

TÍTULO DEL TRABAJO

“Eliminación de microorganismos y dinámica del biofilm en humedales construidos de flujo subsuperficial”

TÍTULO RESUMIDO

“Eliminación microorganismos en humedales construidos”

NOMBRE DE AUTORES

Jordi Morató^{1*}, Inmaculada Salcedo¹, Francesc Codony¹, Sandra Delgado¹, Joan García², Josep M. Bayona³.

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LAS INSTITUCIONES

¹Lab. Microbiología Sanitaria y Medioambiental. Universitat Politècnica de Catalunya, EUOOT-Edifici TR8, C/Violinista Vellsolà, 37, Terrassa-08222. Barcelona.

²Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Dept. de Ingeniería Hidráulica, Marítima y Ambiental, Universidad Politécnica de Catalunya, Barcelona.

³Departamento de Química Ambiental, CID-CSIC, Barcelona

NÚMERO DE TELÉFONO, FAX Y E-MAIL

Telf.: 34 93 7398328; Fax.: 34 93 7398301; E-mail: morato@oo.upc.edu

FIGURAS Y TABLAS

1 Figura y 2 tablas

ELIMINACIÓN DE MICROORGANISMOS Y DINÁMICA DEL BIOFILM EN HUMEDALES CONSTRUIDOS DE FLUJO SUBSUPERFICIAL

Jordi Morató^{1*}, Inmaculada Salcedo^{1,2}, Francesc Codony¹, Sandra Delgado¹, Joan García², Josep M. Bayona³.

¹Lab. Microbiología Sanitaria y Medioambiental. Universitat Politècnica de Catalunya.

²Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Dept. de Ingeniería Hidráulica, Marítima y Ambiental, Universidad Politécnica de Catalunya, Barcelona

³Departamento de Química Ambiental, CID-CSIC, Barcelona

RESUMEN

Se ha analizado la influencia de los diferentes factores ambientales y del diseño en la eliminación de los indicadores microbianos, en humedales construidos de flujo subsuperficial utilizados para el tratamiento de aguas residuales. Los humedales de FSS someros, con una profundidad de la lámina de agua promedio de 0.27 m. han mostrado una mayor eficiencia en la eliminación de la mayoría de indicadores bacterianos entéricos del agua efluente, como *E. coli*, enterococos fecales, esporas de clostridios y *Pseudomonas*, comparando con los humedales profundos (0.5 m. prof.). Esta mayor eficiencia se relaciona con las condiciones de oxidación, mayores en los humedales someros. Al mismo tiempo, los humedales construidos también presentan un claro efecto disminuyendo la presencia de los indicadores microbianos adheridos (en el biofilm) a las gravas y las raíces de los macrófitos, a lo largo del humedal, en el área cerca de la salida. Los humedales de FSS someros también se han mostrado más eficaces para eliminar la mayoría de los indicadores bacterianos entéricos de los biofilms de las gravas y de las raíces (como *Escherichia coli*, enterococos fecales y esporas de clostridios), que los humedales profundos.

PALABRAS CLAVE: Humedales construidos, Diseño, Flujo subsuperficial, eliminación de microorganismos, indicadores, aspectos sanitarios.

MICROBIAL REMOVAL AND BIOFILM DYNAMICS IN SUBSURFACE CONSTRUCTED WETLANDS.

ABSTRACT

The influence of different environmental and key design factors on the removal of bacterial indicators in horizontal subsurface flow constructed wetlands (SSFs) treating urban wastewater was studied. Shallow SSFs with an average water depth of 0.27 m were more effective for the removal of enteric indicators from the water, such as planktonic *Escherichia coli*, total coliforms, fecal enterococci, spores of clostridia and *Pseudomonas*, than deep SSFs with an average water depth of 0.50 m. The higher efficiency of shallow SSFs was related to their more oxidised conditions. At the same time, constructed wetlands have a clear effect decreasing the microbial indicators attached to the gravel and macrophytes roots, along the wetland length, at the area near the outlet. Shallow SSFs were also more effective for the removal of most bacterial enteric indicators from the biofilms (such as *Escherichia coli*, fecal enterococci, spores of clostridia), than deep SSFs.

KEYWORDS

Constructed wetlands; design; subsurface flow; microbial removal, indicators, sanitary aspects.

1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de reacciones bioquímicas que transforman los contaminantes se producen en las interfases sólido-líquido presentes en el agua, el medio granular y la rizosfera y, especialmente, a nivel del biofilm. Por otra parte, el conjunto de procesos abióticos (físicos/químicos) o bióticos (microbianos/fitológicos) que tienen lugar en un humedal construido, provocan una reducción del número de microorganismos patógenos, por lo que los humedales construidos se constituyen en sistemas con una muy buena eficiencia para eliminar microorganismos perjudiciales para la salud pública, mejorando la calidad sanitaria de los efluentes tratados.

Los patógenos microbianos, entre los que se incluyen a los helmintos, protozoarios, hongos, bacterias y virus, son de gran importancia en la valoración de la calidad del agua y el riesgo que suponen para la salud pública. Teniendo en cuenta que los exámenes rutinarios de

organismos patógenos presentes en el agua de los humedales no son recomendables, debido al costo y al bajo número de patógenos específicos presente en cualquier momento, de forma tradicional se ha utilizado a los organismos indicadores para sugerir la presencia de patógenos. De todos modos, hoy en día, está claro que no hay una correlación directa entre el número de cualquier indicador y los patógenos entéricos (Grabow, 1996). De hecho, varios miembros del grupo coliformes totales y algunos de los denominados coliformes fecales (*Klebsiella*, *Enterobacter*) no son específicos de contaminación fecal. Por tanto, en algunos casos los organismos indicadores e incluso algunos patógenos oportunistas se pueden encontrar de forma natural en el humedal.

Aunque el indicador más utilizado son los coliformes fecales, también se ha estudiado el comportamiento en humedales construidos de otros grupos microbianos, como los estreptococos fecales, *Salmonella*, *Yersinia*, *Pseudomonas* y *Clostridium* (Herskowitz, 1986). Todos estos grupos microbianos entéricos humanos, junto con los virus, decrecen a su paso por los humedales de flujo subsuperficial (Gersberg *et al.*, 1989).

En este trabajo, se analizan los principales factores del diseño del humedal y su posible influencia en la eliminación de los microorganismos indicadores de la calidad del agua. El trabajo se ha complementado con un seguimiento simultáneo de los microorganismos presentes en el agua y en el biofilm del medio granular y de la rizosfera.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Planta piloto de flujo subsuperficial. Se ha realizado un estudio de eliminación de microorganismos indicadores en una planta piloto de flujo subsuperficial (SSF). Dicha planta trata parte de las aguas residuales urbanas generadas por la urbanización de Can Suquet, en el municipio de Les Franqueses del Vallès (Barcelona, Catalunya). Después de una clarificación primaria, el agua residual es dividida por igual y conducida a ocho humedales paralelos, con un área de 54-56 m² cada uno. El tamaño del medio granular entre cada pareja es variable. De este modo, el tipo 1 de cada una de las parejas de lechos contiene grava granítica gruesa ($D_{60}=10$ mm, $C_u=1.6$), mientras que el tipo 2 contiene grava granítica fina ($D_{60}=3.5$ mm, $C_u=1.7$). Finalmente, los humedales de tipo A, B, y C presentan una profundidad media de agua de 0.50 m., mientras que los D de 0.27 m. El sistema empezó a operar en marzo del 2001, cuando los SSFs fueron plantados con *Phragmites australis*.

2.2. Análisis microbiológicos. Para poder evaluar la eficiencia de eliminación de los indicadores microbiológicos se ha realizado un muestreo mensual en los humedales de los tipos C y D (desde enero del 2003 hasta la actualidad). A partir de las muestras del afluente y del efluente, se realiza un recuento del número de bacterias heterótrofas (HPC), como indicador de proceso, usando el método por inclusión con agar PCA (Merck), incubando las placas durante 72 horas a 22°C. La presencia de otros indicadores como los coliformes totales (TC), *Escherichia coli*, enterococos fecales (FE), esporas de *Clostridium perfringens* y otros grupos microbiológicos como *Pseudomonas* y *Aeromonas* se evaluó mediante filtración de membrana e incubación en medios selectivos, de acuerdo a métodos estandarizados (APHA, 1995). En los humedales de tipo C y D también se realizó una evaluación de la biomasa microbiana adherida al medio granular, mediante muestreadores de biofilm de malla de acero inoxidable 316, que contienen el medio granular característico en cada lecho, distribuidos uno en la parte más cercana a la entrada del afluente, mientras que el segundo está situado más cerca de la salida (efluentes).

3. RESULTADOS

En la Figura 1 se muestran los recuentos obtenidos para los diferentes grupos microbianos determinados en el afluente y los efluentes de los humedales de tipo C y D, mostrando los valores separados para el periodo estival y el periodo invernal. Los humedales de flujo subsuperficial son sistemas que presentan una buena eficiencia de eliminación de microorganismos: 1.5-5 log de reducción para bacterias aerobias, 1.2-2 log para las coliformes totales y de 1 a 2 unidades logarítmicas para los indicadores de contaminación fecal como *Escherichia coli*, enterococos fecales y esporas de Clostridios.

La Tabla 1 muestra el análisis de la varianza para comparar el efecto de los principales factores ambientales y del diseño del humedal y su influencia sobre la eliminación de los principales grupos de indicadores microbianos del agua. Tal como se observa, los **humedales someros (D), con grava fina (2) y durante el periodo estival producen los rendimientos más elevados de eliminación en el agua en la mayoría de indicadores microbianos**, exceptuando el recuento de bacterias aerobias (PCA, 22°C).

La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos del análisis de la varianza para comparar el efecto de los principales factores ambientales y del diseño del humedal sobre la eliminación de los microorganismos del biofilm. En este caso, además de los factores estudiados para el agua, se ha añadido el factor entrada-salida, para diferenciar entre los reactores para muestrear biofilm situados en el lecho del humedal cerca de la entrada y los que se dispusieron cerca de la salida. También se ha estudiado el efecto de muestrear el biofilm en la parte superficial del reactor o en la parte más profunda. En todos los casos se ha observado una disminución de los recuentos microbianos en el biofilm de los reactores situados cerca de la salida, que ha sido significativa en 5 de los 6 indicadores estudiados. Por otra parte, se ha observado que la presencia de coliformes totales ($p=0.826$), *Escherichia coli* ($p=0.505$) y enterococos fecales ($p=0.074$) en el biofilm del humedal, disminuye en las muestras obtenidas de la parte superficial del reactor, aunque de forma no significativa. En el caso de las esporas de clostridios, en la parte superficial del reactor, los recuentos son similares tanto en la entrada como en la salida, mientras que a pesar que se han observado recuentos superiores a los anteriores en la parte profunda de los reactores situados cerca de la entrada, los recuentos son prácticamente nulos en la parte profunda de los reactores situados cerca de la salida.

Respecto al tipo de humedal, el comportamiento ha sido similar para los microorganismos del biofilm y del agua, con la única excepción de los coliformes totales. Por tanto, **los humedales someros (D) han sido más eficientes en la eliminación de los indicadores de contaminación fecal del biofilm**, aunque solo de forma significativa en *Escherichia coli* ($p=0.009$). En cambio, los humedales profundos disminuyen de forma no significativa los recuentos de coliformes totales ($p=0.088$), y de manera significativa en los aerobios teniendo en cuenta la interacción presente con la granulometría ($p=0.036$). Los recuentos de todos los grupos microbianos presentes en el biofilm han disminuido en los humedales con un medio de granulometría fina (2), y en todos los casos ha sido significativa, exceptuando en las esporas de Clostridios ($p=0.278$).

4. DISCUSIÓN

La mayoría de estudios realizados en humedales construidos muestran como la eliminación de bacterias coliformes fecales en los humedales puede alcanzar valores entre 1 y 2.5 unidades logarítmicas (Rivera *et al.*, 1995; Tanner *et al.*, 1995; Ottová *et al.*, 1997), valores similares a los obtenidos en la planta piloto estudiada. A pesar de las importantes reducciones conseguidas en estos humedales de flujo subsuperficial, los valores habituales de eliminación entre 1 y 2 logaritmos para *E. coli* no son a menudo suficientes para satisfacer los

requerimientos de descarga, que a menudo especifican valores inferiores a los 200/100 mL, especialmente para reutilización en aguas agrícolas y para riego urbano sin restricciones.

En cuanto a los factores del diseño del humedal que afectan la eliminación de los microorganismos en el agua, cabe destacar el efecto significativo de la **profundidad de la lámina de agua (tipo humedal: somero-profundo)**, efecto que muchas veces presenta una interacción con la granulometría o la estacionalidad. De manera igual que en el caso de la mayoría de contaminantes químicos (García et al., 2004c), la eficiencia de eliminación microbiana fue mayor en los humedales someros (D) que en los profundos (C). Este comportamiento se puede explicar teniendo en cuenta las mayores características de oxidación en dichos humedales (en promedio, de -144 a -131 mV, frente a los -183 a -151 mV observados en los humedales profundos), factor que aumenta su eficiencia general (García et al., 2004 a,b). De hecho, se ha comprobado que los coliformes fecales sobreviven durante más tiempo cuando las condiciones de su entorno son anaerobias (Ottová et al., 1997). Estas diferencias en el potencial redox en los humedales de FSS según la profundidad se pueden explicar teniendo en cuenta que el coeficiente de transferencia de oxígeno de la atmósfera al agua es inversamente proporcional a la profundidad del agua (Kadlec and Knight, 1996).

Por otra parte, la disminución del potencial redox influye sin duda en la disminución de los recuentos de aerobios (PCA a 22°C) en los humedales profundos (C, $p=0.005$), aunque existe una evidente interacción con la granulometría ($p=0.047$).

Uno de los factores que determinan la tasa de eliminación de los contaminantes, incluyendo entre ellos a los indicadores microbianos, es la superficie disponible para el desarrollo del biofilm. Las tasas de eliminación microbiana dependen en gran medida del **tipo de medio granular**. Es evidente que el material de menor diámetro (material fino, tipo 2) presenta una mayor superficie específica, lo que facilita la adsorción de los diferentes indicadores de contaminación al material y determina, por tanto, una mayor eliminación de todos los indicadores microbianos del agua, que es significativa en el caso de *Escherichia coli* ($p=0.004$), coliformes totales ($p=0.004$) y enterococos fecales ($p=0.012$).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, parece claro que la disminución de la profundidad de la lámina de agua y la utilización de granulometría fina son factores del diseño que aumentan la eficiencia de eliminación de los indicadores de contaminación fecal como *Escherichia coli*, enterococos fecales y esporas de clostridios, tanto en el agua efluente como en los biofilms del medio granular.

5. BIBLIOGRAFIA

APHA (American Public Health Association) (1995). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19th edition, Washington DC.

García, J., Aguirre, P., Mujeriego, R., Huang, Y., Ortiz, L. and Bayona, J. M. (2004a). Initial contaminant removal performance factors in horizontal flow reed beds used for treating urban wastewater. *Wat. Res.*, 38(7), 1669-1678.

García, J., Aguirre, P., Barragán, J., Mujeriego, R., Matamoros, V. and Bayona, J. M. (2004b). Effect of key design parameters on the efficiency of horizontal subsurface flow wetlands: long term performance. *Wat. Res.*, submitted.

García, J. Morató, J.M. Bayona y P. Aguirre. (2004c) Performance of horizontal subsurface flow constructed wetlands with different depth. 9th IWA Intl Conference on Wetland Systems for water pollution Control Avignon 2004. Francia.

Gersberg, R.M., Gearhart, R.A. y Ives, M. (1989). Pathogen removal in constructed wetlands. In *Constructed wetlands for wastewater treatment: municipal, industrial and agricultural* (ed. D.A. Hammer), pp. 431-446. Chelsea, MI, USA: Lewis Publishers.

Grabow, W.O.K. (1996). Pathogenic and indicator organisms in drinking water. Seminario Microbiología de las Aguas de Abastecimiento. AEAS, Madrid. pp. 7-36.

Herskowitz, J. (1986). Listowel artificial marsh project report. Ontario Ministry of the Environment. Water Resources Branch, Toronto, ON, Canada.

Kadlec, R.H. and Knight, R.L. (1996). *Treatment Wetlands*. CRC Press. Florida, USA.

Ottová, V., Balcarová, J. y Vymazal, J. (1997). Microbial Characteristics of Constructed Wetlands. *Wat. Sci. Tech.* 35 (5): 117-123.

Rivera, F., Warren, A., Ramírez, E., Decamp, O., Bonilla, P., Gallegos, E., Calderón, A. and Sánchez, J.T. (1995) Removal of pathogens from wastewaters by the root zone method (RZM). *Wat. Sci. Tech.* 32 (3), 211-218.

Tanner, C.C., Clayton, J.S. and Upsdell, M.P. (1995) Effect of loading rate and planting on treatment of dairy farm wastewaters in constructed wetlands. Removal of oxygen demand, suspended solids and faecal coliforms. *Wat. Res.* 29 (1), 17-26.

6. TABLAS Y FIGURAS

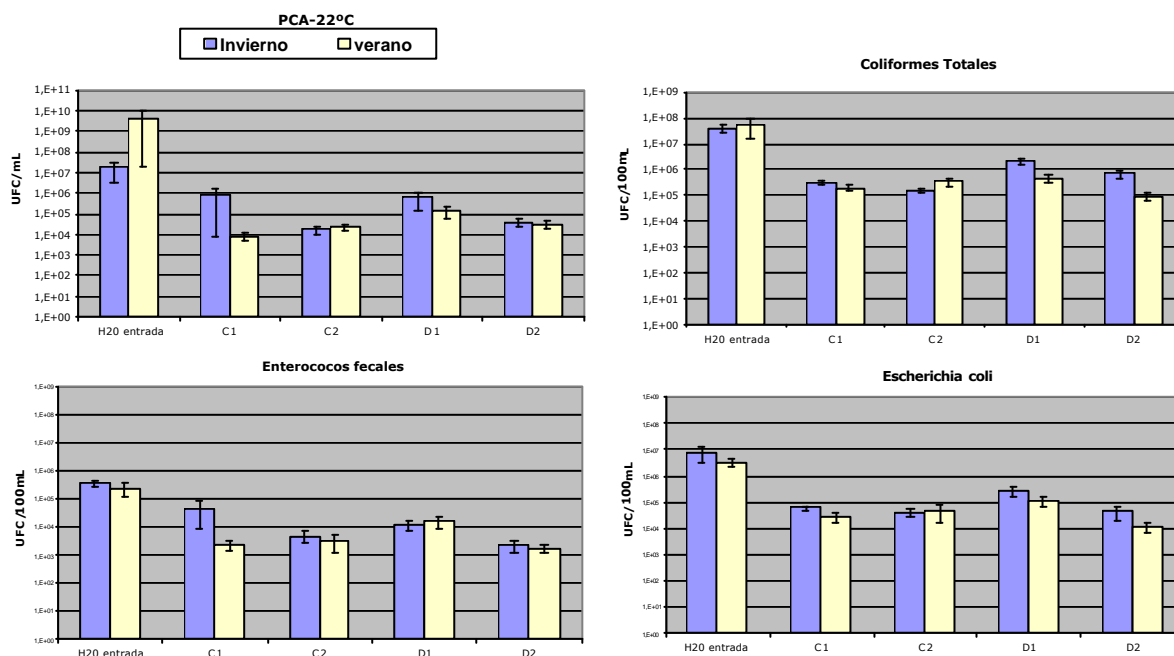


Figura 1. Eliminación de microorganismos en los humedales de flujo subsuperficial. Calidad microbiológica del agua afluente y efluente en los humedales de flujo subsuperficial. C) Humedales someros, D) Humedales profundos, 1) granulometría gruesa y 2) granulometría fina. Las barras representan el error estándar.

Tabla 1. Factores que afectan la eliminación de microorganismos indicadores en el agua efluente. En la parte superior se detalla el factor que produce la mayor eliminación del indicador, y debajo se remarca el nivel de significación. Rojo, significativo; Naranja, valor próximo a la significación; Azul, factores significativos que dependen de interacciones, Verde, próximo a la significación con dependencia de interacciones.

Factor	PCA 22°C	Coliformes Totales	Escherichia coli	Enterococos fecales	Esporas Clostridios	Pseudomonas
Tipo Humedal	Profundo 0	Profundo	Somero	Profundo	Somero	Somero
	0.005	0.041	0.47	0.49	0.039	0.06
Granulometría	Fina 0.16	Fina 0.009	Fina 0.004	Fina 0.012	Fina 0.36	Fina 0.60
Estacionalidad	Invierno 0.98	Verano 0.011	Verano 0.028	Verano 0.61	Verano 0.001	Verano 0.27
TipoHum*Granulometría	C-1/2 0.047	D-2 0.011	D-2 0.013	D-2 0.052	D-2 0.572	D-2 0.60
TipoHum*Estacionalidad	- 0.79	D-V 0.011	- 0.17	- 0.22	0.126	D-Verano 0.039

Profundo (C), Somero (D), Grava Gruesa (1), Grava Fina (2), Verano (V), Invierno (I)

Tabla 2. Factores que afectan la eliminación de microorganismos indicadores en el biofilm. En la parte superior se detalla el factor que produce la mayor eliminación del indicador, y debajo se remarca el nivel de significación. Rojo, significativo; Azul, factores significativos que dependen de interacciones.

Factor	PCA 22°C	Coliformes Totales	Escherichia coli	Enterococos fecales	Esporas Clostridios	Pseudomonas
Tipo Humedal	Profundo 0.185	Profundo 0.088	Somero 0.009	Somero 0.527	Somero 0.662	Somero 0.749
Granulometría	Fina 0.001	Fina 0.001	Fina 0.001	Fina 0.001	Fina 0.278	Fina 0.029
Estacionalidad	Invierno 0.003	Invierno 0.258	Verano 0.048	Verano 0.076	-	Verano 0.391
Entrada-Salida (Situación Reactor)	Salida 0.035	Salida 0.001	Salida 0.001	Salida 0.001	Salida 0.035	Salida 0.559
Superficial-Profunda (Muestra reactor)	Profunda 0.545	Superficial 0.826	Superficial 0.505	Superficial 0.074	Profunda 0.306	Profundo 0.626
TipoHum*Granulometría	C-2 0.036	C-2 0.778	D-2 0.206	D-2 0.533	D-2 0.472	D-2 0.856
Granulometría*E-S	2-S 0.07	2-S 0.283	2-S 0.365	2-S 0.006	2-S 0.301	2-S 0.191
E-S * Sup.Prof	-	-	-	-	S-Prof 0.033	-

Profundo (C), Somero (D), Grava Gruesa (1), Grava Fina (2), Verano (V), Invierno (I)