestar especial atención al níquel, ya que su concentración está en el límite superior para suelos con un pH menor a 7.

Tabla 6.7: Evolución temporal de la concentración microbiológica (UFC/g seco) en el suelo arcilloso

	MS _{arc_3semanas}	MS _{arc_5semanas}
Coliformes totales	3.4 ± 0.9E+07	2.6 ± 1.1E+06
<i>Escherichia coli</i>	4.9 ± 3.1E+03	2.6 ± 0.8E+05
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.0 ± 1.2E+04	5.0 ± 2.1E+04
<i>Enterococcus sp.</i>	<1.1E+02	2.0 ± 0.6E+04
<i>Pseudomonas sp.</i>	3.0 ± 2.0E+04	1.1 ± 1.3E+06
<i>Clostridium perfringens</i>	1.3 ± 0.3E+03	-
Recuento mesófilas totales	4.0 ± 0.3E+07	5.0 ± 0.6E+06
<i>Salmonella spp.</i>	Ausencia en 25g	-

≥10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	≤10 ¹
------------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	------------------

Si se comparan los resultados mostrados en la tabla 6.7 con los resultados de caracterización microbiológica en las muestras iniciales de fango y suelo, se observa cómo, en general, a las 3 semanas de haberse aplicado el fango, el recuento de mesófilas totales se mantiene y a las 5 semanas se reduce el recuento en un orden de magnitud. En cuanto a las bacterias analizadas, a las 3 semanas se produce un incremento de coliformes totales y *Pseudomonas sp.*, mientras que el resto de microorganismos analizados muestran una concentración promedio del mismo orden de magnitud o inferior en el suelo, como en el caso del *Enterococcus sp.* Por otro lado, la concentración de *Clostridium perfringens* no varía tras la aplicación del fango. Otros autores tampoco observan variaciones en la concentración de esta bacteria con el tiempo (Pourcher et al., 2007). Tas 5 semanas, la concentración de *E.coli*, *Pseudomonas sp.* y *Enterococcus sp.* aumenta, la de *S.aureus* se mantiene y la de coliformes totales disminuye.

No se detecta la presencia de *Salmonella spp.* en ninguna de las muestras analizadas; esto puede ser debido a la menor resistencia de esta bacteria al estrés ambiental. Otros autores detectan esta bacteria hasta tres meses después de haberse aplicado el fango al suelo (de las Heras et al., 2005).

Los resultados del análisis del suelo final, tras la recogida del cultivo a las 42 semanas, se muestran en las tablas 6.8 y 6.9.

Tabla 6.8: Caracterización físico-química del suelo arcilloso tras la recogida del cultivo (42 semanas)

	Unidades	MS _{arc_f}
pH	-	7.2
Temperatura	°C	10.4
Conductividad	µS/cm	11000
DQO	mgO ₂ /l	12000
COD	mg/l	20
ST	g/g	0.84

Tabla 6.9: Concentración microbiológica (UFC/g seco) del suelo arcilloso tras la recogida del cultivo (42 semanas)

	MS _{arc_f}
Coliformes totales	8.7 ± 0.3E+03
<i>Escherichia coli</i>	8.3 ± 0.3E+01
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.0 ± 0.7E+03
<i>Enterococcus sp.</i>	<1.0 E+03
<i>Pseudomonas sp.</i>	1.0 ± 0.8+04
Recuento mesófilas totales	1.5 ± 0.6E+06

≥10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	≤10 ¹
------------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	------------------

Tal y como muestra la tabla 6.8, se observa una disminución de la materia orgánica y un aumento del pH en comparación con la muestra de suelo tomada tras 5 semanas tras su abono.

Por otro lado, tal y como muestra la tabla 6.9, no varía el recuento de mesófilas totales respecto a los que había tras 5 semanas de aplicación del fango (tabla 6.7). En general, se observa una reducción de todas las bacterias estudiadas de entre 1 y 4 órdenes de magnitud respecto al análisis tras 5 semanas.

Resultados del análisis del agua de riego

Las tablas 6.10 y 6.11 muestran los resultados promedio de la caracterización físico-química y microbiológica, respectivamente, del agua utilizada en el riego del terreno y procedente del Canal de Navarra.

Tabla 6.10: Caracterización físico-química del agua de riego del suelo arcilloso

	MA _{arc}
pH	7.2
Temperatura (°C)	11.8
Conductividad (μS/cm)	160
DQO (mgO ₂ /l)	110
COD (mg/l)	8.3
SS(mg/L)	110

Tal y como muestra la tabla 6.10, el agua contiene una concentración destacable de sólidos suspendidos y DQO.

En la tabla 6.11 se observa que en el agua de las bacterias más abundantes coliformes totales y *Pseudomonas* sp. y que su utilización supone un aporte continuo de microorganismos al suelo en una concentración del orden de 10³ UFC/100ml.

Tabla 6.11: Caracterización microbiológica (UFC/100ml) del agua de riego del suelo arcilloso

	MA _{arc}
Coliformes totales	1.3 ± 0.5E+03
<i>Escherichia coli</i>	<5.0E+01
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.0 ± 0.4E+01
<i>Enterococcus</i> sp.	<1.0 E+01
<i>Pseudomonas</i> sp.	2.7 ± 0.5E+02
Recuento de mesófilas totales	2.1 ± 0.3E+03

≥10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	≤10 ¹
------------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	------------------

6.2.2 Aplicación del fango en suelo arenoso

Resultados del análisis de suelos y fangos

Los resultados de la caracterización de suelos y fangos previa al abonado se muestran en las tablas 6.12 y 6.13 (MS_{are_i} y MF_{are_i} de la figura 6.5).

La tabla 6.12 muestra los resultados promedio de los parámetros físico-químicos determinados en el suelo arenoso antes del abonado y en el fango que se va a adicionar al suelo.

Tabla 6.12: Caracterización físico-química del suelo arenoso antes de ser abonado y del fango con el que se va a abonar

	Unidades	MS_{are_i}	MF_{are_i}
pH	-	7.1	6.6
Temperatura	°C	18.0	16.0
Conductividad	µS/cm	10700	10000
DQO	mgO ₂ /l	380	3700
COD	mg/l	14.8	300
ST	g/g	0.87	0.85
Proteína bruta	%	0.68	21.34
Fósforo	mg/kg	10.49	16.03
Potasio asimilable	mg/kg	118	292
Ca	mg/g	161.30	49.39
Fe	mg/g	17.581	8.041
Mg	mg/g	4.341	3.777
Cd	mg/g	<MCD	<MCD
Cu	mg/g	<MCD	0.151
Ni	mg/g	0.030	0.043
Pb	mg/g	<MCD	<MCD
Zn	mg/g	0.046	0.692
Hg	mg/g	<MCD	<MCD
Cr	mg/g	<MCD	<MCD

Tal y como se muestra en la tabla 6.12, el suelo arenoso presenta una elevada concentración de minerales como Ca, Fe y Mg (MS_{are_i}). Por otro lado, en el fango es elevada la concentración de proteína bruta, fósforo, potasio así como la cantidad de materia orgánica (MF_{are_i}). La concentración de aquellos metales limitados en la legislación vigente (RD1310/1990), en concreto Cd, Cu, Ni, Pb, Zn, Hg y Cr están por debajo de los límites establecidos, tanto en el suelo como en el lodo. Se debe prestar especial atención a la concentración de níquel en el suelo, ya que está en el límite superior para suelos con un pH menor a 7 (tabla 2.3).

La tabla 6.13 muestra los resultados promedio de la caracterización microbiológica del suelo y el fango por separado, antes de mezclarse.

Tal y como muestran los resultados de caracterización microbiológica de la tabla 6.13, el recuento de mesófilas totales de 10^7 UFC/g de muestra seca en el suelo y la concentración promedio de cada bacteria es superior a 10^2 UFC/g de muestra seca, siendo la mayor concentración la de coliformes totales (MS_{are_i}). Por otro lado, en los fangos el recuento de mesófilas totales es de 10^7 UFC/g de muestra seca, el valor promedio de concentración de cada bacteria es superior a 10^5 UFC/g de muestra seca y la mayor concentración se

corresponde con *Enterococcus* sp. (MS_{are_i}). No se detecta *Salmonella* spp. en las muestras recogidas de suelo y fango.

Tabla 6.13: Caracterización microbiológica (UFC/g seco) de las muestras iniciales del suelo arenoso y el fango con el que se va a abonar el suelo

	MS_{are_i}	MF_{are_i}
Coliformes totales	$8.4 \pm 0.4E+05$	$2.5 \pm 0.3E+06$
<i>Escherichia coli</i>	$4.8 \pm 0.6E+04$	$6.3 \pm 0.4E+05$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$5.7 \pm 0.3E+04$	$6.3 \pm 0.9E+05$
<i>Enterococcus</i> sp.	$1.1 \pm 0.7E+02$	$5.4 \pm 0.5E+06$
<i>Pseudomonas</i> sp.	$2.6 \pm 0.1E+03$	$5.6 \pm 2.1E+05$
<i>Clostridium perfringens</i>	$1.0 \pm 0.6E+02$	$1.0 \pm 0.6E+05$
Recuento mesófilas totales	$3.2 \pm 0.4E+07$	$2.4 \pm 0.3E+07$
<i>Salmonella</i> spp.	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g

$\geq 10^8$	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	$\leq 10^1$
-------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	-------------

La evolución de los resultados del análisis del suelo arenoso abonado, con el transcurso del tiempo se muestra en las tablas 6.14 y 6.15 (parámetros físico-químicos y microbiológicos, respectivamente).

Tabla 6.14: Evolución temporal de los valores de parámetros físico-químicos en el suelo arenoso

	Unidades	$MS_{are_3semanas}$	$MS_{are_5semanas}$
pH	-	7.3	7.2
Temperatura	°C	13	18
Conductividad	$\mu S/cm$	11310	10860
DQO	mgO_2/l	154	1500
COD	mg/l	8.3	21.8
ST	g/g	0.89	0.84
Proteína bruta	%	0.68	0.60
Fósforo	mg/kg	6.5	20.5
Potasio asimilable	mg/kg	130	136
Ca	mg/g	-	124.430
Fe	mg/g	-	16.998
Mg	mg/g	-	4.570
Cd	mg/g	-	<MCD
Cu	mg/g	-	<MCD
Ni	mg/g	-	0.030
Pb	mg/g	-	<MCD
Zn	mg/g	-	0.045
Hg	mg/g	-	<MCD
Cr	mg/g	-	<MCD

Si se comparan los resultados de las tablas 6.12 y 6.14, no se observan diferencias físico-químicas apreciables en el suelo tras tres semanas de la aplicación del fango, salvo una ligera disminución en la materia orgánica presente, aumento del potasio y reducción del fósforo ($MS_{are_3semanas}$). Sin embargo, sí se observa que tras cinco semanas se produce un incremento destacable de la materia orgánica y del fósforo, así como una reducción de la concentración del calcio ($MS_{are_5semanas}$). La concentración máxima de metales establecida en el RD1310/1990 se encuentra por debajo de los límites exigidos. Se debe prestar especial atención al níquel, ya que su concentración está en el límite superior para suelos con un pH menor a 7.

Figura 6.15: Evolución temporal de la concentración microbiológica (UFC/g seco) en el suelo arenoso

	MS _{are_3semanas}	MS _{are_5semanas}
Coliformes totales	3.7 ± 0.6E+05	1.9 ± 0.9E+05
<i>Escherichia coli</i>	3.9 ± 1.7E+03	1.3 ± 0.7E+04
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.6 ± 0.7E+04	8.0 ± 1.6E+03
<i>Enterococcus sp.</i>	6.3 ± 0.4E+01	1.1 ± 0.9E+02
<i>Pseudomonas sp.</i>	1.3 ± 0.3E+05	6.9 ± 2.2E+04
<i>Clostridium perfringens</i>	8.5 ± 0.3E+02	-
Recuento mesófilas totales	6.0 ± 0.6E+05	6.0 ± 0.4E+06
<i>Salmonella spp.</i>	Ausencia en 25 g	-

≥10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	≤10 ¹
------------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	------------------

Si se comparan los resultados mostrados en la tabla 6.15 con los resultados de caracterización microbiológica en las muestras iniciales de fango y suelo, se observa cómo, en general, a las tres semanas de haberse aplicado el fango, el recuento de mesófilas totales se reduce dos órdenes de magnitud y aumenta un orden de magnitud tras 5 semanas. En cuanto a las bacterias analizadas, la concentración de *Pseudomonas sp.* se incrementa dos órdenes de magnitud tras 3 semanas, mientras que el resto de microorganismos analizados muestran una concentración similar o inferior a la determinada en el suelo inicialmente. Por otro lado, la concentración de *Clostridium perfringens* no varía tras la aplicación del fango. A las 5 semanas de haberse aplicado el fango, la concentración de *E.coli* y *Enterococcus sp.* aumenta mientras que para el resto de bacterias se detecta una concentración similar o inferior a la determinada a las 3 semanas.

Al igual que en el suelo arcilloso, no se detecta la presencia de *Salmonella spp.* en las muestras analizadas.

Los resultados del análisis del suelo final, tras la recogida del cultivo a las 24 semanas, se muestran en las tablas 6.16 y 6.17.

Tabla 6.16: Caracterización físico-química del suelo arenoso tras la recogida del cultivo (24 semanas)

	Unidades	MS _{are_f}
pH	-	7.1
Temperatura	°C	16.2
Conductividad	μS/cm	11500
DQO	mgO ₂ /l	1700
COD	mg/l	23.5
ST	g/g	0.92
Proteína bruta	%	0.58
Fósforo	mg/kg	14.69
Potasio asimilable	mg/kg	140.60

Tal y como muestra la tabla 6.16, no se observan variaciones en la composición físico-química en comparación con la muestra de suelo tomada a las 5 semanas tras su abonado.

Por otro lado, tal y como muestra la tabla 6.17, no varía el recuento de mesófilas totales respecto a las que había tras 5 semanas de aplicación del fango (tabla 6.15) y la concentración de las demás bacterias analizadas se mantiene o disminuye un orden de magnitud como en el caso de *E.coli* y *Pseudomonas sp.* respecto a la concentración determinada a las 5 semanas.

Tabla 6.17: Concentración microbiológica (UFC/g seco) del suelo arenoso tras la recogida del cultivo (24 semanas)

	MS _{are_f}
Coliformes totales	3.4 ± 1.2E+05
<i>Escherichia coli</i>	4.1 ± 0.7E+02
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.6 ± 2.4E+03
<i>Enterococcus sp.</i>	6.3 ± 1.3E+02
<i>Pseudomonas sp.</i>	3.8 ± 0.5E+03
Recuento mesófilas totales	3.5 ± 0.4E+06

≥10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	≤10 ¹
------------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	------------------

Resultados del análisis del agua de riego

Las tablas 6.18 y 6.19 muestran los valores promedio de la caracterización físico-química y microbiológica, respectivamente, del agua utilizada en el riego del suelo arenoso y procedente del Canal de Navarra.

Tabla 6.18: Caracterización físico-química del agua de riego del suelo arenoso

	Unidades	MA _{are}
pH	-	7.7
Temperatura	°C	12
Conductividad	μS/cm	190
DQO	mgO ₂ /l	140
COD	mg/l	7.3
SS	mg/l	60

Tabla 6.19: Caracterización microbiológica (UFC/100ml) del agua de riego del suelo arenoso

	MA _{are}
Coliformes totales	3.7 ± 1.3E+02
<i>Escherichia coli</i>	<1.0E+01
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.5 ± 0.8E+02
<i>Enterococcus sp.</i>	<1.0E+01
<i>Pseudomonas sp.</i>	1.8 ± 0.8E+03
Recuento de mesófilas totales	2.5 ± 0.4E+03

≥10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	≤10 ¹
------------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	------------------

En la tabla 6.19 se observa que las bacterias más abundantes *Pseudomonas sp.*, y el uso de esta agua supone adicionar una concentración microbiológica del orden de 10³ UFC/100ml.

6.3 ESTUDIO COMPARATIVO

De los resultados obtenidos en el control físico-químico y microbiológico de las muestras de suelo, fango, suelo abonado y agua de riego se extraen las siguientes interpretaciones y conclusiones:

- 1.- Las propiedades beneficiosas de los fangos quedan patentes por la elevada concentración de materia orgánica y minerales presentes, sobre todo por el porcentaje de proteína bruta, relacionado con el aporte de nitrógeno, resultados que coinciden con los obtenidos por otros autores (de las Heras et al., 2005). Por otro lado, tras adicionar el fango en el suelo y hasta la recogida del cultivo, el suelo abonado tiene una mayor concentración de DQO y de fósforo asimilable. El aumento de potasio en los suelos tras 5 semanas puede relacionarse con la liberación por parte del fango de los minerales y nutrientes que no han sido asimilados todavía por las plantas.
- 2.- En cuanto los resultados de la determinación de metales, no se observa un incremento destacable de la concentración de metales tras la adición del fango, en ninguno de los dos suelos.
- 3.- El tiempo de almacenamiento del fango antes de su aplicación al suelo influye en la concentración microbiológica determinada. El fango que permanece menos tiempo almacenado antes de su aplicación al suelo contiene una mayor concentración de coliformes totales, *E.coli* y *Pseudomonas* sp., siendo hasta 3 órdenes de magnitud mayor que en el fango que permanece más tiempo almacenado hasta su aplicación. Sin embargo, la concentración de *S. aureus*, *Enterococcus* sp. y *C.perfringens* es del mismo orden en los dos fangos analizados.
- 4.- El recuento de mesófilas totales se reduce un orden de magnitud en las muestras finales tomadas en ambos suelos con respecto a la concentración determinada en el suelo inicialmente y antes de añadir el fango. Por otro lado, la concentración de las bacterias analizadas a lo largo de las semanas de muestreo difiere en función microorganismo considerado así como del suelo analizado. Sin embargo, en general, la concentración final de las bacterias analizadas es del mismo orden de magnitud o inferior a la concentración determinada en el suelo antes de añadir el fango. Mientras algunos autores determinan que el tipo de suelo no tiene un efecto significativo en la reducción microbiológica (Lang y Smith, 2007; Schwarz et al., 2014), otros demuestran que la supervivencia de los microorganismos es menor en suelos arenoso (Pourcher et al., 2007), por considerar que en general el suelo arenoso es más agresivo en la descomposición de organismos entéricos al ser más susceptibles al estrés por humedad (Lang y Smith, 2007).
- 5.- En cuanto a la persistencia de las bacterias analizadas, Estrada et al (2004) detectan *E.coli* tras 80 días similares a las detectadas en este estudio. Otros autores encuentran, incluso en suelos tratados con bajas dosis de fangos, coliformes totales y enterococos fecales en mayor concentración que en los suelos sin abonar hasta 12-16 meses después de la aplicación del fango (Gondim-Porto et al., 2016; Schwarz et al., 2014).
- 6.- No se detecta *Salmonella* spp. en ninguna de las muestra analizadas.
- 7.- El agua de riego analizada tiene una concentración microbiológica de hasta 10^3 UFC/100ml, lo que supone un aporte continuo de microorganismos al suelo.

Por otro lado, las tablas 6.20 y 6.21 muestran las principales observaciones obtenidas por otros autores en varios estudios en relación a las variables físico-químicas y microbiológicas, respectivamente.

Tabla 6.20: Observaciones de otros autores en relación a la caracterización físico-química de la aplicación de fango al suelo

TIPO DE MUESTRA	PRINCIPALES OBSERVACIONES	REFERENCIA
Suelos	No aumenta el contenido de fósforo disponible al aplicar el fango en el suelo	(Vieira y Pazianotto, 2016)
	Las diferencias en las características de los suelos estudiados pueden relacionarse con la demanda de agua exigida por cada cultivo, que en el caso del maíz es mucho mayor y más prolongada en el tiempo respecto a la del girasol	(López-Bellido et al., 2009)
	En suelos arenosos se deben efectuar riegos frecuentes con dosis menores que en arcillosos	(García et al., 2009)
	Se observa un descenso del pH en el suelo abonado y un aumento de conductividad y materia orgánica	(Belhaj et al., 2016)
	Se observa un aumento de Zn, Pb, Ni, Cr y Cu tras la adición de altas dosis de fango al suelo	(de las Heras et al., 2005; Lang y Smith, 2007; López-Bellido et al., 2009)
	El aumento de la cantidad de fango añadida al suelo no aumenta el rendimiento de producción y además empiezan a acumularse metales pesados	(de las Heras et al., 2005; Belhaj et al., 2016)
Fangos	Es necesario controlar la salinidad del fango porque puede crear daños fisiológicos a la plantas	(de las Heras et al., 2005; Belhaj et al., 2016; Liu, 2016; Vieira y Pazianotto, 2016)
	En los procesos biológicos de tratamiento de fangos en condiciones aerobias y anaerobias, la liberación de metales pesados está principalmente influenciada por los cambios de pH y por la mineralización de la materia orgánica	(Fang et al., 2016)
	El carbono orgánico disuelto del fango facilita la liberación del Ni debido a la formación de complejos orgánicos de Ni que son solubles	(Mamindy-Pajany et al., 2014; Liu, 2016)
Plantas	Las mayor concentración de Cd, Cu, Ni, Mn y Pb se observa en las raíces del cultivo aunque esto no inhibe el crecimiento del maíz mientras que el rendimiento de los tejidos se incrementa con el fango añadido	(Grotto et al., 2015; Belhaj et al., 2016; Bai et al., 2017)
	El girasol tiene más potencial de acumulación en los tejidos de la raíz que en los brotes y Cr se acumula más en la planta que Ni, Zn o Cu	(Belhaj et al., 2016)
	Los metales se transfieren del suelo a la raíz y de la raíz a los brotes en diferente orden	(Soriano-Disla et al., 2014)
	Factores como la materia orgánica, el pH o la textura del suelo afectan a la biodisponibilidad del metal para ser absorbido por la planta. En el suelo arenoso es más difícil retener los metales pesados.	(de las Heras et al., 2005; Golui et al., 2014; Soriano-Disla et al., 2014; Liu, 2016)
	Los ácidos húmicos están relacionados con la inmovilización y la liberación de metales pesados	(Asensio y Covelo, 2015; Belhaj et al., 2016; Liu, 2016)

Tabla 6.21: Observaciones de otros autores en relación a la caracterización microbiológica de la aplicación de fango al suelo

TIPO DE MUESTRA	PRINCIPALES OBSERVACIONES	REFERENCIA
Suelos	Se observan tiempos menores para la reducción de la concentración microbiológica en suelos abonados con biosólidos en comparación con suelos no abonados, al influir factores ambientales y específicos del suelo como la temperatura, radiación UV, humedad del suelo, pH o actividad de microorganismos autóctonos	(Schwarz et al., 2014)
	La evolución microbiológica depende de condiciones físicas y químicas del suelo además de la disponibilidad de nutrientes más que de condiciones atmosféricas	(Estrada et al., 2004)
	Existe una relación significativa entre la humedad del suelo, la temperatura y la reducción microbiológica. La biota del suelo está involucrada en los procesos de reducción de patógenos	(Horswell et al., 2007; Lang y Smith, 2007; Schwarz et al., 2014; Gondim-Porto et al., 2016; Vieira y Pazianotto, 2016)
	La posible existencia de compartimentos anaerobios favorece el crecimiento de <i>C.perfringens</i>	(de las Heras et al., 2005; Xu et al., 2016)
	Se observa un aumento de esporas de <i>C.perfringens</i> respecto a las muestras iniciales de suelo hasta 24 meses después de adicionar el fango	(Gondim-Porto et al., 2016)
Fangos	Existe una relación entre la reducción de la actividad microbiológica y la concentración de metales como Cd, Cr, Cu o Zn	(Qureshi et al., 2003; de las Heras et al., 2005)
	El fango contiene entre 100 y 1000 veces más de microorganismos que el suelo	(Estrada et al., 2004; Gondim-Porto et al., 2016)
Plantas	La persistencia de los microorganismos en los suelos abonados está relacionada con la combinación del tratamiento aplicado al fango y el tiempo de almacenaje así como de la dosis aplicada. Enterococos se reducen en diferentes ratios en función del tratamiento aplicado al fango	(Gonzalez-Ubierna et al., 2013; Gondim-Porto et al., 2016)
	Bacterias como <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pueden actuar como bioadsorbentes y reducir la acumulación de Cd en el grano	(Suksabye et al., 2016)

Existe una diversidad destacable en los resultados y conclusiones obtenidos por diferentes estudios relacionados con la aplicación de fangos de EDAR en suelo agrícola. Estas diferencias se deben principalmente a la notable variación en las condiciones experimentales, las variables agronómicas, la heterogeneidad de las muestras, la climatología, el periodo de análisis o el tipo de fango (Lang et al., 2007; Schwarz et al., 2014; Gondim-Porto et al., 2016).

En resumen, no se pueden extrapolar resultados obtenidos por otros autores en cuanto a la evolución de los parámetros físico-químicos y microbiológicos del suelo abonado al existir muchas variables no controladas que pueden ser influyentes en los resultados obtenidos.

Capítulo 7

Conclusiones

Como consecuencia de los resultados obtenidos durante el trabajo de investigación realizado en esta Tesis Doctoral en este capítulo se presentan las principales conclusiones alcanzadas.

- La contaminación microbiológica presente en el influente de todas las depuradoras es prácticamente constante, independientemente del origen de las aguas residuales brutas, de la estación del año considerada o del caudal de tratamiento; se cuantifican entre 10^5 - 10^8 UFC/100ml, en función del microorganismo considerado. En general, existe una mayor concentración de bacterias Gram negativas que de Gram positivas. Se detecta de forma sistemática coliformes totales, *E.coli*, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp. y *Clostridium perfringens*, y de manera puntual *Salmonella* spp..
- Las bacterias analizadas presentan una evolución similar a lo largo de la línea de aguas, a través de los tratamientos aplicados; en consecuencia se considera adecuada la utilización del indicador *E.coli* (por su origen fecal presente en gran concentración), como único parámetro de control de la calidad bacteriológica de las aguas residuales y en consecuencia de la eficacia del tratamiento.
- La decantación primaria, no tiene ningún efecto sobre la eliminación de bacterias en las aguas residuales.
- El tratamiento biológico mediante cultivo en suspensión, consigue una mayor reducción de la concentración microbiológica que el basado en la utilización de filtros percoladores.
- Tras un proceso biológico mediante cultivo en suspensión, la decantación secundaria produce un efecto destacable sobre la eliminación bacteriana de las aguas, hecho no detectado cuando la decantación se realiza tras un sistema de filtros percoladores.
- El tratamiento terciario mediante lagunaje reduce la concentración microbiológica del agua hasta cuatro órdenes de magnitud, alcanzando las mayores eliminaciones a mayor tiempo de exposición del agua a la radiación solar. Por el contrario, los humedales aumentan la contaminación bacteriana hasta en un orden de magnitud.
- Si una EDAR consta de tratamiento primario y secundario en la línea de aguas, la contaminación microbiológica experimenta una reducción global en el proceso de depuración, de entre 1-2 órdenes de magnitud (medida en términos de concentración). Si además también incluye tratamiento terciario mediante lagunaje, la reducción global puede ser de hasta 5 ó 7 siete órdenes de magnitud.
- Debido a la gran contaminación bacteriana ya existente en el tramo medio de ríos de la cuenca hidrográfica del Ebro, el impacto de los vertidos urbanos estudiados sobre los mismos se considera prácticamente despreciable, por ser la concentración microbiológica vertida de la misma magnitud que la presente en los cauces receptores.
- Al no existir una metodología estandarizada ni criterios unificados para el análisis microbiológico en fangos, se realiza un estudio para evaluar la idoneidad de diferentes métodos de análisis; se concluye que los resultados de los análisis realizados mediante los métodos de recuento en placa (vertido en placa, placa difusa y filtración en membrana) no son comparables con los obtenidos mediante el método del NMP. Se aconseja la utilización del método de filtración en membrana tanto en bajas como en altas concentraciones bacteriológicas.
- La concentración microbiológica en muestras de fangos a la salida de los decantadores varía entre 10^3 - 10^6 UFC/ml en función del microorganismo analizado. No se observan diferencias

destacables entre los rangos de concentración de bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas. Se detecta de forma sistemática coliformes totales, *E.coli*, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* sp.; se detecta de manera puntual de forma aislada, *Salmonella* spp. en alguna de las muestras de fango analizadas.

- Los tratamientos de digestión realizados a escala piloto, consiguen una reducción de la contaminación microbiológica presente en fangos de hasta 3 órdenes de magnitud, cuando se utiliza un proceso anaerobio mesófilico y de hasta 5 órdenes de magnitud, cuando se aplica un proceso termofílico en condiciones tanto aerobias o anaerobias.
- El TRH del fango en los digestores no influye en la reducción de *Enterococcus* sp. y *E.coli*, en el intervalo estudiado (entre 10 y 20 días en el proceso anaerobio mesófilo y entre 5 y 15 días en los termofílicos, aerobio y anaerobio).
- La reducción de las bacterias objeto de estudio varía en función del tratamiento de digestión aplicado. En concreto, la mayor eliminación de *Enterococcus* sp. se obtiene mediante el tratamiento anaerobio termófilo y la mayor eliminación de *E.coli* se obtiene mediante el tratamiento aerobio termófilo. En consecuencia, se recomienda la utilización del conjunto de ambos indicadores para evaluar la eficacia de un proceso de digestión.
- Los dos procesos de digestión termofílicos estudiados (aerobio y anaerobio), considerados “tratamientos avanzados” en los documentos de trabajo elaborados por la Unión Europea, consiguen la higienización del fango, en términos de concentración de *E.coli* y de ausencia de *Salmonella* spp. teniendo en cuenta los criterios establecidos en el documento más reciente (2010).
- Las condiciones de almacenamiento del fango tratado influyen en la contaminación microbiológica presente. Aunque la concentración de las bacterias Gram positivas no se ve afectada, la concentración de las Gram negativas, disminuye al aumentar el tiempo de almacenamiento.
- El fango tratado procedente de un proceso de depuración de aguas residuales urbanas mejora las características agronómicas de los suelos, tanto de naturaleza arcillosa como arenosa, aumentando la concentración de materia orgánica y nutrientes.
- La aplicación del fango al suelo no supone un empeoramiento de la calidad microbiológica del terreno.

Capítulo 8

Bibliografía

- Abreu-Acosta, N., Vera, L., 2011. Occurrence and removal of parasites, enteric bacteria and faecal contamination indicators in wastewater natural reclamation systems in Tenerife- Canary Islands, Spain. *Ecol. Eng.* 37, 496–503. doi:10.1016/j.ecoleng.2010.12.014
- Asensio, V., Covelo, E.F., 2015. Physical distribution of Ni, Pb and Zn in reclaimed mine soils observed by FE-SEM with an EDS detector. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 13372–13381. doi:10.1007/s11356-015-4587-3
- Astals, S., Venegas, C., Peces, M., Jofre, J., Lucena, F., Mata-Alvarez, J., 2012. Balancing hygienization and anaerobic digestion of raw sewage sludge. *Water Res.* 46, 6218–6227. doi:10.1016/j.watres.2012.07.035
- Bagge, E., Sahlström, L., Albiñ, A., 2005. The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Water Res.* 39, 4879–4886. doi:10.1016/j.watres.2005.03.016
- Baguer, B., 2017. Evaluación de diagnóstico del grado de higienización de fangos procedentes del tratamiento de aguas residuales urbanas. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Zaragoza.
- Bai, Y.-C., Zuo, W.-G., Zhao, H.-T., Mei, L.-J., Gu, C.-H., Guan, Y.-X., Wang, X.-K., Gu, M.-J., Zang, C.-Y., Shan, Y.-H., Feng, K., 2017. Distribution of heavy metals in maize and mudflat saline soil amended by sewage sludge. *J. Soils Sediments* 17, 1565–1578. doi:10.1007/s11368-016-1630-z
- Belhaj, D., Elloumi, N., Jerbi, B., Zouari, M., Abdallah, F. Ben, Ayadi, H., Kallel, M., 2016. Effects of sewage sludge fertilizer on heavy metal accumulation and consequent responses of sunflower (*Helianthus annuus*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 20168–20177. doi:10.1007/s11356-016-7193-0
- Bernal, M.P., Gondar, D.M., 2008. Producción y gestión de los residuos orgánicos: situación actual a nivel mundial, comunitario y estatal. Moreno, J., Mora, R. (Eds.), *Compostaje*. Ediciones Mundi-Prensa. ISBN 978-84-8476-346-8
- Bonilla, N., 2009. Manual de recomendaciones técnicas: cultivo de maíz (*Zea mays*). Ramírez, L., Morúa, J. (Eds.). *Inst. Nac. Innovación y Transf. en Tecnol. Agropecu.* ISBN 978-9968-586-00-9
- Bueno Márquez, P., Días Blanco, M.J., Cabrera Capitán, F., 2008. Factores que afectan al proceso de compostaje. Moreno Casco, J., Mora Herrero, R. (Eds.), *Compostaje*. Ediciones Mundi-Prensa. ISBN 978-84-8476-346-8
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., 2009. Influence of different pretreatments on anaerobically digested sludge characteristics: Suitability for final disposal. *Water. Air. Soil Pollut.* 199, 311–321. doi:10.1007/s11270-008-9880-z
- Carter, M.R., 1993. *Soil sampling and methods of analysis*. Lewis Publishers. Ediciones Taylor&Francis Group. ISBN 978-0-8493-3586-0
- Castro-Hermida, J.A., García-Presedo, I., Almeida, A., González-Warleta, M., Da Costa, J.M.C., Mezo, M., 2008. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Water Res.* 42, 3528–3538. doi:10.1016/j.watres.2008.05.001
- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review.

- Bioresour. Technol. 99, 4044–4064. doi:10.1016/j.biortech.2007.01.057
- Directiva 86/278/CEE del Consejo, de 12 de junio de 1986, relativa a la protección del medio ambiente y, en particular, de los suelos, en la utilización de los lodos de depuradora en agricultura. Diario Oficial de la Unión Europea L181, de 4 de julio de 1986
- Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. Diario Oficial de la Unión Europea L135, de 30 de mayo de 1991
- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. Diario Oficial de la Unión Europea L327, de 22 de diciembre de 2000
- Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de noviembre de 2008, sobre los residuos y por la que se derogan determinadas. Diario Oficial de la Unión Europea L312, de 22 de noviembre de 2008
- de las Heras, J., Mañas, P., Labrador, J., 2005. Effects of several applications of digested sewage sludge on soil and plants. J. Environ. Sci. Heal. A40, 437–451
- Documento de trabajo: Draft Discussion document for the ad hoc meeting on biowastes and sludges, 2003. E 80, enero de 2004
- Documento de trabajo: Working Document: Sludge and Biowaste, 2010. ENV.C.2, septiembre de 2010
- Eaton, A., Clesceri, L., Rice, E., Greenberg, A., 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. APA-AWWA-WEF. ISBN 0-87553-047-8
- Environmental Protection Agency, 2003. Environmental Regulations and Technology Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge Control of Pathogens and Vector Attraction. Environ. Prot. 47, 498–504. doi:10.1016/S0015-1882(99)80035-4
- EPA 354.1, 1971. Determinación de nitritos por espectrofotometría. Environmental Protection Agency
- EPA 410.4, 1993. Determinación de Demanda Química de Oxígeno por colorimetría. Environmental Protection Agency
- Erkan, M., Sanin, F.D., 2013. Can sludge dewatering reactivate microorganisms in mesophilically digested anaerobic sludge? Case of belt filter versus centrifuge. Water Res. 47, 428–438. doi:10.1016/j.watres.2012.10.028
- Estrada, I.B., Aller, A., Aller, F., Gómez, X., Morán, A., 2004. The survival of *Escherichia coli*, faecal coliforms and enterobacteriaceae in general in soil treated with sludge from wastewater treatment plants. Bioresour. Technol. 93, 191–198. doi:10.1016/j.biortech.2003.10.022
- Europa 2020: La estrategia europea de crecimiento 2012. ISBN 978-92-79-23973-1. doi:10.2775/39991
- Fang, W., Wei, Y., Liu, J., Kosson, D.S., van der Sloot, H.A., Zhang, P., 2016. Effects of aerobic and anaerobic biological processes on leaching of heavy metals from soil amended with sewage sludge compost. Waste Manag. 58, 324–334. doi:10.1016/j.wasman.2016.07.036
- Fytli, D., Zabaniotou, A., 2008. Utilization of sewage sludge in EU application of old and new

- methods-A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 12, 116–140. doi:10.1016/j.rser.2006.05.014
- Gamazo, C., López-Goñi, I., Díaz, R., 2005. Manual práctico de microbiología. Ed. Masson Barcelona. ISBN 9788445815199
- Gantzer, C., Gaspard, P., Galvez, L., Huyard, A., Dumouthier, N., Schwartzbrod, J., 2001. Monitoring of bacterial and parasitological contamination during various treatment of sludge. *Water Res.* 35, 3763–3770. doi:10.1016/S0043-1354(01)00105-1
- García, J., Gómez, J., Huete, E., Echeverría, N., Lasheras, A.M., García-Heras, J.L., 2007. Advancing with ATAD. *Water Environ. Technol.* 19, 48–55.
- García, P., Lucena, J., Ruano, S., Nogales, M., 2009. Guía práctica de fertilización racional de los cultivos en España. Edita Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. ISBN 978-84-491-0997-3
- Gavala, H.N., Yenal, U., Skiadas, I. V., Westermann, P., Ahring, B.K., 2003. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of primary and secondary sludge. Effect of pre-treatment at elevated temperature. *Water Res.* 37, 4561–4572. doi:10.1016/S0043-1354(03)00401-9
- George, I., Crop, P., Servais, P., 2002. Fecal coliform removal in wastewater treatment plants studied by plate counts and enzymatic methods. *Water Res.* 36, 2607–2617. doi:10.1016/S0043-1354(01)00475-4
- Gesche, E., Vallejos, A., Saez, M., 2003. Efficiency of sulphite-reducing bacteria as sanitary indicator for water. *MPN-method. Arch. Med. Vet.* XXXV, 90–107.
- Golui, D., Datta, S.P., Rattan, R.K., Dwivedi, B.S., Meena, M.C., 2014. Predicting bioavailability of metals from sludge-amended soils. *Environ. Monit. Assess.* 186, 8541–8553. doi:10.1007/s10661-014-4023-z
- Gómez, P., Lozano, C., Benito, D., Estepa, V., Tenorio, C., Zarazaga, M., Torres, C., 2016. Characterization of staphylococci in urban wastewater treatment plants in Spain, with detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398. *Environ. Pollut.* 212, 71–76. doi:10.1016/j.envpol.2016.01.038
- Gondim-Porto, C., Platero, L., Nadal, I., Navarro-García, F., 2016. Fate of classical faecal bacterial markers and ampicillin-resistant bacteria in agricultural soils under Mediterranean climate after urban sludge amendment. *Sci. Total Environ.* 565, 200–210. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.04.160
- Gonzalez-Ubierna, S., Jorge-Mardomingo, I., Cruz, M., Valverde, I., Casermeiro, M., 2013. Sewage sludge application in Mediterranean agricultural soils: Effects of dose on the soil carbon cycle. *Int. J. Environ. Res.* 7, 945–956.
- Goñi, P., 2011. Bacterias y parásitos en las aguas residuales urbanas. Ormad, M.P., Calvo, B. (Eds.), *Gestión Y Tratamiento de Aguas Residuales*. Cátedra Mariano López Navarro. Universidad de Zaragoza, pp. 141–147. ISBN 978-84-938668-0-8
- Grotto, D., Batista, B.L., Souza, J.M.O., Carneiro, M.F.H., Dos Santos, D., Melo, W.J., Barbosa, F., 2015. Essential and nonessential element translocation in corn cultivated under sewage sludge application and associated health risk. *water. Air. Soil Pollut.* 226. doi:10.1007/s11270-015-2527-y

- Guideline Technical Document, 2006. Bacterial waterborne pathogens-current and emerging organisms of concern. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality. Federa-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water.
- Guzmán, C., Jofre, J., Montemayor, M., Lucena, F., 2007. Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2420–2429. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03487.x
- Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., Peterson, S.B., 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 15–25. doi:10.1038/nrmicro2259
- Higgins, M.J., Chen, Y.-C., Murthy, S.N., Hendrickson, D., Farrel, J., Schafer, P., 2007. Reactivation and growth of non-culturable indicator bacteria in anaerobically digested biosolids after centrifuge dewatering. *Water Res.* 41, 665–673. doi:10.1016/j.watres.2006.09.017
- Horswell, J., Ambrose, V., Clucas, L., Leckie, A., Clinton, P., Speir, T.W., 2007. Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. after application of sewage sludge to a *Pinus radiata* forest. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1321–1331. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03373.x
- Huete, E., 2007. Estudio comparativo de la digestión anaerobia mesófila y termófila de fangos urbanos y modelado matemático del sistema. Tesis doctoral. Universidad de Navarra.
- Ilyas, H., Masih, I., 2017. Intensification of constructed wetlands for land area reduction: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 12081–12091. doi:10.1007/s11356-017-8740-z
- ISO 16649-2:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* -- Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.
- ISO 7251:2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* - Most probable number technique.
- Joo, S.H., Monaco, F., Dello, Antmann, E., Chorath, P., 2015. Sustainable approaches for minimizing biosolids production and maximizing reuse options in sludge management: A review. *J. Environ. Manage.* 158, 133–145. doi:10.1016/j.jenvman.2015.05.014
- Kelessidis, A., Stasinakis, A.S., 2012. Comparative study of the methods used for treatment and final disposal of sewage sludge in European countries. *Waste Manag.* 32, 1186–1195. doi:10.1016/j.wasman.2012.01.012
- Kim, M., Ahn, Y.H., Speece, R.E., 2002. Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic. *Water Res.* 36, 4369–4385. doi:10.1016/S0043-1354(02)00147-1
- Koivunen, J., Siitonen, A., Heinonen-Tanski, H., 2003. Elimination of enteric bacteria in biological-chemical wastewater treatment and tertiary filtration units. *Water Res.* 37, 690–698. doi:10.1016/S0043-1354(02)00305-6
- Lalancette, C., Papineau, I., Payment, P., Dorner, S., Servais, P., Barbeau, B., Di Giovanni, G.D., Prévost, M., 2014. Changes in *Escherichia coli* to *Cryptosporidium* ratios for various fecal pollution sources and drinking water intakes. *Water Res.* 55, 150–61. doi:10.1016/j.watres.2014.01.050

- Lanao, M., 2012. Investigación de la inactivación de *Clostridium perfringens* y *Enterococcus* sp. en aguas mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Lang, N.L., Bellett-Travers, M.D., Smith, S.R., 2007. Field investigations on the survival of *Escherichia coli* and presence of other enteric micro-organisms in biosolids-amended agricultural soil. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1868–1882. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03489.x
- Lang, N.L., Smith, S.R., 2007. Influence of soil type, moisture content and biosolids application on the fate of *Escherichia coli* in agricultural soil under controlled laboratory conditions. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2122–2131. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03490.x
- Larraya, J.M., 2011. Los climas de Navarra: diversidad y localización. *Rev. Clasehistoria* 1–13. ISSN 1989-4988
- Lasheras, A.M., 2011. Criterios de estabilización e higienización de fangos de depuradora. Ormad, M.P., Calvo, B. (Eds.), *Gestión Y Tratamiento de Aguas Residuales*. pp. 197–204. ISBN 978-84-938668-0-8
- Levantesi, C., Beimfohr, C., Blanch, A.R., Carducci, A., Gianico, A., Lucena, F., Tomei, M.C., Mininni, G., 2015. Hygienization performances of innovative sludge treatment solutions to assure safe land spreading. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 7237–7247. doi:10.1007/s11356-014-3572-6
- Liu, H. tao, 2016. Achilles heel of environmental risk from recycling of sludge to soil as amendment: A summary in recent ten years (2007-2016). *Waste Manag.* 56, 575–583. doi:10.1016/j.wasman.2016.05.028
- Lloret, E., Pastor, L., Martínez-Medina, A., Blaya, J., Pascual, J.A., 2012. Evaluation of the removal of pathogens included in the Proposal for a European Directive on spreading of sludge on land during autothermal thermophilic aerobic digestion (ATAD). *Chem. Eng. J.* 198–199, 171–179. doi:10.1016/j.cej.2012.05.068
- López Bellido, L., Betrán Aso, J., Ramos Monreal, Á., López Córcoles, H., López Fuster, P., Bermejo Corrales, J.L., Urbano Terrón, P., Piñeiro Andión, J., Castro Insua, J., Blázquez Rodríguez, R., Ramos Mompó, C., Pomares García, F., Quiñones Oliver, A., Martínez Alcántara, B., Primo-Millo, E., Legaz Paredes, F., Espada Carbó, J.L., García-Escudero Domínguez, E., García García, C., Pérez Rodríguez, J., 2009. Guía práctica de la fertilización racional de los cultivos en España. Parte II: Abonado de los principales cultivos en España. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. ISBN 978-84-491-0997-3
- Lucas, F.S., Therial, C., Gonçalves, A., Servais, P., Rocher, V., Mouchel, J.-M., 2014. Variation of raw wastewater microbiological quality in dry and wet weather conditions. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 5318–28. doi:10.1007/s11356-013-2361-y
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D., 2009. *Brock: Biología de los microorganismos.*, 12^o. ed. Pearson Education. Madrid (España). ISBN 9788478290970
- Madoux-Humery, A.S., Dorner, S., Sauvé, S., Aboufadel, K., Galarneau, M., Servais, P., Prévost, M., 2013. Temporal variability of combined sewer overflow contaminants: Evaluation of wastewater micropollutants as tracers of fecal contamination. *Water Res.* 47, 4370–4382. doi:10.1016/j.watres.2013.04.030

- Mamindy-Pajany, Y., Sayen, S., Mosselmans, J.F.W., Guillon, E., 2014. Copper, Nickel and Zinc Speciation in a Biosolid-Amended Soil: pH Adsorption Edge, μ -XRF and μ -XANES Investigations. *Environ. Sci. Technol.* 48, 7237–7244. doi:10.1021/es5005522
- Manaia, C.M., Novo, A., Coelho, B., Nunes, O.C., 2010. Ciprofloxacin resistance in domestic wastewater treatment plants. *Water. Air. Soil Pollut.* 208, 335–343. doi:10.1007/s11270-009-0171-0
- Marín-Galvín, R., 2003. Físico-química y microbiología de los medios acuáticos: tratamiento y control de la calidad de las aguas. Díaz de Santos, S.A. Madrid (España). ISBN 9788479785901
- Marín, I., Goñi, P., Lasheras, A.M., Ormad, M.P., 2015. Efficiency of a Spanish wastewater treatment plant for removal potentially pathogens: Characterization of bacteria and protozoa along water and sludge treatment lines. *Ecol. Eng.* 74, 28–32. doi:10.1016/j.ecoleng.2014.09.027
- Maspolim, Y., Zhou, Y., Guo, C., Xiao, K., Ng, W.J., 2015. Comparison of single-stage and two-phase anaerobic sludge digestion systems - Performance and microbial community dynamics. *Chemosphere* 140, 54–62. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.07.028
- Matesanz, J.M., 2011. Línea de fangos de una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas. *Gestión de residuos*. Ormad, M.P., Calvo, B. (Eds.), *Gestión Y Tratamiento de Aguas Residuales*. pp. 183–188. ISBN 978-84-938668-0-8
- Metcalf & Eddy, 2002. *Ingeniería de las aguas residuales*, 3ª Edición. Ed. S.A. McGraw Hill/ Interamericana de España. ISBN 9788448115500
- Milieu Ltd, WRC, RPA, 2003. Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land. Final Report. Part I: Overview Report 1–20.
- Mininni, G., Blanch, A.R., Lucena, F., Berselli, S., 2014. EU policy on sewage sludge utilization and perspectives on new approaches of sludge management. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 7361–7374. doi:10.1007/s11356-014-3132-0
- Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario. *Boletín Oficial del Estado* 262, de 1 de noviembre de 1990
- Real Decreto 345/1993, de 5 de marzo, por el que se establecen las normas de calidad de las aguas y de la producción de moluscos y otros invertebrados marinos vivos. *Boletín Oficial del Estado* 74, de 27 de marzo de 1993
- Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. *Boletín Oficial del Estado* 45, de 21 de febrero de 2003.
- Real Decreto 1341/2007, de 11 de octubre, sobre la gestión de la calidad de las aguas de baño. *Boletín Oficial del Estado* 257, de 26 de octubre de 2007
- Orden AAA/1072/2013, de 7 de junio, sobre utilización de lodos de depuración en el sector agrario. *Boletín Oficial del Estado* 142, de 14 de junio de 2013
- Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, por el que se establecen los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad

- ambiental. Boletín Oficial del Estado 219, de 12 de septiembre de 2015
- Ministerio de Agricultura Pesca Alimentación y Medio Ambiente, 2017. Lodos de depuración de aguas residuales. <http://www.mapama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/prevencion-y-gestion-residuos/flujos/lodos-depuradora/>
- Resolución de 16 de noviembre de 2015, de la Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental y Medio Natural, por la que se publica el Acuerdo del Consejo de Ministros de 6 de noviembre de 2015, por el que se aprueba el Plan Estatal Marco de Gestión de Residuos (PEMAR) 2016-2022. Boletín Oficial del Estado 297, de 12 de diciembre de 2015
- Mohammed, R.L., Echeverry, A., Stinson, C.M., Green, M., Bonilla, T.D., Hartz, A., McCorquodale, D.S., Rogerson, A., Esiobu, N., 2012. Survival trends of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Clostridium perfringens* in a sandy South Florida beach. Mar. Pollut. Bull. 64, 1201–1209. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.03.010
- Mosteo, R., Ormad, M.P., Goñi, P., Rodríguez-Chueca, J., García, A., Clavel, A., 2013. Identification of pathogen bacteria and protozoa in treated urban wastewaters discharged in the Ebro River (Spain): Water reuse possibilities. Water Sci. Technol. 68, 575–583. doi:10.2166/wst.2013.201
- Moynihan, E.L., Richards, K.G., Brennan, F.P., Tyrrel, S.F., Ritz, K., 2015. Enteropathogen survival in soil from different land-uses is predominantly regulated by microbial community composition. Appl. Soil Ecol. 89, 76–84. doi:10.1016/j.apsoil.2015.01.011
- Naidoo, S., Olaniran, A.O., 2014. Treated wastewater effluent as a source of microbial pollution of surface water resources. Int. J. Environ. Res. Public Health 11, 249–270. doi:10.3390/ijerph110100249
- Nilsa, 2017. Navarra Infraestructuras Locales S.A. (NILSA) <http://www.nilsa.com/index.asp> (accessed 1.9.17).
- Ormad, M.P., 2011. Descripción general de plantas de tratamiento. Procesos y etapas de depuración en la línea de aguas de una EDAR. Ormad, M.P., Calvo, B. (Eds.), Gestión Y Tratamiento de Aguas Residuales. pp. 59–64. ISBN 978-84-938668-0-8
- Orruño, M., Garaizabal, I., Bravo, Z., Parada, C., Barcina, I., Arana, I., 2014. Mechanisms involved in *Escherichia coli* and *Serratia marcescens* removal during activated sludge wastewater treatment. Microbiologyopen 3, 657–667. doi:10.1002/mbo3.196
- Orzi, V., Scaglia, B., Lonati, S., Riva, C., Boccasile, G., Alborali, G.L., Adani, F., 2015. The role of biological processes in reducing both odor impact and pathogen content during mesophilic anaerobic digestion. Sci. Total Environ. 526, 116–126. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.04.038
- Ottoson, J.R., Schnürer, A., Vinnerås, B., 2008. In situ ammonia production as a sanitation agent during anaerobic digestion at mesophilic temperature. Lett. Appl. Microbiol. 46, 325–330. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02317.x
- Quattara, N.K., Garcia-Armisen, T., Anzil, A., Brion, N., Servais, P., 2014. Impact of wastewater release on the faecal contamination of a small urban river: The Zenne river in Brussels (Belgium). Water, Air, Soil Pollut. 225, 2043. doi:10.1007/s11270-014-2043-5
- Pandey, P.K., Soupir, M.L., 2011. *Escherichia coli* inactivation kinetics in anaerobic digestion of dairy manure under moderate, mesophilic and thermophilic temperatures. AMB Express

1, 18. doi:10.1186/2191-0855-1-18

- Pascual-Benito, M., García-Aljaro, C., Casanovas-Massana, S., Blanch, A.R., Lucena, F., 2014. Effect of hygienization treatment on the recovery and/or regrowth of microbial indicators in sewage sludge. *J. Appl. Microbiol.* 118, 412–418. doi:10.1111/jam.12708
- Picazo, J.J., Prieto Prieto, J., 2016. *Compendio de Microbiología*. Ed. Elsevier. ISBN 9788490229217
- Piterina, A. V., Bartlett, J., Pembroke, T.J., 2010. Evaluation of the removal of indicator bacteria from domestic sludge processed by autothermal thermophilic aerobic digestion (ATAD). *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7, 3422–3441. doi:10.3390/ijerph7093422
- Plan de residuos de Navarra 2017-2027. Boletín Oficial de Navarra 170, de 2 de diciembre de 2016
- Popat, S.C., Yates, M. V., Deshusses, M.A., 2010. Kinetics of inactivation of indicator pathogens during thermophilic anaerobic digestion. *Water Res.* 44, 5965–5972. doi:10.1016/j.watres.2010.07.045
- Pourcher, A.M., Françoise, P.B., Virginie, F., Agnieszka, G., Vasilica, S., Gérard, M., 2007. Survival of faecal indicators and enteroviruses in soil after land-spreading of municipal sewage sludge. *Appl. Soil Ecol.* 35, 473–479. doi:10.1016/j.apsoil.2006.10.005
- Qiu, Y., Lee, B.E., Neumann, N., Ashbolt, N., Craik, S., Maal-Bared, R., Pang, X.L., 2015. Assessment of human virus removal during municipal wastewater treatment in Edmonton, Canada. *J. Appl. Microbiol.* 119, 1729–1739. doi:10.1111/jam.12971
- Qureshi, S., Richards, B.K., Hay, A.G., Tsai, C.C., McBride, M.B., Baveye, P., Steenhuis, T.S., 2003. Effect of microbial activity on trace element release from sewage sludge. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3361–6. doi:10.1021/es020970h
- Rajagopal, R., Massé, D.I., Singh, G., 2013. A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. *Bioresour. Technol.* 143, 632–641. doi:10.1016/j.biortech.2013.06.030
- Reinoso, R., Torres, L.A., Bécares, E., 2008. Efficiency of natural systems for removal of bacteria and pathogenic parasites from wastewater. *Sci. Total Environ.* 395, 80–86. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.02.039
- Rodríguez-Chueca, J., 2013. *Aplicación de Procesos Fenton y pseudo-Fenton en la regeneración de aguas residuales urbanas*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Romero, R., Zúnica, L.R., 2005. *Métodos estadísticos en ingeniería*. Universidad Pública de Valencia. ISBN 84-9705-727-9
- Sahlström, L., 2003. A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresour. Technol.* 87, 161–166. doi:10.1016/S0960-8524(02)00168-2
- Sahlström, L., Aspan, A., Bagge, E., Danielsson-Tham, M.L., Albiñ, A., 2004. Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. *Water Res.* 38, 1989–1994. doi:10.1016/j.watres.2004.01.031
- Sahlström, L., Bagge, E., Emmoth, E., Holmqvist, A., Danielsson-Tham, M.L., Albiñ, A., 2008. A laboratory study of survival of selected microorganisms after heat treatment of biowaste

- used in biogas plants. *Bioresour. Technol.* 99, 7859–7865. doi:10.1016/j.biortech.2007.09.071
- Salas, J.J., Pidre, J.R., Sánchez, L., 2007a. Manual de tecnologías no convencionales para la depuración de aguas residuales: Humedales artificiales. ISBN 78-84-611-6882-8
- Salas, J.J., Pidre, J.R., Sardón, N., 2007b. Manual de tecnologías no convencionales para la depuración de aguas residuales: lagunaje. ISBN 78-84-611-6882-8
- Salsali, H., Parker, W.J., Sattar, S.A., 2008. The effect of volatile fatty acids on the inactivation of *Clostridium perfringens* in anaerobic digestion. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 659–665. doi:10.1007/s11274-007-9514-4
- Scaglia, B., D'Imporzano, G., Garuti, G., Negri, M., Adani, F., 2014. Sanitation ability of anaerobic digestion performed at different temperature on sewage sludge. *Sci. Total Environ.* 466–467, 888–897. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.07.114
- Schwarz, K.R., Sidhu, J.P.S., Pritchard, D.L., Li, Y., Toze, S., 2014. Decay of enteric microorganisms in biosolids-amended soil under wheat (*Triticum aestivum*) cultivation. *Water Res.* 59, 185–197. doi:10.1016/j.watres.2014.03.037
- Sidhu, J.P.S., Toze, S.G., 2009. Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review. *Environ. Int.* 35, 187–201. doi:10.1016/j.envint.2008.07.006
- Sinclair, A., Hebb, D., Jamieson, R., Gordon, R., Benedict, K., Fuller, K., Stratton, G.W., Madani, A., 2009. Growing season surface water loading of fecal indicator organisms within a rural watershed. *Water Res.* 43, 1199–1206. doi:10.1016/j.watres.2008.12.006
- Smith, J.E., Miller, P.D., Jakubowsky, W., Goldstein, N., Rynk, R., 2005. Infectious disease agents in sewage sludge and manure. The JG Press, Inc. Record ID 131079
- Smith, S.R., Lang, N.L., Cheung, K.H.M., Spanoudaki, K., 2005. Factors controlling pathogen destruction during anaerobic digestion of biowastes. *Waste Manag.* 25, 417–425. doi:10.1016/j.wasman.2005.02.010
- Sobrados, L., Gómez, J., Lasheras, A., García-Ganuza, J., 2010. Criterios para aplicación de fangos de depuradora en suelos: estabilidad e higienización. Ed. Centro de Publicaciones CEDEX. ISBN 978-84-7790-517-2
- Song, Y.C., Kwon, S.J., Woo, J.H., 2004. Mesophilic and thermophilic temperature co-phase anaerobic digestion compared with single-stage mesophilic- and thermophilic digestion of sewage sludge. *Water Res.* 38, 1653–1662. doi:10.1016/j.watres.2003.12.019
- Soriano-Disla, J.M., Gómez, I., Navarro-Pedreño, J., Jordán, M.M., 2014. The transfer of heavy metals to barley plants from soils amended with sewage sludge with different heavy metal burdens. *J. Soils Sediments* 14, 687–696. doi:10.1007/s11368-013-0773-4
- Suksabye, P., Pimthong, A., Dhurakit, P., Mekvichitsaeng, P., Thiravetyan, P., 2016. Effect of biochars and microorganisms on cadmium accumulation in rice grains grown in Cd-contaminated soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 962–973. doi:10.1007/s11356-015-4590-8
- Szylak-Szylowski, M., Kulig, A., Miaskiewicz-Pesca, E., 2016. Seasonal changes in the concentrations of airborne bacteria emitted from a large wastewater treatment plant. *Int. Biodeterior.* 115, 11–16.

- Tervahauta, T., Rani, S., Hernández Leal, L., Buisman, C.J.N., Zeeman, G., 2014. Black water sludge reuse in agriculture: Are heavy metals a problem? *J. Hazard. Mater.* 274, 229–236. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.04.018
- Tomei, M.C., Carozza, N.A., 2015. Erratum to Sequential anaerobic/aerobic digestion for enhanced sludge stabilization: comparison of the process performance for mixed and waste sludge. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 7280. doi:10.1007/s11356-014-3948-7
- Torri, S.I., Corrêa, R.S., Renella, G., 2017. Biosolid Application to Agricultural Land—a Contribution to Global Phosphorus Recycle: A Review. *Pedosphere* 27, 1–16. doi:10.1016/S1002-0160(15)60106-0
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L., 2007. Introducción a la microbiología, 9ª Edición. ed. Editorial Médica Panamericana. ISBN 9789500607407
- Tyagi, V.K., Sahoo, B.K., Khursheed, A., Kazmi, A.A., Ahmad, Z., Chopra, A.K., 2011. Fate of coliforms and pathogenic parasite in four full-scale sewage treatment systems in India. *Environ. Monit. Assess.* 181, 123–135. doi:10.1007/s10661-010-1818-4
- UNE EN 27888:1994 Calidad del agua. Determinación de la conductividad eléctrica. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR)
- UNE-EN ISO 6888-1:2000. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species)
- UNE-EN ISO 7027:2001 Calidad del agua. Determinación de la turbiedad
- UNE EN ISO 7899-2:2001. Water quality. Detection and enumeration of intestinal enterococci
- UNE EN ISO 16266:2008. Water quality. Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*
- UNE EN ISO 5667-13:2011 Calidad del agua. Muestreo Parte 13: Guía para el muestreo de lodos 13–15
- UN-EN ISO 5667-3:2013 Water quality. Sampling. Part 3: Preservation and handling of water samples
- UNE EN ISO 16649-1:2013. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para la enumeración de *Escherichia coli* beta-glucuronidasa positivo Parte 1: Técnica de recuento de colonias a 44 °C utilizando membranas y 5-bromo-4.
- UNE EN ISO 9308-1:2014 Calidad del agua. Recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes. Parte 1: Método de filtración por membrana para aguas con bajo contenido de microbiota
- UNE EN ISO 16649-3:2015. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la enumeración de *Escherichia coli* beta-glucuronidasa positiva. Parte 3: Técnica del número más probable utilizando 5-bromo- 4-cloro-3-indol beta-D-glucoronato
- Veses, O., Mostero, R., Ormad, M.P., Ovelleiro, J.L., 2013. Potential toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in sediments from the Ebro River Basin in Spain. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 90, 136–142.
- Vieira, R.F., Pazianotto, R.A.A., 2016. Microbial activities in soil cultivated with corn and

- amended with sewage sludge. Springerplus 5, 1844. doi:10.1186/s40064-016-3502-9
- World Health Organization, 2011. WHO guidelines for drinking-water quality. Fourth Edition. WHO Chron. doi:10.1016/S1462-0758(00)00006-6
- World Health Organization, 2008. WHO guidelines for drinking-water quality. Third Edition. WHO Chron. doi:10.1016/S1462-0758(00)00006-6
- Xu, C., Wang, D., Huber, A., Weese, S.J., Warriner, K., 2016. Persistence of *Clostridium difficile* in wastewater treatment-derived biosolids during land application or windrow composting. J. Appl. Microbiol. 120, 312–320. doi:10.1111/jam.13018
- Zaleski, K.J., Josephson, K.L., Gerba, C.P., Pepper, I.L., 2005. Potential regrowth and recolonization of Salmonellae and indicators in biosolids and biosolid-amended soil. Appl. Environ. Microbiol. 71, 3701–3708. doi:10.1128/AEM.71.7.3701

ANEXO I.

Protocolo de trabajo en el laboratorio de **microbiología**

En el presente documento se muestra el protocolo de trabajo en un laboratorio de microbiología con el objetivo de favorecer las condiciones de trabajo en el mismo

Acceso al laboratorio:

El acceso al laboratorio queda restringido al personal autorizado.

Higiene en el laboratorio:

1. En el laboratorio de microbiología queda totalmente prohibido comer, beber y fumar, así como el almacenamiento de comida y bebida. Además, hay que evitar llevarse a la boca objetos (bolígrafos, lapiceros, etc.), así como tocarse ojos y nariz
2. El uso de bata, guantes y gafas de seguridad queda bajo la responsabilidad de cada uno de los miembros del personal. Sin embargo, se debe poner especial cuidado en evitar el contacto de la piel con material potencialmente infeccioso. Por lo tanto, se recomienda el uso de guantes cuando se manipulen muestras o cultivos que contengan posibles patógenos. No se abandonará la zona de trabajo con los guantes puestos, ni se tocará el teléfono, ordenador, material de oficina, etc. Además se recomienda el uso de guantes cuando se vaya a utilizar material estéril. Las condiciones de limpieza en el laboratorio de microbiología tienen que ser exigentes con el fin de evitar una posible contaminación tanto de las personas como del material de trabajo.
3. Las mesas de escritorio no son mesas de laboratorio, por lo que se evitará el uso de material contaminante sobre las mismas.

Esterilización del material:

1. El material de vidrio (botellas, vasos de precipitado, erlenmeyers, tubos de ensayo, etc.) previamente lavados se someterá a un proceso de esterilización en el autoclave previo a su posterior uso en el trabajo en el laboratorio.
2. El material de vidrio se recubrirá con papel de aluminio con el objetivo de que no entre agua en el interior durante el proceso de autoclavado.
3. Los miembros del laboratorio tienen que comprobar que hay material disponible para que el resto del grupo pueda seguir su experimentación. Así será fundamental que todos nos encarguemos de rellenar las cajas de puntas, los botes de spreaders, de eppendorf, etc cuando se observe que estos se acaban.
4. Con el objetivo de que los miembros del laboratorio sepan si el material está estéril o no, todo el material se etiquetará con cinta adhesiva de autoclave. En dicha cinta aparecen unas líneas negras una vez que el proceso de esterilización ha terminado. Todo material que no tenga dicha etiqueta será considerado como NO ESTÉRIL y por tanto podrá retirarse.
5. El material de trabajo usado que haya estado en contacto con microorganismos patógenos debe ser sometido a un proceso de autoclavado y a un posterior lavado con agua, y jabón. Así cada uno debe ser responsable del material que usa y encargarse de dejarlo limpio en el mismo día para que el resto de miembros del laboratorio puedan utilizarlo en caso de necesidad. En el caso de que no pueda ser autoclavado el mismo día, este material se depositará en la zona destinada para material pendiente de esterilización.

6. Todo el material desechable que haya sido usado y haya estado en contacto con microorganismos (puntas, placas Petri, spreaders, etc.) se depositará en las bolsas especiales de autoclave. Cuando un miembro del laboratorio observe que una de estas bolsas se encuentra llena, deberá meterla en el autoclave intentando evitar la acumulación de residuos microbiológicos en el laboratorio. Una vez el proceso de esterilización ha concluido la basura se puede depositar en el cubo de residuos habitual.
7. El vidrio roto se depositará en el recipiente adecuado habiendo sometido a un proceso de autoclavado previo si este ha estado en contacto con gérmenes patógenos.
8. Queda terminantemente prohibido mezclar el material esterilizado con el material usado, así de este modo una punta de pipeta usada no puede ser devuelta a su caja o no se pueden mezclar tubos eppendorf usados con los esterilizados en el mismo bote.
9. El material utilizado sólo podrá abrirse cerca de un mechero Bunsen o en el interior de la campana de flujo laminar con el fin de evitar la contaminación del mismo. En caso de que no haya sido así, deberá volver a someterse a un proceso de esterilización.
10. La mesa de trabajo del laboratorio deberá limpiarse exhaustivamente con alcohol una vez se termine de trabajar de esta forma evitaremos expandir los gérmenes.

Frigorífico

El tamaño del frigorífico del laboratorio es limitado y por lo tanto hay que tratar de guardar lo necesario el tiempo necesario. De este modo trataremos de seguir estas pautas:

1. Las muestras que entren en el frigorífico deben estar perfectamente etiquetadas. Una vez analizadas se mantendrán en la nevera por un tiempo nunca superior a una semana excepto en aquellos casos en los que se requiera durante más tiempo. De este modo todas aquellas muestras que se consideren llevan demasiado tiempo en el frigorífico podrán ser retiradas.
2. En aquellos casos en los que sea necesario congelar una muestra, esta se guardará en el arcón congelador y nunca en el congelador del frigorífico.
3. El congelador del frigorífico se reserva única y exclusivamente para la conservación de cepas bacterianas, reactivos y hielo.
4. Las muestras que ya hayan sido analizadas deberán ser sometidas a autoclavado antes de verterlas al fregadero o al cubo de la basura.
5. El almacenaje de placas Petri con medio de cultivo en el frigorífico se realizará en cajas o en las bolsas en las que se embalan las propias placas. Las placas deberán ser etiquetadas con el objetivo de poder identificar en cada momento y por cualquier miembro del laboratorio de qué medio de cultivo se trata.
6. Se intentará que las placas no permanezcan más de 15 días en la nevera sin ser utilizadas puesto que estas tienden a degradarse y a contaminarse.
7. Queda totalmente prohibido mezclar en el mismo envase placas utilizadas con placas sin utilizar, de este modo evitaremos la contaminación de las placas nuevas.
8. Las placas de cultivo joven y puro de una bacteria deberán cerrarse con parafilm y deberán estar perfectamente etiquetada con el nombre de la bacteria y la fecha de siembra.

9. Se establecerá una clasificación de baldas en el frigorífico, depositándose el material más contaminante en la parte baja del mismo, y el material limpio y estéril en la parte superior. De este modo evitaremos que posibles goteos o derrames contaminen el material estéril.
10. Se podrán guardar en el frigorífico placas sembradas que queden pendiente de conteos o cualquier otra acción, pero su tiempo de permanencia en el frigorífico no será superior a 3 – 4 días.
11. Todos los miembros del laboratorio deberán encargarse de mantener limpio y ordenado el frigorífico con el objetivo de que todos tengamos espacio suficiente para poder usarlo.

Autoclave:

El autoclave es una pieza fundamental en el laboratorio de microbiología puesto que es el encargado de esterilizar todo el material, por lo tanto es necesario seguir una serie de pautas para utilizarlo de forma correcta.

1. Antes de encender el autoclave hay que cerciorarse de que el nivel de agua destilada en su interior supera la rejilla del fondo del mismo. El agua destilada recubre la resistencia del autoclave. En el caso de que el autoclave se quedase sin agua, la resistencia se rompe lo que supone un importante trastorno para el laboratorio tanto a nivel económico como a nivel laboral.
2. El agua del autoclave se sustituirá una vez cada 3 meses para ello simplemente hay que abrir la válvula de drenaje hasta que este se vacía. Una vez vacío se rellena de nuevo con agua destilada arrastrando previamente la suciedad que acumula el fondo del equipo.
3. Intentaremos no ser egoístas y si observamos que hay material acumulado para autoclavar lo autoclavamos aunque no sea nuestro.
4. Las bolsas de basura se introducirán en un cubo y éste en el autoclave. De este modo si la bolsa se rompe, la basura no se esparcirá por el autoclave.
5. Intentaremos no mezclar basura con material que queremos esterilizar para utilizar en el laboratorio. En el caso de que la mezclamos, la basura la depositaremos en el fondo del autoclave y encima el material limpio así evitaremos que un posible desprendimiento de la basura ensucie el material limpio.
6. No dejaremos el autoclave en funcionamiento durante toda la noche pues es peligroso.

Material

1. Todos los miembros del laboratorio son responsables de comunicar al resto que en el caso de que cierto material esté a cerca de terminarse. De este modo se evitará quedarse sin material.
2. Los pedidos los gestionará la persona asignada por la profesora Ormad a excepción del las bombonas de camping gas. Cualquiera de los miembros del laboratorio puede encargarse de su reposición.

ANEXO II.

Composición de los medios de cultivo

Medios para el análisis de coliformes totales y *Escherichia coli*

Chromogenic Coliform Agar (CCA)

Tabla AII.1: Composición de agar CCA

COMPUESTO	g/l
Peptona	3.00
Cloruro sódico	5.00
Fosfato monosódico	2.20
Fosfato disódico	2.70
Triptófano	1.00
Pinuvato sódico	1.00
Tergitol® 7	0.15
Sorbitol	1.00
Salmon®-Gal	0.20
X-Glucurónido	0.20
Agar	13.00

pH final a 25°C, 6.8 ±0.2

Agar Glucuronico triptona y bilis (TBX)

Tabla AII.2: Composición de agar TBX

COMPUESTO	g/l
Triptona	20.000
Sales biliares N°3	1.500
X-b-D-glucurónido	0.075
Agar	15.000

pH final a 25°C, 7.2 ±0,2

Agar Maconkey

Tabla AII.3: Composición de agar Maconkey

COMPUESTO	g/l
Digerido pancreático de gelatina	17.000
Peptona de carne	1.50
Peptona de caseína	1.50
Lactosa monohidratado	10.000
Sales biliares	1.500
Cloruro sódico	5.000
Rojo neutro	0.030
Cristal violeta	0.001
Agar	15.000

pH final a 25°C, 7.1 ±0,2

Caldo lauril tryptona

Tabla AII.4: Composición de caldo lauril tryptona

COMPUESTO	g/l
Triptosa	20.00
Sodio laurilsulfato	0.10
Lactosa	5.00
Fosfato di-potásico	2.75
Fosfato monopotásico	2.75
Sodio cloruro	5.00

pH final a 25°C, 6.8±0,2

Caldo EC

Tabla AII.5: Composición de caldo EC

COMPUESTO	g/l
Peptona	20.0
Sales biliares N°3	1.5
Lactosa	5.0
Fosfato dipotásico	4.0
Fosfato monopotásico	1.5
Cloruro sódico	5.0

pH final a 25°C, 6.9±0.2

Agua tryptona + test Indol

Tabla AII.6: Composición de agua de tryptona

COMPUESTO	g/l
Triptona	10.0
L-Triptófano	1.0
Cloruro sódico	5.0

pH: 7,2 ± 0,2 a 25°C

Aditivo: 5 gotas de reactivo de Kovacs

Caldo glutamato

Tabla AII.7: Composición de caldo glutamato

COMPUESTO	g/l
Lactosa	20.000
Fosfato dipotásico	1.800
Formiato sódico	0.500
Sulfato magnésico	0.200
L-Cistina	0.040
L(+)-Arginina	0.040
L(-)-Acido aspártico	0.048
Citrato férrico amónico	0.020
Cloruro cálcico	0.020
Púrpura de bromocresol	0.020
Tiamina	0.002
Ácido nicotínico	0.002
Ácido pantotérico	0.002

pH final a 25°C, 6.7±0.1

Medio para el análisis de *Staphylococcus aureus*

Agar Mannitol

Tabla AII.8: Composición de agar Mannitol

COMPUESTO	g/l
Extracto de carne	1.000
Digerido pancreático de caseína	5.000
Peptona de carne	5.000
Cloruro sódico	75.000
D-Manitol	10.000
Rojo fenol	0.025
Agar	15.000

pH final a 25°C, 7.4±0,2

Medio para el análisis de *Enterococcus* sp.

Agar Slanetz&Bartley

Tabla AII.9: Composición de agar Slanetz&Bartley

COMPUESTO	g/l
Triptosa	20.00
Extracto de levadura	5.00
Dextrosa	2.00
Fosfato potásico	4.00
Azida sódica	0.40
Agar	12.00

pH final a 25°C, 7.0±0,2

Aditivo: Solución TTC al 1%. 10ml/l.

Caldo Rothe Azida

Tabla AII.10: Composición de caldo Rothe Azida

COMPUESTO	g/l
Peptona de carne	10.0
Peptona de caseína	10.0
Dextrosa	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato dipotásico	2.7
Fosfato monopotásico	2.7
Azida sódica	0.2

pH final a 25°C, 7.0±0.2