



Área de Ecología
Dpto. de Biodiversidad y Gestión Ambiental.
UNIVERSIDAD DE LEÓN

**Aplicación de humedales
construidos en la
reducción de patógenos
y otros contaminantes
en agua residual
urbana y ganadera**

Patricia Molleda

APLICACIÓN DE HUMEDALES CONSTRUIDOS EN LA
REDUCCIÓN DE PATÓGENOS Y OTROS
CONTAMINANTES EN AGUA RESIDUAL URBANA Y
GANADERA

APPLICATION OF CONSTRUCTED WETLAND IN REDUCING
PATHOGENS AND OTHER CONTAMINANTS IN URBAN AND
LIVESTOCK WASTEWATER

PATRICIA MOLLEDA MARTÍNEZ

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL PARA LA CONSECUCCIÓN DEL TITULO DE
DOCTOR

Dirigida por el Prof. Dr. D. Estanislao de Luis Calabuig y la Prof. Dra. D. Gemma
Ansola González

Programa de Doctorado de Ecología y Tecnología Ambiental

Área de Ecología

Departamento de Biodiversidad y Gestión Ambiental

León 2011

AGRADECIMIENTO

A mis directores de tesis doctoral, el Dr. Estanislao de Luis Calabuig y la Dra. Gemma Ansola González por haber confiado en mí, por su paciencia y dedicación, por ayudarme a resolver todos los problemas que fueron surgiendo y por guiarme durante el largo camino recorrido para la finalización de esta tesis doctoral. Gracias por haberme brindado la oportunidad de continuar mi experiencia como investigadora en el área de la depuración de aguas residuales.

A la Universidad de León, la Diputación de León, el Instituto de Tecnología Agraria de Castilla en León, quienes han financiado este trabajo de investigación. A los habitantes de Bustillo de Cea y a los trabajadores de Centrotec.

A mi familia que me ha ayudado en todo lo que he necesitado y por el apoyo incondicional que he recibido durante estos años. A mis tíos, mis primos especialmente Heike por su apoyo, animo, fuerza y por estar siempre preocupada y pendiente. A mi madre (Maritza, Haydee y Klaus) que aunque lejos por su inyección de energía, animo y paciencia me han apoyado y si estoy aquí es gracias a ellos.

A mis compañeros del Instituto de Medio Ambiente donde he pasado todos estos años, a Rubén por llevarme de muestreo en el viejo Lan-Rover a Bustillo, a Ester quien también me llevo de muestreo a Bustillo en el viejo Lan-Rover. A Paula y Luis por su apoyo y ayuda y por traerme las muestras de lodos de Bustillo. A Iván por los momentos compartidos durante el proyecto de los purines de cerdos. A Roberto por haberme ayudado con la identificación de los protozoarios y helmintos, gracias por compartir incondicionalmente tus conocimientos conmigo.

A Linda por su ayuda y apoyo durante mis primeros días en León y por su amistad durante todos estos años; a Antonio por su ayuda con el Corel para la realización de todos los póster que he realizado durante todos estos años y por su amistad.

A Rafa por los momento de conversación en el despacho, por su buen humor y por ayudarme a maquetar y vincular la tesis.

A Irene, Cristina, Amando, Ricardo, Saúl, Maria, Maria, Natalia, Bea, Bárbara, Cynthia, José, Alejandra por los café las cañas y las risas que hemos compartido.

A las amigas y amigos que he cosechado durante mi tiempo en León por ayudarme a desconectar y por su apoyo durante los tiempos difíciles.

A TODOS MUCHÍSIMAS GRACIAS.

“Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano”

Isaac Newton

ÍNDICE

RESUMEN	viii
SUMMARY	xi
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	14
1.1 DESARROLLO HISTÓRICO.....	15
1.2 SISTEMAS NATURALES DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES	17
1.3 VENTAJAS DEL USO DEL HUMEDAL CONSTRUIDO EN ZONAS RURALES	22
1.4 MICROBIOLOGÍA DE LAS AGUAS RESIDUALES	27
1.5 OBJETIVOS.....	37
1.5.1 Objetivos específicos:.....	37
2 DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA.....	39
2.1 SITUACIÓN GEOGRÁFICA DE BUSTILLO DE CEA	40
2.2 DESCRIPCIÓN DEL MOSAICO JERARQUIZADO DE ECOSISTEMAS ARTIFICIALES (M.J.E.A. ®) A ESCALA REAL	42
2.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y FÍSICO-QUÍMICO	47
2.3.1 Método Analítico	47
2.3.2 Análisis de los datos	49
2.4 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS HUEVOS DE HELMINTOS.....	49
2.4.1 Método Analítico	49
2.4.2 Concentración de huevos de Helmintos.....	50
2.4.3 Viabilidad de los huevos de Helmintos	51
2.5 MOSAICO JERARQUIZADO DE ECOSISTEMAS ARTIFICIALES (M.J.E.A. ®) A ESCALA PILOTO.....	51
2.5.1 Descripción del área de estudio	52
2.5.2 Método Analítico	55
2.5.3 Análisis de los datos	55
3 RESULTADOS	57
3.1 MOSAICO JERARQUIZADO DE ECOSISTEMAS ARTIFICIALES (M.J.E.A. ®) A ESCALA REAL	58

3.1.1	Análisis realizado durante los muestreos estacionales.....	58
3.1.2	Análisis realizado durante los muestreos de los dos periodos vegetativos completos	60
3.1.3	Evaluación de la Viabilidad de los Huevos de Helmintos en lodos.....	80
3.2	MOSAICO JERARQUIZADO DE ECOSISTEMAS ARTIFICIALES (M.J.E.A. ®) A ESCALA PILOTO.....	83
3.2.1	Condiciones físico-químicas del sistema.....	83
3.2.2	Reducción de los Microorganismos.....	86
4	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	100
4.1	MOSAICO JERARQUIZADO DE ECOSISTEMAS ARTIFICIALES (M.J.E.A. ®) A ESCALA REAL	101
4.2	EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS HUEVOS DE HELMINTOS EN LODOS	107
4.3	MOSAICO JERARQUIZADO DE ECOSISTEMAS ARTIFICIALES (M.J.E.A. ®) A ESCALA PILOTO.....	111
5	CONCLUSIONES GENERALES	115
6	ANEXOS.....	119
6.1	ANEXO A: PROTOCOLOS PARA LA DETECCIÓN DE INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL	120
6.2	ANEXO B. PROTOCOLOS PARA CONCENTRACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS. MÉTODO DE FLOCULACIÓN CON CaCO ₃ PARA QUISTES DE <i>GIARDIA</i> Y OOQUISTES DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> (VESEY ET. AL. 1993).....	122
6.3	ANEXO C. PROTOCOLO DE CONCENTRACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y RECUENTO DE HUEVOS DE HELMINTOS EN AGUA RESIDUAL. MÉTODO BAILENGER (1979) MODIFICADO POR BOUHOUM Y SCHWARTZBROD, (1998).....	123
6.4	ANEXO D. PROTOCOLO DE CONCENTRACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y RECUENTO DE HUEVOS DE HELMINTOS EN LODOS (SCHWARTZBROD, 2003).....	125
6.5	ANEXO E. PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS HELMINTOS EN LODOS MÉTODO TAMIZADO-INCUBACIÓN (GASPARD, ET AL, 1997).	126
6.6	ANEXO F. FOTOS DE LOS HELMINTOS OBSERVADOS DURANTE ESTE ESTUDIO.....	128
6.7	ANEXO G. FOTO DE QUISTES Y OOQUISTES DE <i>GIARDIA</i> Y <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>	129
7	REFERENCIAS	130
	GLOSARIO.....	144

RESUMEN

El objetivo de este estudio es determinar la eficiencia de eliminación de organismos patógenos (quistes de *Giardia*, ooquistes de *Cryptosporidium* y huevos de Helmintos), microorganismos indicadores, y parámetros físico-químicos de agua residual urbana mediante un humedal construido de tipo Mosaico Jerarquizado de Ecosistemas Artificiales (MJEA[®]) a escala real. También determinar la eficiencia de eliminación de microorganismos indicadores y parámetros físico-químicos de agua residual de origen ganadero (purín) usando tres cargas diferentes de Nitrógeno en un humedal construido de tipo (MJEA[®]) a escala piloto.

Los estudios realizados en el sistema de depuración a escala real demostraron que el (MJEA[®]) elimina eficientemente los microorganismos indicadores y patógenos. Se observó diferencias significativas en la cantidad de microorganismos detectados durante los periodos de verano, otoño, invierno y primavera y se registró una reducción gradual en los puntos de muestreos próximos a la salida. El sistema de depuración mostró una eficiente eliminación de *Clostridium* (100%) durante el verano y una eficiente eliminación de los huevos de Helmintos durante todas las estaciones en las que se llevaron a cabo los muestreos. El número de quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* encontrados durante todos los periodos de muestreo fue mínimo, observándose ausencia total de estos en el efluente del sistema de depuración. Los microorganismos indicadores tales como: *E. coli* y Coliformes totales mostraron una eliminación de más del 90% y para Estreptococos fecales se observó una eliminación del 74,7% durante el periodo de primavera. Durante el otoño se registró una mayor eficiencia de eliminación de Coliformes fecales. Los géneros de huevos de Helmintos encontrados durante los periodos de muestreo fueron *Trichostrongylus*, *Coccidium* y *Trichuris*, observándose menos de 1 huevo/10l siendo 0 huevo/l a la salida del humedal. Estadísticamente se observó que la presencia de Nitrógeno en forma de Amonio en el sistema presentó una correlación positiva con los Coliformes fecales, Estreptococos fecales y *Cryptosporidium*.

En cuanto a los parámetros físicos-químicos estudiados en el sistema de tratamiento de Bustillo de Cea se ha observado una notable reducción, como ha ocurrido con la DBO₅ durante el periodo vegetativo de Abril a Octubre en la balsa plantada con *Iris*

pseudacorus y *Salix atrocinerea* y que combina los flujos superficiales y subsuperficiales que alcanzó el porcentaje de reducción más elevado (56,2%), siendo la laguna de micrófitos la etapa del sistema que más alta eficiencia de reducción alcanza durante el periodo frío con un 53,4%. Para el Amonio, se observó mayor porcentaje de reducción durante los meses cálidos, cuando la vegetación está más activa. El mayor porcentaje de reducción para Fósforo se obtuvo durante los meses menos calurosos del año y la etapa del tratamiento que más eficientemente redujo la concentración de Fósforo total fue la que combina ambos flujos hidráulicos alcanzando un 56% de reducción, siendo durante el periodo frío la balsa plantada con *Typha* la que mayor reducción del Fósforo total presentó con 50,9%. La reducción de los parámetros físico-químicos: DBO₅, Amonio y Fósforo total se observaron acorde con la normativa oficial (91/271/CEE) que regula los vertidos procedentes de sistemas de tratamiento de aguas residuales urbanas a nivel europeo de poblaciones de entre 2000-5000 habitantes equivalentes.

El sistema de depuración de agua residual de tipo (MJEA[®]), fue construido a escala piloto, para observar como se comporta depurando agua residual de tipo ganadera, específicamente purín de cerdo. Se observó la eficiencia de reducción de parámetros físico-químicos y microbiológicos usando tres cargas diferentes de Nitrógeno 2,34 g NTK/m²d; 2,49 g NTK /m²d, y 3,39 g NTK /m²d.

En cuanto a los parámetros físico-químicos, los valores obtenidos de Oxígeno disuelto fueron bajos, sin observarse diferencia con respecto a las tres cargas de Nitrógeno empleadas durante este estudio. Los valores de DBO₅ con las tres cargas de Nitrógeno empleadas presentaron una marcada disminución en el efluente del sistema, siendo menor de 40 mgO₂/l, que es el valor permitido para vertidos de origen ganadero. Los valores de SST registrados para las tres cargas de Nitrógeno estudiados se encontraron dentro del rango establecido por el Real Decreto 606/2003. Se observó una notable disminución en la concentración de Amonio de hasta 65,73% en el periodo de mayor carga de Nitrógeno aportada (3,39 g NTK /m²d). Los valores de Fósforo total obtenidos con las tres cargas de Nitrógeno estudiadas, se encontraron dentro de los límites permitidos por la legislación para vertidos de origen ganadero. Los resultados obtenidos fueron validados estadísticamente observándose correlación negativa entre las Bacterias aerobias, la Temperatura, el pH y el Amonio. Se observa también correlación entre

Clostridium con el pH y el Oxígeno disuelto. Los microorganismos estudiados mostraron una eliminación eficiente con las tres cargas de Nitrógeno probadas.

Se ha evaluado la presencia y viabilidad de los huevos de Helminths en el lodo del sistema de depuración de agua residual de tipo (MJEA[®]). Se ha observado una concentración total de 96 huevos/kg.m.s. en el lodo del pretratamiento; 336 huevos /kg.m.s. en la laguna micrófitos a 1,5 metros de profundidad y 338 huevos/kg.m.s. en la misma laguna a 1 metro de profundidad. En la laguna de micrófitos la concentración de huevos es mayor debido a que el lodo lleva 9 años sin ser removido. El porcentaje de viabilidad observado fue muy bajo, posiblemente por que los huevos deben haberse sedimentado al fondo de la laguna pudiéndose producir pérdida de viabilidad por acumulación durante un largo periodo de tiempo.

SUMMARY

The aim of this study was to determine the removal efficiency of the real scale constructed wetland system based on Hierarchical Mosaic of Aquatic Ecosystems (H.M.A.E.®) in removing indicator organisms, pathogens and physic chemistry parameters present in urban wastewater.

The H.M.A.E.® system demonstrated efficient reduction of microorganism indicators and organism pathogens. Significant differences in the quantity of organisms detected in the different seasons, and a gradual reduction from one sampling points closed to the downstream was recorded. The system showed a removal efficiency of 100% for *Clostridium* in the summer and also for helminth eggs in every season. The number of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts found during the sampling period was minimal; and these microorganisms were detected in the downstream of the treatment system. In the case of *E. coli*, and SF a reduction greater than 90% was observed. For TC, the reduction observed was 74, 7% during spring. The season when the highest removal efficiencies where achieved was autumn. The Helminth genera found in period sampling were *Trichostrongylus*, *Coccidium* and *Trichuris* although their quantities were below (< 1 eggs/10l), Futhermore, these microorganisms were not present in the effluent of the wetland. The presence of N-NH₄⁺ in the system showed a positive correlation with Coliforms totals, Coliforms faecal, Streptococcus faecal and *Cryptosporidium*.

According to the physicochemical parameters, the system type (H.M.A.E.®) also showed a good reduction efficiency. That is the case of the BOD₅ which highest reduction percentage (56,2%) was found during the period growing season (April to October) in the pool planted with *Iris pseudacorus* and *Salix atrocinerea*, and with a combination of surface and subsurface flows. The pool with the highest efficiency in the reduction of BOD₅ cool season was the one planted with microphytes (53, 4%).

For Ammonium the highest removal efficiency was observed during hot period, when vegetation is most active. Total phosphorus was removed more efficiently also during hot period. In FSSW observed total Phosphorus removal more efficient than the other lagoon stage (56%). During cool period stages planted with *Typha* presented the highest removal of total Phosphorus (50, 9%). The removal of the physicochemical parameters: DBO₅, Ammonium and total Phosphorus was consistent with the range permitted by the

current legislation (91/271/CEE) for discharges of Wastewater treatment plant (WWTP) origin.

There was carried out a research on an alternative swine wastewater purification treatment system method through the construction of pilot plants. It was used the Hierarchical Mosaic of Artificial Ecosystems (H.M.A.E.®) purification treatment system. We observed the efficiency of treatment system HMAE® to removal physicochemical and microbiological parameters using three different nitrogen loadings (2, 34 g TKN/m²d, 2, 49 g TKN/m²d and 3, 39 g TKN/m²d).

According to the physicochemical parameters, the Dissolved oxygen values obtained in the effluent were low, and there was not much difference with respect to the different nitrogen loads (2, 49 g TKN/m²d, 3, 39 g TKN/m²d and 2, 34 g TKN/m²d) used in this study

Values for BOD₅ with the different nitrogen loads (2, 49 g TKN/m²d, 3, 39 g TKN/m²d and 2, 34 g TKN/m²d) in the effluent showed a marked reduction, presenting less than 40 mgO₂/l. That constitutes a permissible value for livestock waste discharge.

The HMAE® pilot plant achieved efficient removal of TSS according to Real Decreto 606/2003.

The experimental HMEA® system showing a notable decrease of ammonium concentrations (65,73%) in effluent were nitrogen loads of 3, 39 g NTK /m²d. Values for total Phosphorus with the different nitrogen loads (2,49 g TKN/m²d, 3,39 g TKN/m²d and 2,34 g TKN/m²d) constituting a permissible value for livestock waste discharge.

In order to determine whether correlations existed between the physicochemical and microbiological parameters in the experimental HMEA® system, the Spearman's rank correlation test was applied (r-Spearman, p < 0, 05). In this study clear negative correlation were observed between aerobic Bacteria, Temperature, pH and Ammonium. We observed correlation between *Clostridium* with pH and Dissolved oxygen

In this study a negative Spearman correlation between Aerobic bacterias; Temperatura, pH and Amonium was found. It was also observed a correlation between *Clostridium*, pH and Disolved oxigen.

The microorganisms showed an efficient removal with the three different nitrogen loads used in this work.

Finally, the presence and viability of Helminth eggs in sludge of treatment system type (H.M.A.E. ®) was evaluated. The result of the sludge analysis found was a total concentration of 96 eggs/ kg d. m. at the first tank (Pre-treatment), 343 eggs /kg. d.m. at the inlet of the first basin (1,5 m deep sludge) and 338 eggs/kg.d.m. at the outlet of the first basin (1 m deep sludge). There were significant difference in the quantity of Helminth eggs detected in the first basin (1, 5 m deep sludge and 1 m deep sludge) and in the first tank (Pre-treatment). In this treatment system (H.M.A.E. ®) the sediment was accumulated on a very long period of time (9 years old) in the first basin however the sediment in the first tank had been removed once a year.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El agua es el elemento más importante y abundante de nuestro planeta. Todas las formas de vida conocidas necesitan agua para vivir. Este recurso natural ha perdido calidad por el acelerado aumento de la población mundial lo que impone una demanda creciente sobre los ecosistemas acuáticos continentales.

Desde hace varios años, la degradación del entorno y principalmente el problema de la contaminación de las aguas superficiales toma mayor importancia. Las aguas superficiales están expuestas a una amplia gama de factores, que pueden alterar su calidad biológica y ocasionar cambios simples o complejos y con diferentes niveles de intensidad. (Toze, 1997).

Aunque el tratamiento de las aguas residuales es una tecnología relativamente joven, ha cobrado una mayor importancia desde principios del siglo XX como resultado de la preocupación general expresada en todo el mundo sobre el problema, cada vez mayor, de la contaminación, que han venido sufriendo los ríos, lagos, océanos y aguas subterráneas, por los desperdicios domésticos, industriales, municipales y agrícolas generados por el aumento desproporcionado de la población mundial (Angelakis *et al.*, 2005).

1.1 DESARROLLO HISTÓRICO

Los métodos de depuración de residuos se remontan a la antigüedad. Los antiguos griegos hicieron grandes avances en el campo de las fuentes de agua, tales como explotación de aguas subterráneas, transporte de agua a grandes distancias, suministro de agua, sistemas de desagüe de aguas residuales y aguas de tormentas, construcción y uso de fuentes de aguas, protección de flujos, drenajes e irrigación de tierras agrícolas y aguas de uso recreacional. Además se han encontrado instalaciones de alcantarillado en lugares prehistóricos de Creta y en antiguas ciudades asirias. Las canalizaciones de desagüe construidas por los romanos todavía funcionan en nuestros días. Aunque su principal función era el drenaje, la costumbre romana de arrojar los desperdicios a las calles significaba que junto con el agua de las escorrentías viajaban grandes cantidades de materia orgánica. Hacia finales de la edad media empezaron a usarse en Europa,

primero excavaciones subterráneas privadas y más tarde, letrinas. Cuando éstas estaban llenas, unos obreros vaciaban el lugar en nombre del propietario. El contenido de los pozos negros se empleaba como fertilizante en las granjas cercanas o era vertido en los cursos de agua o en tierras no explotadas (Angelakis *et al.*, 2005).

Unos siglos después se recuperó la costumbre de construir desagües, en su mayor parte en forma de canales al aire o zanjas en la calle. Al principio estuvo prohibido arrojar desperdicios en ellos, pero en el siglo XIX se aceptó que la salud pública podía salir beneficiada si se eliminaban los desechos humanos a través de los desagües para conseguir su rápida desaparición. Un sistema de este tipo fue desarrollado por Joseph Bazalgette entre 1859 y 1875 con el objeto de desviar el agua de lluvia y las aguas residuales hacia la parte baja del Támesis, en Londres. Con la introducción del abastecimiento municipal de agua y la instalación de cañerías en las casas, llegaron los inodoros y los primeros sistemas sanitarios modernos. A pesar de que existían reservas respecto a éstos por el desperdicio de recursos que suponían, por los riesgos para la salud que planteaban y por su elevado precio, fueron muchas las ciudades que los construyeron.

A comienzo del siglo XX, algunas ciudades e industrias empezaron a reconocer que el vertido directo de desechos en los ríos provocaba problemas sanitarios. Esto llevó a la construcción de instalaciones de depuración. Aproximadamente en aquellos mismos años se introdujo la fosa séptica como mecanismo para el tratamiento de las aguas residuales domésticas tanto en las áreas suburbanas como en las rurales. Para el tratamiento en instalaciones públicas se adoptó primero la técnica del filtro de goteo. Durante la segunda década del siglo, el proceso del lodo activado, desarrollado en Gran Bretaña, supuso una mejora significativa por lo que empezó a emplearse en muchas localidades de ese país y de todo el mundo (Angelakis *et al.*, 2005). Comenzaron a llevarse las aguas residuales fuera de los límites de las ciudades depositándolas en humedales naturales considerados como tierras inútiles (Vymazal *et al.*, 1998, Kadlec, *et al.*, 2000).

A partir del siglo pasado durante los años cincuenta y sesenta los ecologistas empezaron a darse cuenta del valor de los humedales realizando numerosos estudios, comenzando

el desarrollo de las tecnologías de humedales construidos. A mediados de 1955 se desarrolló una de las primeras investigaciones importantes sobre humedales construidos realizada por el Dr. K. Seidel en el instituto Max Planck en Plön Alemania, esta no fue publicada en inglés hasta el año 1976 lo cual dificultó la difusión de los conocimientos. Esta investigación fue muy criticada por los cálculos realizados y las grandes superficies de tierras empleadas (Vymazal *et al.*, 1998).

En los años setenta debido al crecimiento de la llamada “conciencia verde” se abandono el uso de los humedales naturales para el almacenamiento de las aguas residuales comenzándose a usar los humedales construidos. La crisis energética de 1973 le dio un impulso positivo a los humedales construidos por ser de bajo consumo de energía. Pasado el periodo de optimismo y entusiasmo de los años setenta, en los años ochenta se observó esta técnica con mucha precaución y escepticismo debido a inconvenientes de la tecnología y al fracaso de algunos prototipos, posteriormente investigaciones adicionales resolvieron estos problemas llegando a la madurez de esta tecnología en los años noventa (Kangas, 2004, Rousseau, 2005).

1.2 SISTEMAS NATURALES DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Debido a los problemas ecológicos que causa la contaminación de las aguas, los países tienen la obligación de responsabilizarse sobre el dilema económico que supone el resolver eficiente y convenientemente la depuración de las aguas ya utilizadas y degradadas por el hombre. Existe la necesidad de tratar adecuadamente las aguas residuales para su reutilización o redistribución al medio ambiente. Los avances tecnológicos en materia medioambiental son capaces de cubrir cualquier alternativa, pero en la mayoría de los casos, los costes que deben satisfacer los múltiples procesos del tratamiento total, pueden ser privativos (Gopal, 1999; Kivaisi, 2001).

La aplicación de tecnologías blandas en el tratamiento de las aguas residuales urbanas, viene desarrollándose en todo el mundo desde hace décadas. El tratamiento de aguas residuales, mediante sistemas naturales como son los humedales artificiales, está cada vez más extendido y es una opción muy a tener en cuenta para estos municipios, debido

a sus grandes ventajas derivadas de sus bajos costes de explotación y mantenimiento, gran calidad del efluente final, supresión completa de ruidos y también por su estética, al integrarse perfectamente en el paisaje (Knight, 1997; Haberl, 1999). Además requieren una menor susceptibilidad a fluctuaciones de la carga contaminante que los sistemas convencionales. Estas tecnologías se concretan entre otras en: lagunajes y humedales artificiales.

El **lagunaje** es un sistema de tratamiento de agua residual esencialmente biológico que consiste en el almacenamiento de las aguas residuales en una serie de lagunas construidas por el hombre durante un tiempo variable en función de la carga aplicada y de las condiciones climáticas, de forma que la materia orgánica resulte degradada mediante la actividad de los microorganismos presentes en el medio acuático. El proceso de depuración tiene lugar gracias a reacciones biológicas, químicas y físicas, que ocurren en ellas y que tienden a estabilizar el agua residual (Mara, 2001). Los fenómenos que se producen tienen relación con la sedimentación, oxidación fotosíntesis, digestión, aireación y evaporación (Maynard *et al.*, 1999). En función de los tipos de microorganismos, que dependen a su vez de la presencia de oxígeno disuelto, las lagunas, también conocidas como estanques de estabilización, se clasifican en anaerobias, facultativas y aerobias o de maduración. En la Figura 1.1 se observa un esquema de un sistema de lagunaje.

Una laguna anaeróbica es un reactor biológico natural que funciona con ausencia de oxígeno disuelto y de otros compuestos inorgánicos que pueden trabajar como aceptor de electrones (nitratos o sulfatos). Se denominan así puesto que por su diseño (profundidad generalmente superior a los 2 metros) el contenido de oxígeno disuelto en el cuerpo de la misma es prácticamente nulo (Mara y Pearson 1998). En estas lagunas se produce la retención de la mayor parte de los sólidos en suspensión que arrastra el agua, que van al fondo, junto con la materia orgánica particulada, que sufrirá un proceso, en los cuales, se puede llegar hasta la formación de metano. Participan cuatro grupos microbianos: las Bacterias hidrolíticas (*Clostridium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Peptococcus*, etc.), Bacterias acidogénicas (*Acetovibrio*, *Butirivibrio*, *Lactobacillus*, etc.) Bacterias acetogénicas (*Acetogenicum*, *Syntrophobacter*, *Acetobacterium*, etc.) y las Bacterias metanogénicas (*Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanospirillum*,

etc.) todas ellas complementarias e imprescindibles para el proceso. Este proceso se divide en dos grandes etapas. En la primera, un grupo de Bacterias facultativas formadoras de ácidos descomponen las cadenas complejas de la materia orgánica en ácidos grasos, aldehídos y alcoholes. En la segunda etapa, otro grupo de Bacterias estrictamente anaeróbicas, formadoras de metano, transforman los productos intermedios en gas metano, amoníaco y anhídrido carbónico e hidrógeno. El proceso anaeróbico, lo mismo que el aeróbico transforma Carbono, Nitrógeno y Fósforo en protoplasma celular.

En las lagunas facultativas se distingue una zona aerobia próxima a la superficie, una zona anaerobia en el fondo, donde se dan procesos de fermentación y una zona intermedia que contiene Bacterias facultativas y es la que le da el nombre. El proceso aeróbico de la materia orgánica hace que el Carbono se utilice como fuente de energía, para los microorganismos que al ser oxidado produce anhídrido carbónico. Los microorganismos que participan son Bacterias fundamentalmente, pero también hay hongos y protozoos. Estos microorganismos utilizan el Carbono restante, así como el Fósforo y el Nitrógeno para formar nuevas células. El oxígeno necesario para la estabilización de la materia orgánica proviene de la re-aireación, que se produce en la superficie y de la fotosíntesis que se lleva a cabo por medio de las algas presentes en la zona aerobia. En esta zona, las Bacterias, utilizan el oxígeno producido por las algas y desprenden CO_2 que a su vez, es utilizado por éstas, cerrando así el ciclo.

En las lagunas de maduración, las Bacterias aeróbicas descomponen la materia orgánica y utilizan como aceptor de electrones el oxígeno, generado por la actividad fotosintética de las microalgas. Al degradarse la materia orgánica se produce anhídrido carbónico y otros productos que son utilizados por las algas, creando un ciclo vital entre las algas y las Bacterias, clave para la depuración del agua residual. Estas lagunas aeróbicas, también llamadas lagunas de maduración, son completamente aerobias gracias a la escasa profundidad con la que son diseñadas (entre 0,3 y 1 metro) lo cual permite la difusión del oxígeno atmosférico en todo el cuerpo acuático, además del aporte que supone la presencia de algas. Solo una pequeña parte del oxígeno disuelto pasa del aire al agua mediante los mecanismos naturales de mezcla en superficie.

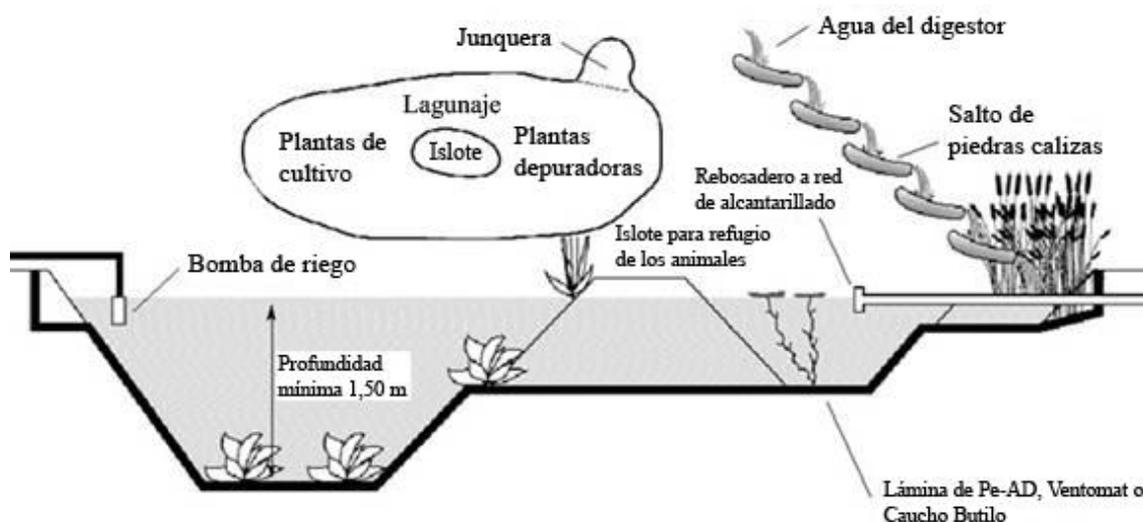


Figura 1.1. Esquema de un sistema de lagunaje (Fuente: ecohabitar.org/.../depuragua.html 2004).

Un humedal natural es un área de transición entre un ecosistema acuático y terrestre, que tiene una alta tasa de actividad biológica. Un **humedal construido** es un sistema de ingeniería, para el tratamiento de agua residual, diseñado y construido para utilizar los procesos naturales como ocurre en los humedales naturales (Kivaisi, 2001 y Al-Rekabi *et al.*, 2007). Consiste en lagunas de diseño apropiado que contiene suelo u otro sustrato seleccionado, columna de agua y vegetación como principal elemento, otro componente que asiste en el tratamiento del agua residual, es la comunidad de microorganismos naturalmente desarrollados. El sustrato es colocado sobre una capa impermeable alineado para proteger el subsuelo de la contaminación del agua residual. El humedal artificial, esta diseñado para tomar ventaja sobre los procesos físicos, químicos y biológicos que ocurren en un humedal natural pero medioambientalmente controlado (USEPA, 1993).

Los sistemas de tratamientos basados en macrófitos, consisten normalmente en un monocultivo o policultivo de plantas vasculares dispuestas en lagunas, tanques o zanjas poco profundas, en los que el tiempo de retención del agua residual es largo comparados con los sistemas de tratamiento convencionales.

La selección de las plantas que pueden ser utilizadas se realiza de acuerdo con su adaptabilidad al clima local, alta capacidad de transportar oxígeno desde las hojas hasta

la raíz, tolerancia a concentraciones elevadas de contaminantes, capacidad asimiladora de los mismos, tolerancia a condiciones climáticas adversas, resistencia a insectos y enfermedades y facilidad de manejo. Existe un amplio rango de plantas acuáticas que tienen la capacidad de tratar el agua residual, entre ellas están *Phragmites australis* (carrizo) *Scirpus lacustris* (junco de laguna), *Iris pseudacorus* (lirio amarillo), *Typha latifolia* (espadaña), *T. glauca* (espadaña), *T. angustifolia* (caña o espadaña), *Carex buchani* (carex), *Juncus effusus* (Junco), *Glyceria máxima* (hierba aromática) (Burka, 1989).

La eliminación de los contaminantes se lleva a cabo a través de una compleja variedad de procesos biológicos, físicos y químicos, entre los que se incluyen transformaciones bacterianas, adsorción, precipitación, absorción y sedimentación. La planta elimina contaminantes asimilándolos directamente de sus tejidos y, además sus rizomas proporcionan superficies para el crecimiento bacteriano y permiten la filtración de los sólidos. La transferencia de oxígeno hacia la zona radicular por parte de estas plantas acuáticas es un requisito para que la eliminación microbiana de algunos contaminantes se realice con eficacia (Biddlestone, *et al.*, 1991; Brix, 1986; Brix, 1987a, Brix 1987b).

La rizosfera proporciona un ambiente oxidado dentro del sustrato anaeróbico, que facilita la descomposición de la materia orgánica y permite la actuación de Bacterias nitrificantes (Crites y Tchobanoglous, 1992).

En relación con el sustrato, existen básicamente dos tipos diferentes de helófitos, los que crecen sobre una capa de grava o arena en los que las reacciones bioquímicas que se producen a nivel de las raíces, así como el rápido crecimiento y proliferación de los mismos, permiten un tratamiento muy efectivo del agua residual y los que crecen sobre una capa de suelo, siendo fundamentalmente el suelo con su particular estructura en la zona radicular y sus microzonas aerobias y anaerobias, los que facilitan la degradación y eliminación de los nutrientes (Seidel, 1976; Kickuth, 1984).

Por otra parte los humedales artificiales se pueden diseñar básicamente como sistemas con flujo superficial del agua, y como sistema con flujo subsuperficial. En los primeros, el suelo tiene una baja conductividad y no permite un flujo significativo a través de la zona radicular. Se piensa que la eliminación de contaminantes se produce a través de

reacciones que tienen lugar en el agua y en la zona superior del sustrato. En los sistemas diseñados con flujo subsuperficial el agua se mueve horizontalmente o verticalmente a través de la zona radicular (Figura 1.2).

1.3 VENTAJAS DEL USO DEL HUMEDAL CONSTRUIDO EN ZONAS RURALES

En comparación con el sistema de tratamiento de agua residual convencional, Los humedales construidos presentan ventajas y desventajas. Estos se presentan como una opción tecnológica sostenible para las pequeñas y medianas comunidades dada su alta eficiencia, bajo costos de operación, mantenimiento y fácil construcción. Además, el aprovechamiento de los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, no solo representa una fuente de agua, sino también una fuente potencial de entrada de nutrientes, con beneficios económicos y ambientales, convirtiéndose de este modo en una alternativa que toma fuerza a nivel mundial y que es conveniente considerar (Al-Rekabi *et al.*, 2007, Bernal *et al.*, 2003).

El humedal artificial de flujo subsuperficial usado para el tratamiento biológico de aguas residuales tiene como ventaja evitar el mal olor, los mosquitos y el contacto humano por estar mantenido bajo la superficie. Esto lo hace más eficiente y requiere menos espacio que el humedal artificial de agua superficial libre (Dallas *et al.*, 2004).

Entre las desventajas a considerar esta el requerimiento de un terreno muy amplio en el cual construir el humedal artificial, la posible disminución del funcionamiento en la estación fría y la posible existencia de malos olores y mosquitos (Al-Rekabi *et al.*, 2007).

Gopal (1999) ha identificado limitaciones a la tecnología del humedal artificial, para el tratamiento de las aguas residuales en países en desarrollo, tales como: uso de grandes extensiones de tierra, falta de conocimiento de la ecología y de las especies nativas de los humedales naturales de los países tropicales, la predominancia de mezcla de agua residual doméstica e industrial y la poca experiencia en el diseño y manejo del humedal artificial.

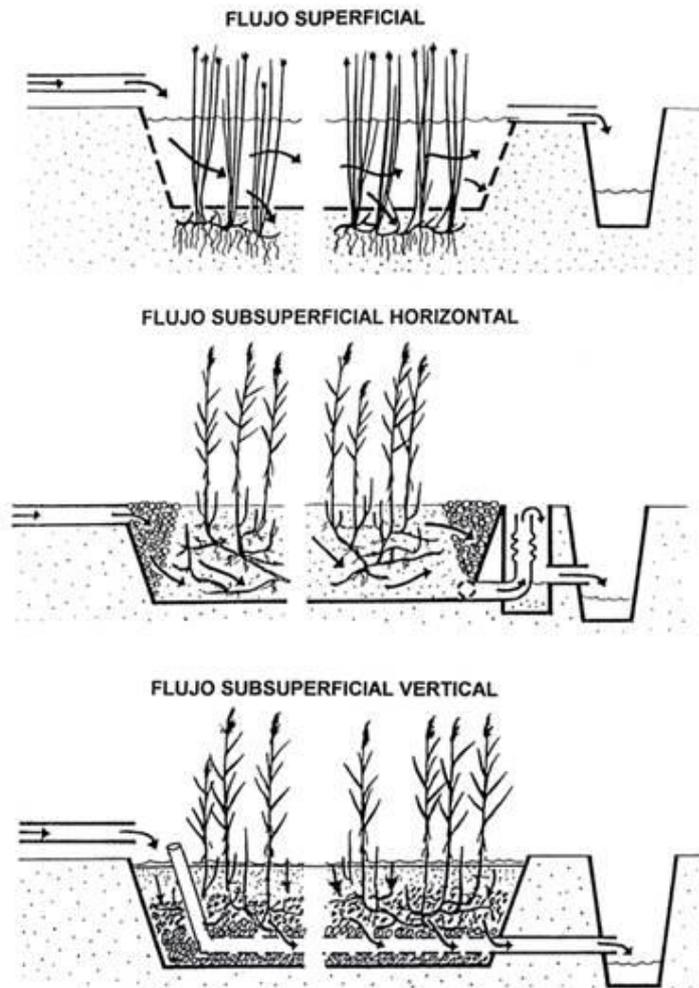


Figura 1.2. Esquema de humedales artificiales de tipo flujo superficial y subsuperficial (vertical y horizontal). (Fuente: Brix, 1987a.).

El tipo de humedal artificial a construir debe ser realizado dependiendo de la calidad del agua ya que como se ha mencionado anteriormente, en muchos países las aguas residuales municipales están mezcladas, con contaminantes tóxicos orgánicos e inorgánicos, los cuales inhiben los procesos microbianos y reducen la eficiencia del tratamiento de los humedales artificiales, por lo que esto debe ser considerado en el diseño del humedal artificial (Kivaisi, 2001).

Los países en desarrollo, interesados en implementar este tipo de sistema de depuración deben investigar sobre las estrategias apropiadas basadas en los parámetros locales. Se deben hacer investigaciones, sobre identificación y caracterización de plantas que sean

capaces de tolerar altos niveles de nutrientes y las condiciones climáticas. Deben tomarse en consideración ciertos factores tales como: el costo de desarrollo y mantenimiento, la topografía relativamente plana que minimice los costos de construcción. El suelo debe ser relativamente impermeable, para proteger las aguas subterráneas, el costo de operación y mantenimiento debe incluir el corte de la vegetación y el control de los insectos (Kivaisi, 2001).

En Colombia al igual que en otros países de la región, los cuerpos de agua son receptores de todo tipo de vertidos de aguas residuales lo cual disminuye la calidad, pone en riesgo la salud de los habitantes, disminuye la productividad y aumenta los costos de tratamiento de depuración (Bernal *et al.*, 2003). Los países de América del sur que depuran sus aguas son muy pocos, Brasil depura el 38% de sus aguas, Venezuela el 28%, Argentina 10%, Colombia el 8% (Global Water Partnership 2000).

Podrían contabilizarse más de 650 humedales naturales y artificiales en Norte América y más de 5000 humedales artificiales de flujo superficial en Europa, para el tratamiento de agua residual (Kadlec y Knight 1996 y Vymazal *et al.*, 1998). Se han realizado una gran cantidad de investigaciones basadas en la estructura, la función y la aplicación de estos sistemas para el tratamiento de varios tipos de aguas residuales.

Cada vez con más fuerza, la sociedad demanda una mayor rigurosidad en los estándares de calidad del agua y se impone la necesidad de desarrollar sistemas eficaces, y de bajo costo, que puedan ser utilizados por pequeños núcleos rurales, en los que las actividades agrícolas y concretamente el uso intensivo de fertilizantes, determinan unas pérdidas de Nitrógeno y Fósforo muy considerables. La falta de efectividad, y los costos extraordinariamente elevados de los sistemas convencionales, en estas comunidades de pequeño tamaño, han obligado a que las administraciones locales busquen soluciones eficaces y más baratas.

En la provincia de León y a nivel más general, en la comunidad de Castilla y León, un porcentaje muy elevado de los centros de población son núcleos rurales de mediana y baja densidad, a los que van especialmente dirigidos los sistemas de tratamiento con macrófitos (Ansola, *et al.*, 2003, Cortijo, *et al.*, 2003, Molleda, *et al.* 2008).

En los últimos años, en España se ha despertado un interés creciente por el desarrollo de programas y planes para la depuración de efluentes ganaderos, basados en la utilización de tecnologías diseñadas para el tratamiento de efluentes de origen urbano o los derivados de la industria. Los residuos ganaderos y en particular los purines de porcino suponen un grave problema medioambiental, en zonas de alta concentración ganadera. (Rosario, 2004). En la última década, la necesidad de una gestión sostenible se ha hecho cada vez más obvia, especialmente en el caso de la producción intensiva de porcinos (Voorburg, 1991; Honeyman, 1996; Adeola, 1999; Coffey, 1999). Los purines son un residuo muy contaminante que debe ser tratado para evitar las negativas consecuencias ambientales que provocan (Rosario, 2004).

La problemática del purín se asocia a su carga contaminante, en particular al contenido de Nitrógeno y agentes patógenos que afectan el suelo, a las aguas superficiales y subterráneas y a la atmósfera. Los residuos provenientes de las granjas de cerdo contienen una elevada concentración de Nitrógeno y materia orgánica (Poach *et al.*, 2003; Szogi *et al.*, 1994; Szogi *et al.*, 1995; Deng *et al.*, 2008). Estas concentraciones se intensifican con el peso de los cerdos, el tipo de alimentación y el clima. (Choi, 2008).

En los años 90 la comunidad europea enfocó el exceso de Nitrógeno producido por las aguas residuales provenientes de residuos ganaderos como un problema medioambiental promulgando la Directiva 91/676/CEE la cual contempla la protección del agua contra la polución causada por los nitratos provenientes de la agricultura.

En España el Real Decreto 324/2000 establece las normas básicas de ordenación de las explotaciones porcinas donde dice que se hace necesario preservar los recursos naturales y proteger el medio ambiente previniendo los efectos negativos que pudiera generar la ganadería intensiva.

En Holanda se han monitoreado los cuerpos de agua subterráneas durante años observándose un incremento en el número de puntos de muestreo que exceden los 50 mg de NO₃ permitidos. Por lo anteriormente expuesto el gobierno holandés a decidido designar todo el territorio como zona vulnerable, implementando la aplicación directa de restricciones que afectan directamente a los agricultores y ganaderos los cuales han tenido que recortar la producción de ganado porcino (Ondersteijn *et al.*, 2002). La

concentración de vertido de Amonio para agua residual de origen ganadero es de 25 mg/l. La gestión de los purines y estiércoles constituye uno de los puntos esenciales de la valoración medioambiental de las explotaciones ganaderas al que se une la emisión de gases y olores (Miner, 1999).

Hasta el momento en España, no se han desarrollado tecnologías de depuración que se adapten al sector porcino, tanto desde el punto de vista funcional como técnico-económico y sean apropiadas a la hora de solicitar la Autorización Ambiental Integrada (Rosario, 2004). La explotación de ganado porcino se incluye dentro de la lista de los sectores de actividad que son fuentes potenciales de vertidos de sustancias que podrían resultar de riesgo para el medio acuático según la Directiva Marco del agua (CONAMA, 2009). Por lo cual se hace importante el tratamiento de los residuos generados por este sector (Directiva Marco del Agua 2000/60/CE).

La aplicación de los humedales artificiales para el tratamiento de las aguas residuales de origen ganadero es relativamente reciente (DuBow y Reaves, 1994; Hunt *et al.*, 1995; Knight *et al.*, 2000; Stone *et al.*, 2004), aunque la cantidad de estudios relacionados con este tema es abundante. En el caso de los residuos porcinos, la mayoría de los humedales artificiales son sistemas de flujo superficial, mientras que solo unos pocos son de tipo subsuperficial (Hunt *et al.*, 1994). Trabajos realizados por Dunne *et al.*, (2005) indican que los humedales artificiales usados para tratar efluentes agroganaderos que causan contaminación sobre el medioambiente pueden reducir o llegar a eliminar el exceso de Nitrógeno.

En la Universidad de León el área de Ecología ha estudiado la eficacia de las combinaciones de humedales artificiales en la depuración de aguas residuales urbanas mediante un Mosaico Jerarquizado de Ecosistemas Artificiales (M.J.E.A.®) a escala real en la localidad de Bustillo de Cea (Ansola *et al.*, 2003; Cortijo *et al.*, 2003; Molleda *et al.*, 2008) y Cubillas de los Oteros, (León) (Cortijo *et al.*, 2005). También se ha estudiado su eficacia como tratamiento terciario de purines de cerdo en Fompedraza, (Valladolid) tras una digestión anaerobia (Cordero *et al.*, 2003).

1.4 MICROBIOLOGÍA DE LAS AGUAS RESIDUALES

Se han publicado, una gran cantidad de estudios sobre la mejora de la calidad microbiológica de las aguas residuales con el uso de humedales artificiales (Falabi *et al.*, 2002; Mandi *et al.*, 1996; Gersberg *et al.*, 1987, 1989a; Reed *et al.*, 1995; Quiñones-Díaz *et al.*, 2001; Graves y Weaver, 2009).

Las aguas residuales además de materia orgánica e inorgánica contiene patógenos excretados en las heces, orina y exudados pulmonares y nasofaríngeos. Una gran variedad de patógenos gastrointestinales pueden ser encontrados en las aguas residuales de origen doméstico incluyendo Bacterias, virus y parásitos (Stott *et al.*, 1997; Morsy *et al.*, 2007).

Las aguas residuales municipales y las aguas residuales industriales, contienen materia orgánica fácilmente biodegradable, químicos orgánicos e inorgánicos, sustancias tóxicas y agentes que causan enfermedades los cuales son frecuentemente descargados en ambientes acuáticos tales como océanos, ríos, lagos, humedales, sin ningún tipo de tratamiento. Esta práctica irregular tiene como consecuencia la contaminación del agua que luego no es útil para el consumo humano, riego, producción de peces o recreo. En áreas rurales y urbanas con densidades de poblaciones muy altas y poco planeadas, la contaminación con agua residual doméstica ocurre a través de la infiltración en los cuerpos de aguas superficiales y subterráneas. La reutilización de las aguas residuales, es una estrategia importante para conservar las fuentes de agua y esta práctica ha sido remitida a países en desarrollo tales como Marrueco, Túnez, Egipto, Sudan, Namibia, India y China, donde las aguas residuales son usadas para el riego de vegetales y otros cultivos y también para el cultivo de peces (Shuval *et al.*, 1986; Kivaisi, 2001). Aunque existe un beneficio económico con respecto al valor como fertilizante que tienen las aguas residuales por la cantidad de nutrientes que presentan, existe también un alto riesgo por la fácil transmisión de enfermedades causadas por las aguas residuales o poco tratadas. Existen evidencias epidemiológicas, sobre la transmisión de enfermedades transmitidas por el agua a través del riego de los alimentos con agua residual no tratada (Shuval *et al.*, 1986; Kivaisi, 2001).

El uso de aguas superficiales como fuentes de agua de bebida, implica un riesgo de transmisión de enfermedades hídricas. Los agentes patógenos, involucrados con la transmisión por esta vía son las Bacterias, virus, protozoos, Helmintos y cianobacterias, que pueden causar enfermedades con diferentes niveles de gravedad, desde una gastroenteritis simple hasta serios y a veces fatales cuadros de diarrea, disentería, hepatitis o fiebre tifoidea.

El agua residual puede contener una amplia variedad de microorganismos potencialmente peligrosos para la salud humana, denominados patógenos.

Los agentes patógenos y los organismos productores de toxinas que pueden estar presentes en aguas superficiales y cuya transmisión hídrica está demostrada se presentan en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Agentes patógenos y organismos productores de toxinas en aguas superficiales. (Fuente: Salgot, 1994).

Bacterias	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>Shigella sp.</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> .
Virus	<i>Enterovirus</i> , <i>Rotavirus</i> , <i>Adenovirus</i> .
Protozoos	<i>Giardia lamblia</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Balantidium coli</i>
Helmintos	<i>Ascaris</i> , <i>Trichuris</i> , <i>Taenia</i> .
Cianobacterias	<i>Anabaena</i> , <i>Mycrocystis</i>

Para establecer tanto la calidad microbiológica de los efluentes obtenidos después de un proceso de depuración como los rendimientos de estos procesos, se utilizan indicadores de contaminación fecal, como Coliformes y Enterococos. Estos microorganismos se utilizan por dos razones principales su identificación y cuantificación es sencilla y económica y, por otro lado, proporcionan información sobre la presencia y el comportamiento de los principales patógenos humanos presentes en las aguas

residuales. Sin embargo, está demostrado que los indicadores bacterianos tienen un limitado, valor predictivo para varios patógenos como el caso de los virus y algunos parásitos que presentan mayor resistencia, tanto a la inactivación natural como a los procesos de tratamiento (Cliver, 1975; Lucena *et al.*, 1988; Bosh *et al.*, 1986, Evanson y Ambrose, 2006; Vera *et al.*, 2006; Gomez-Couso, *et al.*, 2005, Orosz-Coghlan *et al.*, 2006; Sleytr *et al.*, 2007; Payment y Franco, 1993).

La gran variedad de Bacterias patógenas, que pueden encontrarse en el agua residual, la complejidad de las técnicas de enriquecimiento y aislamiento de la mayor parte de estas Bacterias, así como el gasto económico y de recursos humanos, convierten en inviable su determinación rutinaria en el laboratorio. De ahí que se hayan establecido una serie de microorganismos como indicadores. Actualmente los que tienen una mayor aceptación son los Coliformes fecales, *Escherichia coli*, Enterococos y *Clostridium perfringens*.

Los Coliformes, habitan en la región intestinal de los mamíferos y otros animales como parte integrante de la flora intestinal normal. La cantidad de coliformes que una persona tipo elimina diariamente con las heces varía entre 10 y 40×10^6 . Todos los Coliformes pueden existir como organismos saprofitos, es decir, que emplean la materia orgánica producida por otros seres vivos como fuente de materia y energía. Los organismos del genero *Escherichia* tienen procedencia intestinal. La gran cantidad de *E. coli* presente en el tracto digestivo humano, y el hecho de que normalmente no se encuentran en otros ambientes hacen que esta bacteria sea considerada como uno de los mejores indicadores de contaminación fecal disponible. La presencia de esta bacteria en el agua indica una contaminación fecal reciente y la posible existencia de patógenos (Grant *et al.*, 1996).

Clostridium perfringens es una bacteria anaerobia, sulfito reductora, formadora de esporas, que se encuentra en altas concentraciones en las heces humanas y animales. Las esporas de *C. perfringens* son muy resistentes a las condiciones ambientales, además de que las formas vegetativas aparentemente no se multiplican en ambientes acuáticos, razones para considerar a esta bacteria como indicador, muy relacionada con la presencia de virus y protozoos.

En la Tabla 1.2, se pueden observar los principales agentes infecciosos en las aguas residuales domésticas y las enfermedades a que pueden dar lugar.

Las Bacterias que se encuentran, con mayor frecuencia en el agua son las Bacterias entéricas que colonizan el tracto gastrointestinal del hombre y son eliminadas a través de la materia fecal. Dentro de estas Bacterias se pueden encontrar especies del género *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Acrobacter*, etc. Sin embargo, en el agua residual también pueden aparecer Bacterias causantes de enfermedades no entéricas (*Legionella*, *Mycobacterium*, *Leptospira*, etc.). Existe otro tipo de Bacterias, no patógenas (*Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Streptococcus*, etc.) que también pueden producir, en ocasiones, enfermedades de tipo “oportunistas”, sobre todo en aquellas personas cuyos mecanismos de defensa naturales, locales o generales, se hallan disminuidos (Ashbolt *et al.*, 1995).

Los protozoos patógenos para el hombre se encuentran en el agua, como formas de resistencia (quiste y ooquistes) que consiste en una envoltura muy impermeable que les hace resistir las condiciones adversas. Los protozoos son organismos microscópicos, unicelulares con un complejo ciclo de vida que pasa por diferentes estadios y en ocasiones por diferentes hospedadores o hábitat. En el tracto digestivo de gran parte de la población humana coexisten varios protozoos que incluyen amebas, flagelados, coccidios y ciliados. Las especies de protozoos patógenos más comunes son: *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba hartmanni*, *Dientamoeba fragilis*, *Balantidium coli*, *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium parvum*. La principal vía de transmisión de todos estos parásitos es a través de la ruta fecal-oral por contacto directo o indirecto con las formas de resistencia de estos parásitos, incluyendo la transmisión persona a persona, la zoonótica y sobre todo, la asociada al consumo de agua contaminada (Solarte *et al.*, 2006).

Tabla 1.2 Principales microorganismos patógenos presentes en el agua residual. (Fuente: Salgot, 1994).

Microorganismo Patógeno	Enfermedad Causada
Bacterias	
<i>Salmonella Typha</i>	Fiebre tifoidea
<i>Salmonella sp.</i>	Salmonelosis
<i>Shigellae sp.</i>	Disentería bacilar
<i>Escherichia coli</i>	Gastroenteritis, diarreas
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera
<i>Campylobacter jejuni</i>	Diarreas
<i>Legionella sp.</i>	Legionelosis
<i>Yersinia enterocolítica</i>	Diarrea, fiebre y vómito
Virus	
<i>Enterovirus</i> (Echovirus, Coxsackie A y B, Poliovirus)	Gastroenteritis, meningitis, poliomiелitis etc.
Virus de la Hepatitis A (VHA)	Hepatitis A
Virus de la Hepatitis E (VHE)	Hepatitis E
<i>Rotavirus</i>	Gastroenteritis
<i>Calicivirus</i>	Gastroenteritis
<i>Agente de Norwalk</i>	Gastroenteritis
Protozoos	
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Cryptosporidiasis
<i>Giardia lamblia</i>	Giardiasis
<i>Etmamoeba histolytica</i>	Amebiasis (disentería amibiana)
<i>Balantidium coli</i>	Balantidiasis
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Gastroenteritis, diarreas
Helmintos	
<i>Ascaris Lumbricoides</i>	Ascariasis
<i>Trichuris trichiuriura</i>	Trichuriasis
<i>Taenia solium</i>	Taeniasis
<i>Strongyloides stercoralis</i>	Strongiloidiasis (anguilulosis humana)
<i>Ancylostoma duodenale</i>	Ancylostomiasis humana
<i>Fasciola hepática</i>	Distomatosis hepáticas
<i>Toxocara canis</i>	Toxocariasis
<i>Hymenolepis sp.</i>	Gastroenteritis

Estos parásitos han sido responsables de numerosos brotes infecciosos transmitidos por el agua debido en parte a su baja dosis infectiva necesaria para adquirir la enfermedad (10 quistes para *Giardia*) y a su elevada resistencia a los desinfectantes comúnmente utilizados en las plantas de tratamiento de agua residual, siendo *Cryptosporidium* más resistente a estos que *Giardia* (Cacció *et al.*, 2005 y Solarte *et al.*, 2006).

Dentro de los protozoos patógenos, los que presentan mayor importancia en cuanto a la calidad del agua son los pertenecientes al género *Giardia* y *Cryptosporidium*. Los quistes de *Giardia*, se mantienen viables en el agua entre 1 y 3 meses. La alta resistencia de los quistes de *Giardia* a los desinfectantes y su baja dosis infectiva (10

quistes) hacen que el agua sea uno de los principales vehículos de transmisión (Vera *et al.*, 2006; Gomez-Couso *et al.*, 2005).

Los ooquistes de *Cryptosporidium*, son más resistentes a los desinfectantes y pueden causar severos brotes infecciosos (Vera *et al.*, 2006; Liberti *et al.*, 2002; Bonadonna *et al.*, 2002; Ottoson *et al.*, 2006; Reinoso *et al.*, 2008).

El género *Cryptosporidium* se incluye en el Phylum *Apicomplexa*, clase *Sporozoasida*, subclase *Coccidiasina*, orden *Eucoccidiorida*, suborden *Eimeriorina* y familia *Cryptosporidia*. De las 15 especies de *Cryptosporidium* descritas, dos infectan mayoritariamente a los humanos, *C. parvum* y *C. hominis*, aunque otras especies o genotipos pueden afectarlos minoritariamente, *C. felis*, *C. canis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. suis*. *Cryptosporidium* presenta varios estadios en su ciclo de vida, entre los cuales está el ooquiste, que es una etapa latente que resiste las condiciones ambientales. Los ooquistes tienen forma ovoide con 4 esporozoitos vermiformes sin esporocistos y tamaño entre 4,5 y 8 μm . Este parásito puede causar infecciones intestinales tanto en humanos como en animales y no requiere de huéspedes intermediarios. Se multiplica en el intestino delgado y origina serios problemas en los mecanismos de absorción, pues genera una diarrea aguda que es autolimitada en adultos sanos (*Cryptosporidiosis*). También se considera el parásito más importante en la industria del agua, junto con *Giardia* sp., porque se le relaciona como agente etiológico responsable de un número importante de epidemias en diversas partes del mundo (Karanis *et al.*, 2007).

En la Figura 1.3, se puede observar el ciclo biológico de *Cryptosporidium*. La vía de infección a los humanos es fecal-oral. Los ooquistes esporulados, que contienen cuatro esporozoitos, son excretados por el huésped infectado a través de las heces y posiblemente otras rutas, tales como las secreciones respiratorias (1). La transmisión de *C. parvum* y *C. hominis* se produce principalmente por contacto con agua contaminada aunque en ocasiones, las fuentes de alimento también pueden servir como vehículos de transmisión (2). Después de la ingestión (y posiblemente de la inhalación) por un huésped adecuado (3), se produce la desenquistación (a). Los esporozoitos son liberados y parasitan las células epiteliales del tracto gastrointestinal u otros tejidos tales como el sistema respiratorio (b) y se diferencian en trofozoitos (c). El ataque al epitelio intestinal

conduce a una mala absorción y en pacientes inmunocompetentes a diarrea acuosa, no sanguinolenta. En estas células, los parásitos realizan la reproducción asexual (esquizogonia o merogonia) según el esquema: trofozoito » meronte tipo I » merozoito » meronte tipo II » merozoito » gamonte indiferenciado (d, e, f) y a continuación la reproducción sexual (gametogonia) produciendo microgamontes masculinos (g) y macrogamontes femeninos (h). El macrogamonte es fertilizado por los microgametos, dando lugar a un cigoto (i) y formándose un ooquiste (j, k) que se desarrolla por esporulación en el huésped infectado. Se producen dos tipos diferentes de ooquistes, unos de paredes gruesas (j), que es usualmente excretado por el huésped, y otros de paredes finas, cuyo objeto primario es la autoinfección (k). Los ooquistes son infecciosos después de la excreción, lo que permite una transmisión directa e inmediata por vía fecal-oral.

El género *Giardia* se incluye en el phylum *Sarcomastigophora*, subphylum *Mastigophora*, clase *Zoomastigophorea*, orden *Diplomonadida*, familia *Hexamitidae* que incluye solamente este género: *Giardia*. En este género se admiten diferentes especies, dependiendo de los criterios empleados por los diferentes autores. Siguiendo el criterio de especificidad del hospedador (Kulda y Nohynkova, 1996) se han descrito 41 especies diferentes; sin embargo, de acuerdo con el morfológico de disposición de las estructuras microtubulares presentes en los cuerpos medios de los trofozoítos (Erlandsen *et al.*, 1990), se admiten tres grupos de especies: *Giardia agilis*, *Giardia muris* y *Giardia intestinalis (duodenalis o lamblia)*, estando solamente este último grupo asociado con enfermedad en el hombre. A las cepas de procedencia exclusivamente humana se les denomina especies de *G. lamblia*, para diferenciarlas de aquellas de origen animal, pero que pueden infectar al hombre, conocidas como especies de *G. intestinalis* o *G. duodenalis*.

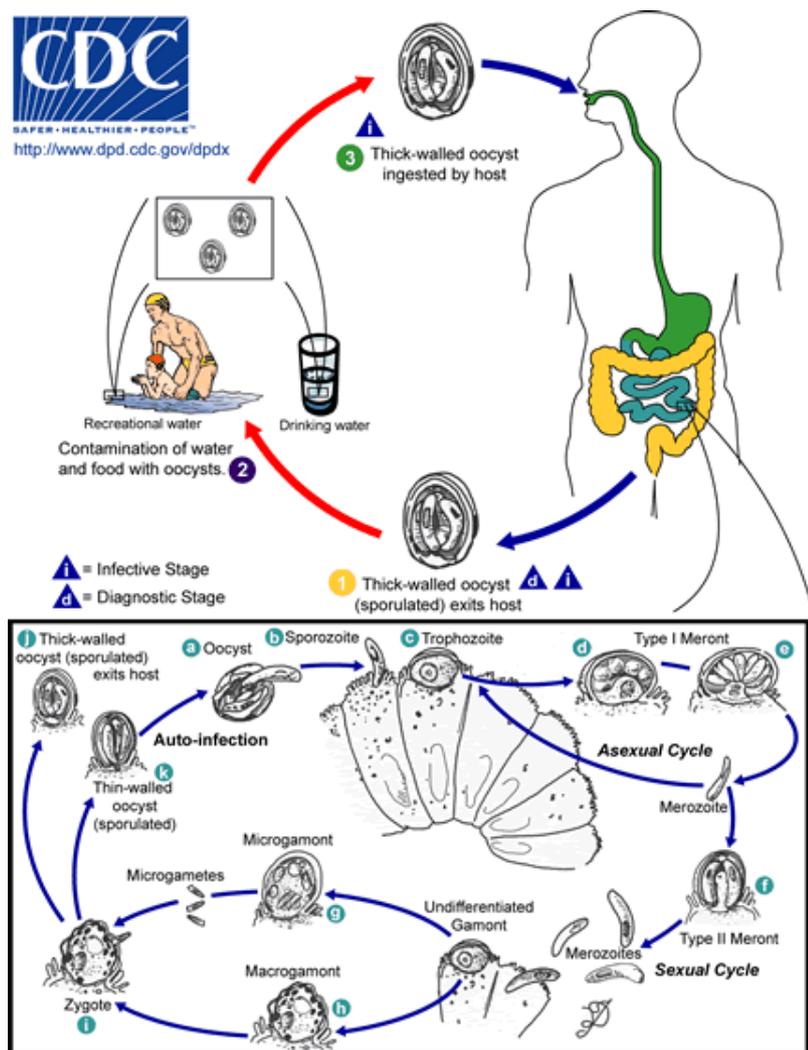


Figura 1.3. Ciclo de vida de *Cryptosporidium parvum*. (Fuente: www.dpd.cdc.gov/dpdx. 2004-2010).

Este parásito presenta dos fases en su ciclo de vida, el trofozoíto (forma vegetativa) cuyo hábitat es el intestino delgado, siendo responsable de las manifestaciones clínicas, y el quiste (forma de resistencia e infecciosa) responsable de la transmisión del parásito, con un tamaño de 15 μm de longitud y 10 μm de anchura, una morfología ovalada y 4 núcleos que siempre aparecen dispuestos en alguno de los polos. El principal modo de transmisión de este patógeno es la ruta fecal-oral, y los niños de las guarderías, escuelas y personas inmunosuprimidas son los grupos que presentan el riesgo más alto de contraer la infección. La patología originada por *G. lamblia* (giardiasis) se debe principalmente a los efectos que causan la acción mecánica de adherirse y fijarse al epitelio intestinal. Dichos efectos producen una alteración de las microvellosidades, que

disminuyen su superficie de exposición al ser engrosadas, y esto conlleva la aparición de diversas alteraciones fisiológicas más o menos graves, según el mayor o menor deterioro del proceso de absorción, como dolores estomacales, diarrea, náuseas, fatiga, ardor epigástrico y otros síntomas compatibles con úlcera o gastritis.

En la Figura 1.4, se representa el ciclo biológico de *Giardia lamblia*. Este parásito vive en forma de trofozoíto en la luz del intestino delgado (principalmente en el duodeno) adherido a las vellosidades intestinales por medio de discos bilobulados. Se alimenta y se reproduce hasta que el contenido intestinal inicia el proceso de deshidratación, momento en el que comienza el enquistamiento del trofozoito: pierde los flagelos, adquiere una morfología ovalada y se rodea de una pared quística (5). Los quistes expulsados junto a las heces ya son infecciosos (1). Cuando dichos quistes son ingeridos por un nuevo hospedador (2), llegan al duodeno, donde se disuelve la pared quística (3), dando así lugar a un individuo tetranucleado que se divide inmediatamente en dos trofozoitos binucleados que se anclan al epitelio intestinal (4), cerrando así su ciclo vital.

Los Helmintos son parásitos de personas y animales que pueden agruparse en dos Phyla: Phylum Plathelminthes o gusanos planos y Phylum Nematodo o gusanos redondos.

Los platelmintos son gusanos segmentados que presentan una morfología aplanada y órganos de fijación en forma de ventosas o ganchos. Entre los platelmintos existen dos grupos de interés en patología humana, los trematodos (*Fasciola hepática*, *Shistosoma haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum*, etc.) y los cestodos (*Taenia solium*, *T. saginata*, *Hymenolepis nana*, *H. diminuta*, etc.).

Por el contrario, los nematelmintos (nemátodos) son gusanos de morfología cilíndrica, no segmentados y de tamaño muy variable (1 mm - 50 cm). Existen diversos nematelmintos parásitos del hombre como *Enterobius vermicularis*, *Acaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Trichuris trichiura*, *Trichinella spiralis*, diversas especies de filarias, etc.

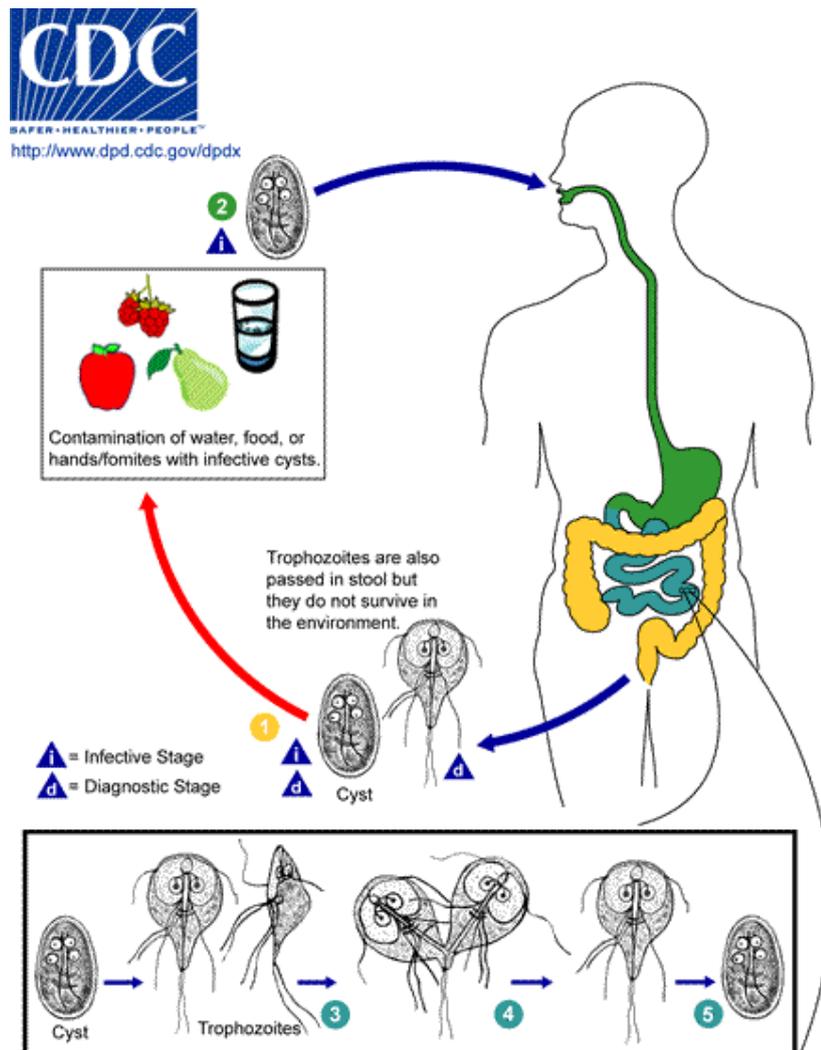


Figura 1.4. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*. (Fuente: www.dpd.cdc.gov/dpdx 2004-2010).

Las características epidemiológicas, que hacen de los Helmintos patógenos entéricos causantes de infección por contacto con agua contaminada son su alta persistencia en el medio ambiente, la mínima dosis infecciosa, la baja respuesta inmune y la capacidad de permanecer en el suelo o agua por largos periodos de tiempo (Khuroo, 1996). Las manifestaciones de la enfermedad por Helmintos varían conforme el tipo y forma de desarrollo del parásito. Aunque la forma madura (adulta) de la mayor parte de los Helmintos no produce enfermedad grave, los huevos y larvas de algunos causan alteraciones que ponen en peligro la vida del enfermo. Las parasitosis intestinales causadas principalmente por nematodos (ascariosis, tricurosis, anquilostomosis) y algunos cestodos (teniosis) presentan una distribución cosmopolita muy ligada al nivel y

el estado de las infraestructuras de saneamiento de la zona, y en particular a la práctica de utilizar aguas residuales sin depurar, o insuficientemente depuradas, para riego agrícola. La distribución de estas parasitosis es amplia, aunque desigual en el mundo, presentando una prevalencia y unas tasas de morbilidad mayores en las áreas tropicales y subtropicales propias de países en desarrollo y con claras deficiencias en el saneamiento urbano.

1.5 OBJETIVOS

1.- Determinar la eficiencia de eliminación de organismos patógenos, microorganismos indicadores y contaminantes físico-químicos de un sistema de depuración de agua residual urbana a escala real formada por un humedal artificial de tipo Mosaico Jerarquizado de Ecosistemas Artificiales (M.J.E.A.[®]).

2.- Determinar la eficiencia, de eliminación de microorganismos indicadores y contaminantes físico-químicos de un sistema de depuración de agua residual ganadera a escala piloto de una granja porcina formado por un humedal artificial de tipo Mosaico Jerarquizado de Ecosistemas Artificiales (M.J.E.A.[®]).

1.5.1 Objetivos específicos:

1-Analizar la presencia de microorganismos indicadores de contaminación fecal tales como *E. coli*, Coliformes totales, *Streptococos* fecales y *Clostridium perfringens*.

2-Analizar la disminución de los diferentes microorganismos indicadores estudiados a lo largo de los diferentes puntos de muestreo para determinar la eficacia depuradora.

3-Observar la presencia de huevos de Helminths, quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium*.

4-Determinar la existencia o no de diferencias significativas en la reducción de contaminantes durante un periodo frío y otro cálido.

5-Determinar la existencia o no de correlación entre las variables biológicas y los contaminantes físico-químicos analizados trabajando a 3 cargas diferentes de Nitrógeno

6- Determinar la viabilidad de los huevos de Helmintos identificados.

7- Evaluar, en función de los resultados encontrados, la posibilidad de poner en práctica este sistema de depuración a escala real para resolver los problemas de residuos generados por granjas porcinas.

2 DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

2.1 SITUACIÓN GEOGRÁFICA DE BUSTILLO DE CEA

Bustillo de Cea es una localidad situada en el sureste de la provincia de León (España) (Figura 2.1). Sus coordenadas UTM son 30T 333514 47044. Es un núcleo de población que durante el período invernal no excede de los 250 habitantes equivalentes, llegándose a alcanzar un total de 561 habitantes equivalentes (según CONAMA) en pleno verano. Es una localidad donde la actividad predominante es agrícola, con cultivos de cereal como son el trigo, centeno, cebada y maíz, aunque también existen pequeñas explotaciones familiares de ganadería, predominando el ganado vacuno sobre el ganado ovino.

En Bustillo de Cea se construyó un sistema de depuración de tipo Mosaico Jerarquizado de Ecosistemas Artificiales (M.J.E.A. [®]) a escala real. Este tipo de depuración se puso en práctica debido a la escasa capacidad financiera de los pequeños municipio como el de Cea para resolver los problemas que generan la contaminación creciente de los ríos causada por los vertido de las aguas residuales, también por la fácil disponibilidad de terrenos rurales de escaso valor, a las optimas condiciones climáticas que benefician la implantación y funcionamiento de este tipo de sistema, a la posibilidad de ser atendida por mano de obra no tecnificada abaratando en gran medida los costes de mantenimientos. Con los objetivos de conseguir una depuración que respondiera con las exigencias de la Directiva Europea 91/271, que fuera fácilmente gestionado por el ayuntamiento de Cea, que causara el menor impacto posible sobre la población del municipio y que la estructura física del sistema se integrara de forma plena en el entorno que la rodea.

Para conseguir una depuración que respondiera con las exigencias de la Directiva Europea 91/271, se propuso este sistema de tratamiento integral de agua a escala real, el cual esta compuesto por un pretratamiento físico en dos etapas y tres balsas conectadas en serie.

Durante los últimos años el equipo de investigadores del Área de Ecología de la Universidad de León, que en la actualidad realiza su actividad a través del “Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad”, viene desarrollando proyectos de investigación sobre depuración de aguas residuales con sistemas tecnológicos blandos. La aplicación práctica de la investigación se ha concretado en la construcción

de la depuradora de Bustillo de Cea. Dicha investigación está financiada por la Diputación Provincial de León. El sistema de depuración utilizado se basa en el tratamiento natural de las aguas residuales con la intervención de plantas acuáticas superiores (micrófitos) en humedales artificiales. Los resultados son muy satisfactorios, ya que se obtienen unos niveles de depuración óptimos con bajos costes de explotación y mantenimiento.

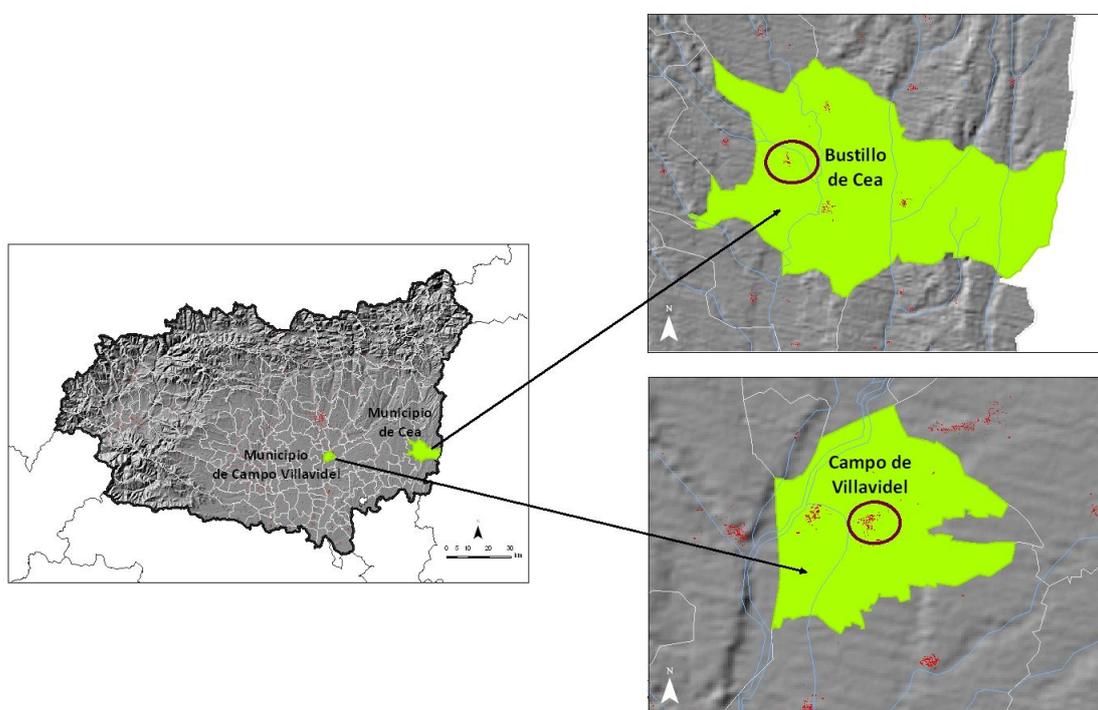


Figura 2.1. Situación Geográfica de Bustillo de Cea y Campo de Villavidel

2.2 DESCRIPCIÓN DEL MOSAICO JERARQUIZADO DE ECOSISTEMAS ARTIFICIALES (M.J.E.A. ®) A ESCALA REAL

En Bustillo de Cea la depuradora ocupa una superficie de 890 m². El diseño de este humedal artificial está inspirado en el sistema denominado Mosaico Jerarquizado de Ecosistemas Artificiales (M.J.E.A. ®) (Figuras 2.2 a 2.7), desarrollado en Bélgica (Radoux y Kemp, 1982) y busca aprovechar y aplicar las distintas adaptaciones de las plantas acuáticas a la depuración del agua residual. (Ansola *et al.*, 2003; Ansola *et al.*, 1995).

El pretratamiento del sistema (Figura 2.2) esta compuesto por dos etapas conectadas en serie y un distribuidor. El agua residual procedente tanto del núcleo de población como de las explotaciones ganaderas, entra en un primer tanque (primera etapa del pretratamiento) compuesto por tres compartimentos, dos en paralelo y uno transversal. En el primero de ellos el agua de entrada reduce su velocidad, lo que favorece la eliminación de elementos sólidos y material en suspensión por efectos de la gravedad, al reducirse la velocidad del flujo de entrada los materiales son eliminados por sedimentación.

De este primer compartimento el agua pasa por vasos comunicantes situados por debajo del nivel superficial del agua a un segundo compartimento paralelo, lo que impide el paso de elementos flotantes. En este compartimiento también se eliminan materiales en suspensión por efecto de la gravedad. Además, esta equipado con un primer juego de rejillas, lo que nos asegura en mayor medida, el efecto de las vasos comunicantes para que no pase ningún elemento flotante al compartimento. El agua pasa a la segunda etapa del pretratamiento que consiste en dos vías paralelas de diez metros de longitud. Cada vía esta equipada con dos juegos de rejillas, el primero más ancho y el segundo más estrecho, que retienen definitivamente cualquier elemento sólido que se pueda haber escapado de la primera etapa del pretratamiento. Después de estos juegos de rejillas cada vía vuelve a aumentar su profundidad para detener la velocidad del flujo y generar de nuevo las condiciones apropiadas para la eliminación de las partículas sólidas más pequeñas por sedimentación. Ocupa una superficie total de 90 m².

Por último, el agua llega a un distribuidor (Figura 2.3), donde se selecciona cual va a ser el primer tratamiento que se va a realizar al agua pretratada. Está compuesto por tres cubetas cuadradas de hormigón del mismo tamaño, equipadas con una tajadera cada

una. La cubeta central envía al agua a la balsa número uno, la situada a su izquierda distribuye el agua hacia la balsa número dos y por último, la cubeta del extremo derecho canaliza el agua hacia la balsa número tres.

A partir de este pretratamiento, el agua entra en el sistema de balsas, el cual está constituido por cuatro ecosistemas a modo de ecosistemas acuáticos artificiales que funcionan en serie.

El primero de los ecosistemas que configuran el MJEA[®], es una laguna que reconstruye un ecosistema acuático con micrófitos (Figura 2.4). La superficie de agua en la cota normal es de 230 m², el volumen admisible hasta esta cota es de 217,5 m³ y el volumen de efluente en la cota normal de funcionamiento de 156,5 m³. La profundidad de la laguna es variable, oscilando entre 1,5 m en la zona de entrada del agua; 0,5 m en la zona central y 1 m en la zona de salida del agua. Este juego de profundidad, combinado con un diseño arriñonado, confiere a esta primera laguna un flujo hidráulico óptimo, reduciendo al máximo las zonas de remansos que entorpecerían el proceso de depuración. Desde aquí, y por la zona menos profunda el agua entra en la segunda laguna o balsa.

El agua que sale de la primera balsa, entra en una segunda cubeta de 220 m² (superficie en la cota de relleno de sustrato), el volumen de efluente en la cota normal es de 100,87 m³ y el volumen admisible total hasta la cota máxima de 181,92 m³. A esta balsa han sido transplantados 15 individuos de *Typha latifolia* por metro cuadrado intentando así potenciar la capacidad de los macrófitos para la eliminación de la contaminación. Los helófitos han sido transplantados de su ambiente natural sobre una capa de sustrato inerte. Sobre el mismo, existe una capa de agua de unos 25 cm, siendo el flujo hidráulico de tipo superficial (Figura 2.5).

El tercer ecosistema reconstruye al igual que la segunda balsa, un sistema semiacuático con flujo superficial. En este humedal se realizó una plantación de *Iris pseudacorus* con la misma densidad que en la anterior. Su superficie es de 87,5 m², el volumen de efluente en la cota normal es de 11,4 m³ y el volumen admisible total hasta la cota máxima es de 52,5 m³. Seguida a esta etapa se ha construido un humedal de flujo subsuperficial horizontal. Se ha realizado una plantación de *Salix atrocinerea*, sobre un

sustrato de grava de tamaño entre 20 y 60 mm ocupando una superficie de 362,5 m² (Figura 2.6).

El caudal medio del agua residual ha sido de 73,3 m³ por día y el tiempo de retención hidráulica medio (TRH) de 13 días. El agua residual ha presentado una Temperatura media de 14,94°C, conductividad de 867,6 µS/cm., oxígeno disuelto (OD) de 2,27 mg/l. Una demanda biológica de oxígeno media (DBO₅) de 155 mgO₂/l y 53,96 mg N/l en forma de (N-NH₄⁺).



Figura 2.2. Etapa de Pretratamiento de la depuradora de tipo MJEA[®] de Bustillo de Cea.



Figura 2.3. Distribuidor la depuradora de tipo MJEA[®] de Bustillo de Cea.



Figura 2.4. Laguna de micrófitos la depuradora de tipo MJEA[®] de Bustillo de Cea.



Figura 2.5. Balsa con *Typha latifolia* y flujo hidráulico superficial. De la depuradora de tipo MJEA[®] de Bustillo de Cea. (Vista de la entrada).



Figura 2.6. Vista general de la Balsa con *Typha latifolia* y flujo hidráulico superficial. De la depuradora de tipo MJEA[®] de Bustillo de Cea.



Figura 2.7. Etapa con *Iris pseudacorus* (flujo superficial) y *Salix atrocinerea* con flujo subsuperficial. De la depuradora de tipo MJEA[®] de Bustillo de Cea.

2.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y FÍSICO-QUÍMICO

2.3.1 Método Analítico

Las muestras de agua fueron recogidas cada 15 días durante dos periodos vegetativos completos y también se realizaron muestreos estacionales durante verano, otoño, invierno y primavera. Se tomaron las muestras en cuatro puntos (Figura 2.8), P1 (Afluente), P2 (laguna de micrófitos), P3 (Balsa con *Typha latifolia*), P4 (Efluente). El análisis microbiológico fue realizado 6 horas después de tomar las muestras de agua.

La determinación de *E. coli*, Coliformes totales (C.T.) y Estreptococos fecales (E.F.) se realizó por filtración de membrana (Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 2005) (con filtro de nitrato de celulosa de tamaño 0,45 μm , Millipore) sembrando en medio de cultivo chromocult agar (Merck), selectivo para la detección simultanea de *E. coli* y C.T. (Frampton *et al.*, 1998; Sleytr *et al.*, 2007) mientras que para E.F. se utilizó medio Streptosel Broth (Merck) como medio selectivo para el

crecimiento de *Streptococcus* en muestras clínicas (Method 9230C A.P.H.A., 2005). *Clostridium* se determinó por shock térmico sembrando en medio de SPS agar (Angelotti, R. *et. al.*, 1962).

Para la determinación de los huevos de Helminths se tomaron 10 litros de agua residual de cada uno de los puntos de muestreo y se siguió el procedimiento de la organización mundial de la salud (WHO, 1989), siendo observados en cámara de Mac Master.

Para la determinación de los quistes de *Giardia* y los ooquistes de *Cryptosporidium*, se tomaron 10 litros de agua residual de cada uno de los puntos de muestreo y se siguió el procedimiento de la USEPA, 1993, siendo observados los quistes de *Giardia* y los ooquistes de *Cryptosporidium* por inmunofluorescencia usando los Kits de anticuerpos de Waterborne, Inc.

Los parámetros físico-químicos (DBO_5 , N-NH_4^+ y PT) fueron analizados siguiendo el Standard Methods para el análisis de agua y agua residual (methods: 5210 B, 4500 N-org B, 4500-P B y E respectivamente) (APHA, 2005).

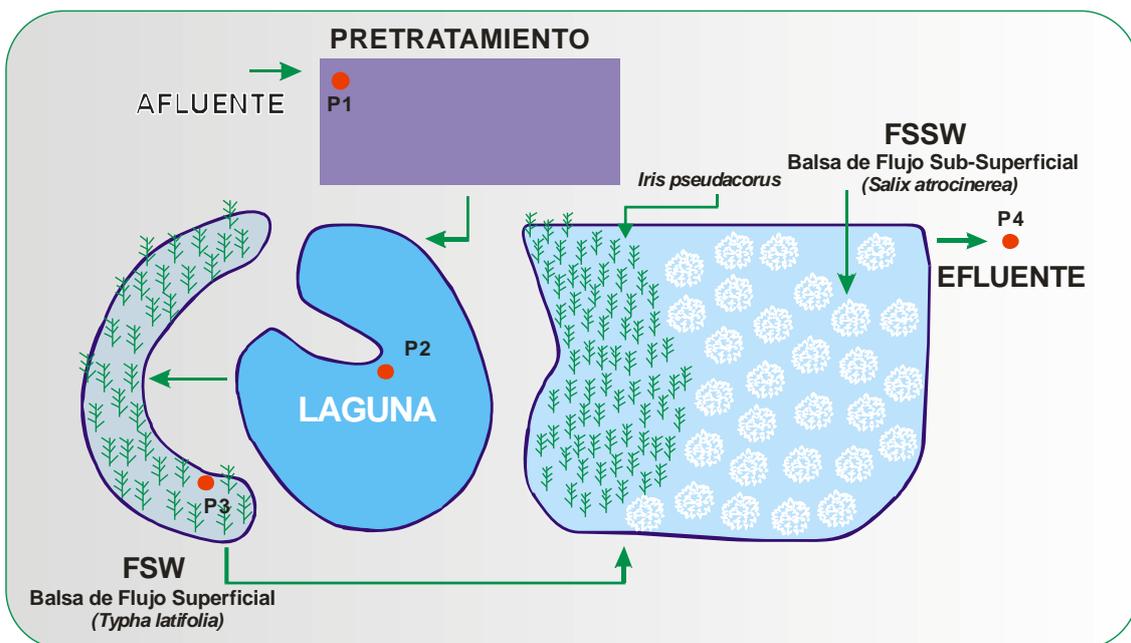


Figura 2.8. Esquema del sistema de depuración de Bustillo de Cea. Puntos de muestreo del agua.

2.3.2 Análisis de los datos

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo según el paquete STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., 2001). Con el objeto, de determinar la existencia de diferencias significativas en la eliminación de los parámetros analizados en las diferentes etapas del sistema y en los distintos periodos estacionales, se ha realizado un ANOVA de una vía con los datos transformados $[\log(x+1)]$ ya que no presentaban homocedasticidad aplicando como post-hoc el Test de Tukey (HSD, honestly significant different). A su vez, se ha realizado un análisis de correlación de Spearman, con los datos sin transformar para determinar la correlación entre los parámetros físico-químicos y microbiológicos. La significación estadística utilizada ha sido: $p < 0,05$.

2.4 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS HUEVOS DE HELMINTOS

2.4.1 Método Analítico

Se realizaron muestreos de lodos del sistema de tratamiento de Bustillo de Cea para determinar la presencia y viabilidad de huevos de Helmintos. Las muestras de lodos fueron tomadas: 1 en el pretratamiento y 2 en la laguna de micrófitos. En la laguna de micrófitos se tomo una muestra a la entrada donde la profundidad es de 1,5 metros y a la salida a 1 metro de profundidad. Es importante destacar que el lodo del pretratamiento es extraído anualmente y desde hace 9 años no se han extraído los lodos de la laguna de micrófitos (Figura 2.9).

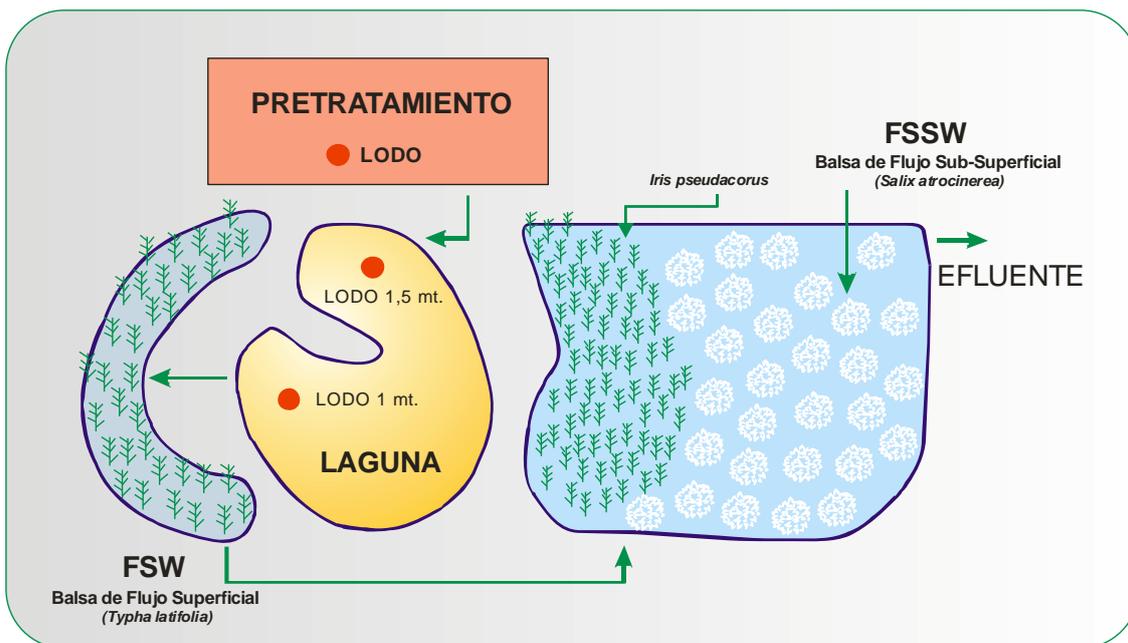


Figura 2.9. Esquema del sistema de Bustillo de Cea, puntos de muestreo de lodo

2.4.2 Concentración de huevos de Helmintos

Se ha utilizado el método de Bailenger (1979) modificado, reconocido por la OMS (WHO, 1989) y mejorado por Gaspard, *et al.*, (1997), con los siguientes pasos:

Se tomaron 100 ml de fango en un vaso de 500 ml. Se añadieron 200-300 ml de agua destilada y posteriormente 8-10 gotas de Triton-X100. Se agitó durante 30 min. El sobrenadante se eliminó por decantación y se recogieron 100 ml de sedimento. Se sometió a centrifugación a 3.500 rpm durante 15 minutos y se desechó el sobrenadante para conservar el sedimento con los huevos.

Se centrifugó de nuevo a 3.500 rpm durante 15 minutos. El sedimento, se resuspende en cinco volúmenes de solución saturada de sulfato de zinc (al 33%) y se toman 10 ml superficiales de cada tubo para constituir una muestra única.

Una porción del producto (1 ml aproximadamente) se transfiere a una cámara Mc Master, utilizando una pipeta automática, con cuidado de que no se formen burbujas. Se deja reposar durante 5 minutos y se observa al microscopio utilizando el objetivo de 20X para contar los huevos.

2.4.3 Viabilidad de los huevos de Helmintos

Para el estudio de la viabilidad de huevos de Helmintos en lodos, se han comparado métodos de incubación, para que los huevos se desarrollen aeróbicamente desde el estado unicelular hasta la etapa larvaria, cuyas diferencias estriban, básicamente en la preparación de la muestra previa a la incubación.

El método más apto utilizado ha sido el de tamizado-incubación desarrollado por Gaspard *et al.* (1997), que consta de los siguientes pasos:

Pesar aproximadamente 10 g de materia seca, filtrar con malla metálica de 1mm, ayudado de 1 litro de agua de lavado, tamizar en tamiz de 100 micras de poro. Lavar con 10 litros de agua destilada para hacer fluir los huevos absorbidos en la materia orgánica. Recuperar el filtrado que contiene huevos de Helmintos de tamaño menor de 100 micras, en bidón y dejar sedimentar mínimo 3 horas. Recoger el sedimento, incubar la suspensión en estufa durante 20 días a 30°C con flujo continuo de aire. Extraer y contar huevos de Helmintos en estado larvario mediante el método modificado de Bailenger (1979) descrito anteriormente.

2.5 MOSAICO JERARQUIZADO DE ECOSISTEMAS ARTIFICIALES (M.J.E.A.®) A ESCALA PILOTO

El sistema de tratamiento de tipo Mosaico Jerarquizado de Ecosistemas Artificiales (MJEA®) a escala piloto, ha sido construido en un Centro tecnológico de inseminación artificial porcina (CENTROTEC). Se encuentra a unos 20 Km al Sureste de la capital leonesa, concretamente en el término municipal de Campo de Villavidel (Figura 2.1).

Este centro atiende a los más modernos criterios de bioseguridad y bienestar animal, tiene una capacidad para 120 verracos donantes de semen, conveniente e individualmente identificados, mas otras 30 plazas, separadas adecuadamente de las anteriores en una nave que actúa de cuarentena y lazareto, donde permanecen los sementales a su llegada, al menos dos meses, y donde se aclimatan y se comprueba su estado sanitario, mediante vigilancia clínica y serológica, antes de introducirlos en la nave principal. Su producción seminal tiene previsto atender anualmente, mediante

inseminación artificial, a la reproducción de unas 40.000 a 60.000 madres reproductoras.

Los suelos de las naves tienen unas ranuras que permiten el almacenamiento de los residuos en unos fosos de medio metro de profundidad. Estos residuos incluyen tanto los excrementos de los animales como el agua empleada para su lavado. Bajo la nave principal hay un total de cuatro fosos independientes que son evacuados aproximadamente cada tres meses, y que van a dar a una balsa de purines que se encuentra en el exterior del recinto. También a esta fosa llegan los residuos procedentes de la nave de cuarentena y lazareto. El purín es extraído regularmente por un servicio para su gestión.

2.5.1 Descripción del área de estudio

El agua residual es extraída de la laguna de pretratamiento y posteriormente el agua es bombeada a un tanque de sedimentación (P1) de 1m^3 que sirve como tratamiento primario donde el caudal y la carga de Nitrógeno total (NTK) son ajustados. De aquí, el agua pasa a un humedal plantado con *Typha latifolia* y flujo superficial (P2) y a otras dos cubetas con flujo subsuperficial plantadas con *Salix atrocinerea* (P3 y P4), todas ellas ubicadas en serie (Figura 2.10).

El sistema de tratamiento está constituido por una fosa que cumple las funciones de laguna de pretratamiento donde es almacenada el agua de la granja de cerdos. Se colocó un tanque de sedimentación y tres balsas, una de flujo superficial con *Typha latifolia* y dos con flujo subsuperficial con *Salix pseudacorus*. (Figura 2.11 a 2.13).

El caudal medio de entrada al sistema es de 180 litros al día y el tiempo de retención hidráulica (TRH) de 16 días en una superficie total de $13,62\text{ m}^2$. Los valores medios del agua de entrada al sistema son: $17,25\text{ }^\circ\text{C}$ de Temperatura, $1,33\text{ mgO}_2/\text{l}$ de oxígeno disuelto, $110,02\text{ mgO}_2/\text{l}$ de (DBO_5) y $158,83\text{ mg N/l}$ en forma de Amonio (N-NH_4^+).

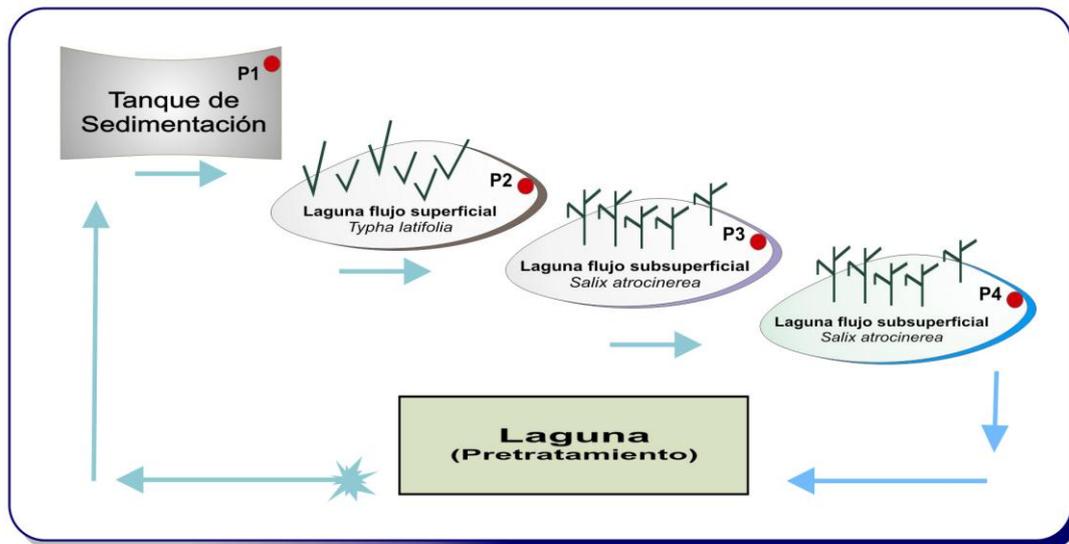


Figura 2.10. Esquema del sistema de depuración piloto de Centrotec.



Figura 2.11. Laguna de pretratamiento o Balsa de almacenamiento de los purines. Del sistema de depuración piloto de Centrotec.



Figura 2.12. Tanque de dilución y primera balsa con *Typha latifolia* y flujo superficial. Del sistema de depuración piloto de Centrotec.



Figura 2.13. Sistema completo: tanque de dilución, balsa con *Typha latifolia* y flujo superficial y las dos siguientes con *Salix atrocinerea* y flujo subsuperficial. Del sistema de depuración piloto de Centrotec.

2.5.2 Método Analítico

Los muestreos (68 - 76 muestras de cada punto) han sido realizados teniendo en cuenta el TRH de cada fase del sistema a lo largo del periodo vegetativo anual (Figura 2.10). Se tomaron 250 ml de muestra en cada punto utilizando como variable tres cargas diferentes de Nitrógeno: 2,34 g NTK /m²d; 2,49 g NTK /m²d y 3,39 g NTK /m²d realizando los análisis microbiológicos durante las seis horas posteriores al muestreo.

El análisis de *E. coli*, Coliformes totales (C.T.) y Estreptococos fecales (E.F.) fue realizado mediante la técnica de membrana filtrante (usando un filtro de nitrato de celulosa de 0,45 µm tamaño de poro, Millipore).

Las Bacterias aerobias (B.A.), fueron analizadas mediante aislamientos en agar nutritivo (Merck) con cicloheximida, usando una Temperatura de 37°C para su crecimiento. El medio de cultivo chromocult agar (Merck) fue seleccionado para la detección simultanea de *E. coli* y C.T. (Framton *et al.*, 1998; Sleytr *et al.*, 2007), mientras que SF Streptosel Broth (Merck) fue usado como medio de crecimiento selectivo para los E.F. (Método 9230C A.P.H.A., 2005).

El análisis de *Clostridium*, fue llevado a cabo a través de un shock térmico en medio de SPS agar (Merck) (Angelotti *et al.*, 1962).

Los parámetros físico-químicos DBO₅, SST, NTK, N-NH₄⁺ y PT fueron analizados siguiendo el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005).

2.5.3 Análisis de los datos

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre las tres carga de Nitrógeno utilizadas en el ensayo, se ha realizado un análisis de varianza (ANOVA) y por tratarse de datos no paramétricos ha sido necesario transformarlos a datos normales utilizando [log(x+1)] y en aquellos casos donde se observaron diferencias significativas se prosiguió a realizar el análisis post hoc de media. Como el número de muestreos realizados fue diferente se ha utilizado el análisis de diferencias significativas mínima de Scheffe que se basa en la distribución F a un nivel de significación del 99%. Los

análisis estadísticos han sido realizados usando el paquete estadístico STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., 2001). También se ha realizado un análisis de correlación de Spearman para determinar la correlación entre los parámetros físico-químicos y microbiológicos.

3 RESULTADOS

3.1 MOSAICO JERARQUIZADO DE ECOSISTEMAS ARTIFICIALES (M.J.E.A. ®) A ESCALA REAL

3.1.1 Análisis realizado durante los muestreos estacionales

La presencia y eliminación de los microorganismos indicadores, fue monitorizado durante los cuatros diferentes periodos de muestreo (Verano, Otoño, Invierno y Primavera). Se observaron diferencias significativas en la cantidad de organismos detectados en las diferentes estaciones y se registró una reducción gradual en los puntos de muestreos próximos a la salida (Tablas 3.1 y 3.2). El sistema mostró, una eficiente eliminación de *Clostridium* (100%) durante el verano y para los huevos de Helmintos durante todos los diferentes periodos de muestreos.

Tabla 3.1. Número medio de microorganismos detectados en verano y otoño. (CT: Coliformes totales, EF: Estreptococos fecales, UFC: Unidades formadoras de colonias).

	Verano			Otoño		
	Afluyente	Efluyente	Eliminación (%)	Afluyente	Efluyente	Eliminación (%)
<i>E.coli</i> UFC/100ml	1,60x10 ⁵	7,75x10 ³	95,2	2,39x10 ⁵	5,54x10 ³	97,7
C.T. UFC/100ml	7,20x10 ⁶	2,73x10 ⁵	96,2	1,50x10 ⁷	9,93x10 ³	99,9
<i>E.F.</i> UFC/100ml	6,81x10 ⁴	2,90x10 ³	95,7	1,52x10 ⁵	7,33x10 ³	95,2
<i>Clostridium</i> UFC/100ml	1,7x10 ¹	0	99,9	8,97x10 ³	2,00x10 ¹	97,8
Helmintos N° huevos/10 l	<1	0	99,9	0,18	0	99,9
<i>Giardia</i> N° quistes/10 l	8	0	99,9	3,5	0	99,9
<i>Cryptosporidium</i> N° ooquistes /10 l	2,7	0	99,9	4	0	99,9

Tabla 3.2. Número medio de microorganismos detectados en invierno y primavera. (CT: Coliformes totales, EF: Estreptococos fecales, UFC: Unidades formadoras de colonias).

	Invierno			Primavera		
	Afluyente	Efluyente	Eliminación (%)	Afluyente	Efluyente	Eliminación (%)
<i>E.coli</i> UFC/100ml	1,33x10 ⁵	7,81x10 ³	94,1	1,54x10 ⁴	1,50x10 ¹	99,9
C.T. UFC/100ml	8,05x10 ⁵	3,06x10 ⁴	96,2	5,41x10 ⁴	1,37x10 ⁴	74,7
<i>E.F.</i> UFC/100ml	1,45x10 ⁵	4,33x10 ³	97,0	4,15x10 ⁴	2,07x10 ³	95,0
<i>Clostridium</i> UFC/100ml	1,81x10 ³	7,00x10 ⁰	99,6	3,05x10 ²	4,00x10 ⁰	98,7
Helmintos N° huevos/10 l	<1	0	99,9	<1	0	99,9
<i>Giardia</i> N° quistes/10 l	5,5	0	99,9	<1	0	99,9
<i>Cryptosporidium</i> N° ooquistes /10 l	4	0	99,9	2,7	<1	99,6

El número de quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium*, encontrados durante todos los periodos de muestreo fue mínimo observándose presencia de estos en el P1 (afluente), P2 (laguna de micrófitos) y P3 (Humedal plantado con *Typha* y flujo superficial). Para *E. coli*, E.F. y C.T. fue observada una eliminación de más del 90% a excepción del último indicador (C.T.) que presentó eliminación del 74,7% durante primavera.

Los géneros de Helmintos, encontrados durante los muestreos realizados en verano fueron: *Trichostrongylus*, *Coccidium* y *Trichuris* su cantidad fue escasa. *Trichostrongylus* y *Trichuris* se observaron en menos de 1 huevo/10l y no se encontraron huevos de Helmintos a la salida del sistema. La abundancia de huevos de Helmintos, encontrados durante los muestreos de otoño y verano mostraron similares resultados. Sólo huevos de Helmintos del grupo *Trichostrongylus* fueron encontrados en el agua de entrada al sistema durante el invierno (1 huevo por 10 l) y durante la primavera, se encontraron los géneros: *Trichostrongylus* y *Trichuris*. *Trichostrongylus* se ha encontrado en las cuatros estaciones muestreadas, aunque la cantidad de huevos observada fue muy baja.

Durante el verano el número de quistes de *Giardia* observados en la entrada del sistema fue de 8 en 10l de muestra, mientras que no se observó ninguno a la salida del sistema. El número de quistes de *Giardia* disminuyó en otoño 3,5 quistes/10l fueron registrados en el P1 no observándose quistes al final del tratamiento. Se encontró mayor número de ooquistes de *Cryptosporidium* durante el otoño que en verano, alcanzándose en la entrada 4 ooquistes en 10 litros de muestra. Los ooquistes de *Cryptosporidium* encontrados durante el verano en la entrada del sistema fueron de 2,7 ooquistes por 10 litros de muestra y no fueron detectados ooquistes a la salida. Durante los muestreos de invierno, se registrarón 5,5 quistes de *Giardia* por 10l observándose su completa eliminación ya que no se detectó su presencia a la salida del sistema de tratamiento (Tabla 3.2). Los ooquistes de *Cryptosporidium* fueron encontrados en número de 2,7 por 10l en el P1 (entrada) y no alcanzó la cantidad de 1 por 10l a la salida del tratamiento siendo la eficiencia de eliminación del 99,6%.

En la Tabla 3.3, se presentan los valores de correlación de Pearson obtenidos entre las variables físico-químicas y los microorganismos indicadores y patógenos del agua residual. La presencia de Nitrógeno, en forma de Amonio en el sistema presenta una

correlación positiva con Coliformes totales, Coliformes fecales, Estreptococos fecales y *Cryptosporidium*. Y también se muestra correlación positiva de *Cryptosporidium* con Estreptococos fecales (0,92) y conductividad (0,59), y una correlación negativa con la Temperatura del agua residual de (-0,65).

Tabla 3.3. Coeficiente de correlación de Pearson entre los microorganismos estudiados y los parámetros físico-químicos. (T: Temperatura, Cond.: conductividad, CT: Coliformes totales, CF: Coliformes fecales, EF: Estreptococos fecales, O.D.: Oxígeno disuelto, NTK: Nitrógeno total Kjeldhal, UFC: Unidades formadoras de colonias).

	T ^a	Cond.	Amonio	C.T.	E.F.	<i>Capillaria</i>
O.D. (mgO ₂ /l)						0,77
NTK (mg N/l)						0,68
C.T. (UFC /100ml)			0,58			
C.F. (UFC /100ml)			0,61			
E.F. (UFC /100ml)			0,67			
<i>Cryptosporidium</i>	-0,65	0,59	0,64		0,92	
<i>Trichuris</i>				0,60		0,65
<i>Giardia</i>	-0,66	0,66			0,90	

Los huevos de *Capillaria*, mostraron una correlación positiva de 0,77 y 0,68 con la concentración de O.D. y NTK respectivamente así como 0,65 con la presencia de *Trichuris*.

3.1.2 Análisis realizado durante los muestreos de los dos periodos vegetativos completos

Las características físico-químicas, del agua residual en cada punto de muestreo del sistema analizado durante el periodo de abril-octubre y noviembre-marzo se observan en las (Tablas 3.4 y 3.5). La Temperatura media del agua ha sido entre 17°C y 15 °C durante el periodo de muestreo de abril-octubre y entre 9 °C y 10 °C durante el periodo de muestreo de noviembre-marzo; observándose una Temperatura media en el sistema completo de 13,6°C.

Tabla 3.4. Características físico-químicas medias del agua residual, así como su desviación típica en cada punto de muestreo del sistema de tipo MJEA[®] (FSW: Balsa de flujo superficial y FSSW: Balsa de flujo subsuperficial).

		Abril-Octubre	Noviembre-Marzo	Periodo Total
Temperatura (°C)	Afluente	16,6 ± 4,0	10,3 ± 3,9	13,6 ± 5,0
	Laguna	16,1 ± 3,8	9,5 ± 3,6	12,9 ± 5,0
	FSW	15,7 ± 4,2	9,1 ± 4,1	12,5 ± 5,3
	FSSW	14,7 ± 3,3	8,9 ± 3,4	11,9 ± 4,4
pH	Afluente	7,3 ± 0,6	7,2 ± 0,5	7,3 ± 0,6
	Laguna	7,5 ± 0,6	7,2 ± 0,5	7,4 ± 0,6
	FSW	7,5 ± 0,6	7,2 ± 0,6	7,4 ± 0,6
	FSSW	7,4 ± 0,3	7,4 ± 0,3	7,4 ± 0,3
Oxígeno Disuelto (mgO₂/l)	Afluente	1,5 ± 1,2	2,5 ± 1,7	2,0 ± 1,5
	Laguna	2,3 ± 1,6	2,8 ± 1,4	2,5 ± 1,5
	FSW	3,6 ± 2,3	2,9 ± 2,1	3,3 ± 2,2
	FSSW	5,6 ± 2,0	5,5 ± 2,1	5,8 ± 1,9

Se ha registrado un ligero cambio de pH entre los periodos de muestreo analizados y los puntos de muestreo del sistema, entre 7,2±0,5 durante el periodo de Noviembre-Marzo y 7,5±0,6 durante el periodo de Abril-Octubre. Para la supervivencia bacteriana el pH del agua debe estar en un rango entre 4-9,5 y el pH óptimo para el crecimiento de Bacterias fecales debe estar entre 6,5 y 7,5 (Awuah *et al.*, 2001).

Las Tablas 3.5 y 3.6 muestran la concentración y eficiencia de eliminación de los parámetros físico-químicos y bacteriológicos de cada uno de los puntos muestreados durante los periodos de Abril- Octubre y de Noviembre- Marzo.

La eficiencia del sistema en la reducción de la materia orgánica indicada por cambios en la DBO₅ se observa en la Tabla 3.5, donde el agua de entrada al sistema tiene una concentración media de 131,1 ± 75 mgO₂/l y de salida de 19,7 ± 8 con un 85,2 % de reducción en la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) durante el periodo de abril-octubre.

Tabla 3.5. Concentración media y eficiencia de eliminación de los parámetros físico-químicos en cada uno de los puntos de muestreo entre los meses de Abril a Octubre en el sistema de tipo (MJEA®). (FSW: Balsa de flujo superficial, FSSW: Balsa de flujo subsuperficial, UFC: Unidades formadoras de colonias).

Parámetros Físicoquímicos	Abril-Octubre					
	Afluyente	% Eliminación				Efluyente
		Laguna	FSW	FSSW	EDAR	
DBO ₅ (mgO ₂ /l)	131,1 ± 75	48,2	34,7	56,2	85,2	19,7 ± 8
Amonio (mgN/l)	46,9 ± 30	43,5	16,6	71,8	71,8	13,2 ± 7
Fósforo T. (mg/l)	8,2 ± 5,6	19,5	22,3	56,0	56,0	4,5 ± 4,6
Organismos Indicadores	(log) Eliminación					
C.T. (log UFC/100ml)	6,9	0,6	0,1	2,2	2,7	4,2
C.F. (log UFC/100ml)	5,8	0,6	0,5	1,2	2,2	3,6
E. F. (log UFC/100ml)	5,3	0,7	0,4	0,9	2,0	3,3
<i>E. coli</i> (log UFC/100ml)	6,8	0,4	0,1	2,6	2,7	4,1
<i>Clostridium</i> (log UFC/1ml)	3,8	1,3	1,1	0,5	2,8	0,9

La Tabla 3.6 muestra el porcentaje de reducción de DBO₅ durante el periodo de Noviembre- Marzo observándose 113,5±68 mg/l a la entrada y de salida un 16,4 ± 7 mg/l y un 85,5% de reducción en la EDAR durante este periodo. Se puede observar que la materia orgánica susceptible a la degradación biológica fue eliminada con eficiencia por el sistema de depuración. Según la normativa oficial (91/271/CEE) donde se establece que los vertidos procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas deben tener una concentración de 25 mgO₂/l y un porcentaje de reducción entre el 70 y 90%, estando este parámetro dentro de los límites permitidos.

Tabla 3.6. Concentración media y eficiencia de eliminación de los parámetros físico-químicos en cada uno de los puntos de muestreo entre los meses de Noviembre a Marzo en el sistema de tipo (MJEA®). (FSW: Balsa de flujo superficial, FSSW: Balsa de flujo subsuperficial, UFC: Unidades formadoras de colonias).

Parámetros Físicoquímicos	Noviembre-Marzo					
	Influyente	% Eliminación				Efluyente
		Laguna	FSW	FSSW	EDAR	
DBO ₅ (mgO ₂ /l)	113,5 ± 68	53,4	45,7	42,8	85,5	16,4 ± 7
Amonio (mgN/l)	29,6 ± 31	31,2	30,2	28,4	65,6	10,2 ± 10
Fósforo T. (mg/l)	8,1 ± 3,6	17,0	50,9	10,1	63,4	3,0 ± 1,7
Organismos indicadores	(log) Eliminación					
C. T. (log UFC/100ml)	6,6	0,3	0,9	1,1	2,3	4,3
C.F. (log UFC/100ml)	5,6	0,6	0,2	0,8	1,6	3,9
E. F. (log UFC/100ml)	5	0,7	0,4	0,9	2,0	3,2
<i>E. coli</i> (log UFC/100ml)	6,8	0,2	1,0	1,5	2,8	4,0
<i>Clostridium</i> (log UFC/1ml)	3,1	0,8	0,7	0,6	2,0	1,0

Analizando el sistema por etapas se ha observado que durante el periodo vegetativo de Abril a Octubre, la balsa plantada con *Iris pseudacorus* y *Salix atrocinerea* y que combina el flujo superficial y subsuperficial alcanza la reducción más elevada de DBO_5 llegando al 56,2% (Tabla 3.5) siendo la laguna de micrófitos la etapa del sistema que más alta eficiencia alcanza durante el periodo frío con un 53,4%(Tabla 3.6).

El Amonio de la EDAR registró un 71,8% de reducción para el periodo cálido (Tabla 3.5) y un 65,6% de Noviembre-Marzo (Tabla 3.6), siendo la concentración media de entrada de $46,9 \pm 30$ mgN/l y de salida de $13,2 \pm 7$ mgN/l (abril-octubre) y la concentración de entrada de $29,6 \pm 31$ mgN/l y de salida de $10,2 \pm 10$ mgN/l para el periodo frío (Tabla 3.6).

Se ha observado una eficiente reducción del Amonio, siendo mayor el porcentaje durante los meses cálidos, cuando la vegetación está más activa. La etapa final, del sistema vuelve a ser la más activa a efectos de eliminación de Amonio alcanzado un 71,8% durante los meses más cálidos (Tabla 3.5) y en los meses frío es la laguna de micrófitos la etapa que alcanza los rendimientos de reducción más elevados con un 31,2% (Tabla 3.6).

El porcentaje de reducción de Fósforo total de la EDAR ha sido de 56,0% para el periodo de Abril-Octubre (Tabla 3.5) y de 63,4% para el periodo de Noviembre-Marzo (Tabla 3.6). El mayor porcentaje de eliminación se ha obtenido durante los meses menos calurosos del año. La concentración media de Fósforo total del agua residual a la entrada del sistema fue de $8,2 \pm 5,6$ mg/l y de salida de $4,5 \pm 4,6$ mg/l (Tabla 3.5) en los meses cálidos, semejante a la concentración media de Fósforo total del agua residual a la entrada del sistema en los meses fríos que ha sido de $8,1 \pm 3,6$ y a la salida de $3,0 \pm 1,7$ (Tabla 3.6).

El Fósforo total registró una eficiente reducción, la etapa más eficiente durante el periodo cálido vuelve a ser la que combina ambos flujos hidráulicos con un valor de reducción del 56% mientras que durante el periodo frío la etapa que presenta mayor eficiencia en la reducción de Fósforo total ha sido la balsa plantada con *Typha latifolia* y que tiene un flujo hidráulico superficial, alcanzando valores medios del 50,9%.

Durante el periodo de muestreo de Abril a Octubre se ha observado una tasa de eliminación de organismos indicadores de contaminación a la salida del sistema para C.T. de 4,2 logUFC/100ml, C.F. de 3,6 logUFC/100ml, E.F. de 3,3 logUFC/100ml, *E. coli* de 4,1 logUFC/100ml y *Clostridium* de 0,9 logUFC/ml (Tabla 3.5).

Para el periodo de muestreo frío, la tasa de eliminación observada también fue bastante alta para C.T. de 4,3 logUFC/100ml, C.F. de 3,9 log UFC/100ml, E.F. de 3,2 logUFC/100ml, *E. coli* de 4,0 log UFC/100ml y *Clostridium* de 1,0 logUFC/ml (Tabla 3.6).

También se puede observar en la Figura 3.1, como se comporta la DBO₅ y algunos de los contaminantes analizados en este estudio tales como, los Coliformes fecales, los Coliformes totales y los Estreptococos fecales tanto en el Afluente como en el Efluente durante los 35 muestreos realizados en el periodo de Abril a Octubre (verano) y de Noviembre a Marzo (invierno), observándose una notable disminución de los organismos indicadores en el efluente tanto en el periodo frío como en el periodo cálido.

Se puede observar como la disminución de la materia orgánica (DBO₅) en el efluente influye notablemente en la presencia de los organismos indicadores de contaminación cuyo número se reduce significativamente en el efluente tanto en el periodo frío como en el cálido demostrando así la eficiencia del sistema de tratamiento de depuración en la eliminación de organismos indicadores de contaminación fecal.

La Tabla 3.7 muestra la presencia y concentración de parásitos patógenos en el sistema de depuración de tipo MJEA[®]. En la entrada del sistema, se han encontrado un 83% de las muestras recogidas con presencia de ooquistes de *Cryptosporidium*, 86% de quistes de *Giardia* y 91% Huevos de Helminetos, observandose una notable reducción en la Balsa de flujo subsuperficial (FSSW).

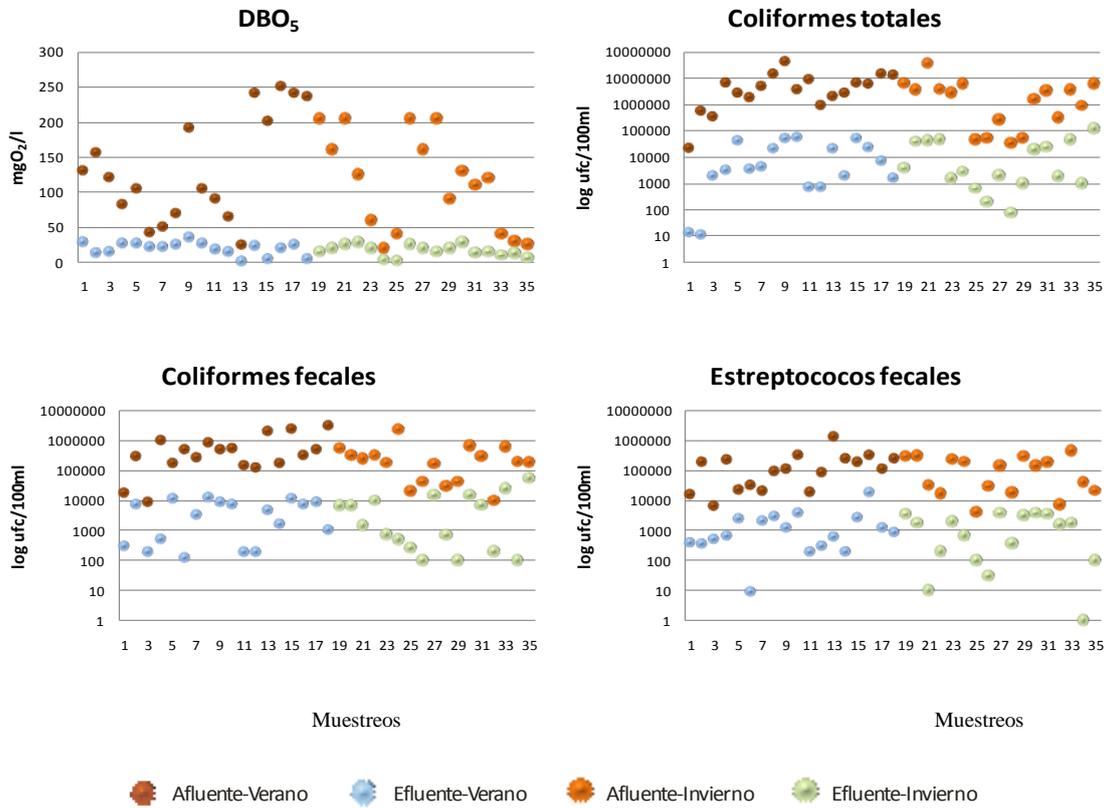


Figura 3.1. Evolución temporal de DBO₅, Coliformes fecales, Coliformes totales y Estreptococos fecales en el Afluente y el Efluente durante el verano e invierno en el Mosaico Jerarquizado de Ecosistemas Artificiales de Bustillo de Cea.

Tabla 3.7. Concentración de parásitos patógenos en agua residual bruta y en el agua residual tratada en las diferentes etapas del sistema de tipo MJEA® (FSW: Balsa de flujo superficial, FSSW: Balsa de flujo subsuperficial).

	Porcentaje positivo (%)	Rango de Concentración (ooquistes/l)	Media (ooquistes/l)
<i>Cryptosporidium</i>			
Afluente	83	0 – 4,9	1,4
Laguna	66	0 – 2,4	0,5
FSW	34	0 – 1,0	0,1
FSSW	6	0 – 0,2	0,01
<i>Giardia</i>			
Afluente	86	0 – 12,1	2,9
Laguna	77	0 – 8,7	1,1
FSW	46	0 – 1,7	0,3
FSSW	23	0 – 0,2	0,1
Helmintos			
Afluente	91	0 – 5,4	1,2
Laguna	86	0 – 2,7	0,5
FSW	51	0 – 0,7	0,2
FSSW	1	0 – 0,1	0,01

En la Figura 3.2 se observa la tasa de eliminación de los huevos de Helmintos, quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* en los periodo de estudio (Noviembre a Marzo), (Abril a Octubre) y (periodo completo) en todos los puntos de muestreo y la Estación Depuradora de Agua Residual (EDAR). La eliminación de los parásitos patógenos, en los dos periodos de estudios fue muy similar y el porcentaje de eliminación en todos los puntos (laguna, FSW y FSSW) del sistema, fue superior a 50% en los dos periodos de estudios y en el periodo completo. Se puede observar, también como en ambos periodos de estudio y en el sistema completo, el porcentaje de eliminación de los microorganismos patógenos en la EDAR fue del 100%. Demostrándose que este sistema es eficiente para la eliminación de microorganismos patógenos en el agua del sistema de tratamiento estudiado.

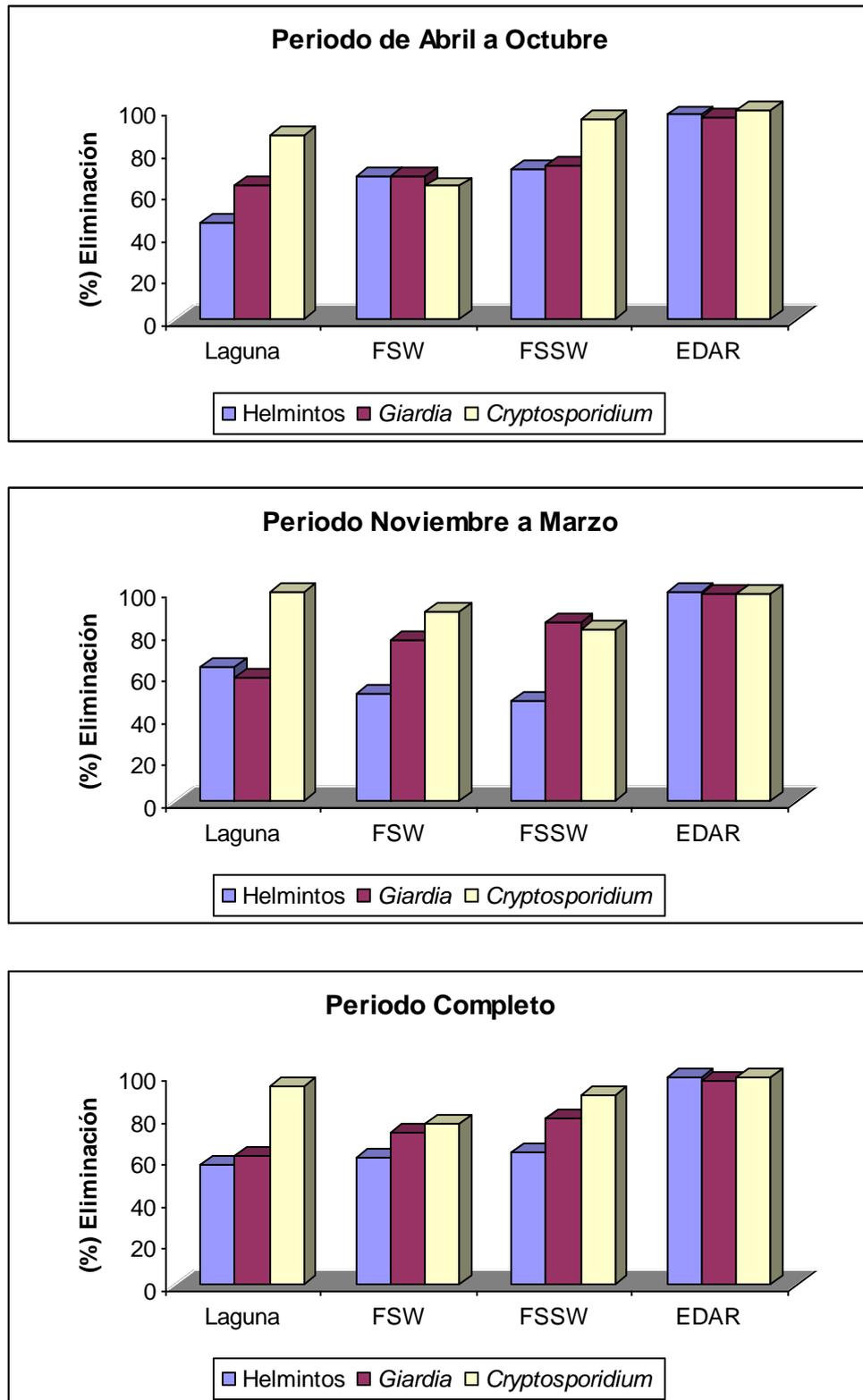


Figura 3.2. Eliminación de huevos de Helmintos, quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* en los periodos de estudio (Abril a Octubre), (Noviembre a Marzo) y (periodo completo) en todos los puntos de muestreo y la EDAR completa (FSW: Balsa de flujo superficial, FSSW: Balsa de flujo subsuperficial, EDAR: estación depuradora de aguas residuales).

La correlación existente entre la concentración de los microorganismos indicadores y los parámetros físico-químicos, en el agua residual bruta que llega al sistema de depuración del tipo MJEA[®] se observa en la (Tabla 3.8). Se ha utilizado el coeficiente de correlación *R*- Spearman, ($p < 0,05$) ya que los datos analizados no se han ajustado a los requisitos de distribución de datos establecidos, por la estadística paramétrica: distribución normal e igualdad de varianzas.

Se ha observado correlación negativa entre DBO_5 y Helmintos (-0,41; $P > 0,05$), Fósforo total y Coliformes totales (-0,43; $P > 0,05$) y Fósforo total y *Clostridium* (-0,9; $P > 0,05$) en el agua residual bruta. En la Figura 3.3 se pueden observar gráficamente estas correlaciones negativas.

Tabla 3.8. Coeficiente de correlación (*R*-Spearman correlations coefficients, $p < 0,05$) entre los parámetros físico-químicos y microbiológicos del afluente analizado en el sistema de tipo MJEA[®] (C.T.: Coliformes totales, C.F.: Coliformes fecales, E.F.: *Escherichia coli*, P.T.: Fósforo total).

	DBO_5	P.T.	C.T.	C.F.	<i>Giardia</i>
C.T.		-0,43			
C.F.			0,66		
E.F.				0,62	
<i>E.coli</i>			0,97	0,65	
<i>Clostridium</i>		-0,90			
<i>Giardia</i>					
<i>Cryptosporidium</i>					0,82
Helmintos	-0,41				

Se ha utilizado el coeficiente de correlación *R*- Spearman, ($p < 0,05$) ya que los datos analizados no se han ajustado a los requisitos de distribución de datos establecidos, por la estadística paramétrica: distribución normal e igualdad de varianzas. El análisis de correlación (*R* –Spearman) se realizó teniendo en cuenta la entrada y salida del agua residual en el sistema (Tabla 3.9), observándose correlación negativa entre el Oxígeno disuelto y los parámetros microbiológicos estudiados a excepción de *Clostridium*.

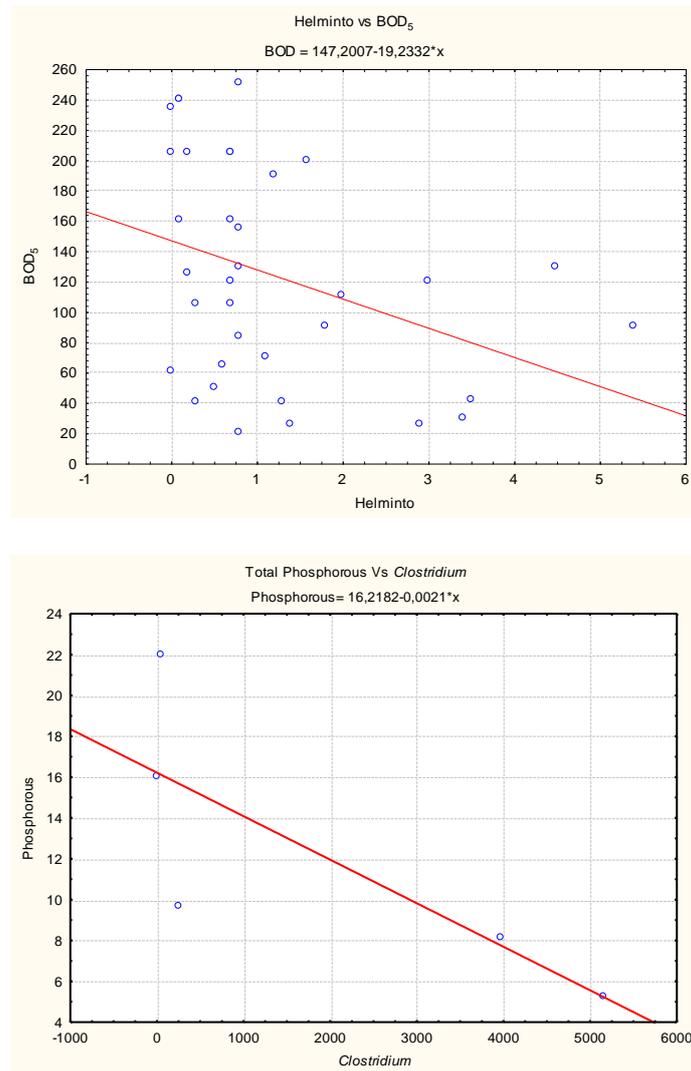


Figura 3.3. Gráficas del coeficiente de correlación de Spearman en el agua residual bruta entre Helmintos vs. DBO₅ y Fósforo total vs. *Clostridium*

El análisis de correlación también ha mostrado correlación positiva destacada entre Amonio y *E. coli* (0,66; $P > 0,05$) y correlación negativa entre este mismo parámetro químico y *Giardia* (-0,40; $P > 0,05$) y *Cryptosporidium* (-0,46; $P > 0,05$).

Tabla 3.9. Coeficiente de correlación (R-Spearman correlations coefficients, $p < 0,05$) entre los parámetros físico-químicos y microbiológicos del agua residual de entrada y salida en el sistema de depuración de tipo MJEA[®] (C.T.: Coliformes totales, C.F.: Coliformes fecales, E.F.: *Escherichia coli*, O.D.: Oxígeno disuelto, DBO₅ Demanda bioquímica de oxígeno, P.T.: Fósforo total).

	C.T.	C.F.	E.F.	<i>E.coli</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	Helmintos
O.D.	-0,4	-0,4	-0,5	-0,4		-0,50	-0,5	-0,3
DBO₅	0,56	0,58	0,57	0,57	0,61	0,52	0,60	0,34
Amonio	0,34	0,31	0,40	0,66	0,46	-0,40	-0,46	0,27
P.T.	0,37	0,47	0,47			0,43	0,31	0,33
C.T.		0,83	0,72	0,98				0,41
C.F.			0,85	0,79	0,57	0,50	0,50	0,34
E.F.				0,62	0,52	0,46		0,37
<i>E.coli</i>					0,50	0,49	0,64	0,31
<i>Clostridium</i>						0,41	0,38	0,36
<i>Giardia</i>							0,85	0,36
<i>Cryptosporidium</i>								0,33

Para determinar la existencia de diferencias significativas en la eliminación de los parámetros analizados en las diferentes etapas del sistema y en los distintos periodos estacionales, se ha realizado un ANOVA de una vía con los datos transformados $[\log(x+1)]$ ya que no presentaban homocedasticidad aplicando como post-hoc el Test de Tukey (HSD, honestly significant different).

Tras la aplicación de un análisis de varianza, a los datos obtenidos para determinar la existencia de diferencias significativas entre los dos períodos de muestreo se ha observado que únicamente han existido diferencias significativas entre el periodo cálido y frío en la Temperatura del agua en todas las etapas del sistema con valores $< 0,0001$.

Por el contrario las Tablas 3.10 a la 3.13 señalan las numerosas diferencias significativas determinadas entre las diferentes etapas del sistema de tratamiento del agua residual tratada en el sistema de tipo MJEA[®], utilizando los valores de los parámetros microbiológicos y físico-químicos analizados durante el ensayo.

En la Tabla 3.10 se observa la diferencia significativa (Post Hoc Tests Tukey HSD test) existente en la reducción de la DBO₅ y la concentración del Oxígeno disuelto (OD) en las diferentes etapas del sistema de tratamiento siendo la etapa de flujo subsuperficial (FSSW) el que más diferencias significativas (8×10^{-6}) mostró para ambos parámetros físico-químicos pudiéndose demostrar estadísticamente como en la laguna de flujo subsuperficial la Materia orgánica (DBO₅) es eficientemente reducida.

Tabla 3.10. Diferencias significativas en la eliminación de DBO₅ y en la concentración de Oxígeno Disuelto en las distintas etapas del tratamiento, para P<0,05. (Post Hoc Tests Tukey HSD test), N=136. (FSW: Balsa de flujo superficial, FSSW: Balsa de flujo subsuperficial).

	DBO ₅			O.D.		
	Afluente	Laguna	FSW	Afluente	Laguna	FSW
Laguna	0,000413					
FSW	0,000008	0,009101		0,018113		
FSSW	0,000008	0,000008	0,000440	0,000008	0,000008	0,000008

En la Tabla 3.11 se observa las diferencias significativas, (Post Hoc Tests Tukey HSD test) existentes en la eliminación de los Coliformes fecales, Coliformes totales y *Streptococos* fecales en las diferentes etapas del sistema de tratamiento de agua residual, siendo las etapas de flujo superficial (FSW) y la de flujo subsuperficial (FSSW) la que más diferencias significativas (8×10^{-6}) mostró para todos los microorganismos indicadores de contaminación fecal analizados en este estudio por lo cual queda estadísticamente demostrado que los organismos indicadores de contaminación son eficientemente eliminados o reducidos por el sistema de tratamiento de agua residual de Bustillo de Cea.

Tabla 3.11. Diferencias significativas en la eliminación de Coliformes totales, Coliformes fecales y *Streptococos* fecales en las distintas etapas del tratamiento, para P<0,05. (Post Hoc Tests Tukey HSD test), N=136. (FSW: Balsa de flujo superficial, FSSW: Balsa de flujo subsuperficial, C.T.: Coliformes totales, C.F.: Coliformes fecales, E.F.: *Streptococos* fecales).

	C.T.		
	Afluente	Laguna	FSW
Laguna	0,004119		
FSW	0,000008		
FSSW	0,000008	0,000008	0,00008
	C.F.		
	Afluente	Laguna	FSW
Laguna	0,00039		
FSW	0,000008		
FSSW	0,000008	0,000008	0,000009
	E.F.		
	Afluente	Laguna	FSW
Laguna	0,000012		
FSW	0,000008		
FSSW	0,000008	0,000008	0,000039

La Tabla 3.12 muestra las diferencias significativas (Post Hoc Tests Tukey HSD test) existente en la eliminación de *Clostridium perfringens* y los huevos de Helmintos en las diferentes etapas del sistema de tratamiento de agua residual pudiéndose observar diferencias significativas de 0,002879 para *Clostridium perfringens* sólo entre la etapa de FSSW y el Afluente. Los huevos de Helmintos mostraron una mayor diferencia significativa (8×10^{-6}) en la etapa del sistema de FSSW y el Afluente además entre la etapa de FSSW y la laguna también mostraron diferencias significativas (0,000034).

Tabla 3.12. Diferencias significativas en la eliminación de *Clostridium perfringens* y huevos de Helmintos en las distintas etapas del tratamiento, para $P < 0,05$. (Post Hoc Tests Tukey HSD test), $N=136$. (FSW: Balsa de flujo superficial, FSSW: Balsa de flujo subsuperficial).

	<i>Clostridium</i>	Helmintos	
	Afluente	Afluente	Laguna
Laguna		0,000593	
FSW		0,000008	0,036407
FSSW	0,002879	0,000008	0,000034

En la Tabla 3.13 se observan las diferencias significativas (Post Hoc Tests Tukey HSD test) en la eliminación de quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* en las diferentes etapas del sistema de tratamiento de agua residual pudiéndose observar para ambos organismos patógenos una gran diferencia significativa entre el Afluente y la Balsa FSSW (8×10^{-6}).

Tabla 3.13. Diferencias significativas en la eliminación de quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* en las distintas etapas del tratamiento, para $P < 0,05$. (Post Hoc Tests Tukey HSD test), $N=136$. (FSW: Balsa de flujo superficial, FSSW: Balsa de flujo subsuperficial).

	<i>Giardia</i>		<i>Cryptosporidium</i>	
	Afluente	Laguna	Afluente	Laguna
Laguna	0,039183			
FSW	0,000018		0,000028	
FSSW	0,000008	0,008849	0,000008	0,023015

En la Tabla 3.4, se observa la relación lineal existente entre las cargas de los diferentes parámetros estudiados (DBO_5 , Amonio y Fósforo total), los microorganismos indicadores (Coliformes totales, Coliformes fecales, Estreptococos fecales y *Clostridium*) y su tasa de eliminación en el sistema completo. Todos los valores de (R^2) del coeficiente de correlación estuvieron cercanos al 1 a excepción del Fósforo total que alcanzó un valor de 0,612.

La Figura 3.5, muestra las relaciones lineales para la carga de DBO_5 y Amonio y su tasa de eliminación en el sistema de depuración en la etapa de laguna, en la etapa de flujo superficial y en la etapa de flujo subsuperficial. El valor de (R^2) del coeficiente de correlación para la DBO_5 en la etapa de flujo superficial este valor fue de 0,555 observándose que en la etapa de laguna y flujo subsuperficial la correlación entre la carga y la tasa de eliminación fue mayor que en la etapa de flujo superficial ($> 0,8$). El valor de (R^2) del Amonio en la laguna fue de 0,637 y en la etapa de flujo subsuperficial de 0,791 a diferencia de la etapa de flujo superficial cuyo valor (0,067) es muy bajo no existiendo correlación entre la carga de Amonio y su tasa de eliminación en esta etapa del sistema.

La Figura 3.6 muestra las relaciones lineales observadas para la carga de Fósforo total y los Coliformes fecales con la tasa de eliminación en las diferentes etapas del sistema de depuración. Encontramos que en los gráficos de dispersión de los Coliformes fecales existe un alto nivel de concentración en los rangos inferiores por lo cual se observa una forma funcional que describe la relación que existe entre la eliminación de este microorganismo y la carga del sistema esto es reforzado por los valores obtenidos de (R^2) los cuales estuvieron entre 0,788 para la etapa de flujo superficial, 0,986 para la etapa de flujo subsuperficial, y 0,940 para la etapa de laguna.

Según los valores de (R^2) del coeficiente de correlación en el Fósforo total la etapa de flujo superficial presentó un valor de R^2 (0,584), el valor de R^2 de la etapa de laguna fue de 0,297 y de flujo subsuperficial de 0,025 siendo estos muy bajos no habiendo correlación entre la carga y su tasa de eliminación.

En la Figura 2.7; se observa la relación lineal para Estreptococos fecales y *Clostridium perfringens*. En el gráfico de dispersión encontramos que para ambos microorganismos

se sigue un patrón similar al lineal y existe un importante nivel de concentración en los rangos inferiores y a lo largo de la pendiente.

El valor más bajo de (R^2) obtenido para *Estreptococos* fecales fue en el sistema de flujo superficial $R^2 = 0,848$. Estos valores demuestran que existe un alto coeficiente de correlación lineal entre la carga y la tasa de eliminación de *Estreptococos* fecales. Para *Clostridium perfringens* los valores de (r^2) estuvieron cercanos al 1 por lo cual existe un alto coeficiente de correlación lineal entre la carga y la tasa de eliminación de este organismo indicador de contaminación fecal en las diferentes etapas del sistema de depuración estudiado.

La Figura 3.8, presenta los parámetros físico-químicos e indicadores fecales del sistema de tratamiento de agua residual de Bustillo de Cea, en diagramas de cajas. Se muestra, el valor medio obtenido en todos los muestreos (N=35), el error estándar, la desviación típica, los valores extremos y los outliers. Se reflejan las diferencias existentes en los diferentes puntos de muestreos (afluente, laguna, FSW: etapa del sistema con flujo superficial plantado con *Typha latifolia* y FSSW: punto de muestreo con flujo subsuperficial plantado con *Salix atrocinerea*).

El diagrama de cajas ofrece información sobre el comportamiento de los diferentes parámetros estudiados en cada una de las lagunas del sistema de depuración de Bustillo de Cea, observándose una disminución progresiva de estos a medida que pasan por las diferentes balsas del sistema de tratamiento siendo en la última de estas (FSSW) donde se observa una completa disminución. Según el diagrama de caja la disminución es más visible en los parámetros microbiológicos que en los físico-químicos.

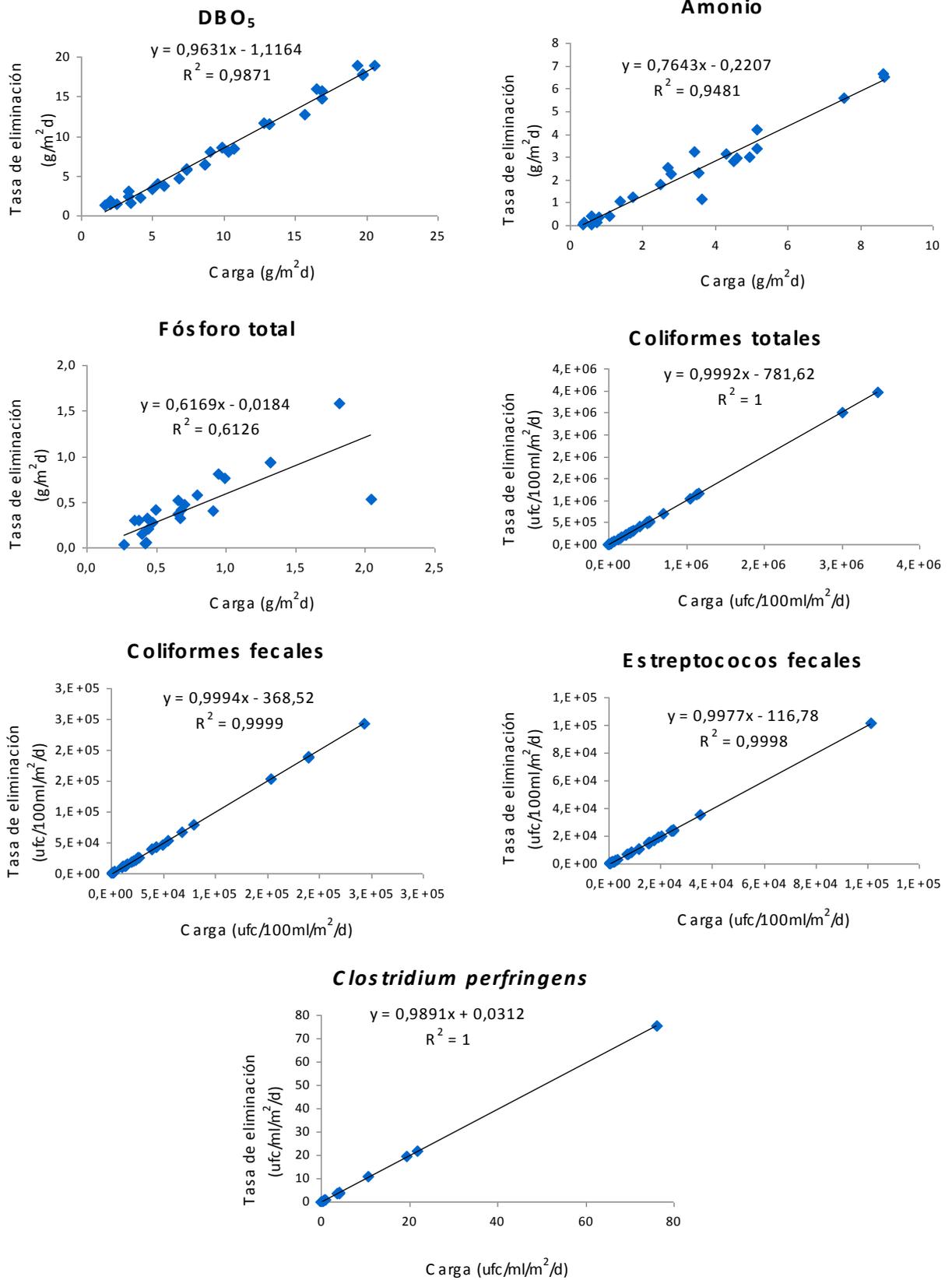


Figura 3.4. Relaciones lineales observadas entre la carga de los diferentes parámetros analizados en el Mosaico Jerarquizado de Ecosistemas Artificiales de Bustillo de Cea y su tasa de eliminación.

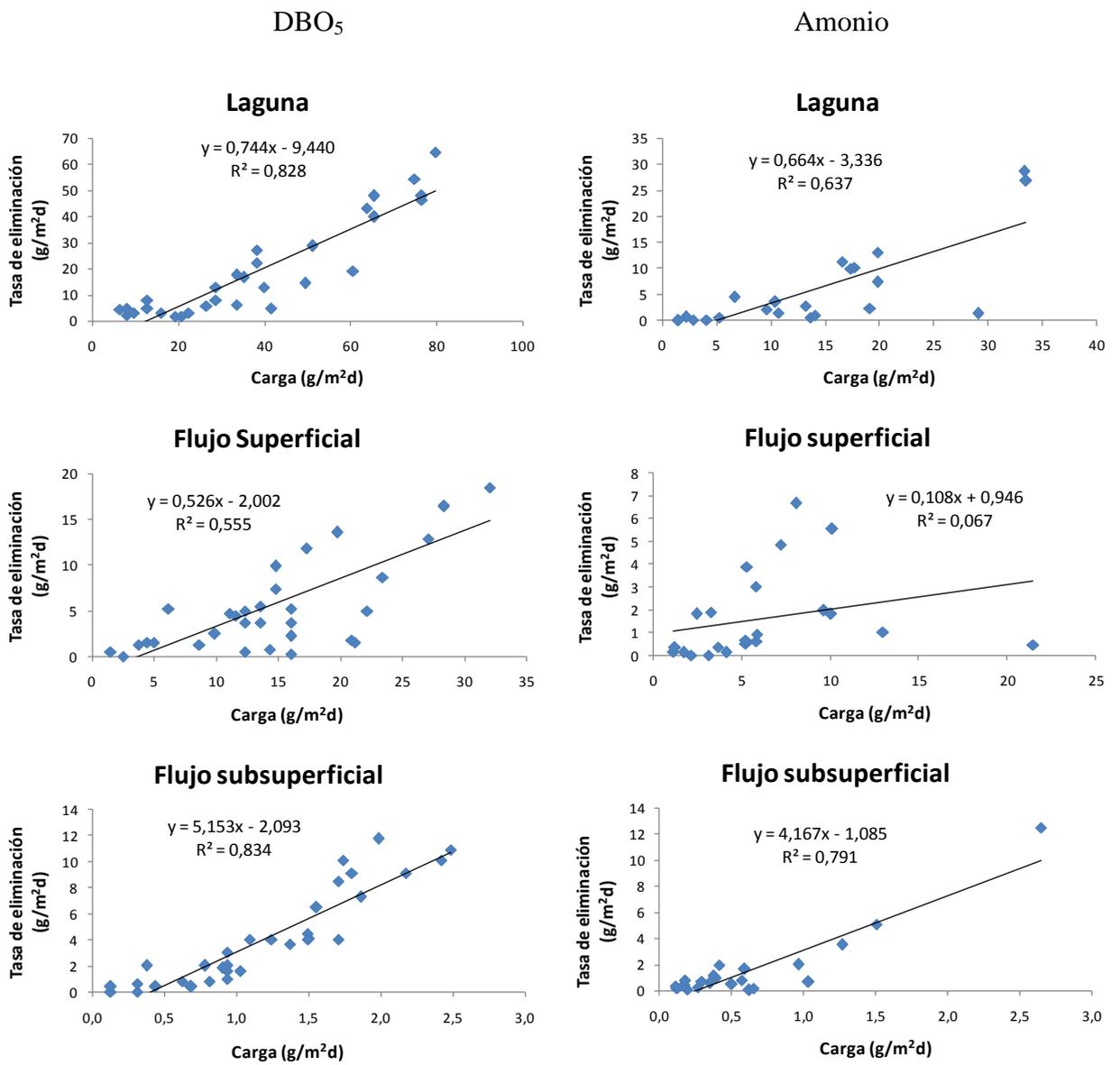


Figura 3.5. Relaciones lineales observadas para la carga de DBO₅ y Amonio en el Mosaico Jerarquizado de Ecosistemas Artificiales de Bustillo de Cea y su tasa de eliminación en las diferentes etapas del sistema: laguna, Balsa con flujo superficial y Balsa con flujo subsuperficial.

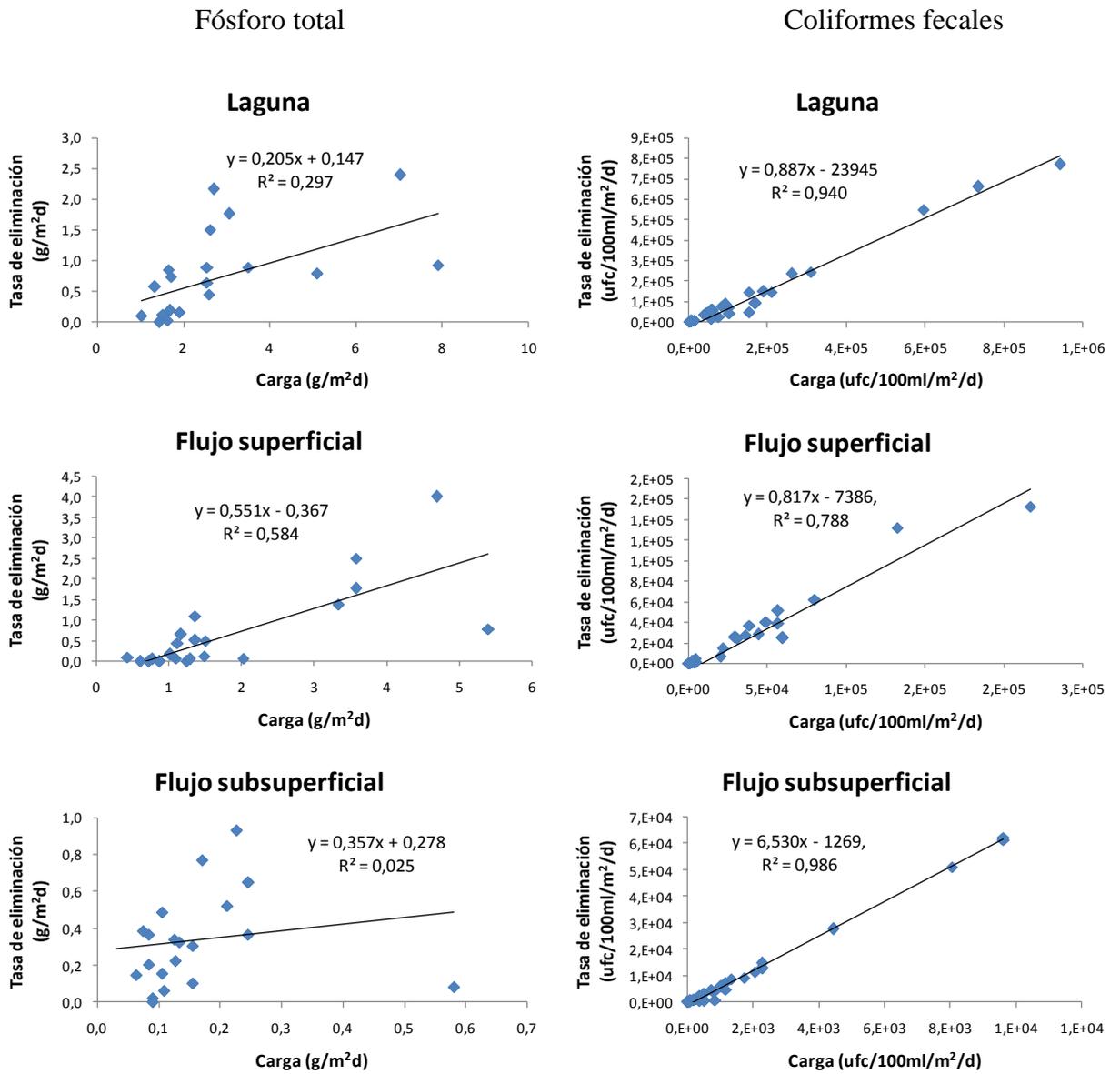


Figura 3.6. Relaciones lineales observadas para la carga de Fósforo total y Coliformes fecales en el Mosaico Jerarquizado de Ecosistemas Artificiales de Bustillo de Cea y su tasa de eliminación en las diferentes etapas del sistema: laguna, Balsa con flujo superficial y Balsa con flujo subsuperficial.

Estreptococos fecales

Clostridium perfringens

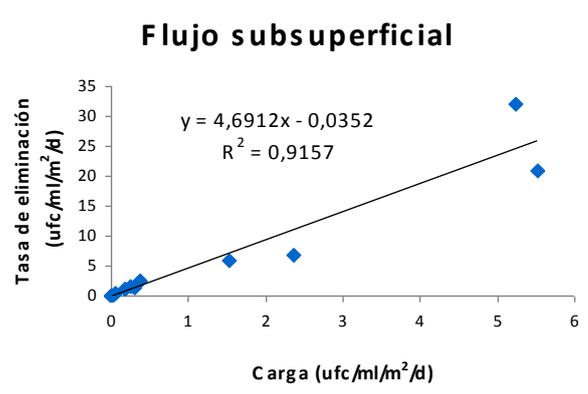
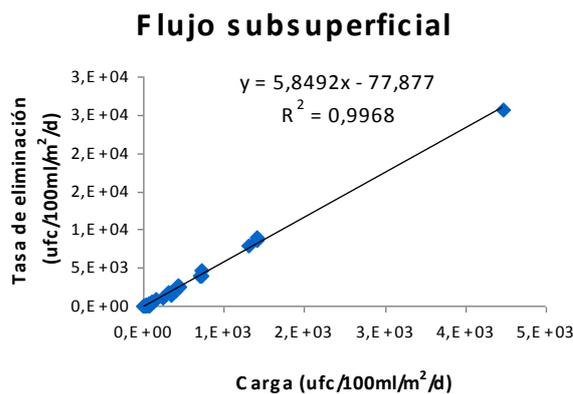
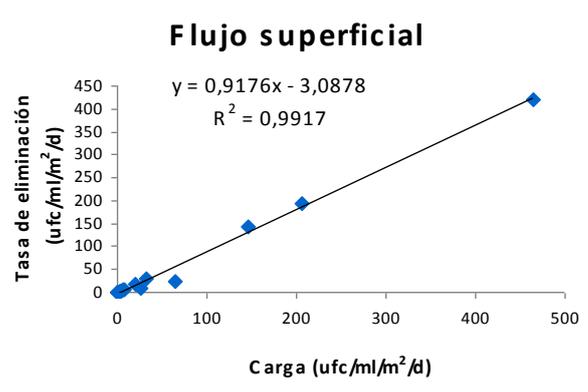
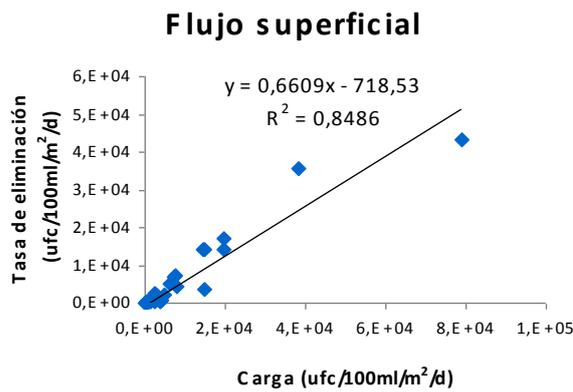
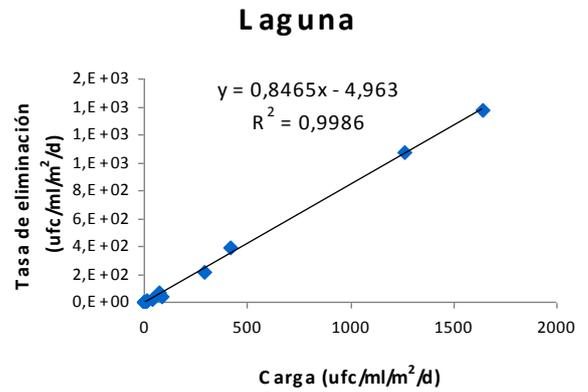
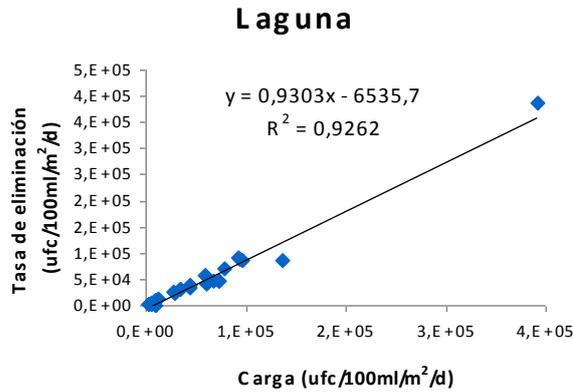


Figura 3.7. Relaciones lineales observadas para la carga de *Estreptococos fecales* y *Clostridium perfringens* en el Mosaico Jerarquizado de Ecosistemas Artificiales de Bustillo de Cea y su tasa de eliminación en las diferentes etapas del sistema: laguna, Balsa con flujo superficial y Balsa con flujo subsuperficial.

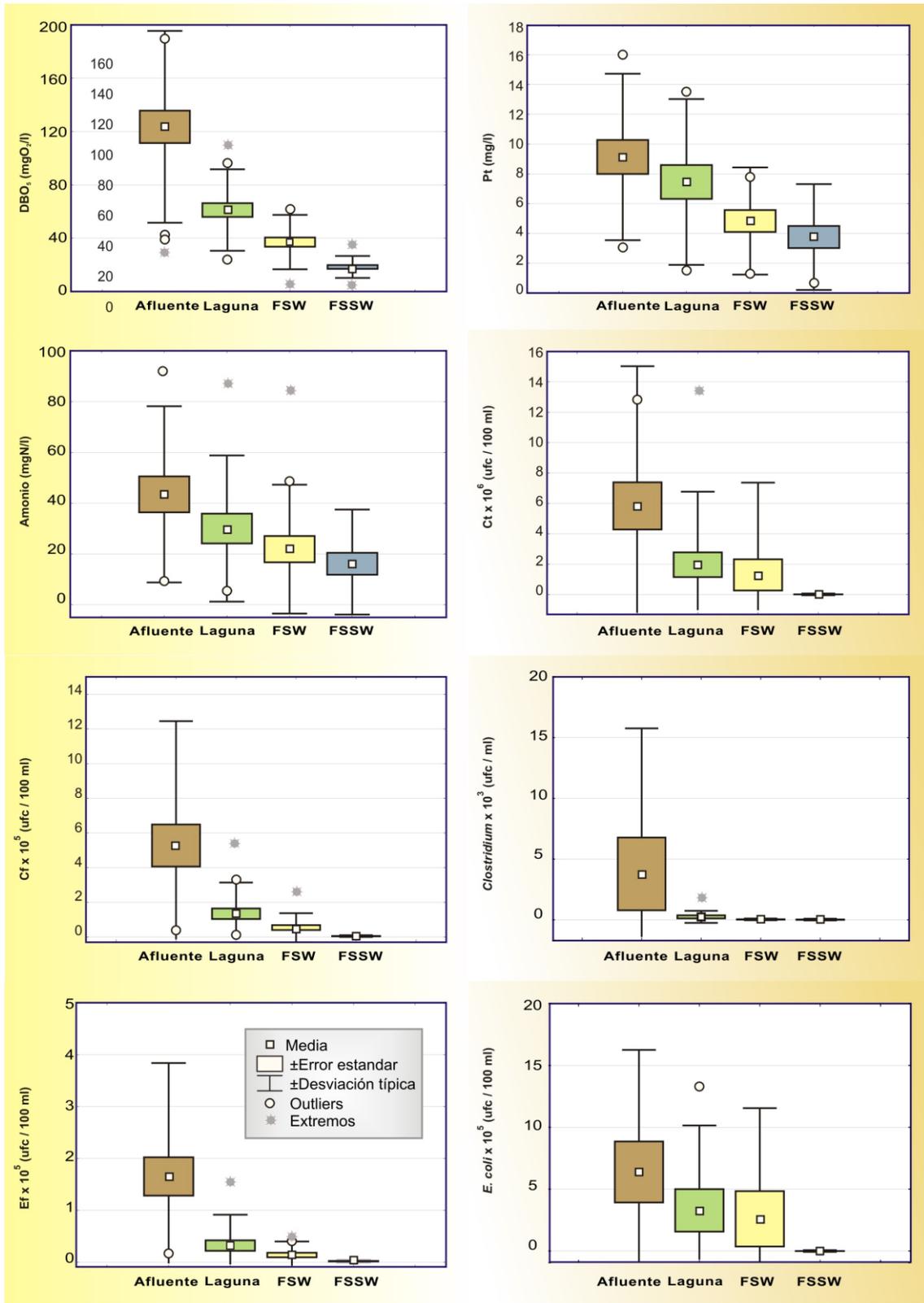


Figura 3.8. Diagramas de cajas para los parámetros físico-químicos e indicadores fecales del sistema de tratamiento de agua residual de Bustillo de Cea. (FSW: Balsa de flujo superficial, FSSW: Balsa de flujo subsuperficial, N=35).

3.1.3 Evaluación de la Viabilidad de los Huevos de Helmintos en lodos

Los resultados obtenidos del conteo de huevos, en lodos procedentes de la planta de tratamiento de tipo Mosaico Jerarquizado de Ecosistemas Artificiales MJEA® de Bustillo de Cea se muestran en la Tabla 3.14 y en la Figura 3.9 se observan los datos taxonómicos de las especies de Helmintos identificadas en este estudio. Se ha encontrado, una concentración total de 96 huevos/kg.m.s. en el lodo del pretratamiento; 336 huevos /kg. m.s. en la laguna microfitos a 1,5 metros de profundidad y 338 huevos/kg.m.s. en la misma laguna a 1 metro de profundidad.

Es importante destacar que el lodo del pretratamiento es extraído anualmente y en la laguna de microfitos desde hace 9 años no se han extraído los lodos. Por esta razón se observa un mayor número de huevos de Helmintos en la laguna de microfitos que en el pretratamiento.

Tabla 3.14. Número de huevos de Helmintos por kilogramos de materia seca encontrados en Bustillo de Cea.

	Nº de H/Kg.m.s.	%Viabilidad	Nº de Huevos Viables	% Viabilidad
Pretratamiento				
<i>Ascaris</i>	47	48,96	2	4,25
<i>Trichostrongylus</i>	29	30,21	2	6,90
<i>Hymenolepis</i>	20	20,83	4	20,00
<i>Trichuris</i>	0	0	0	0
Total	97	100	-	-
Laguna de microfitos a 1,5 m de profundidad				
<i>Ascaris</i>	128	38,09	2	1,56
<i>Trichostrongylus</i>	119	35,42	3	2,52
<i>Hymenolepis</i>	81	24,11	3	3,70
<i>Trichuris</i>	8	2,38	0	0
Total	343	100	-	-
Laguna de microfitos a 1 m de profundidad				
<i>Ascaris</i>	181	53,55	4	2,21
<i>Trichostrongylus</i>	82	24,26	5	6,10
<i>Hymenolepis</i>	66	19,53	4	6,06
<i>Trichuris</i>	9	2,66	0	0
Total	338	100	-	-

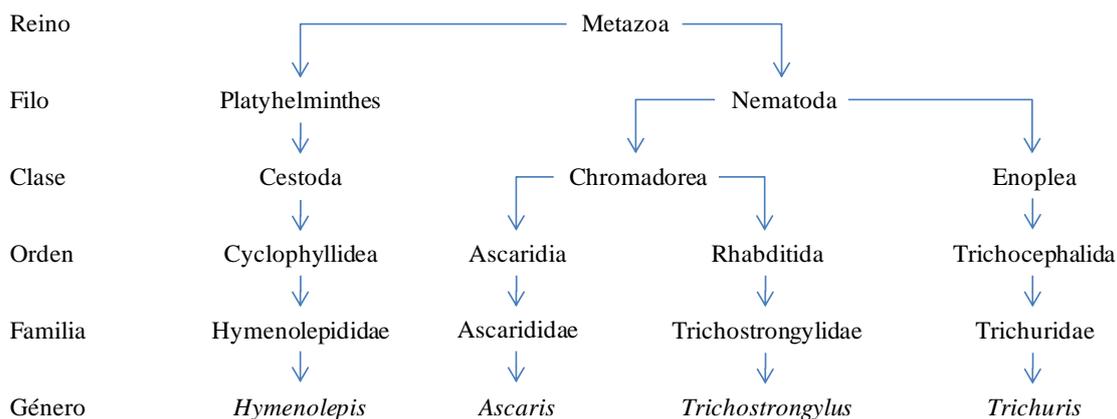


Figura 3.9. Datos taxonómicos de los Helmitos identificados en el estudio. (Fuente: NCBI 2010).

En la Figura 3.10 se observa la distribución de abundancias de huevos de Helmitos encontrados en el lodo del pretratamiento: un 48,96 % de *Ascaris sp.*, un 20,83% de *Hymenolepis sp.* y un 30,21% de *Trichostrongylus sp.*



Figura 3.10. Géneros de Helmitos encontrados en el lodo bruto del pretratamiento de Bustillo de Cea.

En la Figura 3.11, se observa la distribución de abundancias de huevos de Helmitos encontrados en el lodo maduro a 1,5 metros de profundidad: un 38,09 % de *Ascaris sp.*, un 24,11% de *Hymenolepis sp.*, un 35,42% de *Trichostrongylus sp.* y 2,38% de *Trichuris sp.*

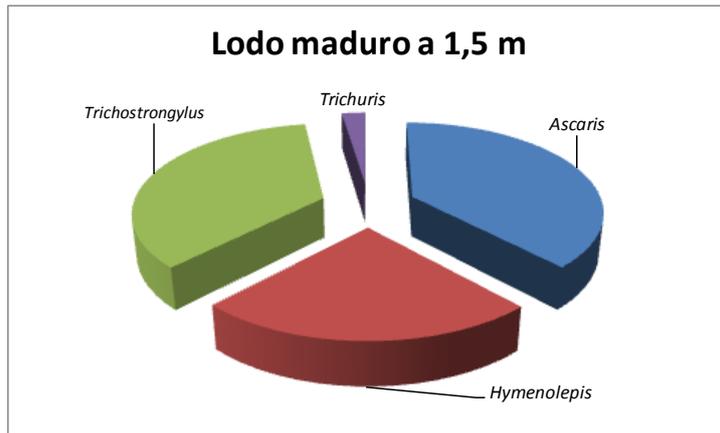


Figura 3.11. Géneros de Helmintos encontrados en el lodo maduro de la laguna de microfitos a 1,5 m de profundidad en Bustillos de Cea.

En la Figura 3.12 se observa la distribución de abundancias de huevos de Helmintos encontrados en el lodo maduro a 1 metro de profundidad: un 53,55 % de *Ascaris sp.*, un 19,53% de *Hymenolepis sp.*, un 24,26% de *Trichostrongylus sp.* y 2,66% de *Trichuris sp.*

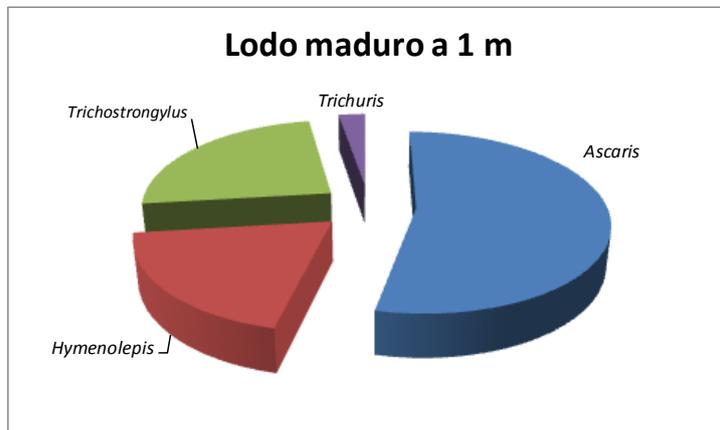


Figura 3.12. Géneros de Helmintos encontrados en el lodo maduro de la laguna de microfitos a 1 m de profundidad en Bustillo de Cea.

3.2 MOSAICO JERARQUIZADO DE ECOSISTEMAS ARTIFICIALES (M.J.E.A. ®) A ESCALA PILOTO

3.2.1 Condiciones físico-químicas del sistema

Las características físico-químicas del agua residual en cada uno de los puntos del sistema de depuración estudiado se muestran en la Tabla 3.15. La Temperatura media del agua durante todo el experimento ha oscilado entre los 16 y 17 °C, alcanzando un valor máximo de 22,39 °C en el punto de muestreo P2 durante el aporte de 2,49 g NTK /m²d y un valor mínimo de 13,27 °C en ese mismo punto durante el aporte de 3,39 g NTK /m²d. El pH se ha mantenido muy cerca de la neutralidad, aunque a mayores cargas de Nitrógeno, el pH ha disminuido ligeramente en los 3 primeros puntos del sistema con respecto a las cargas más bajas

Tabla 3.15. Características físico-químicas del agua residual en cada uno de los puntos muestreados a las diferentes cargas de Nitrógeno utilizadas durante el ensayo.

		2,34gTKN/m ² d	2,49gTKN/m ² d	3,39gTKN/m ² d	Completo
Temperatura(°C)	Afluente	17,34 ± 2,55	19,93 ± 1,65	15,80 ± 4,52	17,25 ± 4,90
	P1	16,85 ± 4,59	21,06 ± 0,85	15,61 ± 3,65	16,96 ± 4,37
	P2	16,56 ± 4,37	22,39 ± 4,31	13,27 ± 3,81	16,41 ± 4,71
	P3	16,13 ± 3,21	21,39 ± 0,48	13,69 ± 5,58	16,09 ± 4,25
	P4	17,34 ± 2,69	22,02 ± 2,28	14,03 ± 5,54	17,02 ± 4,55
pH	Afluente	7,72 ± 0,22	7,6 ± 0,12	7,48 ± 0,48	7,66 ± 0,30
	P1	7,91 ± 0,13	7,40 ± 0,84	7,60 ± 0,63	7,80 ± 0,40
	P2	8,06 ± 0,19	7,92 ± 0,33	7,62 ± 0,32	7,97 ± 0,28
	P3	7,64 ± 0,19	7,91 ± 0,22	7,65 ± 0,23	7,67 ± 0,21
	P4	7,24 ± 0,16	7,61 ± 0,6	7,36 ± 0,24	7,34 ± 0,30
Oxígeno disuelto (mgO₂/l)	Afluente	1,71 ± 1,70	0,12 ± 0,01	0,85 ± 1,30	1,33 ± 1,59
	P1	4,81 ± 1,32	3,68 ± 0,60	3,71 ± 0,34	4,43 ± 1,21
	P2	1,50 ± 0,79	2,03 ± 2,27	1,34 ± 0,87	1,52 ± 0,99
	P3	1,23 ± 0,67	0,26 ± 0,05	0,69 ± 0,76	0,93 ± 0,73
	P4	1,46 ± 1,13	0,29 ± 0,07	1,87 ± 1,27	0,35 ± 1,17

En la Tabla 3.16, se observa la concentración de los parámetros físico-químicos y de los organismos indicadores de contaminación fecal del afluente y efluente del sistema de depuración piloto experimental y el porcentaje de eliminación de estos parámetros en

los puntos P2, P3, P4 y Sistema Completo (S.C.) al aplicar una carga de Nitrógeno de 2,34 g NTK/m²d.

Tabla 3.16. Concentración del afluente y efluente en el Sistema Piloto Experimental y porcentaje de eliminación de los parámetros químicos y microbiológicos a una carga de 2,34 g NTK/m²d. (DBO₅: Demanda bioquímica de oxígenos, SST: Sólidos totales en suspensión, C.T.: Coliformes totales, E.F.: *Escherichia coli*, C.F.: *Coliformes fecales*).

2,34 g NTK/m ² d							
Parámetros químicos	Afluente(P1)	% eliminación				Efluente	
		P2	P3	P4	S.C.		
DBO ₅ (mgO ₂ /l)	73,31± 19,82	57,08	20,54	55,08	84,68	11,23±6,17	
SST (mg/l)	237,61±118,62	79,98	10,66	13,32	84,49	36,85±36,5	
Amonio (mgN/l)	92,39 ± 23,44	14,16	29,34	28,24	56,47	40,21±16,1	
Fósforo T.(mg/l)	19,27 ± 8,55	24,97	7,16	21,20	45,11	10,58±2,62	
Organismos indicadores							
		(log) eliminación					
Bacterias aerobias(logUFC/100ml)	3,5	0,2	0,3	0,1	0,5	1,1	2,4
<i>E. coli</i> (log UFC/100ml)	5,5	0,6	0,3	0,5	0,7	2,1	3,4
C.T. (log UFC/100ml)	6,2	0,6	0,4	0,6	0,3	1,9	4,3
E.F. (log UFC/100ml)	4,6	0,6	0,4	0,4	0,6	2,0	2,6
C.F. (log UFC/100ml)	5,4	0,4	0,3	0,6	0,3	1,6	3,8
<i>Clostridium</i> (log UFC/1ml)	1,5	0,4	0,4	0,6	0,1	1,5	0,0

En la Tabla 3.17, se observan los parámetros químicos y microbiológicos a carga de Nitrógeno de 2,49 g NTK/m²d y en la Tabla 3.18, a 3,39 g NTK/m²d de concentración de Nitrógeno.

Tabla 3.17. Concentración del afluente y efluente en el Sistema Piloto Experimental y porcentaje de eliminación de los parámetros químicos y microbiológicos a una carga de 2,49 g NTK/m²d. (DBO₅: Demanda bioquímica de oxígenos, SST: Sólidos totales en suspensión, C.T.: Coliformes totales, E.F.: *Escherichia coli*, C.F.: *Coliformes fecales*).

2,49 g NTK/m ² d							
Parámetros químicos	Afluente(P1)	% eliminación				Efluente	
		P2	P3	P4	S.C.		
DBO ₅ (mgO ₂ /l)	115,33±25,01	54,05	3,40	62,11	83,18	19,40±6,73	
SST (mg/l)	276,08±195,40	84,74	29,07	56,96	94,60	14,90±5,77	
Amonio (mgN/l)	220,94 ± 40,9	18,05	24,67	25,98	54,00	101,6±30,3	
Fósforo T.(mg/l)	16,34 ± 5,06	24,30	40,58	82,99	92,35	1,25 ± 1,59	
Organismos indicadores							
		(log) eliminación					
Bacterias aerobias(logUFC/100ml)	4	0,6	1,1	0,2	0,4	2,4	1,6
<i>E. coli</i> (log UFC/100ml)	5,9	0,5	0,8	0,3	1,6	3,2	2,7
C.T. (log UFC/100ml)	6,4	0,5	0,5	0,5	1,8	3,3	3,1
E.F. (log UFC/100ml)	4,2	0,6	0,4	0,9	2,3	4,2	0,0
C.F. (log UFC/100ml)	5,3	0,7	0,0	0,7	1,4	2,8	2,6
<i>Clostridium</i> (log UFC/1ml)	2,5	0,3	0,2	1,0	1,1	2,5	0,0

Tabla 3.18. Concentración del afluente y efluente en el Sistema Piloto Experimental y porcentaje de eliminación de los parámetros químicos y microbiológicos a una carga de 3,39 g NTK/m²d. (DBO₅: Demanda bioquímica de oxígenos, SST: Sólidos totales en suspensión, C.T.: Coliformes totales, E.F.: *Escherichia coli*, C.F.: Coliformes fecales).

Parámetros químicos	3,39 g NTK/m ² d						Efluente
	Afluente(P1)	% eliminación				S.C.	
		P2	P3	P4	S.C.		
DBO ₅ (mgO ₂ /l)	141,43 ± 32,88	21,82	41,73	50,78	77,58	21,71±18,8	
SST (mg/l)	407,74±139,51	82,72	28,04	50,04	93,79	25,33±12,0	
Amonio (mgN/l)	163,16 ± 64,23	38,14	9,96	38,48	65,73	55,91±28,3	
Fósforo T.(mg/l)	33,36 ± 4,17	31,05	2,48	34,71	56,10	14,64±7,85	

Organismos indicadores	(log) eliminación						
	Afluente(P1)	P2	P3	P4	S.C.	Efluente	
Bacterias aerobias (log UFC/100ml)	4,1	0,3	0,3	0,0	0,6	1,3	2,8
<i>E. coli</i> (log UFC/100ml)	8,0	1,0	1,4	0,8	0,8	4,0	4,1
C.T. (log UFC/100ml)	8,1	0,8	0,4	0,6	1,0	2,8	5,3
E.F. (log UFC/100ml)	4,6	0,4	0,4	0,7	0,7	2,2	2,4
C.F. (log UFC/100ml)	7,1	0,3	0,4	1,0	1,0	2,7	4,4
<i>Clostridium</i> (log UFC/1ml)	2,2	0,3	0,4	0,5	0,2	1,4	0,8

Para una carga de Nitrógeno de 2,34 g NTK m²d⁻¹ se obtuvo una DBO₅ de 0,15 g m²d⁻¹, para una carga de 2,49 g NTK m²d⁻¹ se obtuvo una DBO₅ de 0,26 g m² d⁻¹ y para la carga de Nitrógeno de 3,39 g NTK m²d⁻¹ se obtuvo una DBO₅ de 0,29 g m² d⁻¹.

La planta piloto experimental, registró una concentración de SST con un valor medio, en el efluente con la carga de Nitrógeno de 2,34 g NTK/m²d (Tabla 3.16) de 36,85 ± 36,5 mg/l, para la carga de 2,49 g NTK/m²d de 14,90 ± 5,77 mg/l (Tabla 3.17) y para la carga de Nitrógeno de 3,39 g NTK/m²d (Tabla 3.18) de 25,33 ± 12,0 mg/l.

Los valores medios de Amonio en el efluente obtenidos en este estudio han sido de 40,21 ± 16,1 mgN/l (Tabla 3.16); 101,6 ± 30,6 mgN/l (Tabla 3.17) y 55,91 ± 28,3 mgN/l (Tabla 3.18).

En este ensayo se han registrado valores de Fósforo de 10,58 ± 2,62 mg/l con 2,34 g NTK/m²d (Tabla 3.16) 1,25 ± 1,59 mg/l durante la aplicación de 2,49 g NTK/m²d (Tabla 3.17) y 14,24 ± 7,85 mg/l con una carga de 3,39 g NTK/m²d (Tabla 3.18)

3.2.2 Reducción de los Microorganismos

En la Figura 3.13, se observa como disminuye notablemente el número de microorganismos en el efluente durante los periodos de primavera, verano y otoño periodos durante los cuales estuvo en funcionamiento el sistema piloto experimental. Siendo *Clostridium perfringens* por ser menos abundante quien presentó una disminución mucho mayor durante los tres periodos de muestreos.

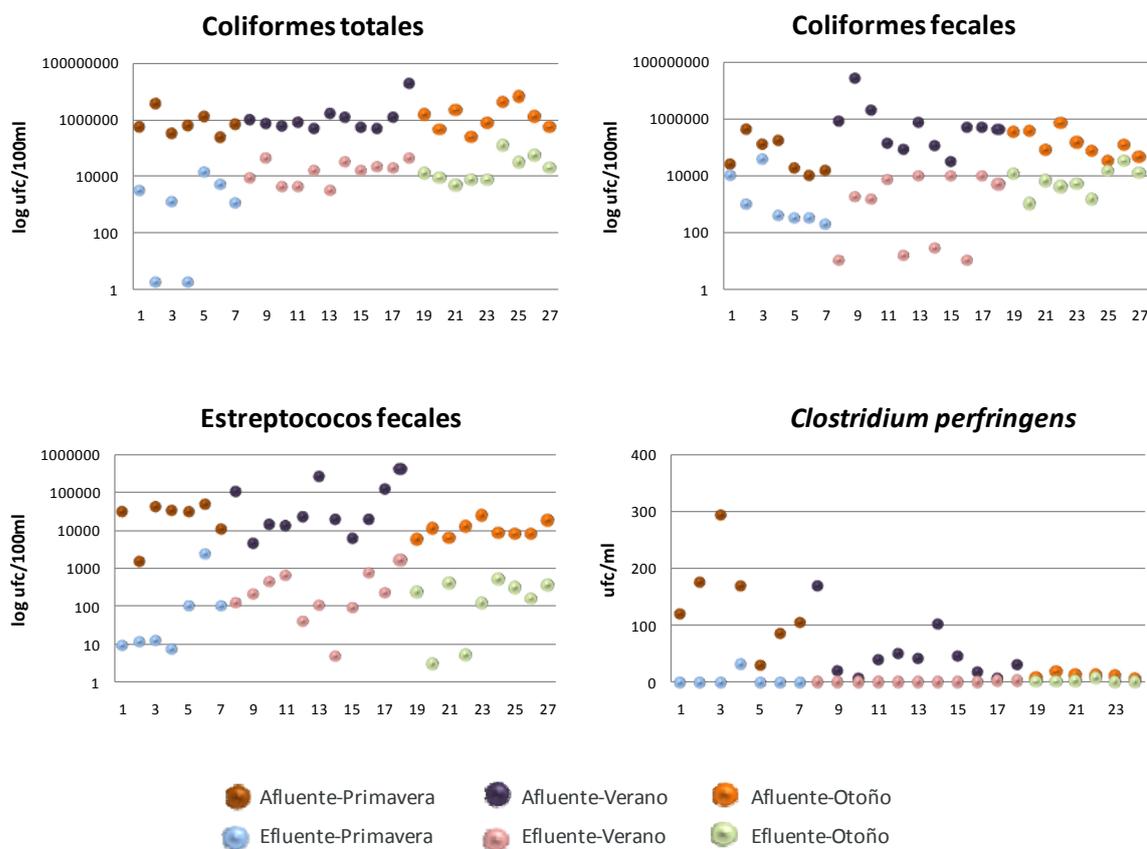


Figura 3.13. Evolución temporal de los Coliformes totales, Coliformes fecales, Estreptococos fecales y *Clostridium perfringens* en el afluente y efluente durante la primavera, verano y otoño.

Los resultados obtenidos, en relación a los microorganismos analizados durante este estudio fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) mediante el uso de diferencias significativas mínima de Scheffe, que se basa en la distribución F para determinar si existen diferencias significativas en la eliminación de los parámetros analizados entre las distintas cargas de Nitrógeno aportadas durante este ensayo.

Para las Bacterias aerobias, a una carga de Nitrógeno de 2,49 g NTK/m²d se observa una eliminación 2,4 log UFC/ml. Con carga de 3,39 g NTK/m²d presentaron una eliminación de 1,3 log UFC/ml y cargas de 2,34 g NTK/m²d de 1,1 log UFC/ml, obteniéndose diferencias significativas en la eliminación de las Bacterias con un valor de F de [F_{14, 81} = 8,77; P < 0,01] (Tabla 3.19).

Para *E. coli*, a una carga de 2,49 g NTK/m²d se observó una eliminación de 3,2 log UFC/100ml, a 3,39 g NTK/m²d una eliminación de 4,0 log UFC/100ml y a 2,34 g NTK/m²d una eliminación de 2,1 log UFC/10 ml obteniéndose diferencias significativas en su eliminación con un valor de F de [F_{14, 181} = 5,26; P < 0,01] (Tabla 3.19).

Los Coliformes totales, a cargas de 2,49 g NTK/m²d muestran una eliminación de 3,3 log UFC/100ml, a cargas de 3,39 g NTK/m²d la eliminación fue de 2,8 log UFC/100ml y a cargas de 2,34 g NTK/m²d fue de 1,9 log UFC/100ml con diferencias significativas y un F de [F_{14,191} = 3,93; P < 0,01] (Tabla 3.19).

Para los Estreptococos fecales, empleando una carga de 2,49 g NTK/m²d alcanzaron una eliminación del 100% y a cargas de Nitrógeno de 3,39 g NTK/m²d de 2,2 log UFC/100ml y para la carga de Nitrógeno 2,34 g NTK/m²d la eliminación fue de 2 log UFC/100ml con diferencias significativas y un valor de F de [F_{14,180} = 4,18; P < 0,01] (Tabla 3.19).

Los Coliformes fecales, a cargas de Nitrógeno de 2,49 la eliminación fue de 2,8 log UFC/100ml y 3,39 g NTK/m²d la eliminación fue de 2,7 log UFC/100ml y a una carga de 2,34 g NTK/m²d presentó una eliminación de 1,6 log UFC/100ml no obteniéndose diferencias significativas en su eliminación.

Para *Clostridium*, utilizando las cargas más bajas de Nitrógeno la eliminación fue del 100% y a una carga de 3,39 g NTK/m²d se observó una eliminación de 1,4 log UFC/1 ml con diferencias significativas en su eliminación en función a la carga de Nitrógeno aportada siendo F de [F_{14,135} = 13,82; P < 0,01], el valor más alto obtenido durante el ensayo. (Tabla 3.19)

Tabla 3.19. Análisis de varianza (ANOVA), usando diferencias significativas mínimas de Scheffe. Tests de Significancia. Sigma-restricted datos no paramétricos. Descomposición de la hipótesis. (BA: Bacterias aerobias, Ec: *E. coli*, CT: Coliformes totales, EF: *Streptococcus fecales*; SC: Suma de cuadrados, G.L.: grados de libertad, F-radio: Cociente entre dos medias cuadráticas, P: Nivel de significación).

	SC	G. L.	F-radio	P
Intercepción	1,463763E+08	1	20,07016	0,000013
BA	8,955411E+08	14	8,77077	0,000000
Error	1,320074E+09	181		
Intercepción	2,154025E+12	1	20,20996	0,000012
<i>E.coli</i>	7,848757E+12	14	5,26002	0,000000
Error	1,929140E+13	181		
Intercepción	2,726851E+13	1	11,99463	0,000659
CT	1,250872E+14	14	3,93016	0,000007
Error	4,342183E+14	191		
Intercepción	2,693696E+09	1	6,219621	0,013536
EF	2,536753E+10	14	4,183747	0,000002
Error	7,795737E+10	180		
Intercepción	463101	1	66,40762	0,000000
<i>Clostridium</i>	1350058	14	13,82824	0,000000
Error	941437	135		

Para determinar, la existencia de correlación entre los parámetros físico-químicos y microbiológicos de las muestras de agua de la totalidad del sistema piloto experimental, se ha aplicado el test de correlación de Spearman por tratarse de datos no paramétricos r -Spearman, ($p < 0,05$) (Tabla 3.20), y se ha observado una baja correlación entre ambos grupos de variables destacando la correlación negativa de las Bacterias aerobias con la Temperatura, el pH y la concentración de Amonio, así como la correlación que presenta *Clostridium* con el pH y el O.D.

Tabla 3.20. Coeficiente de correlación de Spearman ($p < 0,05$) entre los parámetros físico-químicos y los microbiológicos del agua analizada en la totalidad del sistema experimental de depuración a escala piloto. (Tª Temperatura, O.D.: Oxígeno disuelto, DBO₅: Demanda bioquímica de oxígeno; PT: Fósforo total, SST: Sólidos totales en suspensión, B.A.: Bacterias aerobias, C.T.: Coliformes totales, E.F.: *Escherichia coli*, C.F.: Coliformes fecales).

	B.A.	<i>E. coli</i>	C.T.	E.F.	C.F.	<i>Clostridium</i>
Tª	-0,22854				0,302797	
pH	-0,24088				0,181848	-0,25748
O.D.					0,278567	-0,25929
DBO ₅		0,398433	0,465965	0,380506		0,396070
Amonio	-0,29804	0,330667	0,409830	0,281635		0,302615
PT	0,247459		0,228330			0,280926
SST	0,373608	0,53043	0,492917	0,486242		0,337641
B.A.		0,36976	0,434765	0,404668	0,243488	0,365376
<i>E. coli</i>			0,800894	0,638718	0,480200	0,518039
C.T.				0,609684	0,470834	0,560722
S.F.					0,530117	
C.F.						0,214503

El resto de las correlaciones significativas entre los parámetros físico-químicos y microbiológicos, han sido positivas superando el valor de $r = 0,50$ solamente entre *E. coli* y los SST. Las correlaciones significativas más elevadas se han obtenido entre los parámetros microbiológicos.

También se ha realizado un test de correlación r-Spearman, ($p < 0,05$) entre los parámetros físico-químicos y microbiológicos del agua de entrada al sistema (Tabla 3.21). Se observa correlación significativa: ($> 0,5$) entre el OD y el *Clostridium* (-0,60834), la Temperatura y los Coliformes fecales (0,542023), OD y Coliformes fecales (0,521724).

En la Figura 3.14, se observa la relación lineal entre la carga de *Clostridium perfringens* y su concentración en el efluente, así como su tasa de eliminación en el sistema de flujo superficial, en el de flujo subsuperficial y en el sistema completo. Observándose en las gráficas de dispersión de la izquierda la concentración de *Clostridium perfringens* en el efluente y su relación lineal con la carga.

Tabla 3.21. Coeficiente de correlación de Spearman ($p < 0,05$) entre los parámetros físico-químicos y microbiológicos del Afluente del sistema experimental de depuración a escala piloto. (T^a: Temperatura, O.D: Oxígeno disuelto, DBO₅: Demanda bioquímica de oxígeno, PT: Fósforo total, SST: Sólidos totales en suspensión, B.A.: Bacterias aerobias, C.T.: Coliformes totales, C.F.: Coliformes fecales).

	T ^a	pH	O.D.	DBO ₅	Amonio	PT	SST	<i>E.coli</i>
T ^a								
pH								
O.D	0,550743	0,752226						
DBO ₅			-0,67677					
Amonio				0,521570				
PT			0,553756	0,429813				
SST						0,747405		
B.A.		-0,34723						
<i>E.coli</i>					0,421831			
C.T.								0,474357
C.F.	0,542023	0,345023	0,521724					
<i>Clostridium</i>			-0,60834				0,484329	0,394986

Existe un alto nivel de concentración en el rango 0 de la gráfica de dispersión siendo más fuertemente observado en el sistema completo, seguido por la etapa de flujo subsuperficial. Esto es reforzado por los valores de (R^2) de 0,321 y 0,159 para las etapas de flujo subsuperficial y sistema completo respectivamente. No se ha encontrado correlación lineal representativa entre la carga de *Clostridium perfringens* y el efluente debido al bajo número de ufc/ml de este organismo indicador encontrado en el efluente del sistema piloto de Centrotec.

En las gráficas de dispersión de la derecha se observa que existe una alta correlación lineal entre la tasa de eliminación y la carga de *Clostridium perfringens*. Esto es corroborado al observar que los valores de (R^2) están cercanos al 1 en la etapa de flujo subsuperficial y en el sistema completo siendo la etapa de flujo superficial con un valor de 0,673 la etapa en la que la correlación lineal es más baja.

En la Figura 3.15 se observa la relación lineal entre la carga de Coliformes fecales y su concentración en el efluente así como su tasa de eliminación en las distintas etapas del sistema de tratamiento estudiado y en el sistema completo.

En las gráficas de dispersión de la izquierda se observa la relación lineal entre la carga de Coliformes fecales y su concentración en el efluente donde encontramos un alto nivel de concentración en los rangos inferiores cercanos a 0 por lo cual se observa una forma funcional que describe la relación que existe entre la eliminación de este microorganismo y la baja carga de este en el efluente del sistema de tratamiento a escala piloto, lo cual está reforzado con los valores obtenidos de (R^2) que para las etapas de flujo superficial y subsuperficial fueron de 0,001 y 0,007 no existiendo correlación lineal en estas etapas del sistema, solo el sistema completo con un valor de (R^2) de 0,775 presentó una alta correlación lineal entre el efluente y la carga de los Coliformes fecales.

En las gráficas de dispersión de la derecha la relación lineal entre la carga y la tasa de eliminación de los Coliformes fecales sigue un patrón similar al lineal con valores de (R^2) cercanos al 1 en todas las etapas de tratamiento del sistema. Por lo cual existe un alto coeficiente de correlación entre la carga y la tasa de eliminación de los Coliformes fecales en las diferentes etapas del sistema.

En la Figura 3.16 se observa la relación lineal entre la carga de Estreptococos fecales y su concentración en el efluente así como su tasa de eliminación de las etapas de flujo superficial, flujo subsuperficial y sistema completo. Se observa, en las gráficas de dispersión de la izquierda la relación lineal entre la carga de los Estreptococos fecales y su concentración en el efluente donde existe un alto nivel de concentración en los rangos inferiores de la gráfica. El valor de (R^2) de la etapa de flujo subsuperficial fue de 0,374 y del sistema completo de 0,393 no habiendo correlación lineal entre la carga de Estreptococos fecales y su concentración en el efluente a diferencia de la etapa de flujo superficial que con un valor de (R^2) de 0,702 presentó una alta correlación lineal entre la carga de Estreptococos fecales y su concentración en el efluente.

En las gráficas de dispersión de la derecha se observa la relación lineal entre la carga y la tasa de eliminación de los Estreptococos fecales estas siguen un patrón similar al lineal con valores de (R^2) cercanos a 1 con un alto coeficiente de correlación lineal entre la carga y la tasa de eliminación de los Estreptococos fecales en la etapa de flujo superficial, flujo subsuperficial y sistema completo.

En la Figura 3.17, se observa la relación lineal entre la carga de los Coliformes totales y su concentración en el efluente así como su tasa de eliminación en las etapas de flujo superficial, flujo subsuperficial y sistema completo. En las gráficas de dispersión de la izquierda se observa la relación lineal entre la carga de los Coliformes totales y su concentración en el efluente donde encontramos un alto nivel de concentración en los rangos inferiores cercanos al 0 por lo cual se observa una forma funcional que describe que no existe correlación lineal entre la carga y la concentración de Coliformes totales en el efluente lo cual es corroborado por los valores de R^2 que para la etapa de flujo superficial es de 0,115, la etapa de flujo subsuperficial de 0,171 y el sistema completo con 0,123.

En las gráficas de dispersión de la derecha se muestran la relación lineal entre la carga y la tasa de eliminación de los Coliformes totales, observándose que siguen un patrón similar al lineal con valores de (R^2) cercanos al 1 con un alto coeficiente de correlación lineal entre la carga y la tasa de eliminación de los Coliformes totales en la etapa de flujo superficial, flujo subsuperficial y sistema completo.

En la Figura 3.18, se observa la relación lineal entre la carga de *E. coli* y su concentración en el efluente así como su tasa de eliminación en las etapas de flujo superficial, flujo subsuperficial y sistema completo.

En las gráficas de dispersión de la izquierda se muestran la relación lineal entre la carga de *E. coli* y su concentración en el efluente donde se observa un alto nivel de concentración en los rangos inferiores siendo el sistema completo el que por su valor de (R^2) de 0,671 presentó una alta correlación lineal entre la carga y la concentración de *E. coli* en el efluente.

En las gráficas de dispersión de la derecha se muestran la relación lineal entre la carga y la tasa de eliminación de *E. coli*, observándose que sigue un patrón similar al lineal con valores de (R^2) cercanos al 1 por lo cual existe un alto coeficiente de correlación entre la carga de *E. coli* y su tasa de eliminación en las etapa de flujo superficial, flujo subsuperficial y sistema completo.

Clostridium perfringens

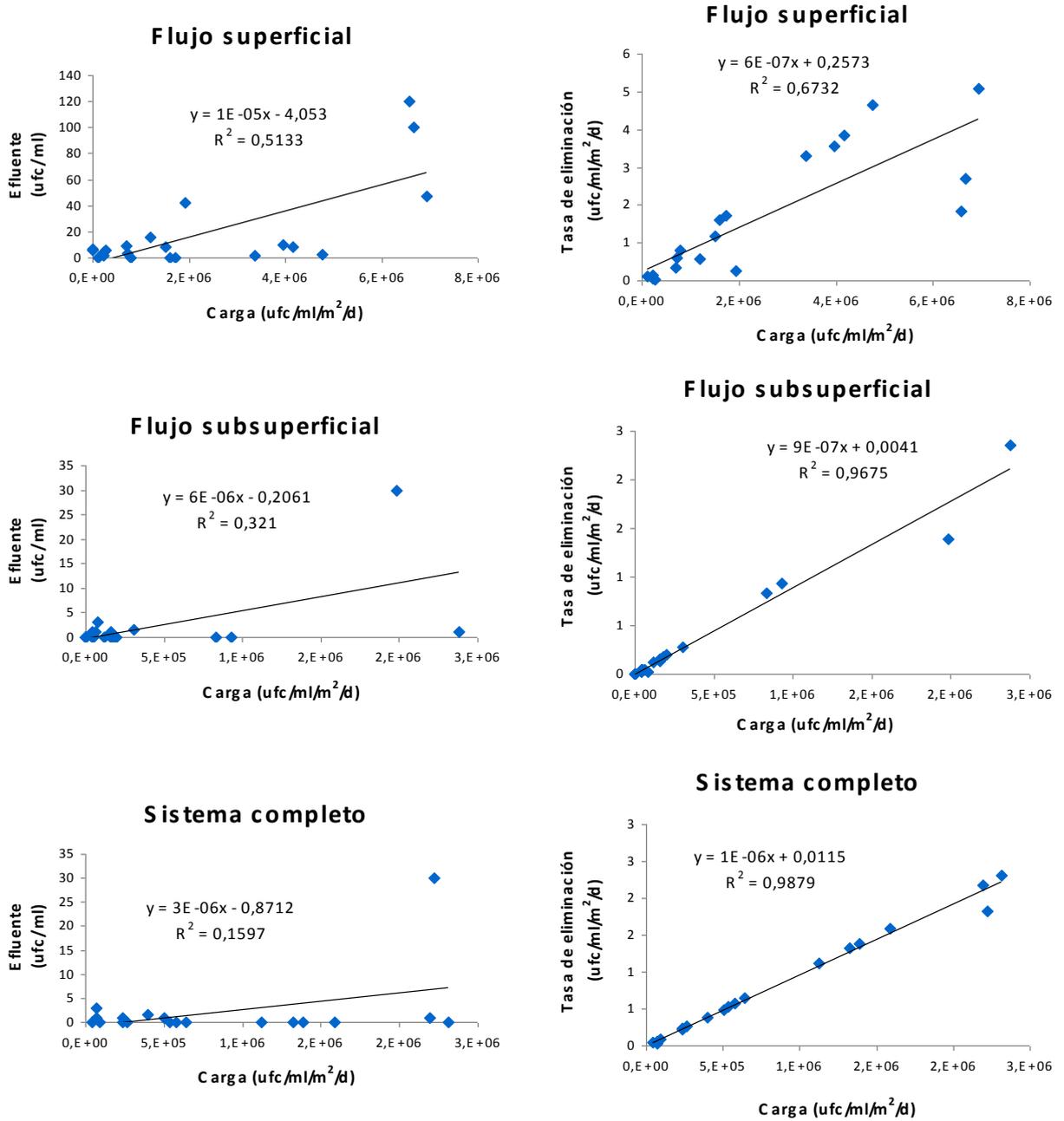


Figura 3.14. Relaciones observadas entre la carga de *Clostridium perfringens* y su concentración en el efluente en las distintas etapas del tratamiento y en el sistema completo (izquierda) y relaciones observadas entre la carga de *Clostridium perfringens* y su tasa de eliminación en las distintas etapas del tratamiento y en el sistema completo (derecha).

Coliformes fecales

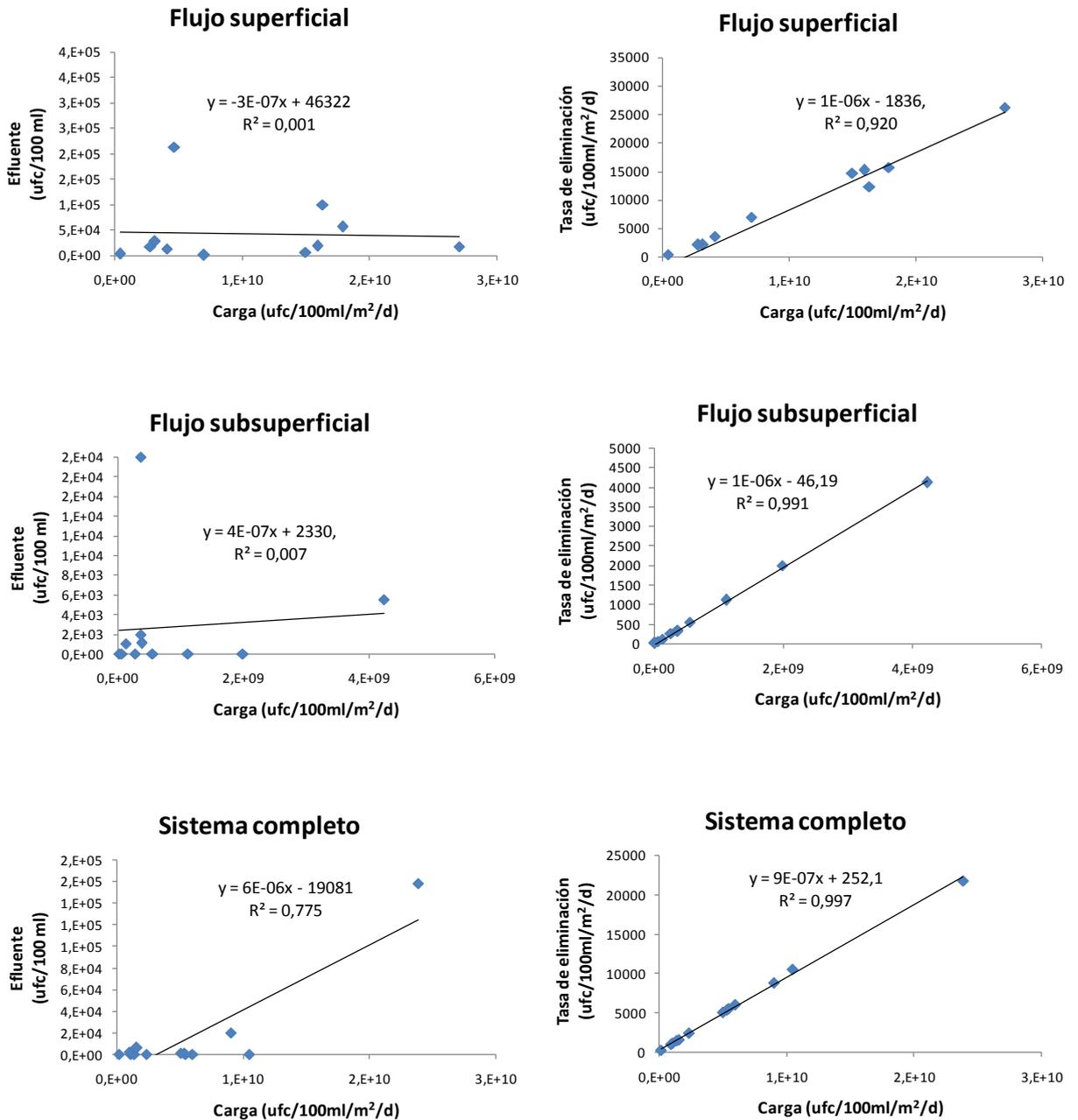


Figura 3.15. Relaciones observadas entre la carga de Coliformes fecales y su concentración en el efluente en las distintas etapas del tratamiento y en el sistema completo (izquierda) y relaciones observadas entre la carga de Coliformes fecales y su tasa de eliminación en las distintas etapas del tratamiento y en el sistema completo (derecha).

Estreptococos fecales

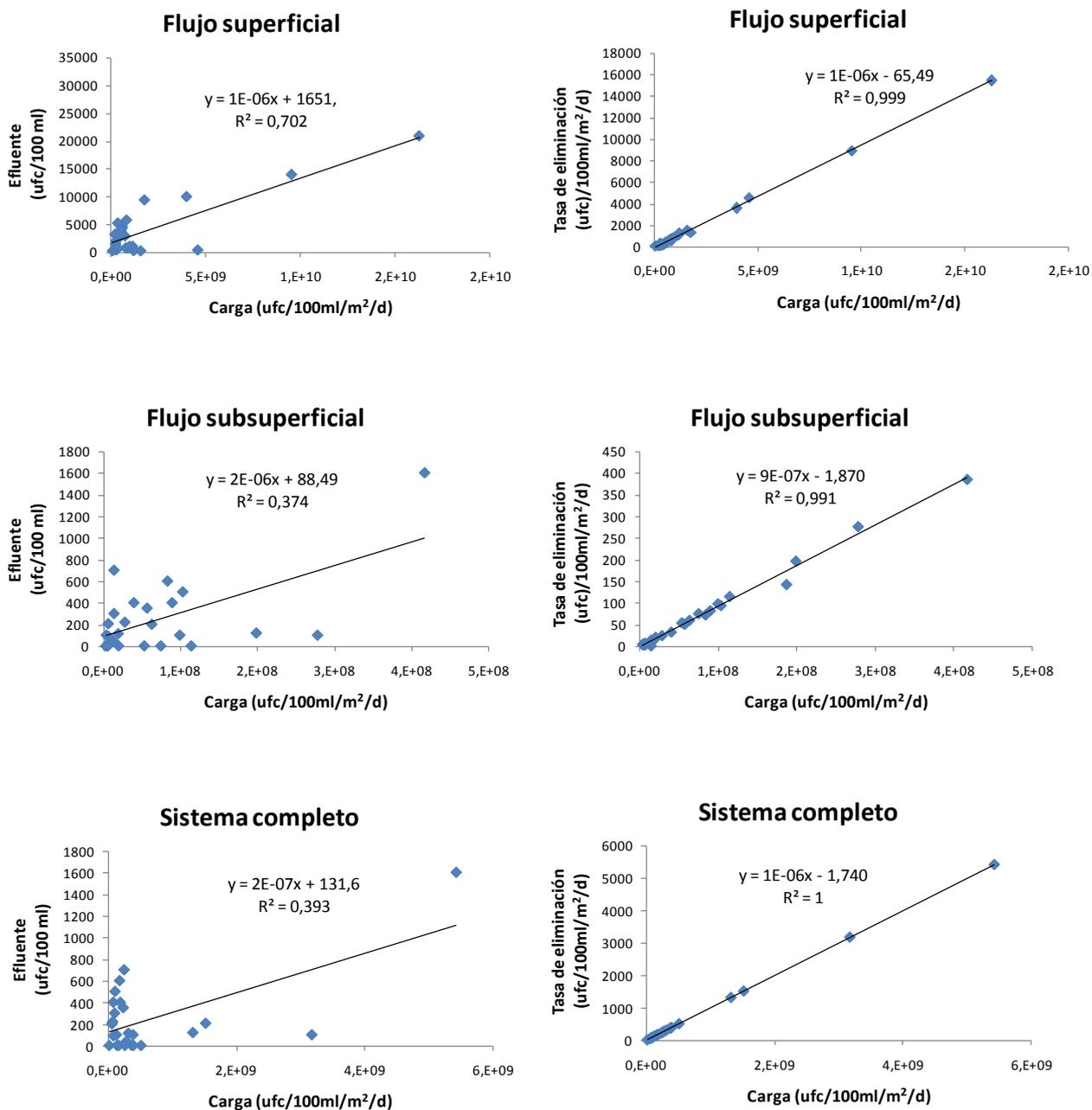


Figura 3.16. Relaciones observadas entre la carga de Estreptococos fecales y su concentración en el efluente en las distintas etapas del tratamiento y en el sistema completo (izquierda) y relaciones observadas entre la carga de Estreptococos fecales y su tasa de eliminación en las distintas etapas del tratamiento y en el sistema completo (derecha).

Coliformes totales

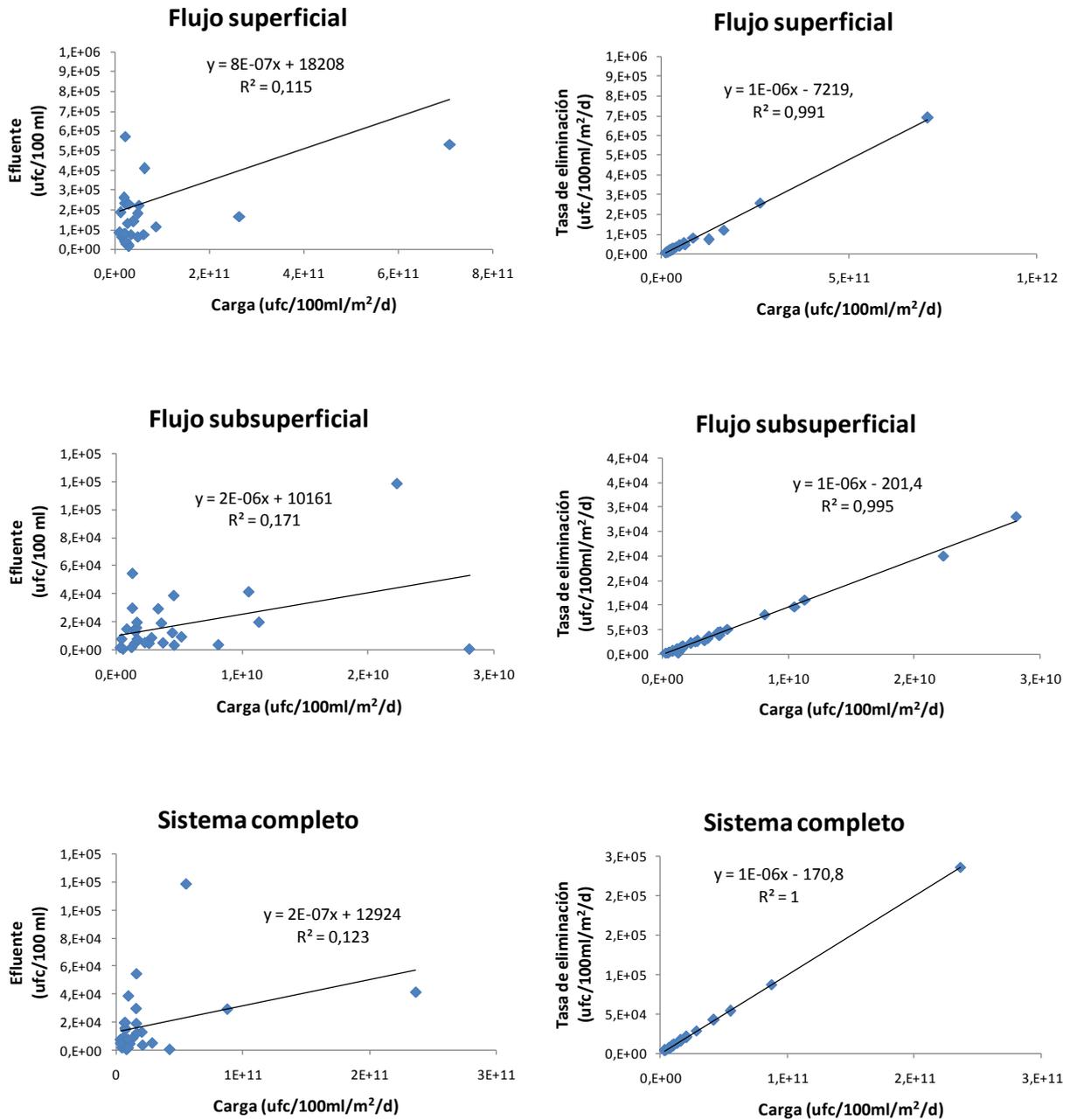


Figura 3.17. Relaciones observadas entre la carga de Coliformes totales y su concentración en el efluente en las distintas etapas del tratamiento y en el sistema completo (izquierda) y relaciones observadas entre la carga de Coliformes totales y su tasa de eliminación en las distintas etapas del tratamiento y en el sistema completo (derecha).

Escherichia coli

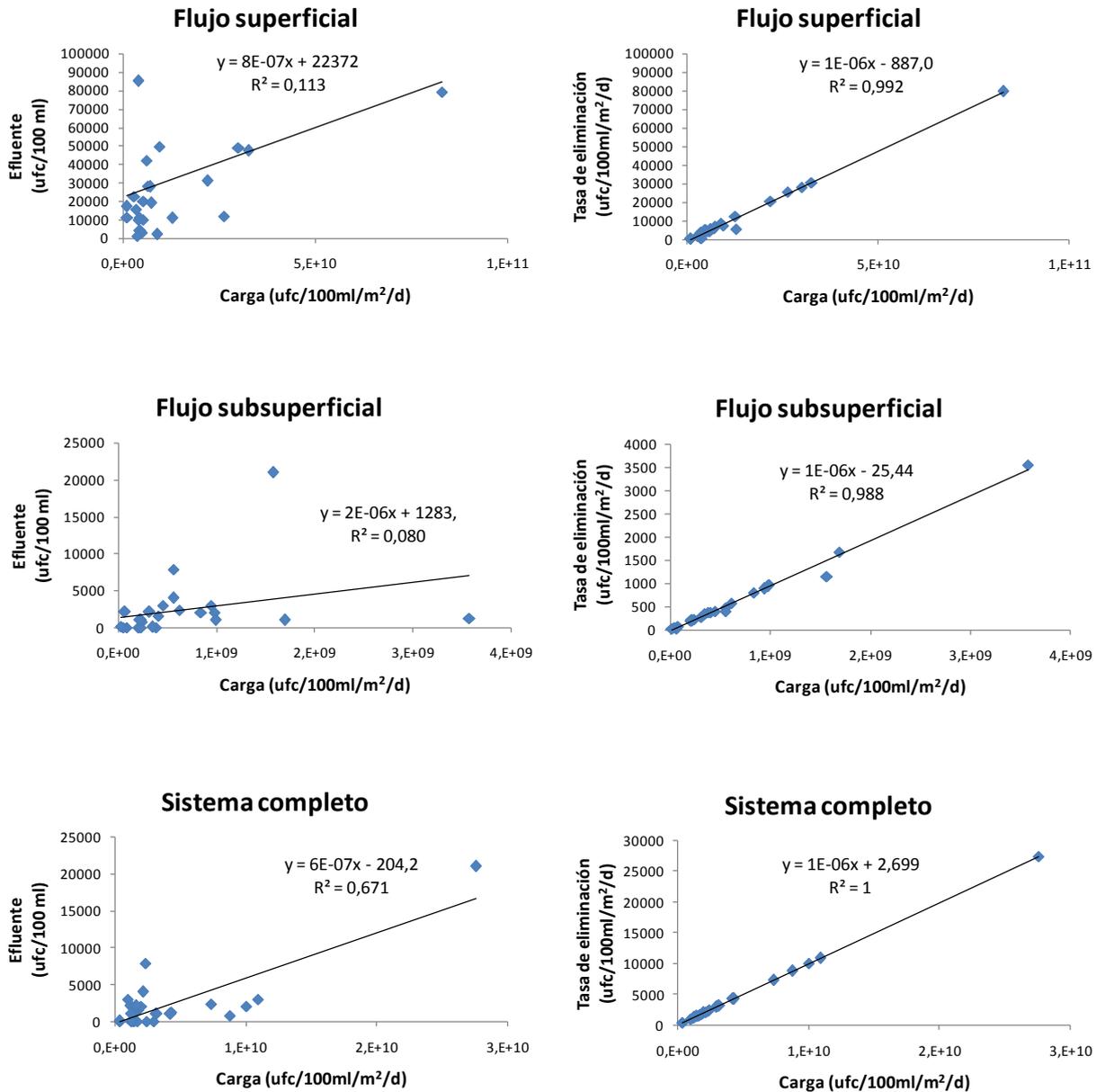


Figura 3.18. Relaciones observadas entre la carga de *Escherichia coli* y su concentración en el efluente en las distintas etapas del tratamiento y en el sistema completo (izquierda) y relaciones observadas entre la carga de *Escherichia coli* y su tasa de eliminación en las distintas etapas del tratamiento y en el sistema completo (derecha).

La Figura 3.19, muestra diagramas de cajas para los parámetros físico-químicos y las Bacterias aerobias del sistema piloto experimental de tratamiento de agua residual, del centro de reproducción porcina CENTROTEC. Se observa como los parámetros físico-químicos y las Bacterias aerobias se reducen significativamente en la etapa FSSW plantada con *Salix atrocinerea* y flujo subsuperficial en relación a los valores obtenidos en el afluente del sistema.

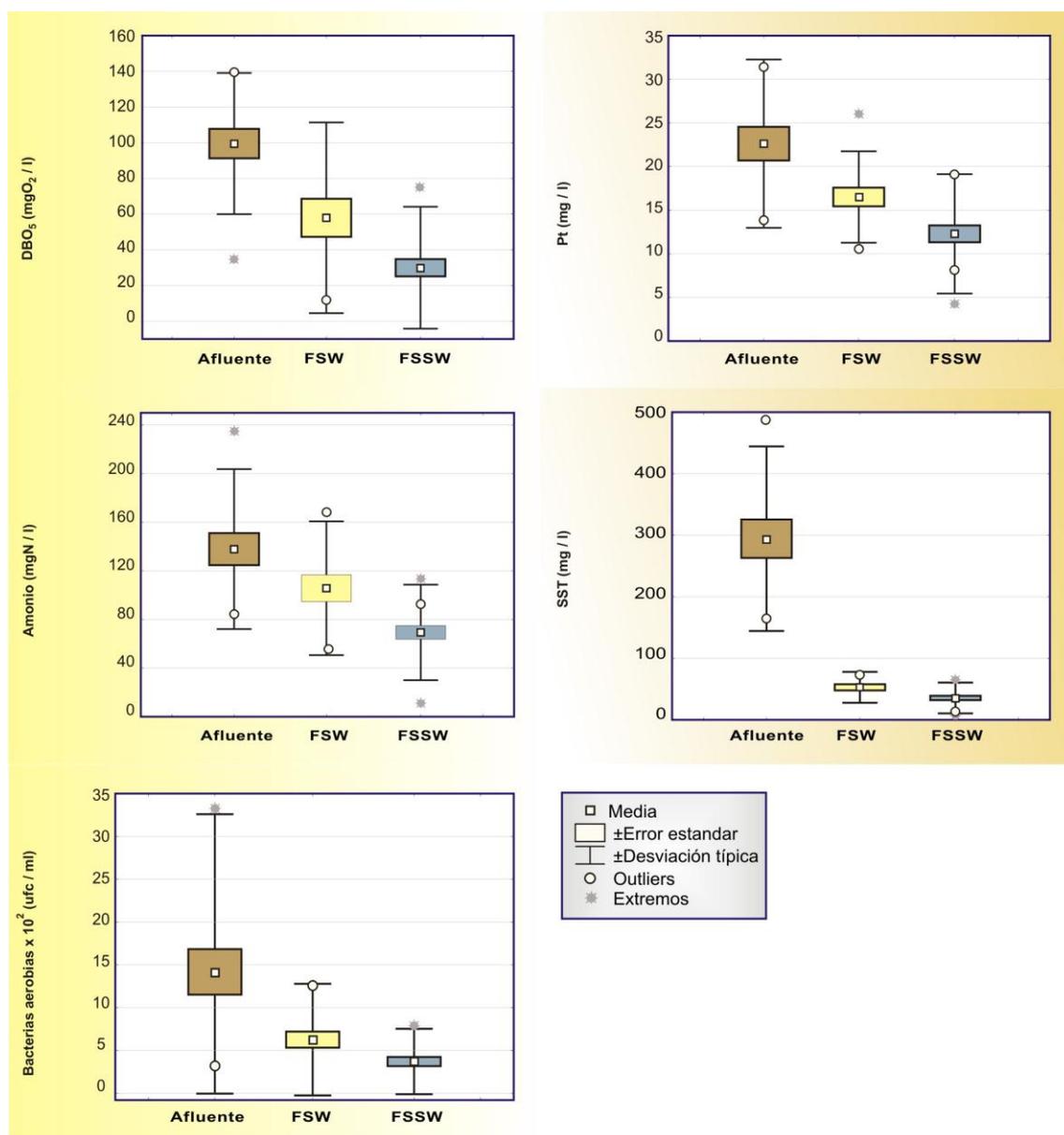


Figura 3.19. Diagramas de cajas para los parámetros físico-químicos y las Bacterias aerobias del sistema piloto experimental de tratamiento de agua residual del centro de reproducción porcina Centrotec. (FSW: Balsa de flujo superficial, FSSW: Balsa de flujo subsuperficial, N=76).

En la Figura 3.20, se observa el diagrama de caja para los indicadores fecales y *Clostridium*, del sistema experimental de CENTROTEC. Se representa el valor medio obtenido en todos los muestreos (N=76), así como el error estándar y la desviación típica, los valores extremos y los outliers. FSW: etapa del sistema con flujo superficial y plantada con *Typha latifolia*; FSSW: etapa del sistema con flujo subsuperficial y plantada con *Salix atrocinerea*. Se observa una notable disminución del número de estos microorganismos en las diferentes etapas del sistema de depuración reduciéndose significativamente en la ultima etapa (FSSW) del sistema de tipo MJEA® en CENTROTEC.

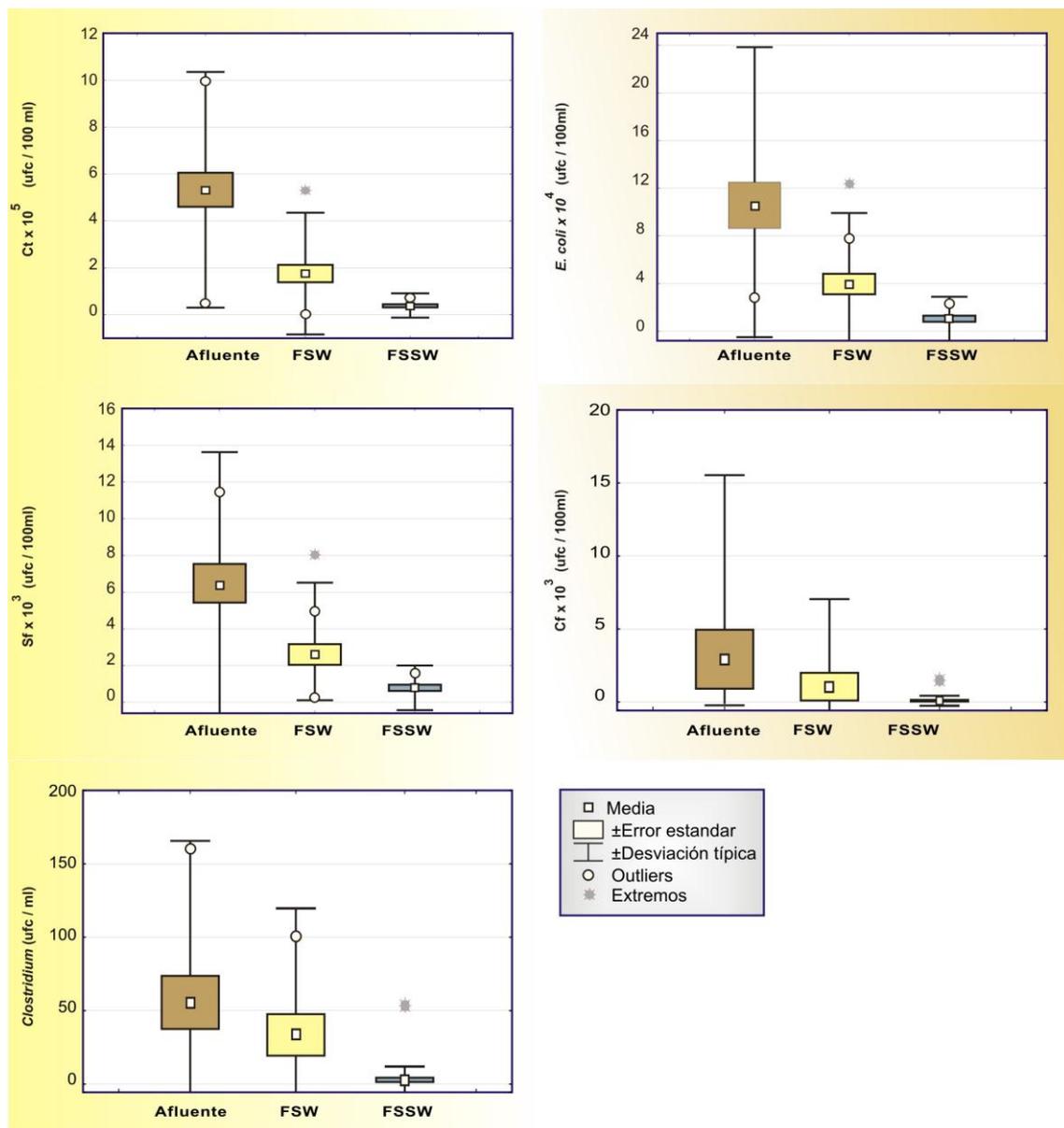


Figura 3.20. Diagramas de cajas para los indicadores fecales y *Clostridium* del sistema MJEA® en Centrotec. (FSW: Balsa de flujo superficial, FSSW: Balsa de flujo subsuperficial, N=76).

4 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1 MOSAICO JERARQUIZADO DE ECOSISTEMAS ARTIFICIALES (M.J.E.A. ®) A ESCALA REAL

Los resultados obtenidos sobre la presencia y eliminación de microorganismos indicadores y organismos patógenos mostraron una reducción significativa en los puntos de muestreos próximos a la salida del sistema de tratamiento. Observándose un 100% de eliminación de *Clostridium* en el periodo de muestreo de verano y el mismo porcentaje de eliminación para los huevos de Helmintos, los quistes de *Giardia* y los ooquistes de *Cryptosporidium* durante todos los periodos de muestreo. El porcentaje de eliminación para los indicadores de contaminación fecal *E. coli*, Coliformes fecales y Estreptococos fecales fue mayor de 90% a excepción de los Coliformes fecales que presentaron un porcentaje de eliminación del 72% durante el periodo de primavera. En general los estudios llevados a cabo por otros autores (Gersberg *et al.*, 1989a; Haberl y Perfler, 1990; Song *et al.*, 2006), mostraron mejores rendimientos con respecto a la eficiencia de eliminación de los coliformes, más del 99% que fue lo registrado en Bustillo de Cea sólo durante los muestreos de otoño.

Karpiscak *et al.*, (1996), obtuvieron una reducción del 57% de Coliformes totales y 62% de Coliformes fecales en un sistema de humedal artificial con lenteja de agua (duckweed). Estos autores también observaron, un 98% de reducción de *Giardia* y 87% de *Cryptosporidium*. También encontraron en un sistema de humedal artificial con *Typha*, *Scirpus*, y *Salix* la reducción de Coliformes totales y Coliformes fecales de 98% y 93% respectivamente, *Giardia* y *Cryptosporidium* fueron reducidos un 73% y 58% respectivamente.

Song *et al.* (2006), detectaron una alta reducción de Coliformes totales 99,7% y Coliformes fecales 99,6%, lo cual fue significativamente reducido de $2,4 \times 10^6$ UFC/100ml y $1,6 \times 10^6$ UFC/100ml a $8,0 \times 10^3$ UFC/100ml y $6,0 \times 10^3$ UFC/100ml respectivamente. Estos porcentajes de eliminación, fueron similares a los encontrados para tratamientos de humedales artificiales por Gersberg *et al* (1989a) y Kadlec y Knight, (1996).

En estudios realizados por Gersberg *et al.* (1989b), en California observaron en un humedal artificial plantado con *Scirpus* una reducción de Coliformes totales de 1,52 unidades logarítmicas. Esta laguna recibía $180 \text{ m}^3/\text{d}$ de efluente secundario que equivale a 1/5 días de tiempo de retención hidráulica (TRH). El mismo estudio se realizó con

sistemas plantados y no plantados que recibían agua residual urbana con un caudal de 50 m³/d con un TRH de 5,4 días. El humedal plantado con *Scirpus*, mostró una eliminación de 2,07 unidades logarítmicas de Coliformes totales, y en el humedal sin vegetación no se encontró tasa de eliminación.

Bavor *et al.*, (1989), determinaron que sólo 2 días de tiempo de retención a 20 °C eran necesarios para lograr una eliminación de Coliformes fecales de 1 unidad logarítmica en una laguna sin vegetación mientras que un TRH de 3 días era necesario para lograr el mismo porcentaje de eliminación en una laguna plantada con *Typha*.

La eliminación de Bacterias Coliformes, ha sido también estudiada por Williams *et al* (1995), quienes confirmaron la capacidad de un humedal artificial de sistema hidropónico para lograr la eliminación de 2 unidades logarítmicas de *E. coli* y Coliformes totales con valores de TRH de más de 24 horas.

En el estudio llevado a cabo en León, los Coliformes fecales registraron una reducción de 1,42 unidades logarítmicas durante el verano, 3,18 en el otoño, 1,42 en el invierno y 0,6 en primavera. Durante el otoño, fue cuando se registró una mayor eficiencia de eliminación en contraposición a la registrada por otros autores como Gersberg *et al.*, (1989b). En el caso de *E. coli* los valores de eliminación fueron 1,32 unidades logarítmicas en el verano, 1,62 en otoño, 1,23 en invierno y 3,01 en primavera, estas últimas mostraron valores con mejor rendimiento. El TRH de Bustillo de Cea es de 13 días lo cual estaría asociado a la eficiencia de eliminación de los microorganismos indicadores. Según Mandi *et al.*, (1993), en los humedales artificiales con flujo subsuperficial y con *Eichornia crassipes*, la sedimentación, la depredación y la muerte celular juegan un papel importante en la eliminación de microorganismos. Este mismo autor, también observa que la tasa de eliminación de Coliformes fecales en lagunas con macrófitos necesita un tiempo de retención de entre 7 y 50 días, atribuyéndose esta diferencia a la aglomeración de Bacterias sobre la raíz y a la depredación causada por la población de nematodos presentes.

Por otro lado, Thurston. J., *et. al* (2001) observaron un notable aumento tanto en el número de Coliformes fecales como de Coliformes totales durante los meses de invierno lo cual pudo ser debido a la actividad animal o a la variación estacional de las plantas. La reducción de los microorganismos indicadores, de calidad tales como

Coliformes totales y *E. coli* en este sistema de depuración, pudo ser debido a factores biológicos tales como la depredación de los nematodos y protozoarios, la acción de lisis o ruptura celular de las Bacterias causada por los bacteriófagos (Green *et al.*, 1997; Decamp y Warren, 1998, Graves y Weaver, 2009) y por los factores químicos tales como las reacciones de oxidación, absorción y la exposición a las plantas y a las toxinas microbianas (Neori *et al.* 2000; Graves y Weaver, 2009).

El género *Cryptosporidium*, es uno de los protozoarios parásitos gastrointestinales más comunes (Slifko *et al.*, 2000; Morsy *et al.*, 2007). Morsy *et al.*, (2007), detectaron ooquistes de *Cryptosporidium* en un 95,5% de las muestras de aguas residuales examinadas; estos resultados son parecidos a los registrados por Farias *et al.*, (2002), los cuales detectaron ooquistes de *Cryptosporidium* en 24 muestras de una estación de bombeo de agua residual de Brasil. Investigadores en otros países registraron poca presencia de ooquistes de *Cryptosporidium*, por ejemplo Johnson *et al.*, (1995), en USA encontraron *Cryptosporidium* en un 54,2% de las muestras de agua residual mientras que Mayer y Palmer, (1996), solo en un 45,5% también en USA. Tanto Rose *et al.*, (1996) en USA como Ottoson, (2001) en Suecia detectaron en un 67% de las muestras de aguas residuales ooquistes de *Cryptosporidium*.

Morsy *et al.*, (2007), observaron ooquistes en agua residual doméstica en un rango entre 0 y 83 Ooquiste/l con un valor medio de 43,8 Ooquistes/l. Lemarchand y Lebaron (2003), en Francia encontraron ooquistes de *Cryptosporidium* en un rango de valores entre 1 y 87,1 Ooquistes/l con un valor medio de 23,4 Ooquistes/l. En el sistema de depuración de tipo MJEA[®] se observaron, ooquistes de *Cryptosporidium* a la entrada del sistema en un rango de valores entre 0 y 4,9 Ooquistes/l en una 83% de las muestras de agua bruta con un valor medio de 1,4 Ooquistes/l.

La escasa cantidad de quistes de *Giardia*, ooquistes de *Cryptosporidium* y huevos de Helmintos en el agua del sistema de tratamiento pudo deberse al fenómeno de sedimentación. Amahmid *et al.*, (2002) determinaron que el rendimiento positivo de una laguna de estabilización en cuanto a la reducción de protozoarios y huevos de Helmintos, está ampliamente atribuido al fenómeno de sedimentación favorecido por el tiempo de retención hidráulica. Este fenómeno influye mucho más sobre los huevos de *Ascaris* que sobre los quistes de *Giardia*.

En el sistema de tipo MJEA[®] estudiado se ha obtenido un 86% de quistes de *Giardia* en el agua bruta o de entrada al sistema de tratamiento.

La presencia y el uso de indicadores de contaminación fecal tales como *E. coli* pueden predecir la presencia de otras Bacterias enteropatógenas (Horman *et al.*, 2004). Estos autores sugieren que no existe correlación positiva entre el número de *E. coli* y la presencia de quistes de *Giardia* tal y como ocurre en el sistema de depuración de tipo MJEA[®], sin embargo sí han encontrado correlación positiva (0,60) entre Coliformes totales y huevos de Helminetos del género *Trichuris*, siendo su correlación de 0,41 en el sistema analizado en Bustillo de Cea.

Autores como Rose *et al.*, (1991), demostraron que existe una inadecuada predicción de la presencia de los parásitos a través de los indicadores bacterianos clásicos, mientras Le Chevallier *et al.*, (1991), evidenciaron una interrelación positiva entre la densidad de los *Cryptosporidium* y los Coliformes totales y fecales.

En el estudio realizado en el sistema de tipo MJEA[®] de Bustillo de Cea la presencia de *Giardia* ha mostrado correlación positiva bastante alta con E.F. (0,90) y la conductividad (0,66) y correlación negativa con la Temperatura (-0,66). Sin embargo la presencia de *Trichostrongylus* en cantidades tan mínimas no ha permitido encontrar correlación positiva o negativa con ningún parámetro tanto microbiológico como físico-químico. La correlación negativa observada entre los quistes de *Giardia* y los ooquistes de *Cryptosporidium* con la Temperatura, esto contradice lo expresado por Thurston. J., (2001), que en general, se observa una relación positiva entre el aumento de la Temperatura y el aumento del número de microorganismos presentes en las muestras. A Temperaturas altas, aumenta el oxígeno en la rizosfera y las raíces comienzan a exudar y a acumular la materia orgánica aumentando el crecimiento de los microorganismos.

Al igual que en nuestro estudio Briancesco y Bonadonna (2005), han encontrado correlación entre los E.F. y los quistes de *Giardia* (0,9) y ooquistes de *Cryptosporidium* (0,92) mientras que para *Clostridium* no se aprecia ninguna correlación con los protozoarios.

Lemarchand y Lebaron en 2003, en un estudio realizado en agua de río llevaron a cabo un análisis de correlación entre ooquistes de *Cryptosporidium* y Coliformes fecales y

encontraron que no existe correlación entre patógenos e indicadores microbianos lo cual está explicado por los factores biológicos, químicos e hidrodinámicos que gobiernan el comportamiento y transporte de estos organismos. Estos factores pueden ser: (Flujo de agua, ataque de partículas, sedimentación, suspensión, supervivencia, etc.).

Los ooquistes de *Cryptosporidium*, pueden sedimentarse y las Bacterias de vida libre pueden permanecer planctónicas en sistema de tratamientos de aguas residuales (Lemarchand y Lebaron, 2003).

En este estudio, el *Clostridium* mostró correlación con DBO₅ ($r= 0,61$; $p>0,05$) y con el Amonio ($r= 0,46$; $p>0,05$) también mostró correlación con los microorganismos indicadores Coliformes fecales ($r=0,57$; $p>0,05$), Estreptococos fecales ($r=0,52$; $p>0,05$) y con *E. coli*: ($r=0,50$; $p>0,05$) a diferencia de el estudio realizado por Thurston *et al.*, (2004) donde encontraron correlación positiva entre *Clostridium* y *Giardia* ($r=0,90$; $p>0,03$). Con lo cual concluyeron que el *Clostridium* y *E. coli* usualmente son considerados buenos indicadores de contaminación fecal debido a su capacidad de sobrevivir en ambientes contaminados y en sistemas de lagunaje artificial.

Abreu *et al.*, (2002), en estudios realizados sobre la presencia de *Giardia* y *Cryptosporidium* en aguas residuales depuradas reutilizadas para riego agrícola en la isla de Tenerife España, encontraron que *Giardia lamblia* presentó una correlación baja con Estreptococos fecales ($r= 0,267$; $p>0,013$), Clostridios sulfito reductores ($r=0,237$; $p>0,036$) y con MES ($r=0,344$; $p>0,002$).

En el sistema MJEA[®] se observó, correlación negativa entre el Amonio y *Giardia* ($r= -0,40$; $p>0,05$) y entre Amonio y *Cryptosporidium* ($r= -0,46$; $p>0,05$) al analizar las muestras del afluente y efluente de forma conjunta. En el trabajo realizado por Thurston *et al.* (2001), también se obtiene una correlación negativa entre *Giardia* y Amonio. Estos resultados sugieren, que el aumento de los niveles de Amonio contribuye a reducir la resistencia ambiental de estos microorganismos. Otros investigadores, también han logrado que los niveles de Amonio aumenten la reducción microbiana (Araki, *et al.*, 2001; Jenkins *et al.*, 1998).

Araki *et al.*, (2001), determinaron que otro factor que influye en la inactivación de los quistes u ooquistes es el equilibrio Amonio-Amonio que tiende a formar gases. Por lo

tanto el Amonio disuelto puede tener un significativo papel inactivador de los ooquistes. Jenkins *et al.*, (1998), demostraron que la exposición a soluciones con bajas concentraciones de Amonio puede afectar a los ooquistes de *C. parvum*. Por lo cual en nuestro estudio las concentraciones de Amonio pudieron haber inactivado a los quistes de *Giardia* y a los microorganismos indicadores.

El análisis realizado sobre las muestras recogidas en el sistema MJEA[®], determina una correlación positiva entre, *E. coli* y *Clostridium*, *Giardia* y *Cryptosporidium* y los huevos de Helmintos no presentaron correlación con ningún parámetro microbiológico.

Según el estudio realizado por Valderrama *et al.*, (2003), los Coliformes fecales y *E. coli* están correlacionados ($r=0,6$) de forma positiva e inversamente correlacionados con la Temperatura ($r=-0,8$). Williams *et al.*, (1995) y Van deer steen *et al.*, (1999) encontraron también correlación entre los microorganismos y la materia orgánica.

En este estudio se ha obtenido correlación negativa entre la DBO₅ y los huevos de Helmintos ($r= -0,41$) en el análisis realizado sobre el agua residual de entrada o agua bruta. También se ha observado, correlación positiva entre DBO₅ y todos los microorganismos analizados en las muestras del afluente y el efluente del sistema. Awuah *et al.*, (2001) obtuvieron resultados muy similares y determinaron que la eliminación de la materia orgánica puede ser debida a procesos físicos y bioquímicos que incluyen la sedimentación de la materia orgánica suspendida en el agua residual, la oxidación de esta causada por las Bacterias heterotróficas del agua residual y la degradación anaeróbica en el sedimento del fondo de la laguna.

La aplicación del análisis de varianza realizado para determinar la existencia de diferencias significativas entre el periodo cálido y frío demostró que se observan diferencias significativas en la reducción de la DBO₅ en las diferentes etapas del sistema de tratamiento siendo la etapa de flujo subsuperficial (FSSW) la que más diferencias significativas.

En general el sistema de tratamiento redujo eficientemente la DBO₅. Esta se encontró dentro de los límites permitidos según la normativa oficial (91/271/CEE) que indica que el agua de vertido de un sistema de tratamiento debe tener 25 mgO₂/l

Con respecto a la concentración de Fósforo total según la normativa oficial (91/271/CEE) el agua de vertido de un sistema de tratamiento de depuración debe tener una concentración de 2 mg/l para zonas sensibles observándose una concentración media de Fósforo total cercana a la establecida por la directiva europea, aunque la zona de vertido no ha sido catalogada como zona sensible.

Las variaciones observadas en la reducción de estos parámetros se deben a los diferentes mecanismos que ocurren en el ecosistema del humedal donde participa la precipitación, la sedimentación, la acumulación de turba, las plantas (Dunne *et al.* 2005). Además la vegetación, la materia en descomposición la fauna, los microorganismos y el sustrato disminuyen la concentración de Fósforo (Zhang *et. al.*, 2009).

4.2 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS HUEVOS DE HELMINTOS EN LODOS

Debido a la presencia de huevos de Helmintos en el agua residual de Bustillo de Cea se hizo necesario realizar ensayos para determinar la presencia y viabilidad de estos en los lodos del pretratamiento y la laguna de microfitos del sistema de tipo MJE[®].

El número total de Helmintos por kilogramo de materia seca encontrados en el pretratamiento fue de 97 H/kg.m.s. registrándose un número de *Ascaris* de 47 H/kg.m.s con un 4,25% de viabilidad o la probabilidad de que existan 2 huevos viables de este Helminto. *Trichostrongylus* (29 H/kg.m.s) con un porcentaje de viabilidad de 6,90% que representan 2 huevos viables e *Himenolepis* (20 H/kg.m.s) con un porcentaje de viabilidad de 20% que representa la posibilidad de que existan 4 huevos viables. Hay que indicar que de los 97 H/kg.m.s totales registrados en la balsa de pretratamiento del sistema de depuración solo se observaron 8 huevos viables.

El número total de huevos de Helmintos por kilogramos de materia seca encontrados en el lodo de la laguna de microfitos a 1,5 m de profundidad fue de 343 H/Kg.m.s de los cuales se registrarón un total de 128 H/Kg.m.s de *Ascaris* con un 1,56% de viabilidad que representan 2 huevos viables. Para *Trichostrongylus* 119 H/Kg.m.s con un 2,52% de viabilidad que representan la existencia de 3 huevos viables. Para *Himenolepis* (81

H/Kg.m.s) con un 3,70% de viabilidad que representan la existencia de 3 huevos viables. También se encontró *Trichuris* (8 H/Kg.m.s) no viables. De los 343 H/Kg.m.s de Helmintos totales registrados en el lodo de la laguna de microfitos a 1,5 m de profundidad solo se observaron 8 huevos viables.

En el lodo de la balsa de microfitos a 1 m de profundidad se identificaron un número total de 338 H/Kg.m.s de los cuales se observaron 181 H/Kg.m.s de *Ascaris* con un 2,21% de viabilidad que representan 4 huevos viables, 82 H/Kg.m.s de *Trichostrongylus* con un 6,10% de viabilidad que representan 5 huevos viables, 66 H/Kg.m.s de *Himenolepis* con un 6,06% de viabilidad que representan la existencia de 4 huevos viables y 9 H/Kg.m.s de *Trichuris* no viables. De los 338 H/Kg.m.s totales registrados en el lodo de la laguna de microfitos a 1m de profundidad se observaron 13 huevos viables.

La normativa vigente establece que en el agua de vertido debe haber menos de 1 huevo de helminto por 10 litros, en la legislación no se especifica nada acerca de la presencia de huevos de Helmintos en lodos pero se recomienda realizar un tratamiento adecuado a los lodos de este sistema de depuración para evitar posible contaminación de la población.

Burd (1968), en estudios realizados de lodos almacenados en lagunas de 5,5 a 10,7 m de profundidad por periodos de muchos meses o años, observó que durante este tiempo los sólidos se sedimentaron en el fondo, registrándose una continua descomposición anaeróbica en la parte más profunda de la laguna, la cual al ser drenada periódicamente, el sobrenadante regresaba a la planta de tratamiento para ser procesado sin la presencia de Helmintos. En los resultados obtenidos en Bustillo de Cea se observó la existencia de un número considerable de huevos de Helmintos en el lodo de las balsas estudiadas, observándose una concentración de estos mayor en los dos puntos muestreados de la laguna de micrófitos que en el lodo de la entrada del sistema, este hecho podría explicarse porque el lodo del pretratamiento o de la entrada del sistema es extraído anualmente y el lodo de la laguna de micrófitos, en 9 años que lleva el sistema de tratamiento funcionando, no ha sido extraído nunca y los huevos podrían haber permanecido sedimentándose en el fondo de la laguna pudiéndose haber producido pérdida de viabilidad por acumulación durante un largo periodo de tiempo.

Sadighian *et al.* (1976), cuantificaron en una planta de tratamiento en Irán un número de 14.000 a 25.000 Huevos de *Ascaris* /g materia seca y Ayres *et al.* (1992), encontraron de 5.187 a 44.306 Huevos de Helmintos/g materia seca en una laguna facultativa, estas concentraciones de parásitos son extremadamente altas, lo cual podría ser consecuencia directa de las bajas condiciones socio-económicas de los habitantes de estos países.

Por el clima templado de los países europeos las aguas residuales contienen bajas cargas de parásitos de origen humano por lo cual la carga contenida en los lodos también depende de los desechos de animales vertidos en los sistema de aguas residuales (WHO, 2004). La existencia de parásitos en lodos es muy conocida (Cram, 1943; Keller y Hide, 1951; Graham, 1981; Schwartzbrod *et al.*, 1989), y el número y tipo de parásitos presentes está influenciado por la tasa de infección de la población local. (Hays, 1977).

En estudios realizados por Schwartzbrod *et al.*, (1986) en muestras de lodo de una planta de tratamiento de aguas residuales de Nancy (Francia) se observaron una contaminación con parásitos bastante significativa de 83 a 130 Huevos/kg materia seca, en la cual todas las muestras estudiadas fueron positivas.

Estudios posteriores realizados por Schwartzbrod *et al.*, (1989) demostraron que las concentraciones variaron de 113 a 135 huevos/100g dependiendo del tipo de lodo estudiado, observándose que el tratamiento aplicado a los huevos de Helmintos fue de bajo impacto. Los huevos de Helmintos detectados pertenecían al filo Nematoda y más raramente a la clase Cestoda del filo Plathelminthes. En Francia, se observaron y fueron recuperados una gran cantidad de parásitos animales y humanos de los lodos incluyendo a *Ascaris* sp., *Toxocara* sp., *Trichuris* sp., *Hymenolepis* sp. y *Taenia* sp.

Según Reimers *et al.* (1981), en investigaciones realizadas al sur de los Estados Unidos en lodos de agua residual de origen urbano, observaron huevos de parásitos viables y quistes encontrándose 18 especies de parásitos diferentes. De 1.000 a 10.000 huevos/kg. de materia seca dependiendo del parásito, el cual varió según la población, tipo de industria, estación del año y región geográfica.

Schwartzbrod *et al.* (1987), cuantificaron en sedimentos de lagunas de estabilización de Marruecos, un número de huevos de Helmintos (nematodos y platelmintos) de 40 a 246 huevos/g de sedimento seco. Estos encontraron, que el número de huevos de

platelmintos desaparecía mucho más rápidamente que los huevos de nematodos. Esta disminución podría ser debida a las condiciones anaerobias del sedimento de la laguna, a fenómenos de depredación o a los efectos de la presión osmótica (Fitzgerald y Ashley, 1977; Panicker y Krishnamoorthi, 1978). Comparando el número de Huevos de Helmintos registrados en otros países con los observados en este estudio es mucho menor el número de huevos de Helmintos registrados en Bustillo de Cea. Aunque no existe un método estándar para la recuperación y detección de Helmintos en muestras de lodos y esta diferencia en las metodologías empleadas por los investigadores limita el grado con el cual se puede asegurar las comparaciones entre los estudios realizados.

También se debe acotar que la identificación al microscopio de los diferentes grupos de Helmintos es muy difícil debido al parecido de las estructuras de los huevos y larvas, se hizo un estudio más o menos presuntivo tanto de larvas como de huevos de Helmintos y se trató de ser lo más preciso posible en cuanto a las especies de Helmintos encontrados. Se debe tener en cuenta que la observación microscópica se ve muy dificultada por la presencia de multitud de huevos de difícil o dudosa clasificación, ya sea de especies de vida libre que habitan los fangos, ácaros y artefactos de varios tamaños y formas que coinciden con la familia *Trichostrongylidae* que es una de la más abundantes en este estudio. (Bernabeu *et al.*, 2002). Además, a veces es casi imposible determinar si los huevos son de origen humano o animal. Según O'Donnell *et al.* (1984), muchos huevos de Helmintos son similares y estructuralmente indistinguibles por ejemplo los géneros *Ascaris*, *Toxocara*, *Trichuri*, *Capillaria* e *Hymenolepis* son muy difíciles de identificar.

En este estudio, se observaron especies de Helmintos tales como: *Ascaris* en mayor porcentaje, el cual es un nematodo parásito propio del hombre y del cerdo. Son huevos ligeramente ovalados, de 35-75 x 35-50 μm , con una membrana albuminoidea característica, gruesa y mamelonada. La fuente de infección es principalmente el suelo, los alimentos, aguas, manos y objetos contaminados con materia fecal que contiene huevos infectantes de *Ascaris* sp. Es un parásito cosmopolita. Habita más frecuentemente en regiones templadas y cálidas del mundo (Pérez *et al.*, 2000).

El nematodo *Trichostrongylus*, se encuentra en el tracto digestivo de los animales herbívoros, esta ampliamente distribuido en todo el mundo y es propio de los rumiantes, caballos y cerdos. Varias especies de esta familia pueden infectar al hombre, provocando dolores abdominales y diarreas. (Pérez *et al.*, 2000).

Hymenolepis es un cestodo que tiene una distribución cosmopolita, aunque es típica de roedores y puede infectar al hombre. Los huevos son esféricos, ligeramente ovalados, con una membrana fina externa y otra interna en la que se observan seis ganchos característicos. (Pérez *et al.*, 2000). Los más estudiados son *Hymenolepis nana* e *Hymenolepis diminuta* comunes en países con clima templado (Baker *et al.*, 2002) ambos presentes en humanos.

Los huevos de *Trichuris trichiura* (del griego *trichos* = pelos y *Kephalos* = cabeza) producen la enfermedad denominada trichuriasis o tricocefalosis. Es una geohelmintiasis frecuente en zonas tropicales, rurales. (Hotez, *et al.*, 2008; Carrada, 2004, Uribaren, 2010).

4.3 MOSAICO JERARQUIZADO DE ECOSISTEMAS ARTIFICIALES (M.J.E.A.®) A ESCALA PILOTO

En el estudio realizado en las aguas residuales de purín se obtuvieron valores de pH cerca de la neutralidad que según el real decreto 606/2003 los valores de pH de los vertidos de agua de explotación de ganado (porcino) deben oscilar entre 5,5 y 9,5 por lo cual los valores obtenidos en este estudio están dentro de los límites permitidos.

En estudios realizados por Hunt *et al.*, (1995), los valores de pH variaron diariamente en un rango de 7,5 a 8,1 llegando a la conclusión de que los valores altos de pH se debe a la actividad diurna de las algas. Esto junto con el aumento de la Temperatura en verano contribuye a volatilizar el $N-NH_4^+$.

En cuanto a los valores de Oxígeno disuelto obtenidos fueron bajos y no se observó mucha diferencia con respecto a las diferentes cargas de Nitrógeno empleadas durante este estudio. Los valores más altos se obtuvieron en el punto (P1), lugar donde se realizó la toma del purín bruto desde la laguna utilizando una bomba extractora que movía el agua aumentando su oxigenación.

Generalmente, cuerpos de agua con una concentración de Oxígeno disuelto (OD) mayor de 5 mgO_2/l son considerados adecuados para sostener la vida acuática. Valores menores a este sugieren condiciones de estrés (hipoxia). Según Thurston *et al.*, (1979), las aguas dulces deben tener entre 5,0 mgO_2/l y 3,5 mgO_2/l . Los valores obtenidos en

este estudio se encuentran por debajo de este rango de valores en el punto de vertido a cauce fluvial.

Se observó también, que los valores de DBO_5 con las tres cargas de Nitrógeno empleadas presentaron una marcada disminución en el efluente del sistema siendo menor de $40 \text{ mgO}_2/\text{l}$ que es el valor permitido para vertidos de origen ganadero. Alcanzando un 84,68 % de reducción con la menor de las cargas de NTK aportada.

Según el estudio realizado por Dunne *et al.*, (2005), en un humedal artificial de flujo superficial, encontraron una carga de DBO_5 de $3,57 \pm 0,49 \text{ g m}^2 \text{ d}^{-1}$ lo cual fue 5 veces menor que los valores registrados por Newman *et al.*, (2000). Otros estudios han registrado una eficiente eliminación de DBO_5 en humedales artificiales con cargas de $9 \text{ g m}^2 \text{ d}^{-1}$ (Reaves *et al.*, 1994; Skarda *et al.*, 1994; Geary y Moore, 1999). Comparando estos valores de cargas con los valores, obtenidos en la planta piloto experimental tenemos que se obtuvo una DBO_5 de $(0,15 \text{ g m}^2 \text{ d}^{-1})$, $(0,26 \text{ g m}^2 \text{ d}^{-1})$ y $(0,29 \text{ g m}^2 \text{ d}^{-1})$ para las tres cargas de Nitrógeno usadas, observándose que todos los valores de carga de DBO_5 se encontrarán dentro del valor permitido para vertidos de origen ganadero y son mucho más bajos que los alcanzados en el estudio de Dunne *et al.*, (2005).

En cuanto a los SST la planta piloto experimental registró una eficiente eliminación de este parámetro, el valor de vertido permitido para los SST es de 80 mg/l según el Real Decreto 606/2003 para residuos ganaderos. Los valores medios obtenidos en el efluente para las tres cargas de Nitrógeno usadas fueron $(36,85 \pm 36,5 \text{ mg/l})$, $(14,90 \pm 5,77 \text{ mg/l})$ y $(25,33 \pm 12,0 \text{ mg/l})$ estando todos los valores dentro del rango establecido por la ley.

Para los valores de Amonio en la planta piloto experimental se observó una notable disminución en la concentración de Amonio de hasta el 65,73% en el periodo de mayor carga de Nitrógeno aportada. La carga de Amonio, obtenida por otros autores tales como Reaves *et al.*, (1994) y Skarda *et al.*, (1994) fue de $83 \pm 13,64 \text{ mg m}^2 \text{ d}^{-1}$ mucho más bajo que el registrado por Geary y Moore (1999) que fue de $3.200 \text{ mg m}^2 \text{ d}^{-1}$.

En cuanto a los valores de Amonio se puede decir que las altas tasas de desnitrificación, pueden verse limitadas por falta de oxígeno para la nitrificación sugiriéndose que la volatilización del Amonio puede ser el principal mecanismo para reducir Nitrógeno en el tratamiento de agua residual de granjas de cerdos. (Knight *et al.*, 2000; Hunt *et al.*,

2002). Una alternativa a este proceso es el Anaerobic Ammonium Oxidation (ANAMMOX), previa nitrificación parcial del Amonio. Bacterias específicas oxidan el Amonio en condiciones anaerobias, utilizando el nitrito como aceptor de electrones y produciendo Nitrógeno gas.

Los autores antes citados obtuvieron valores de Fósforo de $30,89 \pm 3,67$ mg/l y en este ensayo se registraron valores de Fósforo total muchos menores de entre 1 y 10 mg/l. siendo el valor de vertido señalado por la legislación para aguas residual de origen porcino de 10 mg/l. La reducción de Fósforo en un humedal artificial de flujo superficial se lleva cabo a través de algunos mecanismos como sedimentación, precipitación, absorción a través de las raíces de las plantas, etc., pudiéndose ver limitada por las condiciones anaerobias (Craft y Richardson, 1993; Mitsch y Gosselink, 1993; Reddy *et al.*, 1999; Kadlec y Knight, 1996; Braskerud, 2002; Koskiaho *et al.*, 2003).

Dunne *et al.*, 2005, afirmaron que un humedal artificial de flujo superficial usado para depurar agua proveniente de actividades agro-ganaderas reduce entre 48% y 95%, de Sólidos en suspensión (SST); entre 50% y 99% de Nitrógeno (N) y entre 30% y 94% de Fósforo (PT). El humedal artificial experimental, a escala piloto diseñado para Centrotec en este estudio alcanza porcentajes de eliminación semejante y superiores en ocasiones, debido a que se ha utilizado un flujo combinado superficial y subsuperficial para mejorar la eficiencia de la depuración y sus condiciones de oxidación.

En el sistema piloto experimental además de las características físico-químicas también se evaluarán las características microbiológicas del sistema observando elevados porcentajes de reducción de microorganismos indicadores de contaminación fecal.

Estadísticamente se evaluó la existencia de correlación entre los parámetros físico-químicos y microbiológicos observándose una baja correlación entre ambos grupos de variables destacando la correlación negativa de las Bacterias aerobias con la Temperatura, el pH y la concentración de Amonio en el agua del afluente y efluente, así como la correlación que presentó *Clostridium* con el pH y el O.D y el Oxígeno disuelto y *Clostridium*.

Liang *et al.*, (2003), encontraron correlación significativa entre la comunidad microbiana, la eliminación de NTK y la Demanda química de oxígeno pudiéndose explicar como esta comunidad viva es el principal mecanismo de eliminación de estos dos parámetros químicos. Por lo cual muchos científicos están de acuerdo en que la interacción entre las plantas, los microorganismos y el sustrato del sistema de depuración son probablemente el principal mecanismo de depuración del agua residual utilizando humedales artificiales. Según Hunt *et al.*, (1994), los humedales artificiales contienen una población microbiana que con suficiente fuente de Carbono y condiciones aeróbicas, favorecen el proceso de nitrificación.

Según los resultados obtenidos en este estudio el sistema piloto experimental redujó eficientemente los contaminates estudiados a las tres cargas diferentes de Nitrógeno aportadas. Es importante destacar que este estudio debería realizarse a escala real y de esta forma demostrar que el sistema de tratamiento de tipo Mosaico Jerarquizado de Ecosistemas Artificiales es realmente eficiente para depurar este tipo de agua.

5 CONCLUSIONES GENERALES

Con base en los resultados presentados en esta tesis doctoral se puede llegar a las siguientes conclusiones:

1.- El Mosaico Jerarquizado de Ecosistemas Artificiales (MJEA[®]) a escala real analizado en este estudio produce según las normas de OMS un efluente adecuado para ser utilizado como agua de riego agrícola.

2.- El (MJEA[®]) de Bustillo de Cea demostró ser eficiente en la reducción de Bacterias indicadoras y microorganismos patógenos como prueba se produjo una total eliminación de los huevos de Helmintos, quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* en el agua tratada.

3.- La presencia de Amonio, influye directamente sobre la reducción de los microorganismos patógenos presentes, en las aguas residuales tratadas con el MJEA[®] de esta localidad.

4.- Entre los Helmintos, encontrados en el sistema MJEA[®] a escala real se identificaron los géneros *Trichostrongylus*, *Ascaris*, *Hymenolepis* y *Trichuris*. Siendo el género *Trichostrongylus* el más abundante.

5.- Existe una correlación negativa entre: DBO₅ vs. Helmintos; Fósforo total vs. Coliformes totales y Fósforo total vs. *Clostridium* en el agua residual bruta y Oxígeno disuelto con todos los microorganismos, analizados en el conjunto de muestras estudiadas (afluente y efluente) al igual que el Amonio con la presencia de *Giardia* y *Cryptosporidium*.

6.- Se han observado diferencias significativas, en la eliminación de DBO₅, Oxígeno disuelto, Coliformes totales, Coliformes fecales, Estreptococos fecales, *Clostridium*, huevos de Helmintos, *Giardia* y *Cryptosporidium* entre las diferentes etapas que forman parte del sistema de tratamiento integral, siendo en la etapa de FSSW donde las diferencias significativas fueron más altas pudiéndose demostrar estadísticamente, la eficiencia del sistema de tipo MJEA[®] para la eliminación de sustancias contaminantes.

7.- El sistema MJEA[®] puede ser utilizado, de forma eficiente para la depuración de aguas procedentes de granjas de cerdos. Una vez tratada, el agua puede ser usada para regar cultivos agrícolas aunque para ser vertida en ríos es necesario un tiempo de

retención hidráulica más elevado con el fin de que los valores de calidad del agua se encuentren dentro de los límites permitidos.

8.- Con cargas de Nitrógeno bajas y un tiempo de retención hidráulica, medio (al menos 16 días), tanto el Fósforo como el Amonio presentes en el agua residual de granjas porcinas, son reducidos de forma eficiente en el humedal utilizado en las condiciones del ensayo obteniendo valores de vertido dentro de los límites permitidos.

9.- A pH ligeramente básico, la reducción de Bacterias aerobias y *Clostridium* es más elevada así como que los altos niveles de Amonio actúan reduciendo las Bacterias aerobias del purín porcino.

10.- Aunque la viabilidad de los huevos de Helminos analizada en el lodo tratado durante este estudio fue baja, se debe realizar algún tratamiento al lodo antes de darle un uso que pueda afectar la salud pública o contaminar los cursos de aguas.

11.- La alta tasa de eliminación, y pérdida de viabilidad de los huevos de Helminos presentes en el lodo de la laguna del sistema MJEA[®] de Bustillo de Cea pueden deberse a las condiciones aeróbicas del sedimento, a fenómenos de depredación o a la presión osmótica.

12.- El sistema MJEA[®] construido, a escala real ha tenido un efecto claro sobre la reducción de los parámetros físicos-químicos, siendo la etapa con flujo subsuperficial la más eficiente durante la época cálida al tratar agua residual urbana y la laguna de micrófitos la etapa más eficiente durante la época fría.

13.- El sistema MJEA[®] también, ha tenido un efecto claro sobre la tasa de eliminación de los organismos patógenos siendo la etapa con flujo subsuperficial la más eficiente a lo largo de todo el año.

14.- En el caso del tratamiento del agua residual, generada en la granja porcina la eficiencia en la eliminación de las sustancias contaminantes, y organismos patógenos no ha sido posible determinar claramente en que etapa del sistema hubo mayor eficiencia.

15.- Se deben realizar estudios a escala real sobre depuración de agua residual de granjas de cerdo con sistemas de tratamiento de tipo MJEA[®] para poder asegurar que este sistema es realmente eficiente para eliminar sustancias contaminantes y organismos patógenos del purín.

6 ANEXOS

6.1 Anexo A: Protocolos para la detección de indicadores de contaminación fecal

- **Protocolo para determinar *E. coli* y Coliformes totales (Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 2005 y Framton, 1998). Técnica de filtración por membranas (Method 9222D).**

Colocar un filtro estéril de nitrato de celulosa de tamaño de poro de 0.45 μm , (Millipore) en la unidad de filtración. Hacer pasar 100ml de agua residual previamente diluida por el disco filtrante, las Bacterias serán detenidas en la superficie de la membrana.

Colocar el filtro sobre una placa de Petri de tamaño especial que contiene el medio de cultivo Chromocult apropiado para el crecimiento de *E. coli* y Coliformes fecales. Las placas de petri se incuban a 37 °C durante 48 horas.

Después de la incubación se desarrollarán colonias sobre el filtro. Las colonias de color azul son identificadas como *E. coli* y las colonias de color rojo como Coliformes fecales.

- **Protocolo para la determinación de Estreptococos fecales (Method 9230C A.P.H.A., 2005).**

Para EF se uso medio Streptosel Broth (Merck) como medio selectivo para el crecimiento de *streptococcus* en muestras clínicas y se realizó por filtración por membrana siguiendo los mismo pasos empleados para la identificación de *E. coli*.

- **Protocolo para la determinación de *Clostridium perfringens* (Angelotti, R., 1962).**

Clostridium se determinó por shock térmico sembrando en medio de Sulfito polimixina sulfadiazina SPS agar (Merck).

Se siembra 1 ml de cada dilución en placas estériles.

La siembra se hizo en profundidad 1 ml de la muestra

Posteriormente se le agrega el medio de cultivo

Se remueven las placas en sentido circular

Se deja solidificar incubándose posteriormente en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 24 a 48h hasta observar la aparición de colonias negras que determina la presencia de *Clostridium perfringens*.

- **Protocolo para el Recuento de Bacterias aerobias 37°C (UNE- EN ISO 6222; 1999)**

Las Bacterias aerobias o microorganismos cultivables son todas las Bacterias aerobias, levaduras o mohos capaces de formar colonias en el medio específico y a Temperaturas de 37°C y 22°C. En el caso de este estudio solo se realizo el análisis a 37 °C.

Se siembra, por mezclado de un medio de cultivo agar Nutritivo (Merck) y 1ml de cicloheximida.

Se incuban las de placas a 37 °C durante 48 horas.

Se calcula el número de unidades formadoras de colonias (U.F.C.) de la muestra, a partir del número de colonias formadoras en el medio.

La preparación de las muestras, las diluciones y la siembra de los medios se llevo a cabo conforme a las normas ISO 8199, EN ISO 5667-3 e ISO 6887.

Se utilizo el método de siembra en profundidad en placa (ISO 8199).

Poniendo un volumen (1ml) de la dilución realizada y se adiciona el medio fundido.

Se invierten las placas y se colocaron en incubadoras a 37°C por 24h.

Siguiendo el procedimiento descrito en la norma ISO 8199 se cuentan las colonias que se observan en cada placa y se calcula el número estimado de unidades formadoras de colonias presentes en 1 ml de muestra.

6.2 Anexo B. Protocolos para concentración y cuantificación de microorganismos patógenos. Método de Floculación con CaCO₃ para quistes de *Giardia* y Ooquistes de *Cryptosporidium* (Vesey et. al. 1993).

Recoger un volumen de muestra de 10 litros de cada punto de muestreo.

Añadir 100ml. De una solución de cloruro de cálcico (CaCl₂) 1M y 100ml de una solución de bicarbonato sódico (NaHCO₃) 1M.

Ajustar el pH de la mezcla a $10 \pm 0,05$ con hidróxido sódico (NaOH) 4N, dejándolo decantar durante 24 horas.

Decantar el sobrenadante y resuspender los floculos añadiendo ácido sulfámico (H₂NSO₃) al 10%.

Centrifugar a 4000 r.p.m. durante 10 minutos.

Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet con una solución de PBS 1 X-Tween-80 al 0,01%. Repetir el proceso de lavado 2 veces más (la ultima con agua miliQ) hasta dejarlo en 1 ml.

Colocar una alícuota de 100 µl del concentrado final en una lamina portaobjeto de microscopía (esta alícuota se someterá a la detección y cuantificación mediante inmunofluorescencia directa) y dejarla secar a Temperatura ambiente.

Fijar la muestra con metanol y secar a Temperatura ambiente.

Añadir 45µl de anticuerpo (FITC-mAb) y colocar la lamina portaobjeto en una cámara húmeda para incubar en oscuridad durante 1 hora a 37°C.

Aspirar el exceso de anticuerpo.

Aplicar 50 µl de PBS 1 X y dejarlo durante 2 minutos.

Aspirar el PBS y volver a aplicar 50 µl de PBS 1X, dejarlo durante 2 minutos

Aspirar el PBS y aplicar 50 µl de una solución 1:5000 DAPI en PBS, dejarlo durante 2 minutos.

Aspirar el DAPI y aplicar 50 µl de agua miliQ, dejarlo durante 2-3 segundos.

Aspirar el agua y dejarlo secar a Temperatura ambiente

Aplicar 10 µl del medio de montaje, colocar sobre el cubre y examinar bajo microscopio de fluorescencia (con el objetivo de 40X y sin aceite de inmersión).

6.3 Anexo C. Protocolo de concentración, identificación y recuento de huevos de Helmintos en agua residual. Método Bailenger (1979) modificado por Bouhoum y Schwartzbrod, (1998).

Recoger un volumen de muestra (1 a 10 litros) de cada punto de muestreo.

- **Sedimentación**

Someter cada muestra a un proceso de sedimentación en un recipiente abierto de paredes rectas durante 24 horas.

Eliminar el 90% del sobrenadante por decantación y recoger 100 ml de sedimento.

- **Acondicionamiento**

Añadir 35 gotas de Triton X-100 al volumen de muestra anterior (± 1 litro), agitar manualmente o con la ayuda de un agitador durante 5 min filtrar mediante malla de 1mm de diámetro, con agua para lavar.

Centrifugar a 3500rpm a 15 min. Desechar el sobrenadante por decantación y conservar el sedimento con los huevos.

Dejar sedimentar durante 24 horas.

Eliminar el sobrenadante y recoger 100 ml de sedimento.

- **Concentración**

Transferir el sedimento obtenido a dos tubos de 50 ml y centrifugar a 2400 rpm durante 15 minutos.

Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento obtenido en una solución amortiguadora acetoacética (tampón aceto-acético pH = 4,5: acetato sódico 15gr; ácido acético 3,6 ml; agua destilada hasta 1 litro en un volumen igual al volumen del sedimento, homogenizar la muestra.

Agregar un volumen de éter-dietílico o de acetato de etilo igual al doble del volumen de la suspensión anterior.

Agitar vigorosamente y centrifugar a 2400 rpm durante 15 minutos (se obtiene una distribución difásica con fase etérea superior, tapón sólido lipófilo intermedio, fase acuosa inferior y sedimento sólido.

Eliminar la fase etérea, el tapón lipófilo, la fase acuosa y conservar el sedimento.

Resuspender el sedimento en un volumen igual a 5 veces el del sedimento en una solución de ZnSO₄ (33% densidad relativa de 1,18) y centrifugar a 2400 rpm durante 15 minutos.

- **Observación**

Recoger cuidadosamente, con la ayuda de una pipeta Pasteur la película fina de la parte superior del sobrenadante donde se encuentran concentrados los huevos y transferirlos a la cámara de Mac Master.

Antes de proceder al estudio microscópico de la preparación en el portaobjeto, dejar en reposo en la platina del microscopio durante algunos minutos para que las estructuras queden flotando en la superficie del líquido contenido en la cámara.

Realizar la observación al microscopio con el objetivo de 20X, revisando toda la capa superficial del tubo de centrifuga.

- **Determinación cuantitativa**

El cálculo para la determinación del número total de huevos de Helminthos por litros que contiene la muestra inicial del agua residual se calcula con la siguiente fórmula:

$$N = X/P \times V/S$$

N= Número de huevos (litros)

X= Número de huevos contados

P= Volumen del producto en la cámara de recuento (ml)

V= Volumen total de la solución final del trabajo (ml)

S= Volumen de la muestra de agua residual (Litros).

Debido al bajo número de huevos que se observaron normalmente, no se usó esta fórmula de recuento, si no que se observó la totalidad de los mililitros del sobrenadante recogidos por flotación, observándose todo el espacio de la cámara Mac Master y no exclusivamente el interior de la retícula.

6.4 Anexo D. Protocolo de concentración, identificación y recuento de huevos de Helmintos en lodos (Schwartzbrod, 2003).

Tomar 100 ml de muestra.

Añadir 200- 300 ml de agua destilada.

Añadir 8-10 gotas de TRITON- X- 100.

Agitar 30 minutos.

Determinar el peso de la muestra (M) y su contenido en materia seca en g/g de lodo (K).

Filtrar la suspensión en tamiz de 1mm.

Sedimentar el filtrado al menos 24 horas.

Eliminar el sobrenadante y recoger 100 ml aproximados de sedimento.

Centrifugar a 3500 rpm durante 15 minutos.

Desechar el sobrenadante y conservar el sedimento con los huevos.

- **Limpieza y Purificación**

Añadir a los tubos de centrifuga un volumen S de sedimento, en una solución amortiguadora 2S de tampón acetato-acético.

Agitar

Agregar 6S de éter dietílico (en campana).

Tapar y Agitar vigorosamente hasta que se forme una emulsión.

Centrifugar a 3500 rpm durante 15 minutos. Se forma una distribución en 4 fases, éter superior, tapón lipófilo intermedio (se pega a la pared del tubo), fase acuosa inferior y sedimento con los huevos.

Sedimento con volumen de 1-3 ml (S). Guardar en frío. Hasta la observación microscópica. Si el tapón lipófilico resulta muy grueso, el sedimento se aprecia muy pastoso y/o el éter dietílico aparece con color intenso puede indicar que no se ha purificado suficiente, repetir todo el proceso de limpieza y purificación.

El sedimento se resuspende en cinco volúmenes de solución saturada de sulfato de zinc (33%).

Centrifugar a 2700 rpm durante 10 minutos, medir el volumen de producto final (X).

Transferir 1 ml a la cámara de Mac Master.

Dejar reposar la cámara 5 minutos

Observar al microscopio 100X y contar huevos.

6.5 Anexo E. Protocolo para la determinación de la viabilidad de los Helmintos en lodos método tamizado-incubación (Gaspard, *et al*, 1997).

Pesar X gramos de muestra (10 gr. de materia seca).

Filtrar con malla metálica de 1mm, ayudado de 1 litro de agua de lavado.

Tamizar en tamiz de 100 μ de poro.

Lavar con 10 litros de agua destilada

Recuperar el filtrado, que contiene huevos de Helmintos de tamaño menor a 100 micras y dejar sedimentar más de dos horas.

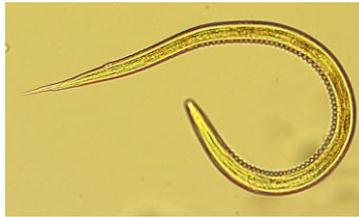
Recoger el sedimento, lavar las paredes del bidón y del tamiz con Tritón X-100 al 1% para separar los huevos adheridos a las paredes y a la materia orgánica.

Incubar en estufa la suspensión durante 20 días a 30° C con flujo continuo de aire.

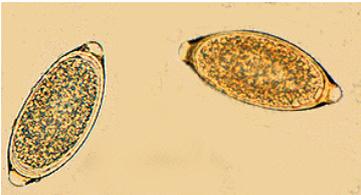
Extracción y recuento de huevos de Helmintos realizado según el método de Bailenger (1979).

6.6 Anexo F. Fotos de los Helmintos observados durante este estudio.

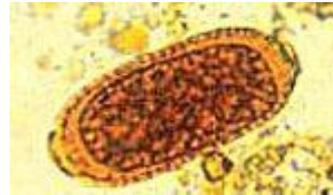
Phylum Nematoda:



Huevos y Larva de *Trichostrongylus sp*



Huevos de *Trichuri sp.*



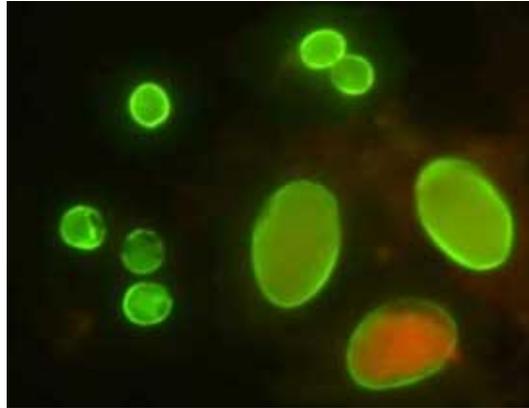
Huevo de *Capillaria sp.*

Phylum Platyhelminthes:



Huevo de *Hymenolepis sp.*

6.7 Anexo G. Foto de Quistes y Ooquistes de *Giardia* y *Cryptosporidium*.



Quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* usando anticuerpo monoclonal (FITC).

7 **REFERENCIAS**

- Abreu, N., Martín, M., Ortega, A., Castillo, A., Aguiar, E., Valladares, E. 2002. Presencia de *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium* spp. en aguas residuales depuradas reutilizadas para riego agrícola en la isla de Tenerife España. Efecto del transporte a larga distancia sobre la calidad del agua residual. *Rev. Salud Ambient.* 2(1):2-7.
- Adeola, O. 1999. Nutrient management procedures to enhance environmental conditions: an introduction. *J. Anim. Sci.* 77, 427-429.
- Al-Rekabi, W., Qiang, H., Quiang, W., Abbas, A. 2007. Utilization of constructed wetlands for wastewater wetland treatment. *European Journal of Scientific Research.* 18(1):165-185.
- Amahmid, O., Asmama, S., Bouhoum, K. 2002. Urban wastewater treatment in stabilization ponds: occurrence and removal of pathogens. *Urban Water.* 4, 255-262.
- Angelakis, A., Koutsoyiannis, D. and Tchobanoglous, G. 2005. Urban wastewater stormwater technologies in ancient Greece. *Water Research.* 39, 210-220.
- Angelotti, R., Hall, E., Foter, J., Lewis, M. 1962. Quantitation of *Clostridium perfringens* in Foods. *Appl. Microbiol.* 10, 193-199.
- Ansola, G., Fernández, C. and De Luis E. 1995. Removal of organic matter and nutrients from urban wastewater by using experimental emergent aquatic macrophyte system. *Ecol. Eng.* 5, 13-19.
- Ansola, G., González, J., Cortijo, R., De Luis, E. 2003. Experimental and full-scale pilot plant constructed wetlands for municipal wastewaters treatment. *Ecol. Eng.* 21, 43-52.
- APHA, AWWA, WPCF. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Ed. Eaton, A.D. Clesceri, L.S., Rice, E.W. and Greenberg A.E., 21 The Editions, Baltimore, Maryland.
- Araki, S., Martín, S., Becares, E., De Luis-Calabuig, E., Rojo-Vazquez, F. 2001. Effect of high rate algal ponds on viability of *Cryptosporidium parvum* oocyst. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3322-3324.
- Ashbolt, J., Ball, A., Dorsch, M., Turner, C., Cox, P., Chapman, A., and Kirov, M. 1995. The identification and human health significance of environmental aeromonas. *Water Sci. Technol.* 31, 263-270.
- Awuah, E., Asante, K., Anohene, F., Lubberding, J., Gijzen, J. 2001. Environmental conditions in macrophyte and algal- based domestic wastewater pond systems. *Wat. Sci. Tech.* 44(6):11-18.
- Ayres, M., Alabaster, P., Mara, D., Lee, L. 1992. A design equation for human intestinal nematode egg removal in waste stabilisation ponds. *Water Research,* 26(6):863-865.

- Bailenger, J. 1979. Mechanisms of parasitological concentration in coprology and their practical consequences. *Journal of American Medical Technology*, 41, 65-71.
- Baker, J., Muller R. and Rollinson D. 2002. *Himenolepis* spp: A versatile cestodes parasites model. *Advances in Parasitology*. 51. pp 260.
- Bavor, J., Roser, J., Fisher, J., Smalls, C. 1989. Performance of solid-matrix wetland systems viewed as fixed film bioreactors. In: *Constructed Wetlands for wastewater Treatment; Municipal, Industrial and Agricultural*. D. A. Hammer (Ed). Lewis Publishers, Michigan, pp.646-656.
- Bernabeu, A., Pérez, G., Gómez, D., Morenilla, J., Amores, S., Bernacer, I., Esteban, J. 2002. Identificación de huevos por Helminthos en aguas residuales. *Tecnología del agua*. 221, Febrero, 35-42.
- Bernal, P., Cardona, A., Galvis, A., Peña, R. 2003. Guía de selección de tratamientos de aguas residuales domésticas por métodos naturales. Seminario Internacional sobre métodos naturales para el tratamiento de aguas residuales. Universidad del Valle. Instituto Cinara. pp 19-27.
- Biddlestone, J., Gray, R. and Job, D. 1991. Treatment of dairy farm wastewaters in engineered reed bed systems. *Process Biochemistry*. 26, 265-648.
- Bonadonna, L., Briancesco, R., Ottaviani, M., Veschetti, E. 2002. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and correlation with microbial, chemical and physical water variables. *Environ. Monitoring and Assessment*. 75, 241-252.
- Bosh, A., Lucena, F., Girones, R., Jofre, J. 1986. Survey of viral pollution in Besos River. *Journal of Water Pollution Control Federation*. 58: 87-91.
- Bouhoum, K. and Schwartzbrod, J. 1998. Epidemiological study of intestinal helminthiasis in a Marrakech raw sewage spreading zone. *Zentralblatt Hygiene Umweltmed*. 200, 553-561.
- Braskerud, C. 2002. Factors affecting Phosphorus retention in small constructed wetlands treating agricultural non-point source pollution. *Ecol. Eng*. 19, 41-61.
- Briancesco, R. and Bonadonna, L. 2005. An Italian study on *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater, fresh water and treated water. *Environ. Monitoring and Assessment*. 104, 445-457.
- Brix, H. 1986. Root-zone systems. Operational experience of 14 Danish systems in the initial phase. Report to the Environmental Protection Board. pp. 80.
- Brix, H. 1987a. The applicability of the wastewater treatment plant in othfresen as scientific documentation of the root-zone method. *Wat. Sci. Tech*. 19(10):19-24.
- Brix, H. 1987b. Treatment of wastewater in the rhizosphere of wetland plants- the root zone method. *Water Science and Technology* 19, 107-118.

- Burd, S. 1968. A study of sludge handling and disposal. U.S. Department of the Interior, publication no. WP-20-4. Federal Water Pollution Control Administration. Office of Research and Development. Cincinnati. Ohio.
- Burka, U. 1989. Notes from 1st reed bed workshop. Newham, Gloucester Shire.
- Cacció, M., Thompson, A., McLauchlin, J., Smith, V. 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* 21, 430-437.
- Carrada, T. 2004. Trichuriasis: Epidemiología, diagnóstico y tratamiento. *Revista Mexicana de Pediatría.* 71(6):299-305.
- Choi, E. 2008. Piggery waste management: toward a sustainable future. *Water.* 21, 19-21.
- Cliver, O. 1975. Virus associated with wastewater solids. *Environmental Letter* 10, 215-223.
- Coffey, T. 1999. A swine integrator's perspective on nutrient management procedures. *J Anim Sci.* 77, 445-9.
- CONAMA VII. 2009. Cumbre de desarrollo sostenible. VII Congreso Nacional de medio ambiente GT9 Aplicaciones de la Directiva Marco del Agua. www.conama.org.
- Cordero, C., Ansola, G. and Luis, E. 2003. Swine wastewater tertiary treatment for nitrogen removal by a constructed wetland. In: 1st International seminar on the use of aquatic macrophytes for wastewater treatment in constructed wetlands, Lisboa. 591-610.
- Cortijo, R., Ansola, G. and Luis E. 2003. M.H.E.A. Constructed wetland of Bustillo de Cea, León (España). In: 1st International seminar on the use of aquatic macrophytes for wastewater treatment in constructed wetlands, Lisboa. 525-546.
- Cortijo, R., Ansola, G. and Luis E., 2005. Aplicación de tecnologías de bajo coste para la depuración integral de agua residual en pequeños municipios de la comunidad de Castilla y León. En: Encuentro internacional en fitodepuración. Lorca. 102-107.
- Craft, B. and Richardson, J. 1993. Peat accretion and N, P and organic C accumulation in nutrient-enriched and unenriched Everglades peatlands. *Ecol. Applications.* 3, 446-458.
- Cram, E. 1943. The effect of various treatments processes on the survival of helminth and protozoan cysts in sewage. *Sewage Works J.* 15, 1119-1138.
- Crites, W. and Tchobanoglous, T. 1992. Discussion of Nitrogen Removal in Experimental wetland Treatment Systems; evidence for the role of aquatic plants. *Wat. Env. Res.* 64 (7):920.

- Dallas, S., Scheffe, B. and Ho, G. 2004. Redbeds for greywater treatment case study in Santa Elena Monteverde, Costa Rica Central America. *Ecological Engineering*. 23, 55-61.
- Decamp, O. and Warren, A. 1998. Bacteriovory in ciliates isolated from constructed wetlands (reed beds) used for wastewater treatment. *Water Res.* 32, 1989–1996.
- Deng, L., Zheng, P., Chen, Z., Mahmood, Ch. 2008. Improvement in post-treatment of digested swine wastewater. *Bioresource Technol.* 99, 3136-3145.
- Directiva 91/271/CEE del consejo de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. DO L 135, pp.40-52.
- Directiva 91/676/CEE del consejo de 12 de diciembre de 1991, relativa a la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos utilizados en la agricultura. Diario oficial nº L 375 de 31/12/1991.
- Directiva Marco del Agua 2000/60/CE del parlamento europeo y del consejo de 23 de octubre de 2000. Por el que se establece un marco de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- DuBowoy, J. and Reaves P. 1994. Constructed wetland for animal waste management. Proceedings of a workshop sponsored by the USA EPA Region V Conservation. Lafayette, Indiana.
- Dunne, E., Culleton, N., O'Donovan, G., Harrington, R. 2005. A farm-scale integrated constructed wetland to treat farmyard dirty water. Johnstown Castle Research Centre. Wexford Agriculture and Food Development Authority. pp. 1-38.
- Erlandsen, L., Bemrich, J. and Wells, L. 1990. Axenic culture and characterization of *Giardia ardea* from the great bleu heron (*Ardea herodias*). *J. Parasitol.* 76, 717-724.
- Evanson, M. and Ambrose, R. 2006. Source and growth dynamics of faecal indicator bacteria in a coastal wetland system and potential impacts to adjacent waters. *Water Res.* 40, 475-486.
- Falabi, A., Gerba, P. and Karpiscak, M. 2002. *Giardia* and *Cryptosporidium* removal from wastewater by a duckweed (*Lemna gibba* L.) covered pond. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 384-387.
- Farias, C., Gamba, C. and Pellizari, H. 2002. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw sewage and creek water in the city of Sao Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology.* 33, 41–43.
- Fitzgerald, P. and Ashley, R. 1977. Differential survival of *Ascaris* ova in wastewater sludge. *Journal Water Pollution Control Federation*, 49: 1722-1724.

- Frampton, E., Restaino, L., Blaszkowski, L. 1998. Evaluation of β -glucuronidase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indol- β -D-glucuronide (X-GLUC) in a 24 hour direct plating method for *Escherichia coli*. *J. Food Protection*. 51, 402-404.
- Gaspard, P., Wiart, J. Schwartzbrod, J. 1997. Parasitological contamination of urban sludge used for agricultural purposes. *Waste Manag. and Res.* 15, 429-436.
- Geary, M. and Moore, A. 1999. Suitability of a treatment wetland for dairy wastewaters. *Water Sci. Technol.* 40, 179-185.
- Gersberg, R., Lyon, R., Brenner, R., Elkin, V. 1987. Fate of viruses in artificial wetlands. *Appl Environ. Microbiol.* 53, 731-736.
- Gersberg, M., Lyon, R., Brenner, R., Elkins, V. 1989a. Integrated wastewater treatment using artificial wetland: a gravel marsh case study. In: *Constructed wetlands for wastewater treatment; Municipal, Industrial and Agricultural*. A. Hammer (Ed). Lewis Publishers, Chelsea, Michigan, pp. 145-152.
- Gersberg, M., Gearhart, A. and Ives, M. 1989b. Pathogens removal in Constructed Wetlands Wastewater Treatment; Municipal, Industrial and Agricultural. D. A. Hammer (Ed). Lewis Publishers, Chelsea, Michigan, pp. 231-446.
- Global Water Partnership. 2000. *Agua para el siglo XXI: De la visión a la acción*. America del Sur.
- Gomez-Couso, H., Mendez-Hermida, F., Castro-Hermida, J., Ares-Mazas, E. 2005. *Giardia* in shellfish-farming areas: Detection in mussels, river water and waste waters. *Veterinary Parasitology*. 133, 13-18.
- Gopal, B. 1999. Natural and constructed wetlands for wastewater treatment: potentials and problems. *Water Sci. Technol.* 40(3): 27-35.
- Graham, J. 1981. Parasites and the land application of sewage sludge. Rapport Ontario Ministry of the Environment, No. 110. (Quoted by Schwartzbrod *et al.*, 1989).
- Grant, B., Pendroy, P., Bellin, L., Mayer, K., Palmer J. 1996. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in raw and treated municipal sewage. *Applied and environmental microbiology*. 62, 3466-3469.
- Graves, K. and Weaver, W. 2009. Characterization of enterococci populations collected from a subsurface flow constructed wetland. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1226-1234.
- Green, B., Griffin, P., Seabridge, K. Dhobie, D. 1997. Removal of bacteria in subsurface flow wetlands. *Water Sci. Technol.* 35, 109-116.
- Haberl, R. and Perfler, R. 1990. Seven years of research work and experience with wastewater treatment by a reed bed system, In: *Constructed Wetlands in water Pollution Control (Adv. Wat. Pollut. Control No 11)*, Cooper, P. F. and Findlater, B. C. (eds), pp, 529-534. Pergamon Press, Oxford.

- Haberl, R. 1999. "Constructed Wetlands: A Chance to Solve Wastewater Problems in Developing Countries". Water Science and Technology, Vol: 40(3), Oxford.
- Hays, B. 1977. Potential for parasitic disease transmission with land application of sewage plant effluents and sludge. Water Research, 11:583-595.
- Honeyman, S. 1996. Sustainability issues of USA swine production. J. Anim. Sci. 74, 1410-1417.
- Horman, A., Rimhanen-Finne, R., Maunula, L., Bosdorff, C.H., Torvela, N., Heikinheimo, A., Aniñen, L. 2004. *Campylobacter* spp. *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. Noroviruses, and indicator organisms in surface water in south western Finland, (2000-2001). Appl. Environ. Microbiol. 70, 87-95.
- Hotez, J., Bottazi, E., Franco, P., Ault, K., Periago, R. 2008. The Neglected Tropical Diseases of Latin America and the Caribbean: A Review of Disease Burden and Distribution and a Roadmap for Control and Elimination. PLoS Negl Trop Dis. 2(9):e300. doi: 10.1371/journal.pntd.00003000.
- Hunt, G., Szogi, A., Humenik, J., Rice, M., Stone, C. 1994. Swine waste water treatment by constructed wetland in the south eastern U. S. 144-154. In N: P.J. DuBow and R.P. Reaves (eds) Constructed wetlands for animal waste management, purdue research foundation, West Lafayette, INC.
- Hunt, G., Thon, O., Szogi, A., Humenik, J. 1995. State of the art for animal wastewater treatment in constructed wetlands. Proc. 7 Th intl. Symp. On Agricultural and Food Processing waste, pp. 53-65.
- Hunt, G., Szögi, A., Humenik, J., Rice, M., Matheny, A., Stone, C. 2002. Constructed wetlands for treatment of swine wastewater from an anaerobic lagoon. Transactions of the ASAE. 45(3):639-647.
- Jenkins, V., Bowman, D., Ghiorse, C. 1998. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocyst by ammonium. Appl. Environ. Microbiol. 64,784-788.
- Johnson, C., Reynolds, A., Gerba, P., Pepper, L., Rose, B. 1995. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in marine waters. Water Science and Technology, 31, 439-442.
- Kadlec, H. and Knight, L. 1996. Treatment wetlands. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Kadlec, H., Knight, L., Vymazal, J., Brix, H., Cooper, P., Haberl, R. 2000. Constructed wetlands for pollution control: processes, performance, design and operation – Chapter 1. Introduction to constructed wetlands. IWA specialist group on use of macrophytes in water pollution control. Scientific and technical Report No. 8, IWA Publishing, London, UK, 156 pp.
- Kangas, C. 2004. Ecological Engineering Principles and Practice Chapter 2. Treatment wetlands. Lewis Publishers, Boca Raton, 452 pp. ISBN 1-56670-599-1.

- Karanis, P., Kourenti, C., Smith, H. 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J. Water Health.* 5, 1-38.
- Karpiscak, M., Gerba, P., Watt, M., Foster, E., Falabi, A. 1996. Multi-species plan systems for wastewater quality improvements and habitat enhancement. *Water Sci. Technol.* 33, 231-236.
- Keller, P. and Hide, G. 1951. Sterilization of sewage sludge: incidence and relative viability of *Ascaris* ova at sewage disposal works in the Johannesburg Area. *South América Medical Journal.* 25, 338-342.
- Khuroo, M. 1996. Ascariasis. *Gastroenterology Clinics of North America.* 25, 553-77.
- Kickuth, R. 1984. Das Wurzelraumverfahren in der Praxis. *Landsch. Stadt.* 16, 145-153.
- Kivaisi, K. 2001. The potential for constructed wetlands for wastewater treatment and reuse in developing countries: a review. *Ecological Engineering.* 16, 545-560.
- Knight, L. 1997. Wildlife habitat and public use benefits of treatment wetlands. *Water Sci.Tech.*35 (5): 35-43.
- Knight, L., Payne, E., Borer, E., Clarke, A., Pries, H. 2000. Constructed wetlands for livestock wastewater management. *Ecol. Eng.* 15, 41-55.
- Koskiaho, J., Ekholm, P., Rätty, M., Riihimäki, J., Puustinen, M. 2003. Retaining agricultural nutrients in constructed wetlands-experiences under boreal conditions. *Ecol. Eng.* 20, 89-103.
- Kulda, J. and Nohynkova, E. 1996. *Giardia* in humans and animals. En: Kreier JP (ed.) *Parasitic protozoa* 2^a ed. San Diego Academic Press. 10, 225-242.
- Le Chevallier, M. 1991. Characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* removal in drinking water treatment plants. American Water Works Service Company, Inc. pp. 180-187.
- Lemarchand, K. and Lebaron, P. 2003. Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in a French coastal watershed: Relationship with faecal indicators. *FEMS Microbiology Letters.* 218, 203–209.
- Liang, W., Zhen-bin, W., Shui-ping, Ch., Qiao-hong, Z., Hong-ying, H. 2003. Roles of substrate microorganisms and urease activities in wastewater purification in a constructed wetland system. *Ecol. Eng.* 21, 191-195.
- Liberti, L., Notarnicola, M. and Petruzzelli, D. 2002. Advanced treatment for municipal wastewater reuse in agriculture. UV disinfection: parasite removal and by-product formation. *Desalination.* 152, 315-324.

- Lucena, F., Bosch, A., Ripoll, J., Jofre, J. 1988. Faecal pollution in Llobregat river. Interrelationship of viral, bacterial and physicochemical parameters. *Water Air Soil Pollution*. 39, 15-25.
- Mandi, L., Ouazzani, N., Bouhoum, K., Boussaid, A. 1993. Wastewater treatment by stabilization ponds with and without macrophytes under arid climate. *Wat. Sci. Tech.* 28(10): 177-181.
- Mandi, L., Houhoum, B., Asmama, S., Schwartzbrod, J. 1996. Wastewater treatment by reed beds and experimental approach. *Water Res.* 30, 2009-2016.
- Mara, D. and Pearson, W. 1998. Design manual for waste stabilization ponds in Mediterranean countries. European Investment Bank. Lagoon Technology International. Leeds, United Kingdom.
URL: <http://www.leeds.ac.uk/civil/cei/water/tphe/publicat/pdm/med/medman.html>. (2010).
- Mara, D. 2001. Appropriate wastewater collection, treatment and reuse in developing countries. *Proceedings of the Institution of Civil Engineers-Municipal Engineer*, 145, 299-303.
- Mayer, L. and Palmer, L. 1996. Evaluation of PCR, nested PCR, and fluorescent antibodies for detection of *Cryptosporidium* by PCR in environmental water Samples. *Water Science and Technology*. 2: 95-100.
- Maynard, E., Ouki, K. and Williams, C. 1999. Tertiary lagoons: A review of removal mechanisms and performance. *Water research*. 33, 1-13.
- Miner, R. 1999. Alternatives to minimize the environmental impact of large swine production units. *J. Anim. Sci.* 77, 440-444.
- Mitsch, J. and Gosselink, G. 1993. *Wetlands*. 2nd Edition. Jon Wiley and Sons, Inc., New York.
- Molleda, P., Blanco, I., Ansola, G., de Luis, E. 2008. Removal of wastewater pathogen indicator in a constructed wetland in León Spain. *Ecol. Eng.* 33, 252-257.
- Morzy, E., Al-Herrawy, A., and Ali, M. 2007. Assessment of *Cryptosporidium* removal from domestic wastewater via constructed wetland systems. *Water air soil Pollut.* 179, 207-215.
- NCBI, Taxonomy database. National Center for biotechnology information USA National. 1994- 2010. Encyclopaedia Britannica. Inc. All right reserved. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- Neori, A., Reddy, R., Ciskova-Koncalova, H., Agami, M. 2000. Bioactive chemical and biological-biochemical activities and their function in rhizosphers of wetland plants. *Bot. Rev.* 66, 350-378.

- Newman, M., Clausen, C. and Neafsey, A. 2000. Seasonal performance of a wetland constructed to process dairy milkhouse wastewater in Connecticut. *Ecol. Eng.* 14, 81-198.
- O'Donnell, C., Mayer, K., Jones, J., Benton, T., Nichols, K. Schaefer, F. 1984. Applied of parasites eggs upon storage in sludge. *Applied and environmental microbiology.* 48(3):618-625.
- Ondersteijn, C., Beldman, A., Dartselaar, C., Giesen, G., Huirne, R. 2002. The Dutch mineral accounting system and the European nitrate directive: implications fro N and P Management and farm performance. *Agriculture, Ecosystems & Environment.* 92 (2-3): 283-296.
- Orosz-Coghlan, P., Rusin, P., Karpiscak, M., Yerba, Ch. 2006. Microbial source tracking of *Escherichia coli* in a constructed wetland. *Water Environ. Res.* 78 (3):227-232.
- Ottoson, J. 2001. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Swedish wastewater treatment plants. *Vatten.* 57, 283–289.
- Ottoson, J., Hansen, A., Bjorlenius, B., Norder, H., Senstrom, T., 2006. Removal of viruses parasitic protozoa and microbial indicators in conventional and membrane processes in a wastewater pilot plant. *Wat. Res.* 40, 1449-1457.
- Panicker, R. and Krishnamoorthi, P. 1978. Elimination of enteric parasites during sewage treatment processes. *International Association for Water Pollution Control, Technical Annual V.* pp. 130-138.
- Payment, P. and Franco. E. 1993. *Clostridium perfringens* and somatic coliphagos as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(8):2418-2424.
- Pérez, O., Faubell, M., Morenilla, J., Bernacer, I., Bernabeu, A., Gómez, D., Amores, S. 2000. Presencia de huevos de Helminthos en fangos de depuración de aguas residuales. *Tecnología del Agua.* 232, 20-24.
- Poach, E., Hunt, G., Vanotti, G., Stone, A., Mattheni, A., Johnson, H., Sadler, J. 2003. Improved nitrogen treatment by constructed wetlands receiving partially nitrified liquid swine manure. *Ecol. Eng.* 20, 183-197.
- Quiñónez-Díaz, J., Karpiscak, M., Ellman, D., Gerba, P. 2001. Removal of pathogenic and indicator microorganisms by a constructed wetland receiving untreated domestic wastewater. *J. Environ. Sci. Health.* 36, 1311–1320.
- Radoux, M. and Kemp, D. 1982. Aproche écologique et esperimentale des potentialities épuratrices de quelques hélrophytes: *Phragmites australis* (cav.) Trin. Ex Steud. *Typha latifolia* L. et *Carex acuta* L. *Trib. Cebedeau* 465-466 (35):325-340.
- Real Decreto 324/2000, de 3 de marzo, por el que se establecen normas básicas de ordenación de las explotaciones porcinas (BOE nº. 58, de 8.3.00).

- Real Decreto 606/2003, de 23 de mayo, por el que se modifica el Real Decreto 849/1986, de 11 de abril, por el que se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico, que desarrolla los Títulos preliminar, I, IV, V, VI y VIII de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas. *B.O.E.* nº 135, de 6 de junio de 2003, pp. 22071-22096.
- Reaves, P., DuBow, J. and Miller, K. 1994. Performance of a constructed wetland for dairy waste treatment in LaGrange County, Indiana. pp. 43-52. *In* P.J.
- Reddy, R., Kadlec, H., Flaig, E., Gale, M. 1999. Phosphorus retention in streams and wetlands: a review. *Critical Reviews Environ. Sci. Techn.* 29, 83-146.
- Reed, C., Crites, W., Middlebrooks, J. 1995. *Natural Systems for Waste Management and Treatment*, 2nd edn. New York: McGraw-Hill.
- Reimers, S., Little, D., Englander J., Leftwich, B., Bowman, D., Wilkinson, F. 1981. Parasites in southern sludges and disinfection by standard sludge treatment. EPA 600/2-81-160.
- Reinoso, R., Becares E. and Smith, H. 2008. Effect of various environmental factors on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J. Appl. Microbiol.* 104(4):980-986.
- Rosario, A. 2004. Aplicación de sistemas de tratamientos de residuos ganaderos en Gran Canaria. Cabildo de Gran Canaria. Consejería de Agricultura Ganadería y pesca. Servicio técnico de extensión agraria.
- Rose, J., Gerba, Ch. and Jakubowski, W. 1991. Survey of potable water supplies for *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Environ. Sci. Tech.* 25 (8): 1393-1400.
- Rose, J., Dickson, J., Farrah, R., Carnahan, P. 1996. Removal of pathogenic and indicator microorganisms by a full-scale water reclamation facility. *Water Research.* 30, 2785-2797.
- Rousseau, D. 2005. Performance of constructed treatment wetlands: Model-Based evaluation and impact of operation and maintenance. Thesis submitted in fulfilment of the requirements for the degree of doctor (PhD) in applied biological sciences environmental technology academiejaar. pp. 310.
- Sadighian, A., Arfaa, F., Ghadirian, E., Movatagh, K. 1976. Contamination with helminth eggs of various processing stages of the sewage treatment plants in Isfahan, central Iran. *Iranian Journal of public Health.* 5, 180-187.
- Salgot, M. 1994. Prevenció del risc Sanitari derivat de la reutilització d'aigües residuals depurades com a aigües de reg. Departamento de Sanidad y Seguridad Social, Generalitat de Catalunya. Posibilidad de Reutilización. (En red). Disponible en: www.mie.esab.upc.es/arr/T20E.htm.
- Schwartzbrod, J., Thevenot, T., Collomb, J., Baradel, M. 1986. Parasitological study of wastewater sludge. *Environmental Technology Letters.* 7, 155-162.

- Schwartzbrod, J., Mathieu, C., Thevenot, T., Baradel, M., Schwartzbrod, L. 1987. Wastewater sludge: parasitological and virological contamination. *Water Science and Technology*. 19 (8):33-40.
- Schwartzbrod, J., Stien, L., Bouhoum, K. Baleux, B. 1989. Impact of wastewater treatment on helminth eggs. *Water Science and Technology*. 21 (3):295-297.
- Schwartzbrod, J. 2003. Quantification and viability determination for helminth eggs in sludge (Modified EPA Method 1999). University of Nancy.
- Seidel, K. 1976. Macrophytes and water purification, In: *Biological control of water pollution*. In: J. Tourbier y R. W. Pierson, (eds.):109-121 University of Pennsylvania Press.
- Shuval, I., Adin, A., Fattal, B., Rawitz, E., Yekutieli, P. 1986. Wastewater irrigation in developing countries health effect and technical solutions. World Bank Technical Paper. No. 51.
- Skarda, A., Moore, A., Niswander, F., Gamroth, J. 1994. Preliminary results of wetland for treatment of dairy farm wastewater. P.34-42. *In P.J.*
- Sleytr, K., Tietz, A., Langergraber, G., Haberl, R. 2007. Investigation of bacterial removal during the filtration process in constructed wetlands. *Sci. Total Environ*. 380, 173-180.
- Slifko, R., Smith, V., Rose, B. 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal for Parasitology*. 30, 1379–1393.
- Solarte, Y., Peña, M., Madera, C. 2006. Transmisión de protozoarios patógenos a través del agua para consumo humano. *Colombia Médica*. 37(1):74-82.
- Song, Z., Zheng, Z., Jie, L., Xianfeng, S., Xiaoyuan, H., Wei W., Min, X. 2006. Seasonal and annual performance of a full-scale constructed wetland system for sewage treatment in China. *Ecol. Eng.* 26, 272-282.
- StatSoft, Inc. 2001. STATISTICA 6.0. Tulsa (OK), USA.
- Stone, C., Poach, E., Hunt, G., Reddy, B. 2004. Marsh-pond-marsh constructed wetland design analysis for swine lagoon wastewater treatment. *Ecological Engineering*. 23(2):127-123.
- Stott, R., Jenkins, T., Shabana, M., May, E. 1997. A survey of the microbial quality of wastewaters in Ismalia, Egypt and the implications for wastewater reuse. *Water Science and Technology*. 35(11):211–217.
- Szogi, A., Hunt, G., Humenik, J., Stone, C., Rice, M., Sadler, J. 1994. Seasonal dynamics of nutrients and physical-chemical conditions in a constructed wetland for swine wastewater treatment. ASAE Paper # 94-2602. International Winter Meeting, Atlanta, GA, Dec. 13-16 pp.12.

- Szogi, A., Hunt, G., Humenik, J., Stone, C., Rice, M. 1995. Constructed Wetland for Swine wastewater treatment in the Eastern Coastal plain, USA. Versatility of wetland in the agriculture landscape. Published by American society of agricultural engineers. Hyatt regency Tampa Florida. Edited by Kenneth Campbell. pp.675-682.
- Thurston, R., Russo, C., Felterof, M., Edsall, A., Barber, M., 1979. A review of the EPA red book: quality criteria for water. Water quality section, American Fisheries Society, Bethesda Maryland. pp.313.
- Thurston, J., Gerba, C., Foster, K., Karpiscak, M. 2001. Fate of indicator microorganisms, *Giardia* and *Cryptosporidium* in subsurface flow constructed wetlands. Water Res. 35(6):1547-1551.
- Thurston, J., Henry, G., Eghball, B, 2004. Constructed wetlands for the reduction of manure-borne faecal indicator and pathogenic micro organisms from dairy cattle wastewater: In Proceeding for the international Water Associations 9th International conference on constructed wetlands. 9th IWA International Conference on Constructed Wetlands, September 26-30, Avignon, France.
- Toze, S. 1997. Microbial pathogens in wastewater. Literature review for urban water system. Multi divisional research program. CSIRO LAND and WATER. Technical report No 1/97, June.
- UNE-EN ISO 6222. 1999. Calidad del agua. Enumeración de microorganismos cultivables. Recuento de colonias por siembra en medio de cultivo de agar nutritivo. ISO 6222:1999. AENOR. Madrid. España.
- Uribarren, T. 2010. Trichuriasis. Recursos en Parasitología. Departamento de Parasitología. Facultad de Medicina, UNAM.
- USEPA. U. S. Environmental Protection Agency. 1993. Standards for the use or disposal of sewage sludge. 40 CFR Parts 403 and 503. Federal Register February 19, Vol. 58 9248-9415.
- Valderrama, T., Campo, C., Velandia, S. Zapata, N. 2003. Evaluación del efecto de tratamiento con plantas acuáticas (*E. crassipes*, *Lemna* sp. y *L. laevigatum*) en la remoción de indicadores de contaminación fecal en aguas residuales domésticas. Seminario internacional sobre métodos naturales para el tratamiento de aguas residuales. Universidad del Valle, Instituto Cinara.123-201.
- Van deer steen, P., Brenner, A., Shabtai, Y., Oron G. 1999. The effect of environmental conditions on faecal coliform decay in post-treatment of UASB reactor effluent 4th International Specialist Conference WSP: Technology & environment. Marrakech 20th-23rd. April.
- Vera, L., Martel, G., Gutiérrez, J., Márquez, M. 2006. Gestión sostenible del agua residual en entornos rurales. Capitulo 3: Evaluación de los sistemas de depuración natural. Proyecto depuranat. Instituto Tecnológico de Canarias. Departamento de agua. Dirección de investigación y desarrollo tecnológico. 299.

- Vesey, G., Slade, S., Byrne, M., Shepherd, K., Fricker, R. 1993. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. *Journal of Applied Bacteriology*. 75, 82-86.
- Voorburg, H. 1991. Pollution by animal production in The Netherlands: solutions. *Rev. Sci. Tech.* 10, 655-68.
- Vymazal, J., Brix, H., Cooper, F., Green, B., Haberl, R. 1998. *Constructed wetlands for wastewater treatment in Europe*. Backhuys Pub., Leiden. pp. 264.
- WHO. 1989. Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture. WHO technical report. Series N°. 778, World Health Organisation, Geneva, Switzerland.
- WHO-EM/CEH/121/E. 2004. *Integrated guide to sanitary parasitology*. World Health Organization. Regional Office for the Eastern Mediterranean. Regional Centre for environmental health activities. Amman-Jordan. pp. 124.
- Williams, J., Bahgat, M., May, E., Ford, M. Butler, J. 1995. Mineralization and pathogen removal in gravel bed hydroponic constructed wetlands for wastewater treatment. *Wat. Sci. Tech.* 32(3):49-58.
- Zhang, D., Gersberg, R., Keat, T., 2009. Constructed Wetland in China. *Ecological Engineering*. 35, 1367-1378.

GLOSARIO

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Agentes patógenos y organismos productores de toxinas en aguas superficiales. (Fuente: Salgot, 1994).	28
Tabla 1.2 Principales microorganismos patógenos presentes en el agua residual. (Fuente: Salgot, 1994).....	31
Tabla 3.1. Número medio de microorganismos detectados en verano y otoño. (CT: Coliformes totales, EF: Estreptococos fecales, UFC: Unidades formadoras de colonias).	58
Tabla 3.2. Número medio de microorganismos detectados en invierno y primavera. (CT: Coliformes totales, EF: Estreptococos fecales, UFC: Unidades formadoras de colonias).....	58
Tabla 3.3. Coeficiente de correlación de Pearson entre los microorganismos estudiados y los parámetros físico-químicos. (T: Temperatura, Cond.: conductividad, CT: Coliformes totales, CF: Coliformes fecales, EF: Estreptococos fecales, O.D.: Oxígeno disuelto, NTK: Nitrógeno total Kjeldhal, UFC: Unidades formadoras de colonias).....	60
Tabla 3.4. Características físico-químicas medias del agua residual, así como su desviación típica en cada punto de muestreo del sistema de tipo MJEA [®] (FSW: Balsa de flujo superficial y FSSW: Balsa de flujo subsuperficial).	61
Tabla 3.5. Concentración media y eficiencia de eliminación de los parámetros físico-químicos en cada uno de los puntos de muestreo entre los meses de Abril a Octubre en el sistema de tipo (MJEA [®]). (FSW: Balsa de flujo superficial, FSSW: Balsa de flujo subsuperficial, UFC: Unidades formadoras de colonias).....	62
Tabla 3.6. Concentración media y eficiencia de eliminación de los parámetros físico-químicos en cada uno de los puntos de muestreo entre los meses de Noviembre a Marzo en el sistema de tipo (MJEA [®]). (FSW: Balsa de flujo superficial, FSSW: Balsa de flujo subsuperficial, UFC: Unidades formadoras de colonias).....	62
Tabla 3.7. Concentración de parásitos patógenos en agua residual bruta y en el agua residual tratada en las diferentes etapas del sistema de tipo MJEA [®] (FSW: Balsa de flujo superficial, FSSW: Balsa de flujo subsuperficial).....	66
Tabla 3.8. Coeficiente de correlación (R-Spearman correlations coefficients, $p < 0,05$) entre los parámetros físico-químicos y microbiológicos del afluente analizado en el sistema de tipo MJEA [®] (C.T.: Coliformes totales, C.F.: Coliformes fecales, E.F.: Estreptococos fecales, P.T.: Fósforo total).	68
Tabla 3.9. Coeficiente de correlación (R-Spearman correlations coefficients, $p < 0,05$) entre los parámetros físico-químicos y microbiológicos del agua residual	

de entrada y salida en el sistema de depuración de tipo MJEA [®] (C.T.: Coliformes totales, C.F.: Coliformes fecales, E.F.: Estreptococos fecales, O.D.: Oxígeno disuelto, DBO ₅ Demanda bioquímica de oxígeno, P.T.: Fósforo total).....	70
Tabla 3.10. Diferencias significativas en la eliminación de DBO ₅ y en la concentración de Oxígeno Disuelto en las distintas etapas del tratamiento, para P<0,05. (Post Hoc Tests Tukey HSD test), N=136. (FSW: Balsa de flujo superficial, FSSW: Balsa de flujo subsuperficial).	71
Tabla 3.11. Diferencias significativas en la eliminación de Coliformes totales, Coliformes fecales y Estreptococos fecales en las distintas etapas del tratamiento, para P<0,05. (Post Hoc Tests Tukey HSD test), N=136. (FSW: Balsa de flujo superficial, FSSW: Balsa de flujo subsuperficial, C.T.: Coliformes totales, C.F.: Coliformes fecales, E.F.: Estreptococos fecales).	71
Tabla 3.12. Diferencias significativas en la eliminación de <i>Clostridium perfringens</i> y huevos de Helmintos en las distintas etapas del tratamiento, para P<0,05. (Post Hoc Tests Tukey HSD test), N=136. (FSW: Balsa de flujo superficial, FSSW: Balsa de flujo subsuperficial).	72
Tabla 3.13. Diferencias significativas en la eliminación de quistes de <i>Giardia</i> y ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> en las distintas etapas del tratamiento, para P<0,05. (Post Hoc Tests Tukey HSD test), N=136. (FSW: Balsa de flujo superficial, FSSW: Balsa de flujo subsuperficial).	72
Tabla 3.14. Número de huevos de Helmintos por kilogramos de materia seca encontrados en Bustillo de Cea.....	80
Tabla 3.15. Características físico-químicas del agua residual en cada uno de los puntos muestreados a las diferentes cargas de Nitrógeno utilizadas durante el ensayo.	83
Tabla 3.16. Concentración del afluente y efluente en el Sistema Piloto Experimental y porcentaje de eliminación de los parámetros químicos y microbiológicos a una carga de 2,34 g NTK/m ² d. (DBO ₅ : Demanda bioquímica de oxígenos, SST: Sólidos totales en suspensión, C.T.: Coliformes totales, E.F.: Estreptococos fecales, C.F.: Coliformes fecales).	84
Tabla 3.17. Concentración del afluente y efluente en el Sistema Piloto Experimental y porcentaje de eliminación de los parámetros químicos y microbiológicos a una carga de 2,49 g NTK/m ² d. (DBO ₅ : Demanda bioquímica de oxígenos, SST: Sólidos totales en suspensión, C.T.: Coliformes totales, E.F.: Estreptococos fecales, C.F.: Coliformes fecales).	84
Tabla 3.18. Concentración del afluente y efluente en el Sistema Piloto Experimental y porcentaje de eliminación de los parámetros químicos y microbiológicos a una carga de 3,39 g NTK/m ² d. (DBO ₅ : Demanda bioquímica de oxígenos,	

SST: Sólidos totales en suspensión, C.T.: Coliformes totales, E.F.:
Estreptococos fecales, C.F.: Coliformes fecales). 85

Tabla 3.19. Análisis de varianza (ANOVA), usando diferencias significativas mínimas de Scheffe. Tests de Significancia. Sigma-restricted datos no paramétricos. Descomposición de la hipótesis. (BA: Bacterias aerobias, Ec: *E. coli*, CT: Coliformes totales, EF: Estreptococos fecales; SC: Suma de cuadrados, G.L.: grados de libertad, F-radio: Cociente entre dos medias cuadráticas, P: Nivel de significación). 88

Tabla 3.20. Coeficiente de correlación de Spearman ($p < 0,05$) entre los parámetros físico-químicos y los microbiológicos del agua analizada en la totalidad del sistema experimental de depuración a escala piloto. (T^a Temperatura, O.D.: Oxígeno disuelto, DBO₅: Demanda bioquímica de oxígeno; PT: Fósforo total, SST: Sólidos totales en suspensión, B.A.: Bacterias aerobias, C.T.: Coliformes totales, E.F.: Estreptococos fecales, C.F.: Coliformes fecales). 89

Tabla 3.21. Coeficiente de correlación de Spearman ($p < 0,05$) entre los parámetros físico-químicos y microbiológicos del Afluente del sistema experimental de depuración a escala piloto. (T^a: Temperatura, O.D: Oxígeno disuelto, DBO₅: Demanda bioquímica de oxígeno, PT: Fósforo total, SST: Sólidos totales en suspensión, B.A.: Bacterias aerobias, C.T.: Coliformes totales, C.F.: Coliformes fecales). 90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema de un sistema de lagunaje (Fuente: ecohabitar.org/.../depuragua.html 2004).	20
Figura 1.2. Esquema de humedales artificiales de tipo flujo superficial y subsuperficial (vertical y horizontal). (Fuente: Brix, 1987a.)	23
Figura 1.3. Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium parvum</i> . (Fuente: www.dpd.cdc.gov/dpdx . 2004-2010).	34
Figura 1.4. Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i> . (Fuente: www.dpd.cdc.gov/dpdx 2004-2010).	36
Figura 2.1. Situación Geográfica de Bustillo de Cea y Campo de Villavidel	41
Figura 2.2. Etapa de Pretratamiento de la depuradora de tipo MJEA [®] de Bustillo de Cea.	44
Figura 2.3. Distribuidor la depuradora de tipo MJEA [®] de Bustillo de Cea.	45
Figura 2.4. Laguna de micrófitos la depuradora de tipo MJEA [®] de Bustillo de Cea... 45	
Figura 2.5. Balsa con <i>Typha latifolia</i> y flujo hidráulico superficial. De la depuradora de tipo MJEA [®] de Bustillo de Cea. (Vista de la entrada).....	46
Figura 2.6. Vista general de la Balsa con <i>Typha latifolia</i> y flujo hidráulico superficial. De la depuradora de tipo MJEA [®] de Bustillo de Cea.	46
Figura 2.7. Etapa con <i>Iris pseudacorus</i> (flujo superficial) y <i>Salix atrocinerea</i> con flujo subsuperficial. De la depuradora de tipo MJEA [®] de Bustillo de Cea.....	47
Figura 2.8. Esquema del sistema de depuración de Bustillo de Cea. Puntos de muestreo del agua.	48
Figura 2.9. Esquema del sistema de Bustillo de Cea, puntos de muestreo de lodo.....	50
Figura 2.10. Esquema del sistema de depuración piloto de Centrotec.	53
Figura 2.11. Laguna de pretratamiento o Balsa de almacenamiento de los purines. Del sistema de depuración piloto de Centrotec.	53
Figura 2.12. Tanque de dilución y primera balsa con <i>Typha latifolia</i> y flujo superficial. Del sistema de depuración piloto de Centrotec.	54
Figura 2.13. Sistema completo: tanque de dilución, balsa con <i>Typha latifolia</i> y flujo superficial y las dos siguientes con <i>Salix atrocinerea</i> y flujo subsuperficial. Del sistema de depuración piloto de Centrotec.	54

Figura 3.1. Evolución temporal de DBO ₅ , Coliformes fecales, Coliformes totales y Estreptococos fecales en el Afluente y el Efluente durante el verano e invierno en el Mosaico Jerarquizado de Ecosistemas Artificiales de Bustillo de Cea.....	65
Figura 3.2. Eliminación de huevos de Helmintos, quistes de <i>Giardia</i> y ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> en los periodos de estudio (Abril a Octubre), (Noviembre a Marzo) y (periodo completo) en todos los puntos de muestreo y la EDAR completa (FSW: Balsa de flujo superficial, FSSW: Balsa de flujo subsuperficial, EDAR: estación depuradora de aguas residuales).....	67
Figura 3.3. Gráficas del coeficiente de correlación de Spearman en el agua residual bruta entre Helmintos vs. DBO ₅ y Fósforo total vs. <i>Clostridium</i>	69
Figura 3.4. Relaciones lineales observadas entre la carga de los diferentes parámetros analizados en el Mosaico Jerarquizado de Ecosistemas Artificiales de Bustillo de Cea y su tasa de eliminación.	75
Figura 3.5. Relaciones lineales observadas para la carga de DBO ₅ y Amonio en el Mosaico Jerarquizado de Ecosistemas Artificiales de Bustillo de Cea y su tasa de eliminación en las diferentes etapas del sistema: laguna, Balsa con flujo superficial y Balsa con flujo subsuperficial.	76
Figura 3.6. Relaciones lineales observadas para la carga de Fósforo total y Coliformes fecales en el Mosaico Jerarquizado de Ecosistemas Artificiales de Bustillo de Cea y su tasa de eliminación en las diferentes etapas del sistema: laguna, Balsa con flujo superficial y Balsa con flujo subsuperficial.	77
Figura 3.7. Relaciones lineales observadas para la carga de Estreptococos fecales y <i>Clostridium perfringens</i> en el Mosaico Jerarquizado de Ecosistemas Artificiales de Bustillo de Cea y su tasa de eliminación en las diferentes etapas del sistema: laguna, Balsa con flujo superficial y Balsa con flujo subsuperficial.	78
Figura 3.8. Diagramas de cajas para los parámetros físico-químicos e indicadores fecales del sistema de tratamiento de agua residual de Bustillo de Cea. (FSW: Balsa de flujo superficial, FSSW: Balsa de flujo subsuperficial, N=35).....	79
Figura 3.9. Datos taxonómicos de los Helmintos identificados en el estudio. (Fuente: NCBI 2010).....	81
Figura 3.10. Géneros de Helmintos encontrados en el lodo bruto del pretatamiento de Bustillo de Cea.....	81
Figura 3.11. Géneros de Helmintos encontrados en el lodo maduro de la laguna de microfitos a 1,5 m de profundidad en Bustillos de Cea.....	82
Figura 3.12. Géneros de Helmintos encontrados en el lodo maduro de la laguna de microfitos a 1 m de profundidad en Bustillo de Cea.	82

Figura 3.13. Evolución temporal de los Coliformes totales, Coliformes fecales, Estreptococos fecales y <i>Clostridium perfringens</i> en el afluente y efluente durante la primavera, verano y otoño.	86
Figura 3.14. Relaciones observadas entre la carga de <i>Clostridium perfringens</i> y su concentración en el efluente en las distintas etapas del tratamiento y en el sistema completo (izquierda) y relaciones observadas entre la carga de <i>Clostridium perfringens</i> y su tasa de eliminación en las distintas etapas del tratamiento y en el sistema completo (derecha).....	93
Figura 3.15. Relaciones observadas entre la carga de Coliformes fecales y su concentración en el efluente en las distintas etapas del tratamiento y en el sistema completo (izquierda) y relaciones observadas entre la carga de Coliformes fecales y su tasa de eliminación en las distintas etapas del tratamiento y en el sistema completo (derecha).....	94
Figura 3.16. Relaciones observadas entre la carga de Estreptococos fecales y su concentración en el efluente en las distintas etapas del tratamiento y en el sistema completo (izquierda) y relaciones observadas entre la carga de Estreptococos fecales y su tasa de eliminación en las distintas etapas del tratamiento y en el sistema completo (derecha).....	95
Figura 3.17. Relaciones observadas entre la carga de Coliformes totales y su concentración en el efluente en las distintas etapas del tratamiento y en el sistema completo (izquierda) y relaciones observadas entre la carga de Coliformes totales y su tasa de eliminación en las distintas etapas del tratamiento y en el sistema completo (derecha).....	96
Figura 3.18. Relaciones observadas entre la carga de <i>Escherichia coli</i> y su concentración en el efluente en las distintas etapas del tratamiento y en el sistema completo (izquierda) y relaciones observadas entre la carga de <i>Escherichia coli</i> y su tasa de eliminación en las distintas etapas del tratamiento y en el sistema completo (derecha).....	97
Figura 3.19. Diagramas de cajas para los parámetros físico-químicos y las Bacterias aerobias del sistema piloto experimental de tratamiento de agua residual del centro de reproducción porcina Centrotec. (FSW: Balsa de flujo superficial, FSSW: Balsa de flujo subsuperficial, N=76).....	98
Figura 3.20. Diagramas de cajas para los indicadores fecales y <i>Clostridium</i> del sistema MJEA [®] en Centrotec. (FSW: Balsa de flujo superficial, FSSW: Balsa de flujo subsuperficial, N=76).....	99