

**CAPÍTOL 2**  
**SISTEMA EXPERIMENTAL PER A LA**  
**COLONITZACIÓ MICROBIANA DE SUPERFÍCIES**



# Capítol 2 | Sistema experimental per a la colonització microbiana de superfícies

<b>2.1.</b>	<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>34</b>
2.1.1.	HIDRODINÀMICA DE MEDIS POROSOS: REACTORS DE LLIT EMPACAT	34
2.1.2.	SIMILITUD HIDRODINÀMICA	38
2.1.3.	INFLUÈNCIA DEL BIOFILM EN EL RÈGIM HIDRÀULIC	38
<b>2.2.</b>	<b>MATERIAL I MÈTODES</b>	<b>43</b>
2.2.1.	CARACTERÍSTIQUES DEL SISTEMA: DISSENY, CONSTRUCCIÓ I MUNTATGE.	43
2.2.2.	OPERACIÓ I OPTIMITZACIÓ DEL SISTEMA EXPERIMENTAL	46
2.2.3.	MESURES IN SITU	49
2.2.4.	PROVEÏMENT D'AIGUA: ZONES DE MOSTREIG	49
2.2.5.	CALIBRATGE AL LABORATORI: MESURA DE LA PÈRDUA DE CÀRREGA	51
2.2.6.	EFFECTE DEL MATERIAL DE SUPORT EN EL DESENVOLUPAMENT DEL BIOFILM	55
2.2.7.	PROCESSAT DE LES MOSTRES: RENTAT I SONICACIÓ	56
2.2.8.	AVALUACIÓ DE LA REPRODUCTIBILITAT DE LA FORMACIÓ DE BIOFILMS	59
2.2.9.	EFFECTE DE L'ESFORÇ DE CISALLA EN EL DESENVOLUPAMENT DEL BIOFILM	60
2.2.10.	INFLUÈNCIA DEL BIOFILM EN LA HIDRODINÀMICA DEL MEDI PORÓS	61
2.2.11.	ANÀLISI ESTADÍSTICA DE LES DADES	62
<b>2.3.</b>	<b>RESULTATS</b>	<b>63</b>
2.3.1.	RENDIMENT DEL REACTOR DE LLIT EMPACAT	63
2.3.2.	CALIBRATGE EN LABORATORI DEL SISTEMA	66
2.3.3.	EFFECTE DEL MATERIAL DE SUPORT	73
2.3.4.	PROCESSAT DE LES MOSTRES: RENTAT I SONICACIÓ	75
2.3.5.	REPRODUCTIBILITAT DE LA COLONITZACIÓ DEL MATERIAL DE SUPORT.	77
2.3.6.	EFFECTE DE L'ESTRÈS DE CISALLA	77
2.3.7.	INFLUÈNCIA DEL BIOFILM EN LA HIDRODINÀMICA DEL MEDI PORÓS	80
<b>2.4.</b>	<b>DISCUSSIÓ</b>	<b>82</b>
2.4.1.	IDONEÏTAT DE LA TÈCNICA UTILITZADA	82
2.4.2.	EFFECTE DE L'ESTRÈS DE CISALLA	84
2.4.3.	INFLUÈNCIA DEL BIOFILM EN LA HIDRODINÀMICA DEL MEDI PORÓS	85
<b>2.5.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>86</b>

## 2.1. Introducció

S'ha desenvolupat un sistema experimental per al mostreig i la monitorització de la formació de biofilms en sistemes aquàtics. Amb aquest sistema, biofilms model es formen a la superfície d'un suport inert de característiques ben definides. Un dels requisits fonamentals es troba en el fet de mostrejar comunitats ambientals complexes, on sovint es produeixen interaccions entre espècies diferents de microorganismes que acaben definint la composició i estructura del biofilm.

El sistema model s'ha dissenyat per obtenir el màxim de mostra -biofilm- en el mínim espai possible i, al mateix temps, simular les condicions hidràuliques i ambientals que es poden produir a qualsevol xarxa de distribució d'aigua. En aquest sentit, s'ha optat per utilitzar un mostrejador format per un reactor ple amb un medi porós com a material de suport. Aquesta configuració en llit empaquetat fix permet la producció de biofilms controlant el gradient de velocitats i obtenint el màxim de superfície de mostreig en el mínim espai possible. Això és especialment important per als experiments de camp, on l'espai és un factor clau la majoria de les vegades.

### 2.1.1. Hidrodinàmica de medis porosos: Reactors de Llit Empacat

El creixement dels biofilms a les interfases sòlid-líquid està fortament influenciat per les condicions hidrodinàmiques d'aquest últim, les quals determinen el transport de nutrients al biofilm i la presència de forces físiques que actuen sobre la superfície. Per tal d'obtenir el màxim de biofilm en el mínim espai possible s'ha triat un reactor de llit empaquetat format per un medi porós amb esferes de vidre de 5 mm de diàmetre. En aquest sistema, les variables hidràuliques més importants són la permeabilitat (**k**), que descriu les propietats conductives del medi porós, i el factor de fricció (**f**), que ens quantifica la resistència a la fricció. Respecte a la geometria del sistema la variable més important és la porositat ( $\epsilon$ ). La **porositat** mesura la quantitat d'espai de porus lliure, i es pot definir com la relació entre l'espai que ocupen els porus dins d'un volum definit, essent la seva expressió (Bear 1972):

$$\epsilon = \frac{V_p}{V_T} = \frac{V_T - V_{\text{esf.}}}{V_T} = \frac{L \cdot (\pi \cdot R)^2 - \left(\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r_{\text{esf}}^3\right) N}{L \cdot (\pi \cdot R)^2} \quad (2.1)$$

on  $V_p$  és el volum de porus,  $V_T$  és el volum total,  $R$  és el radi del reactor,  $r_{\text{esf}}$  és el radi de les esferes de vidre i  $N$ , correspon al nombre d'esferes dins del reactor. Quan s'utilitzen elements sòlids esfèrics de radi homogeni, la porositat és funció del tipus d'empaquetament. En el nostre cas, al conèixer el volum total es treballa amb el nombre d'esferes que l'omple. A partir d'aquestes equacions, trobem l'expressió final de la porositat pel reactor de llit empaquetat:

$$\epsilon = 1 - \left( \frac{4 \cdot r_e^3 \cdot N}{3 \cdot L \cdot R^2} \right) \quad (2.2)$$

La porositat del sòl o d'una roca determina la capacitat d'emmagatzematge d'aigua, la qual no coincideix amb la de drenatge, que serà més petita. Així, cal diferenciar entre la porositat total o la relació entre el volum de buits i el volum total de la roca, i la porositat efectiva que determina la capacitat de drenatge i que és l'accessible als fluids lliures, exclouent la porositat no connectada i l'espai ocupat per l'aigua d'adsorció o l'aigua lligada a les argiles.

La **conductivitat hidràulica** ens dona la mesura de la facilitat amb que l'aigua es mou a través dels porus o espais buits, i depèn de la grandària dels mateixos, de la tortuositat dels conductes i de la forma dels grans i dels porus, així com de la viscositat i la densitat de l'aigua. D'altra banda, la **permeabilitat** és un paràmetre semblant amb les dimensions d'una velocitat, dependent del tipus de fluid que en el nostre cas és l'aigua. Una vegada coneguda la porositat, es pot determinar la permeabilitat del sistema, amb la següent expressió:

$$K = \frac{Q \cdot L}{A_p \cdot h_f} \quad (2.3)$$

on  $K$  és la permeabilitat,  $Q$  és el cabal que circula pel reactor,  $L$  és la longitud del reactor,  $h_f$  és la pèrdua de càrrega en la longitud  $L$  i  $A_p$  és l'àrea de pas efectiva disponible pel flux o àrea de porus efectiva. Per determinar l'àrea de pas efectiva, realitzem la suposició de que la porositat volumètrica és igual a la porositat en àrea. Es a dir, suposem que el percentatge de porus en el total del medi porós és igual al percentatge de porus que es troben en una secció transversal a aquest medi.

$$A_p = \varepsilon \cdot A_{cs} = \varepsilon \cdot \pi \cdot r^2 \quad (2.4)$$

Substituint, ens queda la següent expressió de porositat, on  $A_{cs}$  és l'àrea de la secció transversal al medi porós:

$$\varepsilon = \frac{V_p}{V_t} = \frac{A_p}{A_{cs}} \quad (2.5)$$

Finalment, al substituir  $A_p$  a l'expressió de la permeabilitat (equació 2.3) ens queda l'expressió final:

$$K = \frac{Q \cdot L}{\varepsilon \cdot \pi \cdot r^2 \cdot h_f} \quad (2.6)$$

Dos conceptes geomètrics de la secció del reactor són molt importants pel càlcul de la pèrdues per fricció: el **radi hidràulic** ( $R_H$ , o **relació  $A_p/P_p$** ) és la relació entre l'àrea de pas per on circula l'aigua ( $\varepsilon \cdot A_{cs}$ ), i el **perímetre mullat**. Aquest últim és el perímetre de la secció transversal del reactor on hi ha contacte del líquid amb la paret i el medi porós (perímetre sòlid on l'aigua frega):

$$P_p = d_p^2 \cdot \pi \cdot A_{cs} \cdot \frac{6(1-\varepsilon)}{d_p^3 \cdot \pi} \quad (2.7)$$

En el nostre cas, el perímetre està format pel perímetre de la secció de la canonada de 1/2" del reactor, més el perímetre de les esferes de 5 mm de diàmetre que hi han en aquesta secció. En medis porosos però, és més convenient definir un **radi hidràulic mitjà** per un volum unitari de medi porós, de la forma que segueix (Bear 1972):

$$R_H = \frac{\varepsilon \cdot d_p}{6(1-\varepsilon)} \quad (2.8)$$

Per conèixer el tipus de règim hidràulic s'acostuma a utilitzar el **nombre de Reynolds** (Munson et al. 1990), que ens descriu la importància relativa de les forces d'inèrcia sobre les forces viscoses. Genèricament aquest nombre adimensional que defineix la relació de forces viscoses i d'inèrcia, s'escriu com:

$$Re = \frac{v \cdot \rho \cdot D}{\mu} \quad (2.9)$$

on  $D$  és una longitud característica del sistema (com el radi hidràulic,  $R_H$ ), mentre que  $\mu$  i  $\rho$  són característiques del fluid. Aquí,  $\rho$  és la densitat de l'aigua ( $998 \text{ kg m}^{-3}$ ) i  $\mu$  és la viscositat de l'aigua ( $1,005 \times 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , a  $20^\circ\text{C}$ ). Finalment,  $v$  és una velocitat característica del flux, la velocitat mitjana de circulació del líquid per la tuberia, que en termes del cabal volumètric s'expressa com segueix:

$$v = \frac{Q}{\pi \cdot r^2} \quad (2.10)$$

Generalment s'accepta que en canonades de secció circular, els valors de  $Re < 2.000$  són representatius del flux laminar estable, mentre que el flux turbulent està present quan es troben valors de  $Re > 4.000$  (Crane 1989, Sotelo 1994). Entremig es troba una zona de transició on les condicions poden alternar entre el flux laminar i el turbulent en funció de les condicions ambientals, la rugositat de la canonada o les condicions d'entrada a la tuberia, així com d'altres factors externs i interns (Characklis et al. 1990). Considerant qualsevol secció perpendicular al flux, la velocitat mitjana es pot basar en l'àrea total de la secció transversal de la canonada. En aquest cas s'acostuma a parlar de velocitat superficial (Bear 1972, de Nevers 1991, Middleman 1998):

$$v_0 \equiv v_m \cdot \varepsilon \quad (2.11)$$

D'altra banda, la velocitat mitjana es pot basar en l'àrea oberta al flux, anomenant-se en aquest cas velocitat intersticial. En termes del cabal volumètric, la velocitat superficial ( $v_0$ ) i la velocitat mitjana o intersticial ( $v_m$ ) a través del llit empaquet són, respectivament (Bear 1972, de Nevers 1991, Middleman 1998):

$$v_o = \frac{Q}{A_{cs}} \quad (2.12)$$

$$v_m = \frac{Q}{\varepsilon \cdot A_{cs}}$$

Des d'un punt de vista pràctic s'acostuma a utilitzar la velocitat superficial, ja que es pot mesurar més fàcilment o es pot relacionar directament amb el cabal. Per analogia, es pot definir també un nombre de Reynolds modificat pel flux a través de llits empaquetats, substituint la velocitat superficial a l'equació de Reynolds (Leva 1959, Middleman 1998):

$$Re' = \frac{v_0 \cdot \rho \cdot d_p}{(1 - \varepsilon) \cdot \mu} \quad (2.13)$$

En aquest cas, s'accepta que pel flux a través de medis porosos, valors de  $Re' < 10$  són representatius del flux laminar, mentre que el flux turbulent està present quan es troben valors de  $Re' > 1000$  (Middleman 1998).

Tanmateix, s'ha de considerar que part de l'energia del flux, el que es coneix com a **pèrdua de càrrega**, es transforma en un altre tipus d'energia que no és utilitzable pel moviment. Això és degut bàsicament, als efectes viscosos i a les forces de fricció originades per la pròpia turbulència i pels canvis de geometria al llarg del medi (canvis de direcció, ampliacions, reduccions, vàlvules, etc.). En general, el **factor de fricció** es pot definir a partir de la velocitat superficial i del radi hidràulic expressat com proporció o fracció de  $d_p$  (Leva 1959):

$$f = \frac{(\Delta P/L) \cdot \varepsilon^2 \cdot d_p}{3 \cdot \rho \cdot v_0^2 \cdot (1 - \varepsilon)} \quad (2.14)$$

En règims de flux laminar a través de llits empaquetats s'acostuma a utilitzar el factor de fricció modificat (equació de Carmen-Kozeny), un factor de fricció adimensional relacionat amb la porositat i el número de Reynolds (Tchobanoglous 1969), del tipus:

$$f \equiv \frac{\Delta P \cdot \varepsilon^3 \cdot d_p}{L \cdot \rho \cdot v_0^2 \cdot (1 - \varepsilon)} = \frac{150 \cdot (1 - \varepsilon)}{Re'} \quad (2.15)$$

Tenint en compte que entre la pèrdua de càrrega expressada i la caiguda de pressió existeix la següent relació (Crane 1989):

$$\Delta P = g \cdot \rho \cdot h_f \quad (2.16)$$

en un règim laminar es defineix la pèrdua de càrrega a través d'un medi porós de longitud  $L$  amb l'equació de Carmen-Kozeny (Characklis & Marshall 1990, Cunningham et al. 1991):

$$h_f = f \cdot \frac{L \cdot (1 - \varepsilon) \cdot v_0^2}{d_p \cdot \varepsilon^3 \cdot g} = \frac{150(1 - \varepsilon)}{Re'} \cdot \frac{L \cdot (1 - \varepsilon) \cdot v_0^2}{d_p \cdot \varepsilon^3 \cdot g} \quad (2.17)$$

Per flux turbulents el factor de fricció acostuma a ésser independent de Reynolds, especialment quan existeix una rugositat suficient a l'interior del reactor, produïda per l'acumulació del biofilm i d'altres dipòsits. En aquestes condicions, el factor de fricció és constant:

$$f \equiv \frac{\Delta P \cdot \varepsilon^3 \cdot d_p}{L \cdot \rho \cdot v_0^2 \cdot (1 - \varepsilon)} = \text{constant} \quad (2.18)$$

Sovint s'acostuma a utilitzar un valor per a la constant de 1,75. Amb aquest coeficient, l'equació 2.18 s'anomena equació de Burke-Plummer, i permet ajustar les dades per valors de Reynolds superiors a 1.000 (Middleman 1998).

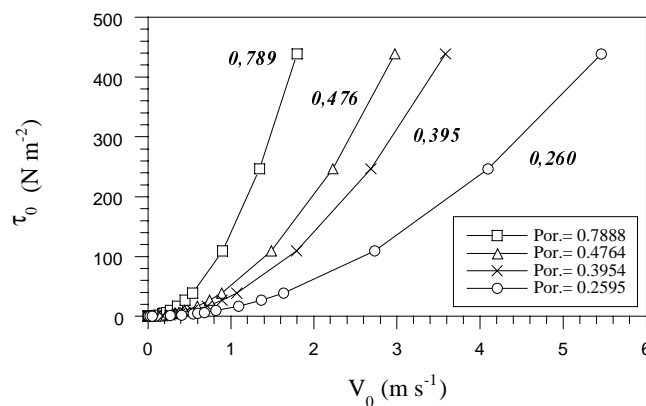
Quan ens trobem amb valors de Reynolds entre 10 i 1.000, el model més simple que es pot adoptar és sumar els factors de fricció de l'equació de Carmen-Kozeny (eq. 2.17) i de Burke-Plummer (eq. 2.18), en el que s'anomena l'equació d'Ergun (Ergun 1952, Middleman 1998):

$$f \equiv \frac{\Delta P \cdot \varepsilon^3 \cdot d_p}{L \cdot \rho \cdot v_0^2 \cdot (1 - \varepsilon)} = \frac{150 \cdot (1 - \varepsilon)}{Re'} + 1,75 \quad (2.19)$$

D'altre banda, un dels paràmetres hidrodinàmics més importants i bàsic per determinar el potencial de formació de biofilms en qualsevol sistema, l'**esforç o estrès de cisalla** ( $\tau_0$ ), depèn de la velocitat del flux: velocitats elevades produeixen un esforç de cisalla alt, amb una influència negativa en la formació del biofilm (Characklis & Marshall 1990). En el nostre cas, ha estat necessari determinar la magnitud de l'esforç de cisalla que es produirà a l'interior del reactor amb el medi porós. L'esforç de cisalla a la superfície del biofilm i a la superfície del substrat es va obtenir de la fórmula general, a partir de la velocitat superficial (equació 2.11) i el factor de fricció modificat segons el tipus de règim del flux (equació 2.17, 2.18 o 2.19):

$$\tau_0 = \frac{f}{8} \cdot \rho \cdot v_0^2 \quad (2.20)$$

Assumint que la velocitat mitjana és proporcional a la velocitat superficial, es pot realitzar l'estudi teòric de com influeix la variació de la porositat en la corba de velocitat-esforç de cisalla. A la Figura 2.1 s'ha mantingut el mateix rang de cabals (0,1-1.200 L/h) i velocitats (0-1,7 m/s), variant la porositat. Com s'aprecia, a mesura que disminueix la porositat es necessita més velocitat per aconseguir el mateix esforç de cisalla. Per tant, és evident que la porositat influeix en el règim hidràulic del reactor de llit empacat.



**Figura 2.1.** Influència de la porositat en la corba velocitat-esforç de cisalla, mantenint el mateix rang de cabals i velocitats.

### 2.1.2. Similitud hidrodinàmica

En el disseny del reactor o mostrejador es va optar per utilitzar un medi porós, ja que la gran superfície de deposició que presenten les esferes que constitueixen el medi porós augmenta la capacitat de formació dels biofilms dins del reactor de llit empaquetat. Alhora, es poden obtenir mostres més grans que les obtingudes amb els sistemes fins ara emprats, especialment si es compara amb un tros de paret de canonada normal.

Per poder conèixer millor els avantatges que presenta el mostrejador format per un reactor de llit empaquetat fix amb un medi porós al seu interior i poder comparar-lo amb un mostrejador de canonada, és imprescindible conèixer els paràmetres hidràulics característics per a cada cas. En aquest sentit, s'ha establert la similitud hidrodinàmica entre una canonada i el reactor de llit empaquetat format per esferes com a medi porós. A la Taula 2.1 s'observen les equacions que defineixen els principals paràmetres hidrodinàmics que s'estableixen en una tuberia, tant per flux laminar com per un règim turbulent (Sotelo 1994, Mayol 1997a,b). Amb aquestes equacions s'han establert els valors per a cada un d'aquests paràmetres hidrodinàmics en canonades de diàmetre i velocitats de pas de l'aigua diferent (veure Taula 2.2 i Taula 2.3), per comparar-ho després amb els valors obtinguts per un reactor amb medi porós al seu interior. Els diàmetres emprats, entre 1/4" i 14", són els que s'utilitzen tant en edificis com en xarxes urbanes de distribució d'aigua.

En primer lloc, s'ha calculat el cabal necessari per aconseguir una velocitat determinada segons els diferents diàmetres de canonada. En segon lloc, s'ha obtingut el nombre de Reynolds característic per a cada situació, per conèixer si ens trobem amb un règim laminar ( $Re < 2.000$ ) o turbulent ( $Re > 4.000$ ), o bé en zona de transició ( $2.000 < Re < 4.000$ ). Una vegada es coneix Reynolds es calculen els altres paràmetres hidrodinàmics com la pèrdua de càrrega, la variació de pressió, el factor de fricció i l'esforç de cisalla, escollint les fórmules característiques per a cada tipus de règim (veure Taula 2.1). Les fórmules utilitzades pel flux turbulent són vàlides també per a la zona de transició (Sotelo 1994, Daugherty & Ingersoll 1954, Mayol 1997a).

### 2.1.3. Influència del biofilm en el règim hidràulic

S'ha de considerar que el desenvolupament del biofilm en el reactor de llit empaquetat i la seva acumulació en el medi porós resulta en la reducció de l'espai de porus lliures, afectant de retruc a les característiques hidrodinàmiques del medi (Bryers & Characklis 1981, Lewandowski & Stoodley 1995). La influència del biofilm en el règim hidràulic es pot calcular mesurant la porositat en les diferents etapes del seu desenvolupament (Cunningham et al. 1991). En primer lloc, es mesura volumètricament la porositat mitjana pel llit net sense biofilm, amb l'equació 2.1. Després es calcula la porositat del llit empaquetat amb biofilm,  $\epsilon_f$ , utilitzant la següent expressió (Alonso et al. 1997):

$$\epsilon_f = 1 - (1 - \epsilon_0) \cdot \left[ \left(1 + L_f/R_p\right)^3 - \frac{n}{4} \cdot \left(L_f/R_p\right)^2 \left(2 \cdot L_f/R_p + 3\right) \right] \quad (2.21)$$

on  $\epsilon_0$  és la porositat inicial del llit empaquetat net,  $L_f$  és el gruix mitjà del biofilm, mesurat per microscòpia confocal (veure 4.2.3),  $R_p$  és el radi de les partícules, esferes en el nostre cas i  $n$  és el nombre d'esferes en contacte amb una determinada esfera.

Assumint que la biomassa només pot créixer en la superfície banyada per l'aigua a les esferes i a la paret del mostrejador, la porositat i l'àrea específica – o superfície on el biofilm pot créixer per unitat de volum del reactor - dependran del nombre d'esferes en contacte amb una determinada esfera, i variaran amb el creixement del biofilm. Per un empaquetament regular, el nombre de punts de contacte entre una esfera determinada i les esferes adjacents s'anomena nombre de coordinació. Els sistemes més freqüents d'empaquetament regular són els cúbics, amb un valor de  $n=6$  i els romboèdrics o compactes, amb  $n=12$ . Aquests valors extrems s'engloben en la porositat real del llit empaquetat, mesurada de forma volumètrica (veure 2.2.3).

L'àrea específica del biofilm al reactor,  $a_f$ , es pot calcular a partir de la següent relació, essent  $\epsilon_0$  el valor de la porositat per al llit empaquetat net sense biofilm:



$$a_f = \frac{3(1-\varepsilon_0)}{2 \cdot R_p} \cdot \left(1 + L_f/R_p\right) \cdot \left((2-n) \cdot L_f/R_p + 2\right) \quad (2.22)$$

**Taula 2.1.** Equacions hidrodinàmiques que descriuen el flux per una tuberia (Sotelo 1994, Daugherty & Ingersoll 1954, Mayol 1997a).

Paràmetre Hidrodinàmic	Equació	Nº	Unitats
Cabal	$Q = v \cdot A_{cs}$	(2.23)	m <sup>3</sup> s <sup>-1</sup>
Nombre de Reynolds	$Re = \frac{v \cdot \rho \cdot d}{\mu}$	(2.24)	
Pèrdua de càrrega per fricció (Darcy-Weibach)	$h_f = f \cdot \frac{L}{d} \cdot \frac{v^2}{2 \cdot g}$	(2.25)	m
Flux laminar (Re<2.000)			
Factor de fricció (Poiseuille)	$f_{lam} = \frac{64}{Re}$	(2.26)	
Pèrdua de càrrega	$h_f = \frac{32 \cdot \mu \cdot v \cdot L}{\rho \cdot g \cdot d^2}$	(2.27)	m
Esforç de cisalla	$\tau_{lam} = \frac{8 \cdot \mu \cdot v}{d}$	(2.28)	N m <sup>-2</sup>
Flux turbulent (Re>4.000)			
Factor de fricció (Colebrook-White), tubs rugosos en zona de transició o règim turbulent (Re>2.300)	$f_{turb} = \frac{0,25}{\left[\log\left(\frac{\omega/d}{3,71 + 2,51/\left(Re \sqrt{f_{turb}}\right)}\right)\right]^2}$	(2.29)	
Pèrdua de càrrega en règim rugós turbulent establert	$h_{f_{turb}} = f_{turb} \cdot \frac{L}{d} \cdot \frac{v^2}{2g}$	(2.30)	m
Esforç de cisalla	$\tau_{turb} = \frac{f_{turb}}{4} \cdot \rho \cdot \frac{v^2}{2}$	(2.31)	N m <sup>-2</sup>
v	Velocitat mitjana		m s <sup>-1</sup>
A <sub>cs</sub>	Àrea de la secció transversal de la tuberia		m <sup>2</sup>
d	Diàmetre de la tuberia		m
L	Longitud de la tuberia		m
μ	Viscositat de l'aigua (μ=1,005 x 10 <sup>-3</sup> Kg m <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> , a 20°C)		Kg m <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
ρ	Densitat de l'aigua (ρ=998,23 Kg m <sup>-3</sup> , a 20°C)		Kg m <sup>-3</sup>
g	Constant gravitacional (g=9,8 m s <sup>-1</sup> )		m s <sup>-1</sup>
ω	Rugositat absoluta de la tuberia (ω = 4,6 x 10 <sup>-5</sup> m, per tuberies noves d'acer)		M
f	Factor de fricció (sense dimensions)		
h <sub>f</sub>	Pèrdua de càrrega per fricció		m

**Taula 2.2.** Principals paràmetres hidrodinàmics per canonades d'instal·lacions interiors i petits sistemes de distribució. (Longitud = 0,069 m). La línia discontinua separa el règim laminar (part superior) de la zona de transició. La línia continua separa aquesta de la zona de règim turbulent (part inferior).

Q (L/h)	V (m/s)	Reynolds	Factor fricció (f)	$h_f$ (m)	$\Delta P$ (Pa)	Esforç cisalla (N m <sup>-2</sup> )
<i>1/4" (0,00869 m)</i>						
2,14	0,01	86,31	0,74	3,00E-05	2,94E-01	9,25E-03
21,35	0,10	863,15	0,07	3,00E-04	2,94E+00	9,25E-02
42,70	0,20	1726,29	0,04	6,01E-04	5,88E+00	1,85E-01
64,06	0,30	2589,44	0,02	9,01E-04	8,82E+00	2,78E-01
68,18	0,32	2756,37	0,02	9,59E-04	9,38E+00	2,95E-01
74,73	0,35	3021,01	0,02	1,05E-03	1,03E+01	3,24E-01
85,41	0,40	3452,58	0,02	1,20E-03	1,18E+01	3,70E-01
106,76	0,50	4315,73	0,01	1,50E-03	1,47E+01	4,63E-01
160,14	0,75	6473,60	0,03	7,06E-03	6,90E+01	2,17E+00
213,52	1,00	8631,46	0,03	1,25E-02	1,23E+02	3,86E+00
266,90	1,25	10789,33	0,03	1,96E-02	1,92E+02	6,03E+00
320,28	1,50	12947,19	0,03	2,82E-02	2,75E+02	8,67E+00
373,65	1,75	15105,06	0,03	3,83E-02	3,75E+02	1,18E+01
427,03	2,00	17262,92	0,03	5,00E-02	4,90E+02	1,54E+01
533,79	2,50	21578,65	0,03	7,82E-02	7,65E+02	2,41E+01
<i>1/2" (0,0158 m)</i>						
7,06	0,01	156,94	0,41	9,09E-06	8,89E-02	5,09E-03
70,58	0,10	1569,36	0,04	9,09E-05	8,89E-01	5,09E-02
141,17	0,20	3138,71	0,02	1,82E-04	1,78E+00	1,02E-01
211,75	0,30	4708,07	0,01	2,73E-04	2,67E+00	1,53E-01
225,40	0,32	5011,58	0,01	2,90E-04	2,84E+00	1,62E-01
247,04	0,35	5492,75	0,03	7,11E-04	6,95E+00	3,98E-01
282,34	0,40	6277,43	0,03	9,28E-04	9,07E+00	5,19E-01
352,92	0,50	7846,78	0,03	1,45E-03	1,42E+01	8,11E-01
529,38	0,75	11770,17	0,03	3,26E-03	3,18E+01	1,82E+00
705,84	1,00	15693,57	0,03	5,78E-03	5,66E+01	3,24E+00
882,30	1,25	19616,96	0,03	9,04E-03	8,84E+01	5,06E+00
1058,76	1,50	23540,35	0,03	1,30E-02	1,27E+02	7,29E+00
1235,22	1,75	27463,74	0,03	1,77E-02	1,73E+02	9,92E+00
1411,68	2,00	31387,13	0,03	2,31E-02	2,26E+02	1,29E+01
1764,60	2,50	39233,92	0,03	3,61E-02	3,53E+02	2,02E+01
<i>3/4" (0,02093 m)</i>						
12,39	0,01	207,89	0,31	5,18E-06	5,07E-02	3,84E-03
123,86	0,10	2078,90	0,03	5,18E-05	5,07E-01	3,84E-02
247,72	0,20	4157,80	0,02	1,04E-04	1,01E+00	7,68E-02
371,58	0,30	6236,70	0,02	3,65E-04	3,57E+00	2,71E-01
395,53	0,32	6638,76	0,02	4,13E-04	4,04E+00	3,06E-01
433,51	0,35	7276,15	0,02	4,96E-04	4,85E+00	3,68E-01
495,44	0,40	8315,60	0,02	6,48E-04	6,34E+00	4,80E-01
619,30	0,50	10394,50	0,02	1,01E-03	9,89E+00	7,50E-01
928,95	0,75	15591,76	0,02	2,27E-03	2,22E+01	1,69E+00
1238,60	1,00	20789,01	0,02	4,04E-03	3,95E+01	3,00E+00
1548,25	1,25	25986,26	0,02	6,31E-03	6,18E+01	4,68E+00
1857,90	1,50	31183,51	0,02	9,09 E-03	8,89E+01	6,74E+00
2167,55	1,75	36380,77	0,02	1,24E-02	1,21E+02	9,18E+00
2477,20	2,00	41578,02	0,02	1,62E-02	1,58E+02	1,20E+01
3096,50	2,50	51972,52	0,02	2,52E-02	2,47E+02	1,87E+01

**Taula 2.3.** Principals paràmetres hidrodinàmics per canonades de xarxes de distribució d'aigua potable i abastament. (Longitud = 0,069 m). La línia discontinua separa el règim laminar (part superior) de la zona de transició. La línia continua separa aquesta de la zona de règim turbulent (part inferior).

Q (L/h)	V (m/s)	Reynolds	Factor fricció (f)	h <sub>r</sub> (m)	ΔP (Pa)	Esforç cisalla (N m <sup>-2</sup> )
<i>1" (0,0264m)</i>						
197,06	0,10	2622,22	0,02	3,25E-05	3,18E-01	3,05E-02
394,12	0,20	5244,43	0,02	1,21E-04	1,18E+00	1,13E-01
591,18	0,30	7866,65	0,02	2,72E-04	2,66E+00	2,54E-01
629,29	0,32	8373,78	0,02	3,08E-04	3,01E+00	2,88E-01
689,71	0,35	9177,76	0,02	3,70E-04	3,62E+00	3,46E-01
788,24	0,40	10488,86	0,02	4,83E-04	4,72E+00	4,52E-01
985,30	0,50	13111,08	0,02	7,54E-04	7,37E+00	7,05E-01
1477,96	0,75	19666,62	0,02	1,69E-03	1,66E+01	1,59E+00
1970,61	1,00	26222,16	0,02	3,01E-03	2,95E+01	2,82E+00
2463,26	1,25	32777,70	0,02	4,71E-03	4,60E+01	4,40E+00
2955,91	1,50	39333,24	0,02	6,77E-03	6,63E+01	6,34E+00
3448,56	1,75	45888,78	0,02	9,22E-03	9,02E+01	8,63E+00
3941,22	2,00	52444,32	0,02	1,20E-02	1,18E+02	1,13E+01
4926,52	2,50	65555,40	0,02	1,88E-02	1,84E+02	1,76E+01
<i>1" (0,05m)</i>						
70,69	0,01	262,22	0,24	9,07E-07	8,88E-03	1,61E-03
706,86	0,10	2622,22	0,02	9,07E-06	8,88E-02	1,61E-02
1413,72	0,20	5244,43	0,02	5,42E-05	5,30E-01	9,60E-02
2120,58	0,30	7866,65	0,02	1,22E-04	1,19E+00	2,16E-01
2257,28	0,32	8373,78	0,02	1,38E-04	1,35E+00	2,45E-01
2474,00	0,35	9177,76	0,02	1,66E-04	1,62E+00	2,94E-01
2827,43	0,40	10488,86	0,02	2,17E-04	2,12E+00	3,84E-01
3534,29	0,50	13111,08	0,02	3,39E-04	3,31E+00	6,00E-01
5301,44	0,75	19666,62	0,02	7,62E-04	7,45E+00	1,35E+00
7068,58	1,00	26222,16	0,02	1,35E-03	1,32E+01	2,40E+00
8835,73	1,25	32777,70	0,02	2,12E-03	2,07E+01	3,75E+00
10602,88	1,50	39333,24	0,02	3,05E-03	2,98E+01	5,40E+00
12370,02	1,75	45888,78	0,02	4,15E-03	4,06E+01	7,35E+00
14137,17	2,00	52444,32	0,02	5,42E-03	5,30E+01	9,60E+00
17671,46	2,50	65555,40	0,02	8,46E-03	8,28E+01	1,50E+01
<i>4" (0,1m)</i>						
282,74	0,01	993,26	0,06	2,27E-07	2,22E-03	8,04E-04
2827,43	0,10	9932,64	0,02	5,77E-06	5,64E-02	2,04E-02
5654,87	0,20	19865,27	0,02	2,31E-05	2,26E-01	8,18E-02
8482,30	0,30	29797,91	0,02	5,19E-05	5,08E-01	1,84E-01
9029,13	0,32	31718,88	0,02	5,88E-05	5,75E-01	2,08E-01
9896,02	0,35	34764,23	0,02	7,06E-05	6,91E-01	2,50E-01
11309,73	0,40	39730,55	0,02	9,23E-05	9,03E-01	3,27E-01
14137,17	0,50	49663,18	0,02	1,44E-04	1,41E+00	5,11E-01
21205,75	0,75	74494,78	0,02	3,24E-04	3,17E+00	1,15E+00
28274,33	1,00	99326,37	0,02	5,77E-04	5,64E+00	2,04E+00
35342,92	1,25	124157,96	0,02	9,01E-04	8,81E+00	3,19E+00
42411,50	1,50	148989,55	0,02	1,30E-03	1,27E+01	4,60E+00
49480,08	1,75	173821,14	0,02	1,77E-03	1,73E+01	6,26E+00
56548,67	2,00	198652,74	0,02	2,31E-03	2,26E+01	8,18E+00
70685,83	2,50	248315,92	0,02	3,60E-03	3,53E+01	1,28E+01

(Continuació)

Q (L/h)	V (m/s)	Reynolds	Factor fricció (f)	$h_f$ (m)	$\Delta P$ (Pa)	Esforç cisalla (N m <sup>-2</sup> )
<i>12" (0,3 m)</i>						
254,47	0,00	297,98	0,21	2,52E-09	2,47E-05	2,68E-05
2544,69	0,01	2979,79	0,02	2,52E-08	2,47E-04	2,68E-04
25446,90	0,10	29797,91	0,01	1,53E-06	1,49E-02	1,62E-02
50893,80	0,20	59595,82	0,01	6,11E-06	5,97E-02	6,49E-02
76340,70	0,30	89393,73	0,01	1,37E-05	1,34E-01	1,46E-01
81262,13	0,32	95156,65	0,01	1,56E-05	1,52E-01	1,66E-01
89064,15	0,35	104292,69	0,01	1,87E-05	1,83E-01	1,99E-01
101787,60	0,40	119191,64	0,01	2,44E-05	2,39E-01	2,60E-01
127234,50	0,50	148989,55	0,01	3,82E-05	3,73E-01	4,06E-01
190851,75	0,75	223484,33	0,01	8,59E-05	8,40E-01	9,13E-01
254469,00	1,00	297979,10	0,01	1,53E-04	1,49E+00	1,62E+00
318086,26	1,25	372473,88	0,01	2,39E-04	2,33E+00	2,54E+00
381703,51	1,50	446968,66	0,01	3,43E-04	3,36E+00	3,65E+00
445320,76	1,75	521463,43	0,01	4,68E-04	4,57E+00	4,97E+00
508938,01	2,00	595958,21	0,01	6,11E-04	5,97E+00	6,49E+00
636172,51	2,50	744947,76	0,01	9,54E-04	9,33E+00	1,01E+01
<i>14" (0,5 m)</i>						
706,86	0,00	496,63	0,13	8,02E-10	7,85E-06	1,61E-05
7068,58	0,01	4966,32	0,01	8,02E-09	7,85E-05	1,61E-04
70685,83	0,10	49663,18	0,01	8,30E-07	8,12E-03	1,47E-02
141371,67	0,20	99326,37	0,01	3,32E-06	3,25E-02	5,88E-02
212057,50	0,30	148989,55	0,01	7,47E-06	7,31E-02	1,32E-01
225728,14	0,32	158594,41	0,01	8,46E-06	8,28E-02	1,50E-01
247400,42	0,35	173821,14	0,01	1,02E-05	9,94E-02	1,80E-01
282743,34	0,40	198652,74	0,01	1,33E-05	1,30E-01	2,35E-01
353429,17	0,50	248315,92	0,01	2,07E-05	2,03E-01	3,68E-01
530143,76	0,75	372473,88	0,01	4,67E-05	4,57E-01	8,27E-01
706858,35	1,00	496631,84	0,01	8,30E-05	8,12E-01	1,47E+00
883572,93	1,25	620789,80	0,01	1,30E-04	1,27E+00	2,30E+00
1060287,52	1,50	744947,76	0,01	1,87E-04	1,83E+00	3,31E+00
1237002,11	1,75	869105,72	0,01	2,54E-04	2,49E+00	4,50E+00
1413716,69	2,00	993263,68	0,01	3,32E-04	3,25E+00	5,88E+00
1767145,87	2,50	1241579,60	0,01	5,19E-04	5,07E+00	9,19E+00

## 2.2. Material i Mètodes

### 2.2.1. Característiques del sistema: disseny, construcció i muntatge.

Apart d'obtenir les condicions adequades per a la similitud hidràulica, és important tenir present que ens interessa un reactor el suficientment petit com per facilitar la seva manipulació i instal·lació en experiments de camp, així com per reduir al màxim els cabals d'aigua a utilitzar. La grandària de la mostra a obtenir es garanteix amb el nombre d'esferes dins del reactor i l'esforç de cisalla, adequant el cabal a la secció i porositat del reactor.

La pèrdua de càrrega obtinguda en aquest reactor no és significativa enfront de les condicions reals existents als sistemes de distribució d'aigua, on es recomana una pressió de 4-5 kg/cm<sup>2</sup> per mantenir pressions de sortida a les aixetes de 5 mca (Steel 1972, Mayol 1983). D'altra banda, aquesta pèrdua de càrrega tampoc resulta un valor limitant per les bombes d'extracció d'aigua disponibles al mercat.

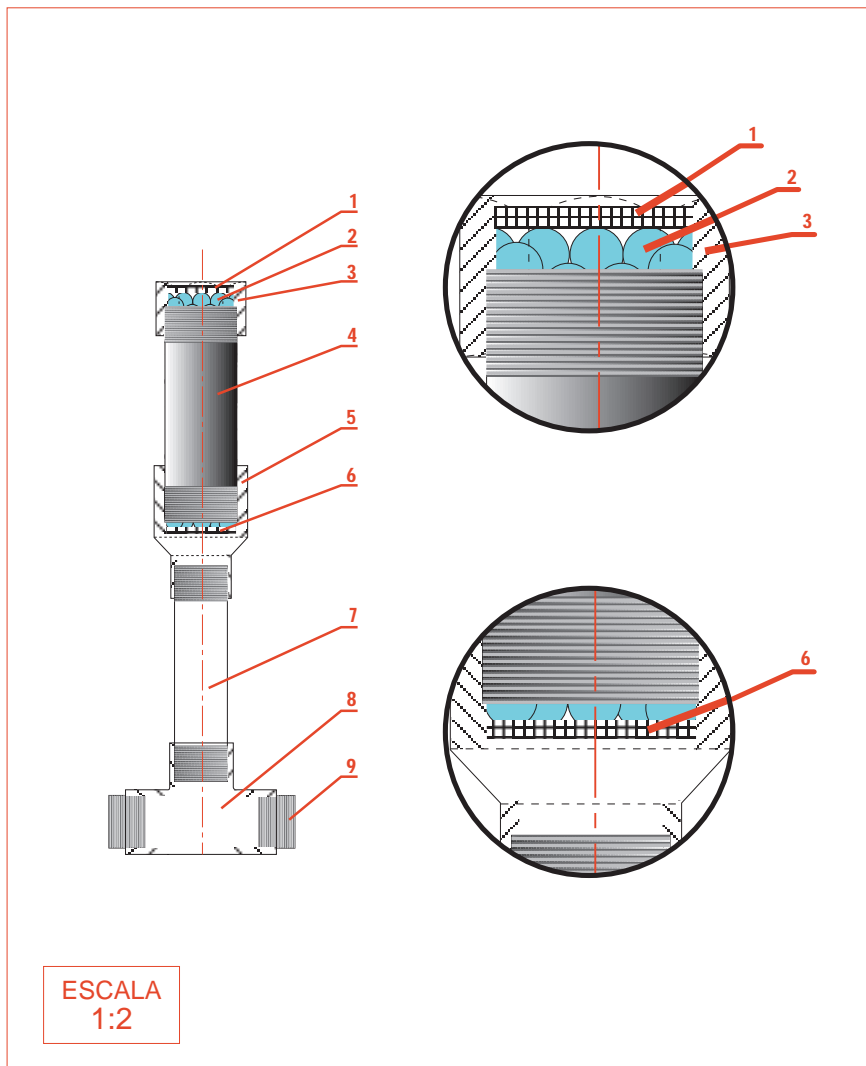
Per tots aquests motius esmentats, s'ha decidit realitzar la instal·lació principal amb tuberies llises de 1/4" (0,00869 m), mentre que per a cada un dels mostrejadors s'ha escollit la configuració de reactor de llit empaquet, format per una tuberia de 1/2" (0,0158 m) plena d'esferes de vidre com a medi porós de suport.

Els reactors estaven formats per tubs cilíndrics d'acer inoxidable austenític AISI 316. Es tracta d'un acer al crom-níquel (Cr≈18%, Ni≈10%, Mo≈3, C≈0,08%), molt utilitzat en la indústria química per les seves propietats, essent la varietat més resistent a la corrosió, a l'oxidació en general i presentant les millors característiques mecàniques a temperatures elevades, resistint temperatures de 350°C. De fet, és un material molt apte per a les condicions d'ús en els mostrejors de camp amb aigües d'origen divers. També suporta bé les condicions d'esterilització per calor amb l'autoclau. En el nostre cas, el reactor també havia de presentar el màxim de resistència a la corrosió, degut a que tant les parets internes com les externes entren en contacte permanent amb l'aigua. A més, el material havia de presentar un elevat grau de resistència a agents químics, especialment el clor.

Així mateix, és important que el material a utilitzar no alteri la formació natural dels biofilms. S'han desestimat la majoria de materials plàstics pels problemes que presenten en alliberar partícules orgàniques que poden ser utilitzades per microorganismes del biofilm, augmentant de forma significativa el seu desenvolupament (Petzoldt 1993, Keevil et al. 1995). D'altra banda, el material també hauria d'estar exempt de productes tòxics que perjudiquessin el propi creixement dels biofilms. En aquest sentit, alguns materials com el coure presenten un cert efecte antimicrobià, especialment sobre les poblacions de bacteris coliformes (Domek et al. 1984), reduint l'habilitat d'aquests bacteris per adherir-se i multiplicar-se a la superfície d'aquest material (Assanta et al. 1998).

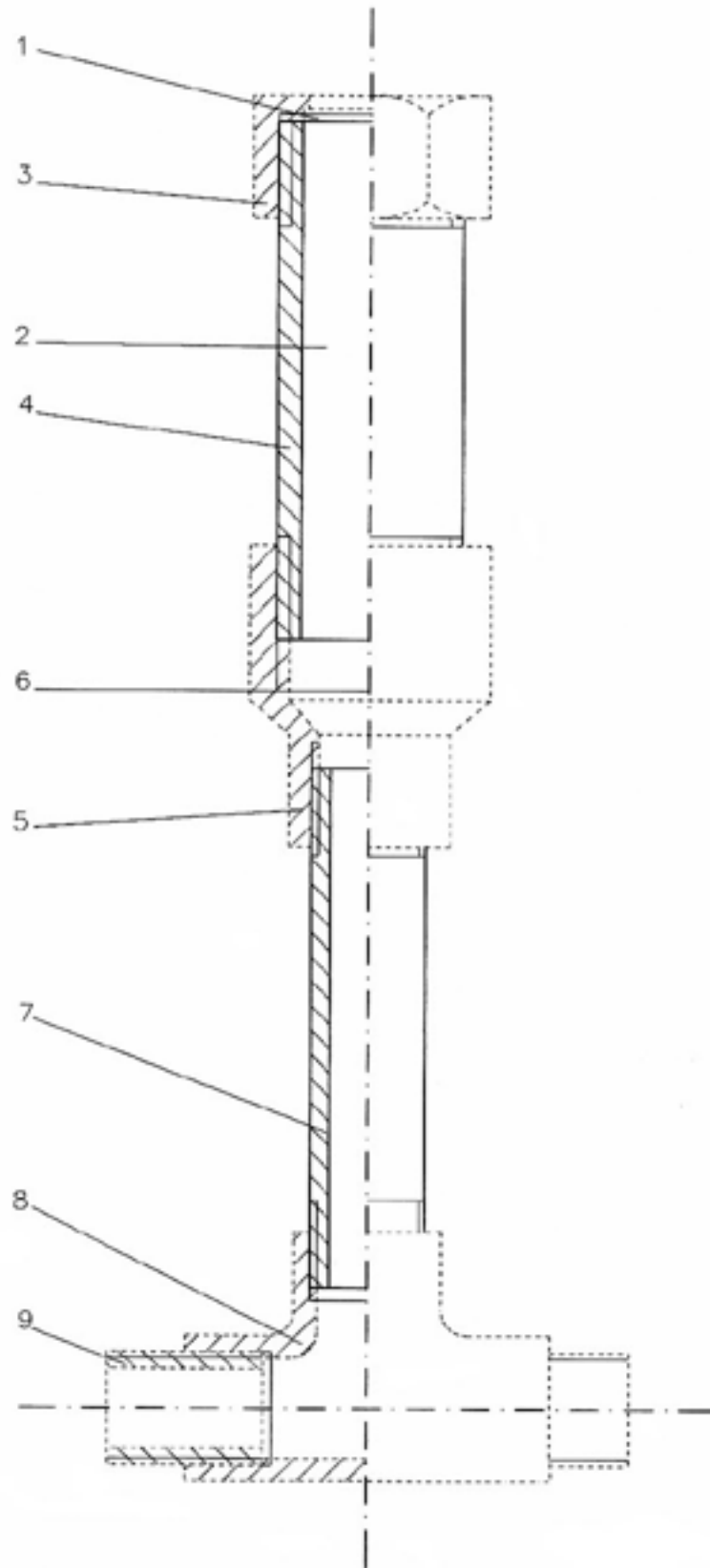
Una vegada seleccionat el material, el disseny s'ha centrat en el dimensionat del reactor de llit empaquet (veure Figura 2.2). En aquest aspecte, la premissa general ha estat obtenir un sistema que ocupés el mínim d'espai, per facilitar la seva instal·lació i utilització.

Els reactors, formats per tubs de 1/2" (1,580 cm) de diàmetre i una longitud total de 6,9 cm, contenien esferes de vidre de 5 mm de diàmetre com a medi de suport estàndard. D'aquesta forma s'obté un mostrejador petit i manejable, que es pot esterilitzar fàcilment a l'autoclau i que es pot situar en espais reduïts i que, alhora, presenta una gran superfície de mostreig (90,321 cm<sup>2</sup> per mostrejador, tenint en compte només el material de suport). La Taula 2.5 (veure 2.3.1) resumeix les principals característiques de disseny, així com els principals paràmetres hidrodinàmics per cada reactor de llit empaquet.



	Denominació	Material	Observacions
1	Malla Grupinox nº 20	AISI 316	Sup. Útil aprox. =68,2 % Llum=1,14 mm Ø filferros = 0,24 mm
2	Material de suport (esferes de vidre)	Vidre	Ø = 5 mm
3	Femella superior roscada	AISI 316	Ø = 1/2"
4	Tub d'acer roscat	AISI 316	Ø = 1/2" L=60 mm
5	Peça reductora	AISI 316	Ø 1/2" a 1/4"
6	Malla Grupinox nº 20	AISI 316	Id. 1
7	Tub d'acer roscat	AISI 316	Ø = 1/4" L=60 mm
8	Te d'acer amb rosca	AISI 316	Ø = 1/4"
9	Connexió rosca exterior	AISI 316	Ø = 1/4" L=38 mm

**Figura 2.2.** Esquema del reactor de mostreig (llit empackat fix) utilitzat al sistema experimental i descripció dels seus components. A la dreta (pàgina següent), esquema detallat del reactor de mostreig (Esc. 2:1).



La Figura 2.3 ens indica com s'han disposat els diferents reactors per formar el sistema experimental complet, mostrant (a la part inferior) detalls de les unions entre cada reactor. El nombre de reactors per sistema experimental pot ser variable, encara que inicialment el sistema dissenyat preveu 5 mostrejadors, un per cada dia "laborable" de la setmana, situats en una o dues línies (part superior, Figura 2.3). És evident, que el nombre de mostrejadors no pot ser molt elevat, de cara a reduir les dimensions del sistema experimental. D'altra banda, l'increment en el nombre de mostrejadors augmenta el cabal necessari per mantenir les mateixes condicions hidrodinàmiques. La unió entre les dues línies de 5 reactors s'ha realitzat gràcies a elements d'acer inoxidable AISI 316, de 1/4". En primer lloc, un element T distribuïa l'aigua d'entrada que circulava a través d'un tub roscat i un colze, fins a cada una de les línies formades per 5 reactors, tal com es veu a la part superior de la Figura 2.3.

Tal com s'especifica a la mateixa Figura 2.3, el sistema experimental s'ha alimentat amb aigua, generalment bombant des del proveïment utilitzat. Els reactors s'han operat en mode ascendent, sortint l'aigua per la seva part superior. D'aquesta forma l'aigua cobria tot el sistema, fet que ajudava a aconseguir una millor regulació de la temperatura. El flux de l'aigua a través del medi porós es mantenia durant un temps predeterminat, després del qual el reactor es treia i es transportava al laboratori per analitzar el contingut de microorganismes adherits al medi porós.

Per facilitar els canvis de mostrejadors o reactors s'han escollit unions del tipus roscades. Alhora, la majoria de les vegades s'ha procurat utilitzar accessoris normalitzats per abaratir el cost. Per mantenir el material de suport utilitzat dins del reactor de llit empaquet s'han utilitzat dues malles d'acer inoxidable AISI 316, tal com es detalla a la Figura 2.2 (elements 1 i 6, malla Grupinox nº 20, Acimetal, Terrassa).

Les connexions entre el proveïment d'aigua i el sistema experimental s'han realitzat utilitzant tuberies que alteressin el mínim les condicions de l'aigua, ja sigui pel lixiviat de nutrients o ions metàl·lics. En general, s'han utilitzat canonades acreditades per a la conducció d'aigua, com la tuberia flexible "Hidrotubo 32" (Espiroflex 13, 14019703) o tuberies de nylon (Neoplast Ultravinil transparent).

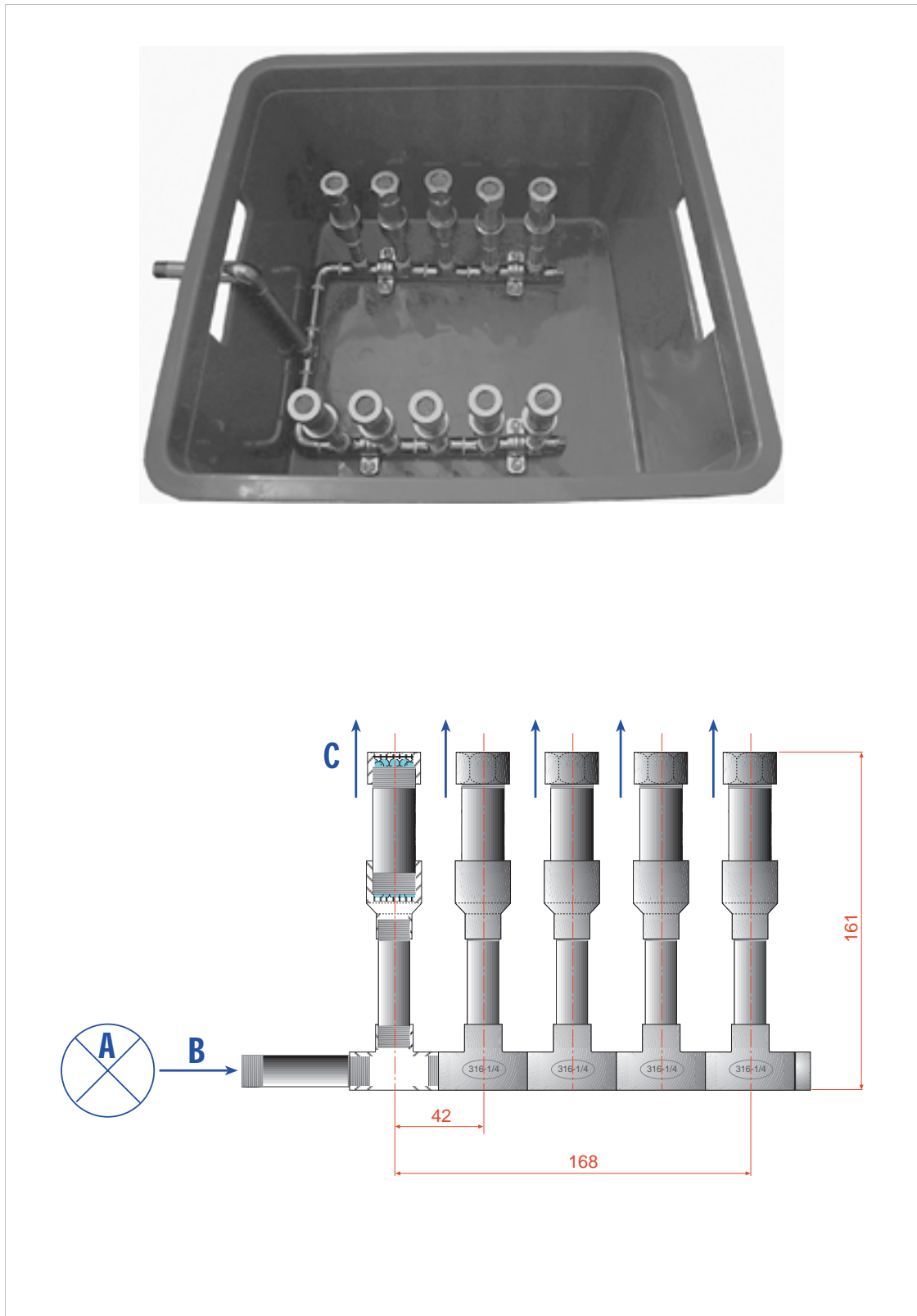
### 2.2.2. Operació i Optimització del sistema experimental

Abans de la seva utilització al sistema experimental, cada reactor ple de medi porós (esferes de vidre), s'ha esterilitzat a l'autoclau, a 1 atm i 125°C durant 35 min. En el cas d'utilitzar materials polimèrics com a suport, s'han esterilitzat netejant-los amb una solució d'hipoclorit sòdic (250 mL/1.000 L) al 12,5% , durant 2 hores.

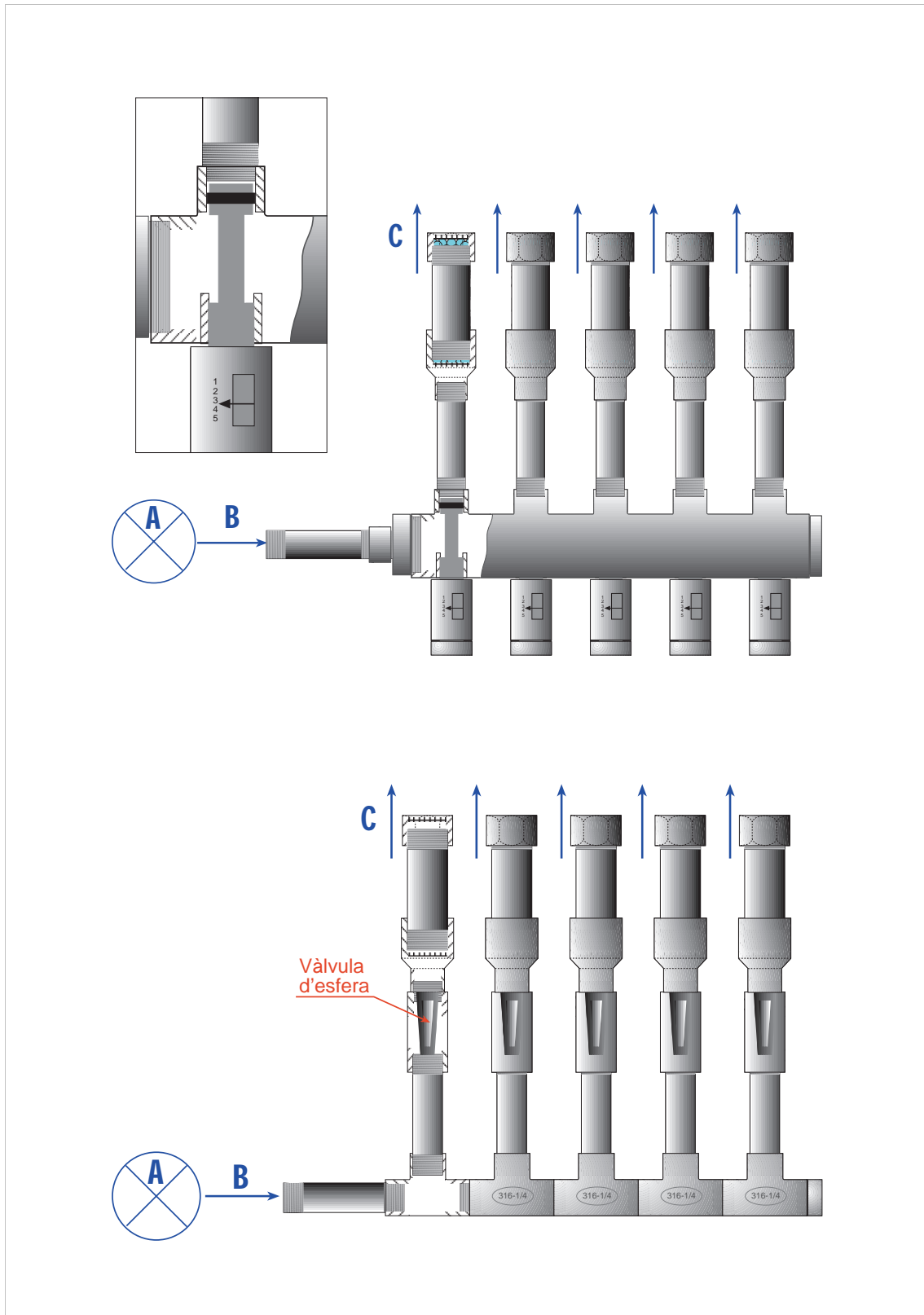
El proveïment d'aigua que ha alimentat el sistema experimental s'ha portat a terme, en alguns casos, amb l'ajuda d'un sistema de bombament. Degut a que la majoria d'experiments s'han realitzat a cabal constant, el principal paràmetre a controlar ha estat el cabal. Per tant, les bombes necessàries són les que presenten menors oscil·lacions brusques de cabal a variacions grans d'alçada manomètrica. S'ha optat segons el cas, entre una bomba submergida o una bomba de superfície, tenint en compte que les bombes de superfície no poden bombar aigua des de qualsevol profunditat, ja que es poden produir problemes de cavitació, o formació de vapor d'aigua al seu interior. Per tant, per escollir una bomba de superfície s'ha de tenir en compte l'energia mínima a l'entrada de la bomba per evitar la cavitació. Les bombes submergides no presenten aquests problemes, encara que el seu preu és força més elevat.

El cabal que circula per la instal·lació s'ha controlat amb una vàlvula d'esfera (vàlvula Tajo 2000, FontGas). Apart, en alguns experiments, s'ha controlat de forma independent el cabal per cada un dels mostrejadors o reactors, amb una vàlvula d'esfera situada just abans de l'entrada del reactor o bé gràcies a col·lectors comercials que incorporen reguladors individuals per a cada reactor (Figura 2.4), com el col·lector Barbi (Barbi-Santiago, Bilbao).





**Figura 2.3.** Unió dels diferents reactors que formen el sistema experimental. A) Bomba centrífuga, B) Entrada d'aigua al sistema, i C) Sortida de l'aigua. Dades en mil·límetres.



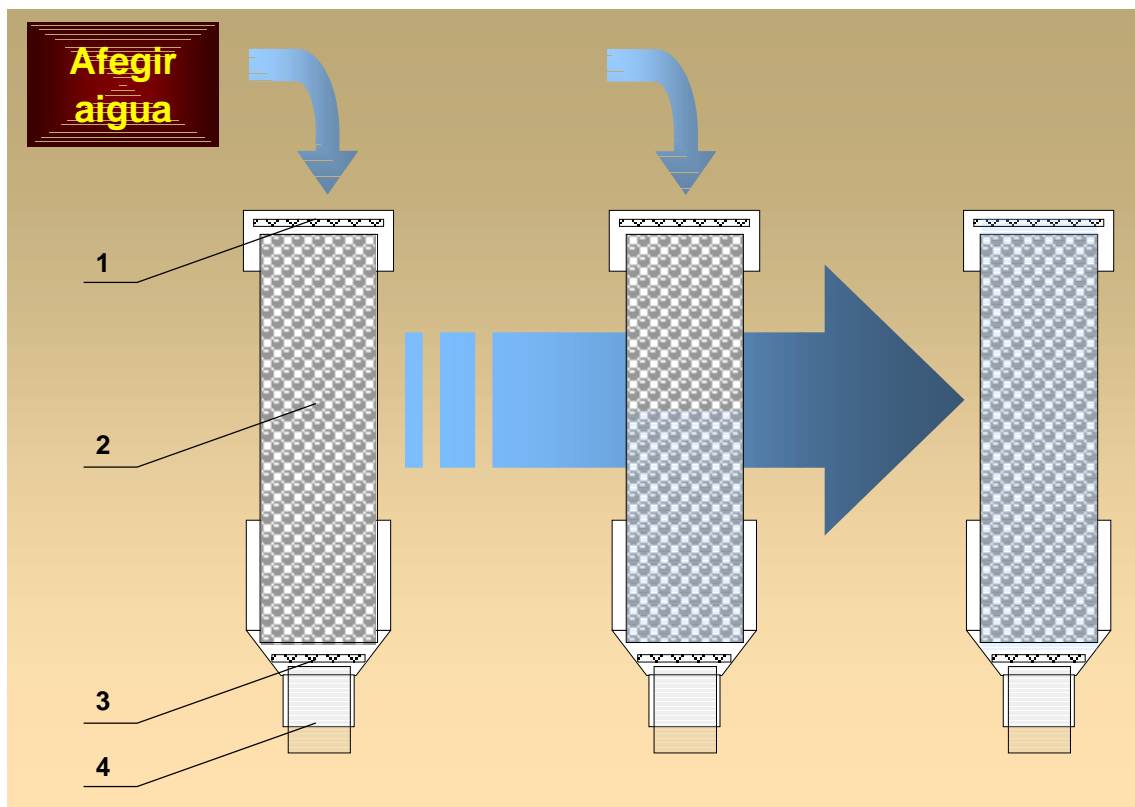
**Figura 2.4.** Components del sistema experimental amb la configuració on es controla el cabal de cada reactor de forma independent. Part superior, utilitzant el col·lector Barbi i, part inferior, amb vàlvules d'esfera a cada reactor.

### 2.2.3. Mesures in situ

Els **paràmetres ambientals** més importants com la temperatura, pH, potencial redox, contingut d'oxigen i conductivitat, s'han mesurat in situ amb una sonda multiparamètrica ECM Multi (Neurtek Medio Ambiente S.A., Zarautz).

D'altra banda, també es van mesurar alguns dels paràmetres que afecten el rendiment dels reactors del sistema experimental. Així, es va mesurar el **cabal** de cada un dels reactors del sistema, abans i després de realitzar cada mostreig. La mesura del cabal es va fer de forma volumètrica.

Igualment, es va mesurar la **porositat** de forma volumètrica a cada reactor de llit empaquetat, abans que aquests fossin colonitzats pel biofilm (Bear 1972). La porositat es pot quantificar coneixent el volum de porus del reactor ( $V_p$ ) i el volum total del reactor ( $V_t$ ), segons ja s'ha vist a l'equació 2.1. Per fer la mesura, es va tancar l'extrem inferior del reactor (peça reductora) amb un tap de rosca de 1/4" (veure Figura 2.5). Després es va afegir aigua destil·lada amb una micropipeta, mesurant la quantitat necessària per enrasar amb la part superior del reactor (exactament a sota de la malla superior).

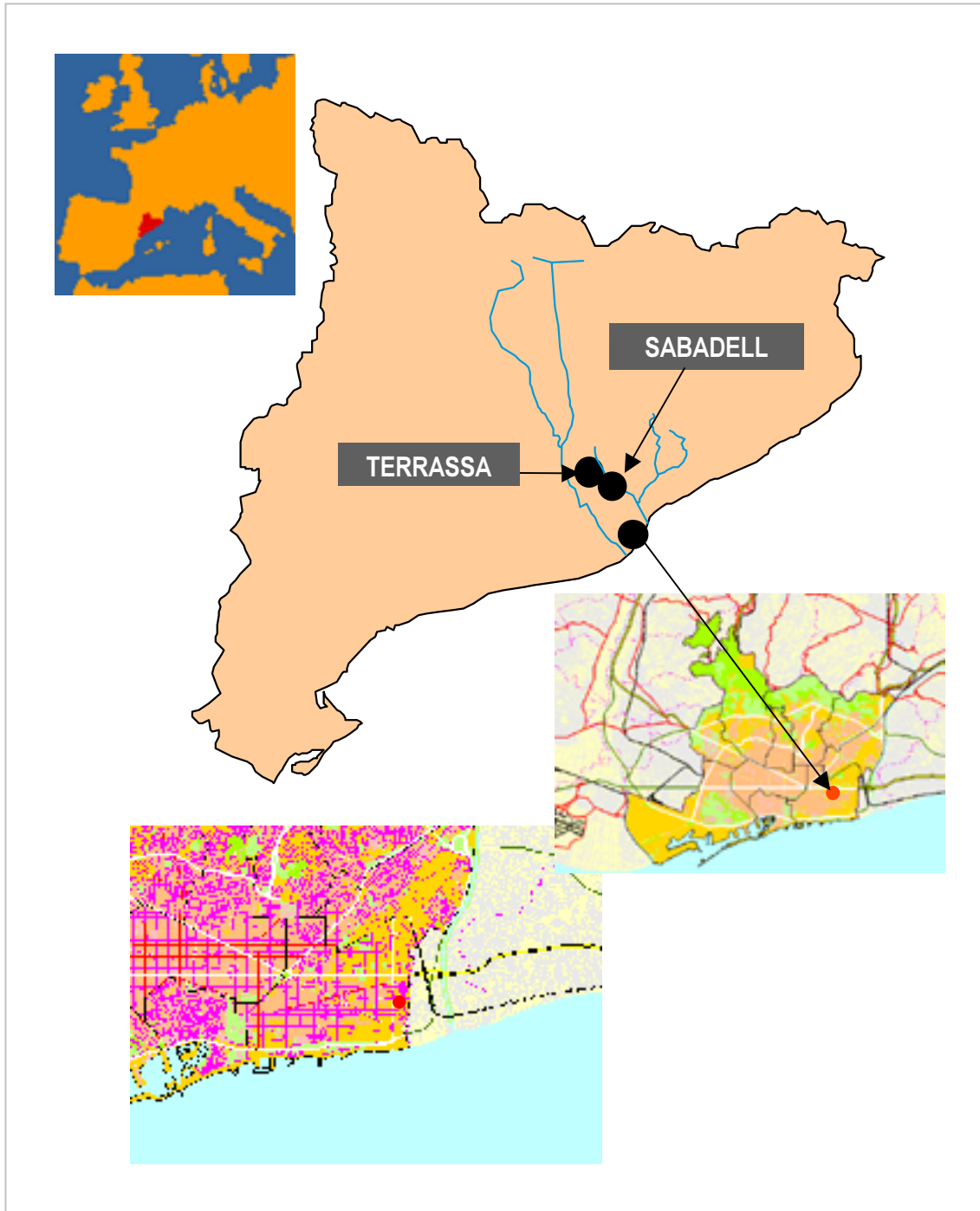


**Figura 2.5.** Muntatge experimental per mesurar volumètricament la porositat dels reactors. 1) Malla superior, 2) Medi porós, 3) Malla inferior i, 4) Tap.

### 2.2.4. Proveïment d'aigua: zones de mostreig

Per poder avaluar el sistema per al desenvolupament de biofilms model en experiments de camp, s'han utilitzat tres estacions experimentals. El mostreigador de biofilms s'ha provat en dues estacions experimentals que aprofiten aigua subterrània i en una tercera, corresponent a una xarxa interna de distribució d'aigua potable. Els reactors es van deixar durant períodes de temps predeterminats, després dels quals es treien del sistema per analitzar-los al laboratori, on es quantificava la formació del biofilm a la superfície de les esferes de vidre (veure 3.2.4).

La primera estació utilitzada per avaluar el desenvolupament dels biofilms al camp ha utilitzat l'aigua d'un pou situat a Barcelona, al carrer d'Alfons el Magnànim, en unes instal·lacions del Ferrocarril Metropolità de Barcelona (FCMB). Aquest pou recull les aigües de drenatge del metro de Barcelona barrejades amb aportacions de l'aqüífer al·luvial de la conca del riu Besòs, localitzat al nord de Barcelona, Catalunya (veure Figura 2.6 i apartat 3.2.1). La construcció d'un dipòsit de reserva i d'una xarxa de distribució per part de l'Institut Municipal de Parcs i Jardins, ha permès la seva reutilització per a la irrigació de parcs i jardins de la Vila Olímpica a Barcelona.



**Figura 2.6.** Localització de les tres estacions experimentals per al treball de camp, marcades amb un punt negre sobre el mapa de Catalunya. Les dues ampliacions mostren la zona de Barcelona (Sant Martí, Besòs).

La segona estació s'ha situat en unes instal·lacions de la Companyia d'Aigües de Sabadell (CASSA) al barri de Can Oriac, al nord de Sabadell (veure Figura 2.6 i 3.2.2). En aquest lloc es troba un dipòsit que acumula les aigües que provenen de la mina de Ribatallada, de la mateixa companyia i d'aproximadament 3 km de longitud. Actualment, aquesta instal·lació només s'utilitza en l'extinció d'incendis i per altres usos no potables, com la irrigació de camins de zones en construcció. No obstant, la urbanització del barri de Can Llong situada ben a la vora i amb una ocupació de 642.700 m<sup>2</sup> podria accelerar la seva reutilització per la important presència de zones enjardinades (4000 m<sup>2</sup>).

La tercera estació utilitzada ha estat la xarxa de distribució interna d'aigua potable del laboratori de Microbiologia de l'Escola Universitària d'Òptica i Optometria de la Universitat Politècnica de Catalunya (veure Figura 2.6 i 3.2.3). Aquesta tercera i última zona de mostreig s'ha escollit per poder comparar les dades obtingudes en xarxes de distribució on no es realitza cap tipus de tractament amb les xarxes d'aigua potable.

### 2.2.5. Calibratge al laboratori: mesura de la pèrdua de càrrega

Per poder determinar les condicions hidràuliques reals dels reactors de llit empaquet es van realitzar una sèrie d'assaigs al laboratori. Amb aquestes proves es va quantificar la pèrdua de càrrega que es produeix al sistema experimental format pels reactors de llit empaquet, determinant les característiques generals de la seva hidrodinàmica. Això s'ha realitzat amb el sistema buit (sense medi porós) format per reactors de 1/2" de diàmetre, així com afegint-hi esferes de vidre de 5 mm de diàmetre com a medi porós. Les dades obtingudes es van comparar amb les dades teòriques.

En el primer assaig de calibratge s'ha mesurat la pèrdua de càrrega que es produeix al sistema utilitzant un captor de pressió Wika (WIKA 909.40.500, Klingenberg, Germany). Per fer-ho, s'ha utilitzat un reactor de llit empaquet fix de les mateixes característiques que els utilitzats en tots els experiments, ple igualment d'esferes de vidre de 5 mm de diàmetre com a medi porós. Amb una clau d'esfera s'ha variat el cabal que circula pel sistema, graduant l'entrada d'aigua. Gràcies al captor de pressió situat perpendicularment a l'entrada del reactor amb un element-T d'acer inoxidable (veure Figura 2.7), s'ha mesurat la variació de pressió produïda al variar els cabals d'entrada (de 0 a 800 L/h). La pressió mesurada amb el captor Wika ens permet determinar la pèrdua de càrrega del mostrejador o reactor ( $\Delta h_{E-S}$ ), a partir de l'equació de pèrdua de l'energia o equació de Bernoulli. Partint d'aquesta equació s'arriba a l'expressió que ens descriu la pèrdua de càrrega del nostre sistema:

$$\left( \frac{p_1}{\rho_1 \cdot g} + \frac{v_1^2}{2 \cdot g} + z_1 \right) = \left( \frac{p_2}{\rho_2 \cdot g} + \frac{v_2^2}{2 \cdot g} + z_2 \right) + h_f \quad (2.32)$$

on  $z_1$  és la cota o alçada de la tuberia d'entrada del sistema,  $z_2$  és l'alçada de la tuberia de sortida del sistema,  $p_1$  i  $p_2$  representen la pressió manomètrica a l'entrada i a la sortida del reactor respectivament,  $v_1$  i  $v_2$  representen la velocitat en cada un d'aquests punts respectius i, finalment,  $h_f$  és la pèrdua de càrrega. Tenint en compte que s'ha disposat el reactor en posició horitzontal (veure Figura 2.7),  $z_1$  és igual a  $z_2$ , per la qual cosa les dues cotes s'anul·len. D'altra banda, en els casos on el sistema no està cobert per aigua no es té en compte la pressió manomètrica a la sortida, perquè s'agafa com a valor zero de referència la pressió atmosfèrica local. Finalment, l'equació de Bernoulli es converteix pel nostre sistema en:

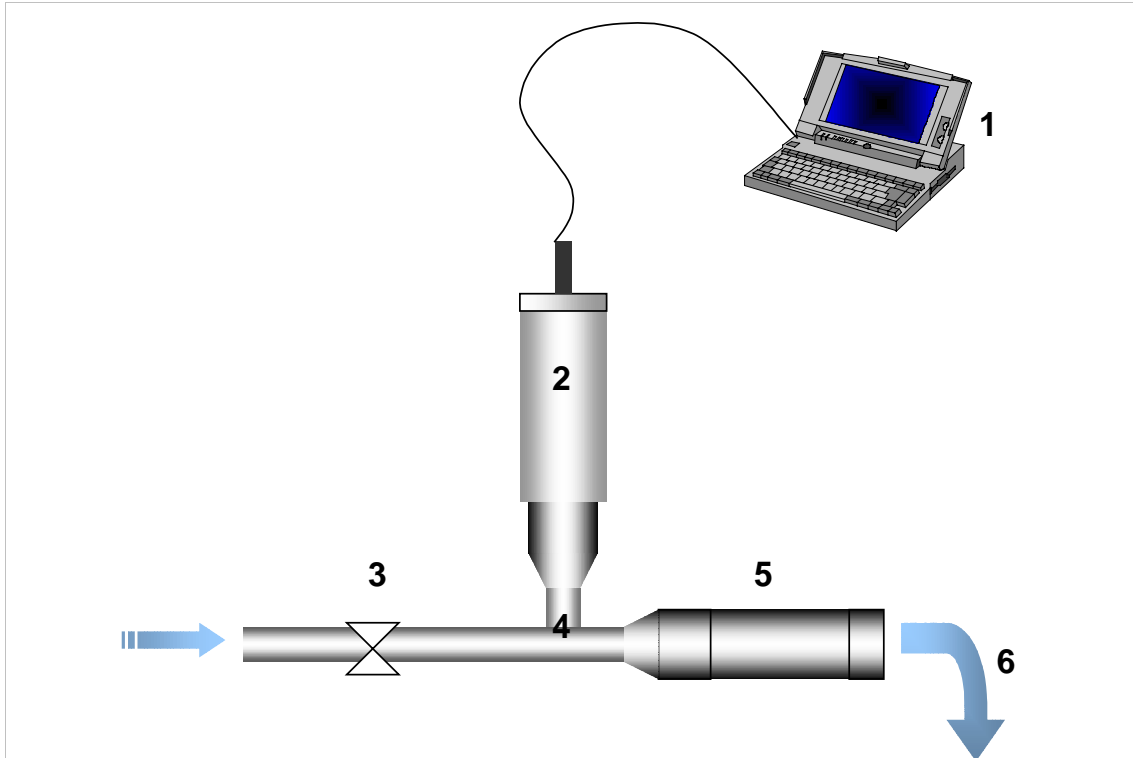
$$\Delta h_{E-S} = \frac{P_c}{\rho \cdot g} + \frac{v_1^2 - v_2^2}{2 \cdot g} \quad (2.33)$$

on  $P_c$  és la pressió mesurada amb el captor Wika,  $v_1$  és la velocitat de l'aigua a l'entrada i  $v_2$  la velocitat a la sortida.

Per calcular la pèrdua de càrrega es determina volumètricament el cabal, mesurant en una proveta mil·limetrada un volum determinat durant un temps controlat, i es calcula la velocitat del fluid a l'entrada ( $v_1$ ) i a la sortida ( $v_2$ ), de la forma següent:

$$v_1 = \frac{Q}{A_{cs1}} = \frac{Q}{\pi \cdot r_1^2}$$

$$v_2 = \frac{Q}{A_{cs2}} = \frac{Q}{\pi \cdot r_2^2}$$
(2.34)



**Figura 2.7.** Mesura de la pèrdua de càrrega gràcies a un captor de pressió Wika. 1) Lector de les dades, 2) Captor de pressió, 3) Clau de pas d'entrada de l'aigua, 4) T-adaptadora, 5) Reactor de llit empaquetat i 6) Sortida de l'aigua.

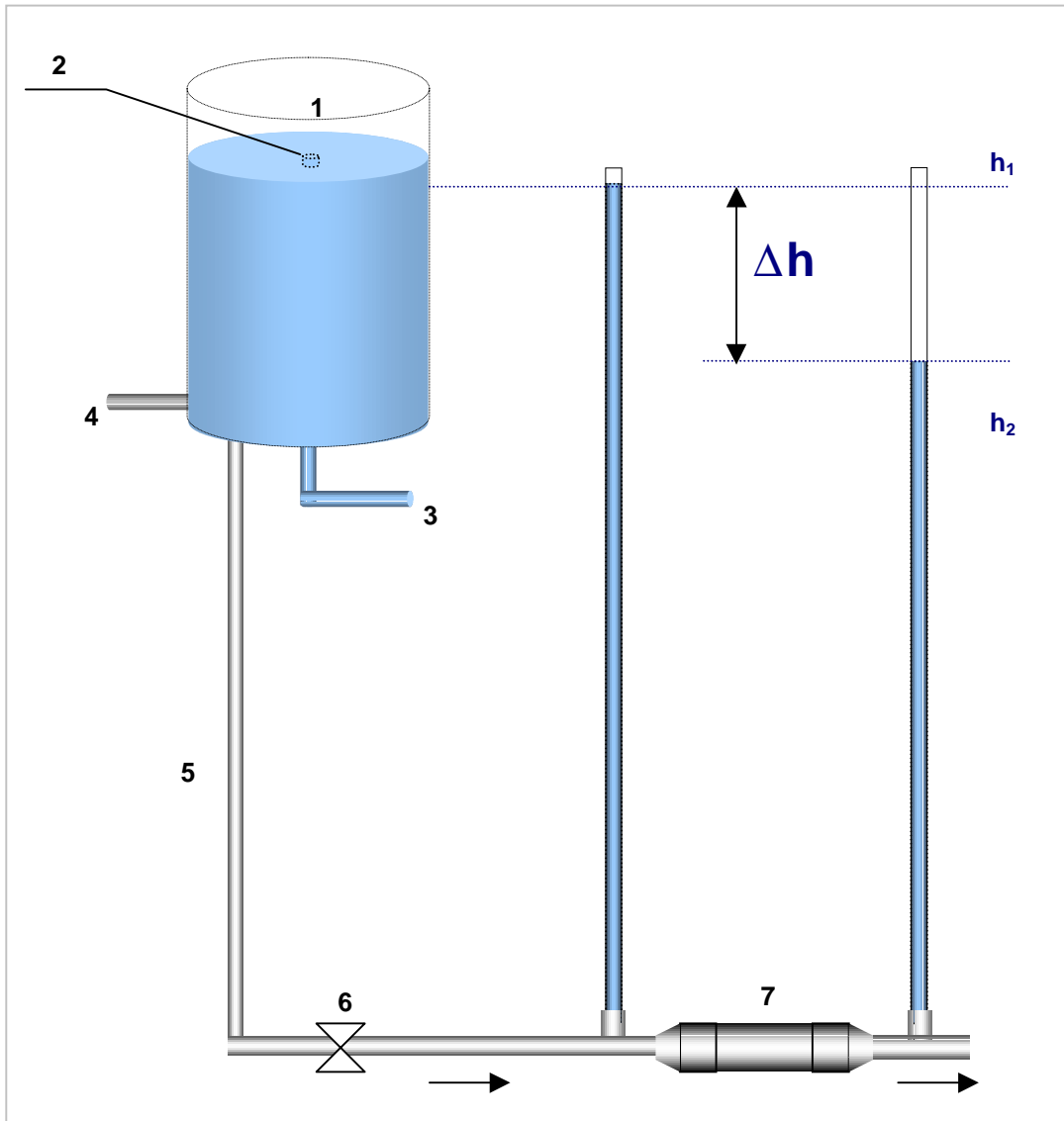
En un segon assaig de calibratge s'ha mesurat la pèrdua de càrrega amb l'ajuda del sistema representat a la Figura 2.8, partint també de l'equació de pèrdua de l'energia. Després de realitzar les mateixes simplificacions, tenint en compte que el reactor també s'ha disposat en posició horitzontal, l'expressió es converteix per aquest sistema, en:

$$\Delta h_{E-S} = h_1 - h_2 + \frac{v_1^2 - v_2^2}{2 \cdot g}$$
(2.35)

on  $h_1$  és la pèrdua de càrrega expressada en metres (m o mca) produïda a l'entrada del reactor i  $h_2$  és la pèrdua de càrrega a la sortida del reactor. Després de mesurar el cabal volumètricament, agafant en una proveta mil·limetrada un volum determinat durant un temps controlat, s'ha calculat  $v_1$  i  $v_2$  a partir de l'equació 2.34. D'aquesta manera, l'assaig s'ha realitzat de la forma que es detalla:

- ❑ S'obre l'entrada d'aigua al dipòsit i es tanquen totes les sortides, excepte una que anomenarem sobreeixidor. La missió del sobreeixidor és la d'expulsar del dipòsit tota l'aigua que entri de més al sistema, per poder tenir-hi un nivell constant.
- ❑ Es posa el reactor a una certa alçada per sota del nivell del dipòsit. Es deixa la vàlvula d'entrada (vàlvula de comporta) oberta al màxim, deixant un temps fins que s'hagi purgat tot el sistema.
- ❑ Es mesura el cabal de la forma indicada, amb la proveta i el cronòmetre.

- ❑ Es mesura la diferència d'alçada en metres entre  $h_1$  i  $h_2$ , que correspondrà a la pèrdua de càrrega entre l'entrada i la sortida, en metres de columna d'aigua (m).
- ❑ Es tanca la vàlvula d'entrada 1/4 de volta i es repeteix el pas anterior, i una altra vegada es torna a tancar la vàlvula d'entrada 1/4 de volta.
- ❑ Es fa el mateix, tancant cada vegada 1/4 de volta la vàlvula d'entrada.



**Figura 2.8.** Determinació de la pèrdua de càrrega dels reactors. 1) Dipòsit d'aigua, 2) Sobreixidor, 3) Tuberia de desguàs, 4) Entrada d'aigua, 5) Sortida d'aigua del dipòsit, 6) Vàlvula de comporta, 7) Reactor de llit empacat.

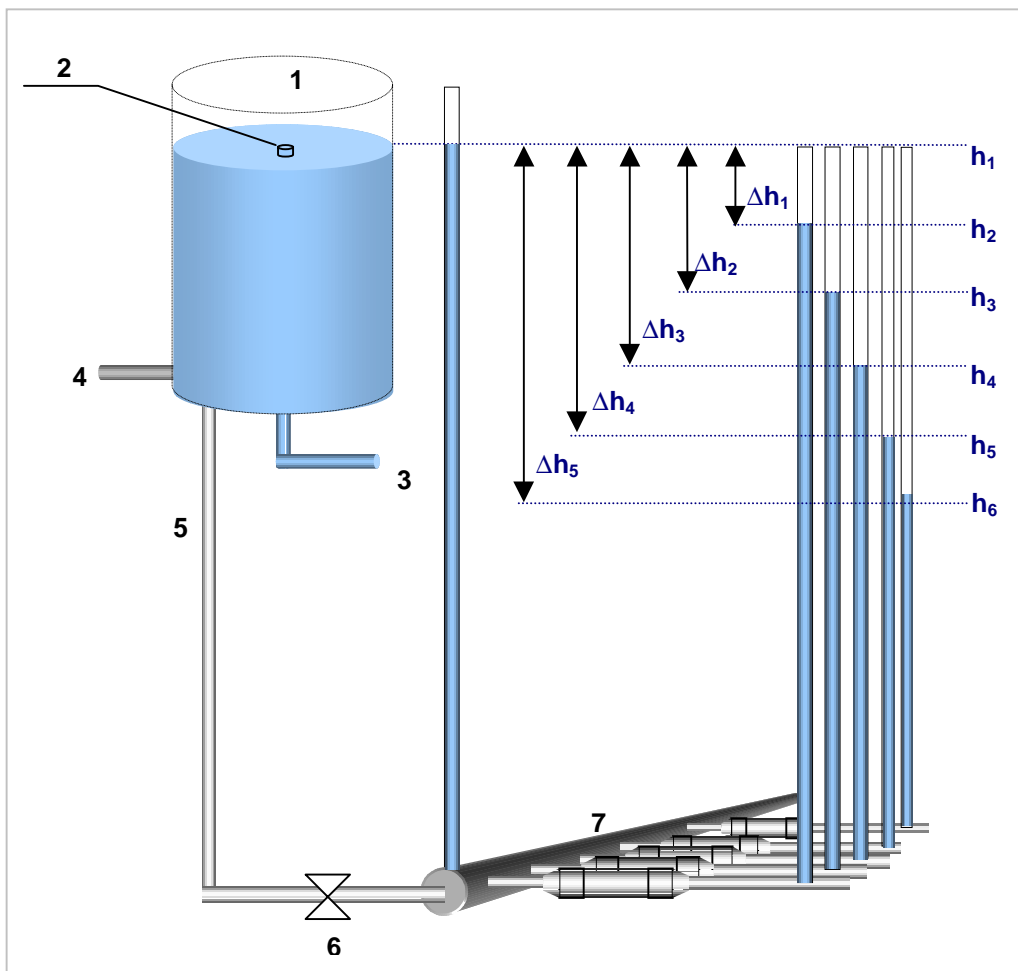
Una vegada caracteritzat amb aquest sistema el comportament hidrodinàmic d'un sol reactor de llit empacat, s'ha determinat la influència de connectar diferents reactors en paral·lel. Per això, s'ha utilitzat el mateix muntatge però afegint el sistema experimental format per 5 reactors de llit empacat (veure Figura 2.9). Per aquest sistema, tenint en compte que el reactor s'ha disposat en posició horitzontal, l'expressió es converteix en:

$$\Delta h_1 = (h_1 - h_2) + \frac{v_1^2 - v_2^2}{2 \cdot g} \quad (2.36)$$

Després d'obrir l'entrada d'aigua al dipòsit de la mateixa manera que s'ha explicat anteriorment, s'han disposat tots els reactors a una mateixa alçada per sota del nivell del dipòsit. Amb la vàlvula d'entrada oberta al màxim s'ha mesurat el cabal que surt pel primer reactor, al mateix temps que l'alçada en metres entre  $h_1$  i  $h_2$ , valor que correspondrà a la pèrdua de càrrega entre l'entrada i la sortida del primer reactor, en metres (m).

En segon lloc, i procedint de la mateixa forma s'ha mesurat el cabal que surt pel segon reactor i l'alçada entre  $h_2$  i  $h_3$ , valor que correspondrà a la pèrdua de càrrega entre el primer i el segon reactor, en metres (m). S'ha fet el mateix per a cada un dels reactors del sistema, mesurant cada vegada el cabal de sortida de cada reactor i la pèrdua de càrrega corresponent. Posteriorment, després de tancar la vàlvula d'entrada 1/4 de volta s'han repetit cada un dels passos anteriors. El procediment sencer s'ha repetit tancant cada vegada 1/4 de volta la vàlvula d'esfera.

A partir de les dades obtingudes en aquests experiments de calibratge s'han realitzat les gràfiques que ens relacionen el cabal amb la pèrdua de càrrega. Els valors mesurats s'han comparat a la mateixa gràfica amb els estimats a partir de les equacions descrites anteriorment (veure 2.1.1). En cada cas, s'ha determinat una funció que ens doni el valor de la pèrdua de càrrega en funció del cabal, ajustant les dades a una aproximació quadràtica amb suport informàtic (Kaleidagraph, v. 3.0.1, 1994, Abelbeck Software).



**Figura 2.9.** Determinació de la pèrdua de càrrega connectant 5 reactors en paral·lel. 1) Dipòsit d'aigua, 2) Sobreixidor, 3) Tuberia de desguàs, 4) Entrada d'aigua, 5) Sortida d'aigua del dipòsit, 6) Vàlvula de comporta, 7) Reactors de llit empaquetat.



### 2.2.6. Efecte del material de suport en el desenvolupament del biofilm

Després d'haver-se decantat per la configuració de reactor de llit empaquetat fix amb medi porós com a suport de colonització, per tal d'obtenir el màxim de superfície de mostreig en el mínim espai possible, s'havia d'escollir el tipus de material que formaria part dels reactors com a medi porós. Tenint en compte els experiments previs del Grup Europeu d'Estudi de les Biomasses Adherides (Levy 1997), ens vam decidir per utilitzar esferes de vidre de 5 mm de diàmetre. Les característiques d'aquest material no afavoreixen el creixement dels microorganismes, especialment si ho comparem amb materials molt més idonis en aquest sentit, com el PVC (Petzoldt 1993, Keevil et al. 1995). No obstant, es tracta d'un material molt assequible i econòmic, molt adequat com a suport per poder comparar el desenvolupament dels biofilms formats. D'altra banda, el vidre ha estat un dels materials més utilitzats per estudiar l'adherència microbiana a superfícies (Costerton et al. 1995), i un dels que es tenen més dades bibliogràfiques.

S'ha realitzat un experiment per calibrar el sistema experimental i comprovar l'efecte del material de suport sobre el creixement dels biofilms, comparant la capacitat de diferents materials de suport per afavorir el desenvolupament de biofilms. L'estudi s'ha centrat en avaluar l'impacte dels materials en el desenvolupament del biofilm. Els materials test s'han utilitzat com a medi porós dins dels reactors de llit empaquetat fix de la mateixa forma que les esferes de vidre, determinant la influència que la selecció dels materials presenta en la colonització i el creixement bacterià.

A més del vidre, utilitzat com a material de suport estàndard per a la realització dels experiments de colonització microbiana, s'han escollit materials de suport metàl·lics en forma d'esferes de 5 mm de diàmetre d'aliatge d'acer al crom (AISI 52100-ASTM A 295, NSK, FEYC, S.A., Barcelona) i acer inoxidable austenític (AISI 316, FEYC, S.A., Barcelona).

Els aliatges de ferro-carboni es classifiquen en *acers* quan es tracta d'un aliatge forjable amb un contingut de carboni comprès entre el 0,1 i el 1,76%, mentre que s'anomena *fundició* als aliatges no forjables que presenten del 2,5 al 4% de carboni (Mayol 1997a). Els *acers al carboni* estan constituïts fonamentalment per ferro i carboni, mentre que els *acers aleats* contenen altres elements d'aliatge en quantitats significatives, com el crom, níquel, cadmi, molibdè o altres. De fet, els **tubs d'acer** s'han utilitzat des de fa molts anys per a la conducció de líquids, com en canonades de desguàs de fundició grisa (DIN1172) o tuberies d'acer dolç al carboni ("mild steel") en línies de conducció d'aigua i altres aplicacions industrials, malgrat que avui en dia la seva gran utilitat es centra en aplicacions on es requereixen tuberies de pressió. Tanmateix, canonades d'acer desenvolupades inicialment per aplicacions industrials com el transport de gas i petroli, s'estan aplicant amb èxit per a la conducció d'aigua, especialment en línies de distribució d'aigua potable de seguretat (Europipe, Sollac, Dunkerque). En aquest cas, les bones propietats dels acers es milloren amb un revestiment intern de morter de ciment, que compleix amb les normes alimentàries i garanteix la potabilitat de l'aigua i alhora, amb un revestiment extern de polietilè que protegeix l'acer dels impactes, l'envelliment i l'agressió del sòl.

Els **tubs d'acer inoxidable** estan fabricats amb aliatges basades en el ferro que presenten una gran resistència a la corrosió, degut a la formació d'una capa superficial d'òxid de crom molt fina. Encara que el crom - present com a mínim en un 10,5% - configura la gran resistència a la corrosió dels acers inoxidables, la presència d'altres elements en modifica de forma substancial les seves característiques físico-químiques. Així, la presència de níquel millora encara més la resistència a la corrosió, augmentant l'estabilitat de la capa d'òxid superficial. L'acer inoxidable AISI 316 (Fe/Cr18/Ni10/Mo3) amb un baix contingut en carboni (0,08 max, densitat = 7,96 g cm<sup>-3</sup>) pertany a la família dels acers austenítics (Goodfellow 1996), els més resistents a la corrosió atmosfèrica i a certs àcids. Són els que presenten millors característiques mecàniques a temperatures elevades, i per això s'utilitzen especialment com a elements de forns, calderes, torres de refrigeració, intercanviadors i, en general, tot tipus d'instal·lacions industrials.

A part de les **canonades de fibrociment** per sanejament i pressió (UNE-41080, UNE-88203), actualment les tuberies plàstiques o de resines s'han introduït definitivament en la distribució d'aigua potable, ocupant la part més important del sector. Tuberies fabricades amb resines de diferents famílies s'han intentat aplicar per a la conducció d'aigües residuals, aigües potables i productes químics industrials, amb més o menys èxit.

Cal citar el **PVC** (clorur de polivinil) utilitzat àmpliament en la distribució d'aigua potable en les seves diferents variants, especialment el PVC rígid per conduccions d'evacuació d'aigua potable i aigües residuals (UNE-53114), canonades de sanejament per col·lectors i xarxes de clavegueram (UNE-53332), xarxes de drenatge i sistemes de canonades al sòl, col·lectors d'aigües pluvials i conductes d'aire i gas (Mayol 1997a).

També s'utilitza àmpliament el **PE** (polietilè), en les seves dues variants de polietilè de baixa densitat o LDPE (UNE-53142) i polietilè d'alta densitat o HDPE (UNE-53133), en canonades d'aigua potable, aigües brutes i aplicacions industrials i irrigació. El polietilè reticular **PE-R** (UNE-53381) permet temperatures d'utilització en règim permanent de 100-110°C, per la qual cosa s'utilitza per a la circulació d'aigua calenta, en calefaccions (terra radiant) i aigua sanitària (Mayol 1997a).

D'altra banda, les canonades de polièster reforçades amb fibra de vidre o **PRFV** (UNE-53323), s'utilitzen especialment per a usos industrials i tuberies a pressió de gran diàmetre.

Finalment, caldria citar el **PP** (polipropilè) en presència de temperatures elevades, en instal·lacions a pressió d'aigua freda, calenta, hidrosanitària, calefacció i d'aire condicionat refrigerat per aigua i en baixants per instal·lacions de sanejament.

Degut a la importància de les canonades plàstiques s'han escollit esferes de 6 mm de diàmetre d'**ABS** (ABS-STAREX, densitat = 1,05 g cm<sup>-3</sup>, Unasa, Barcelona), com a control positiu de colonització microbiana, per comparar amb l'efecte produït en els altres materials. Aquesta resina de la família dels estirens és un copolímer d'acrilonitril, butadiè i estirè, que pel seu bon aspecte superficial s'utilitza en camps ben diversos com l'elèctric, la indústria de l'automòbil i la indústria en general, per exemple en la construcció d'aixetes i en el sector hidrosanitari.

Les mostres de cada material s'han empaquetat dins dels tubs d'acer inoxidable dels reactors i s'han esterilitzat de la forma adient en cada cas. Els materials metàl·lics i el vidre s'han esterilitzat amb l'autoclau de la forma habitual, mentre que els materials plàstics s'han esterilitzat amb una solució d'hipoclorit sòdic (250 mL/1.000 L) al 12,5% durant 2 hores. Els reactors de medi porós (10 reactors amb materials diferents) es van exposar a l'aigua freàtica de forma simultània, mantenint un flux constant així com les mateixes condicions ambientals per als reactors al llarg de tot l'experiment, com la temperatura, cabal, velocitat de l'aigua o el carboni orgànic biodegradable. Els reactors plens amb esferes de vidre, ABS, acer o acer-inox en funció de cada cas es van deixar 14 i 37 dies en contacte amb l'aigua subterrània – a cabal constant –, de l'estació experimental de CASSA a Sabadell. Finalment, es va realitzar el recompte de viables dels biofilms desenvolupats, de la forma habitual (veure 3.2.4).

#### 2.2.7. Processat de les mostres: rentat i sonicació

Les mostres per analitzar el biofilm requerien un processat al laboratori per separar els microorganismes adherits al material de suport (veure Figura 2.10, i PNT-1 a l'annex). El primer pas en el processat de les mostres al laboratori ha estat sempre el rentat dels reactors de llit empaquetat fix, per separar els microorganismes planctònics que no estaven adherits de forma irreversible a la superfície del material de suport.

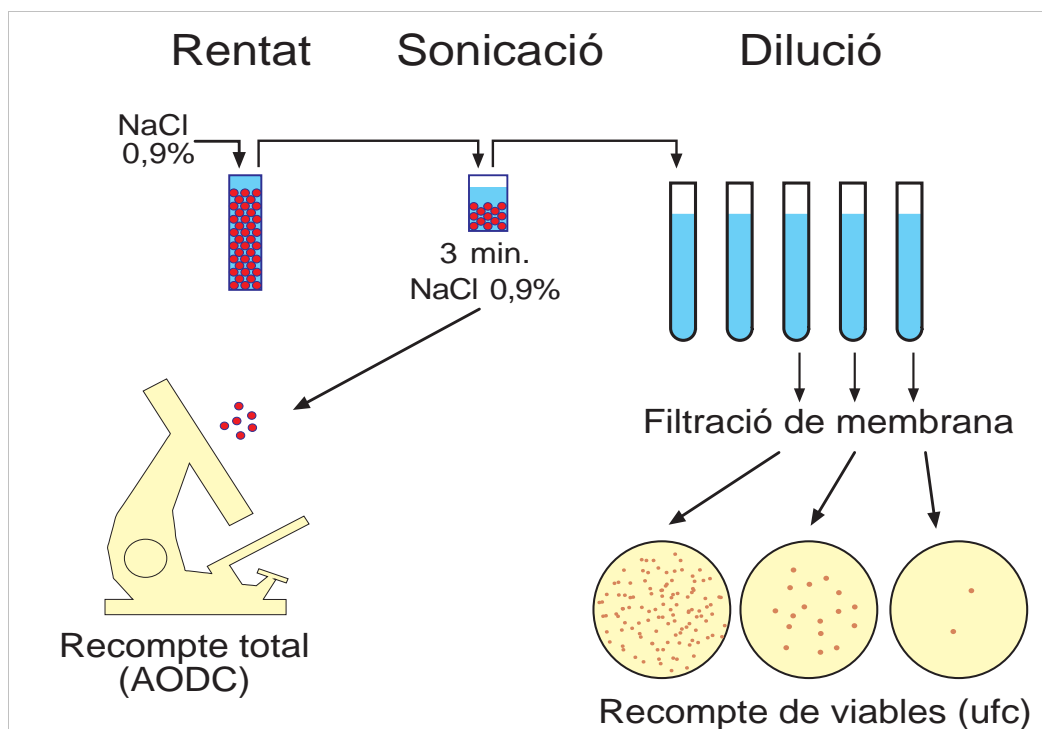
S'ha estudiat la idoneïtat de tres tipus diferents de rentats: A, B i C (veure Figura 2.11). Després d'instal·lar 10 reactors, s'ha comparat els rentats A i B en 5 experiments independents analitzant els reactors per parelles (rentat A i B), després de 2, 4 i 15 dies de contacte amb l'aigua subterrània –a cabal constant– del pou de l'estació experimental de Sant Martí. Tots els reactors han estat sotmesos a les mateixes condicions ambientals durant tot l'experiment, com la temperatura, cabal, velocitat de l'aigua o el carboni orgànic biodegradable.

Posteriorment, s'ha realitzat el recompte de viables dels biofilms desenvolupats de la forma habitual (veure 3.2.4). El mateix experiment s'ha repetit de la mateixa forma explicada abans amb 10 reactors més, comparant aquesta vegada el rentat B amb el C. Les característiques generals dels tres rentats analitzats es resumeixen a la Figura 2.11:

- ❑ *Rentat A*, abocant 200 mL de solució salina estèril (0,9% NaCl) al reactor de llit empaquetat.
- ❑ *Rentat B*, on després de fer-se el rentat A, les esferes de vidre es transferien dins d'un recipient de plàstic estèril, ple amb 15 mL de s.s. estèril (0,9% NaCl), i després s'abocava tot el contingut dins d'una xeringa de 10 mL buida. Les esferes contingudes dins de la xeringa es rentaven amb 100 mL més de s.s. estèril (0,9% NaCl) i es posaven dins d'un altre recipient ple amb 15 mL de s.s. a la mateixa concentració.
- ❑ *Rentat C*, on a diferència dels anteriors, les esferes de vidre es transferien directament dins d'un recipient de plàstic ple amb 15 mL de s.s. estèril (0,9% NaCl). Posteriorment, es realitzaven tres rentats consecutius amb una micropipeta, traient els 15 mL de s.s., afegint-ne 15 més cada vegada i realitzant una lleugera agitació per rotació, sense donar la volta al recipient.

També s'ha analitzat la quantitat de microorganismes presents als lixiviat resultants de la realització de cada un dels rentats. Les aigües de rentat s'han recollit en ampolles Schott estèrils i s'han filtrat segons la metodologia habitual (veure 3.2.4) per determinar-ne el nombre de microorganismes.

Una vegada s'ha realitzat el rentat les mostres es sotmeten a un bany d'ultrasons (Selecta 3000513, 150 w, 1-50 Hz), per separar els microorganismes del material de suport, analitzant-se el líquid resultant de la forma habitual. Seguint els treballs del Grup Europeu d'Estudi de les Biomasses Adherides (Levy 1997, Piriou 1997), s'ha realitzat una única sonicació de les mostres, durant 3 minuts. Altres factors importants a tenir en compte (veure Taula 2.4) són la posició del recipient dins del sonicador sense tocar el fons i el nivell de l'aigua del sonicador, 1 cm per sobre respecte al nivell intern del recipient amb les esferes. Després de la sonicació la mostra s'agita al vòrtex (Heidolph Reax 2000) a la màxima velocitat durant 30 segons i, finalment, de forma manual unes 30 vegades per assegurar la seva homogeneïtzació.



**Figura 2.10.** Processament previ i anàlisi de les mostres de biofilm.

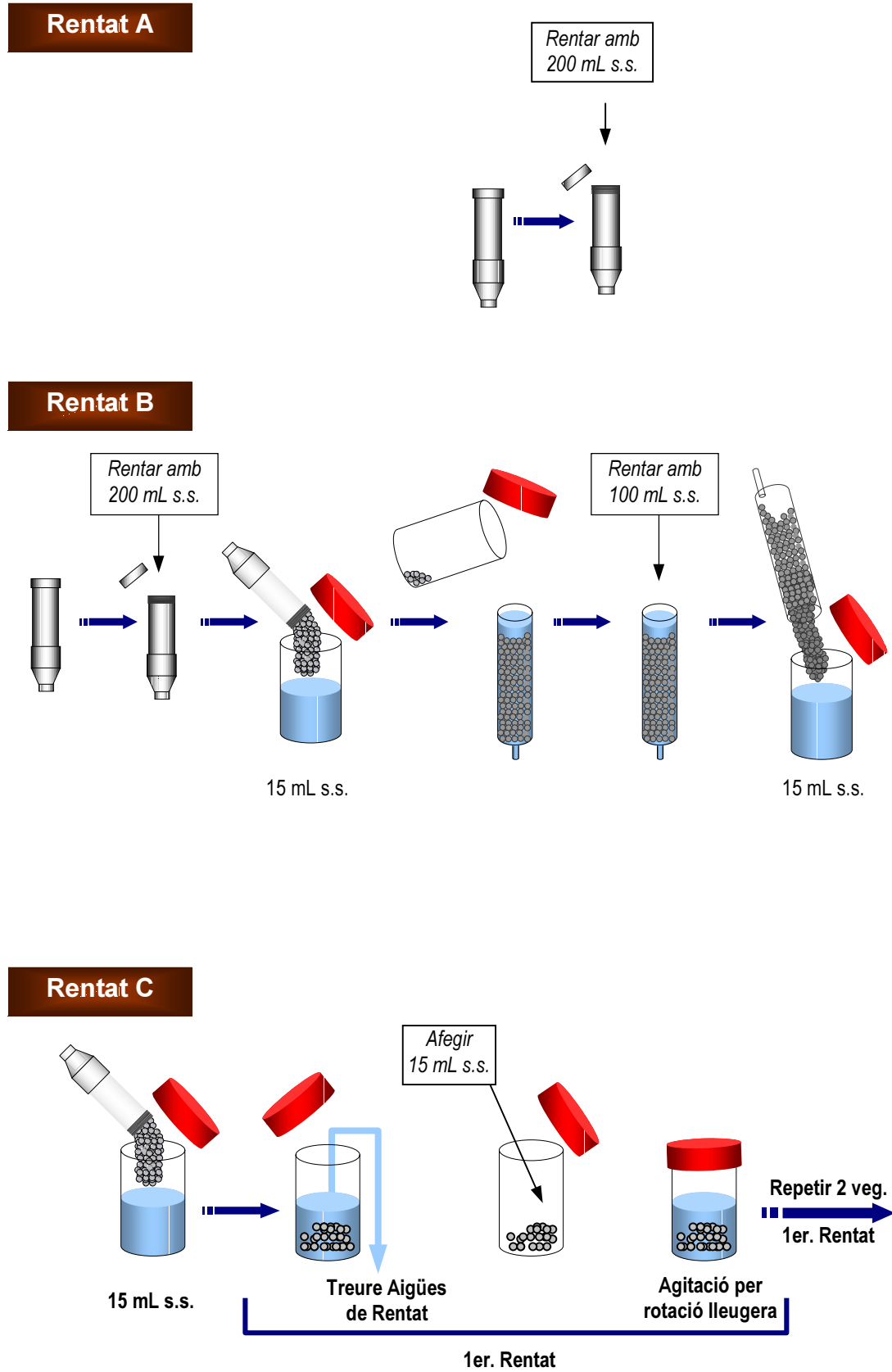


Figura 2.11. Tipus de rentats de les mostres per separar els microorganismes planctònics no adherits de forma irreversible.

**Taula 2.4.** Principals recomanacions del Grup Europeu d'Estudi de les Biomasses Adherides, respecte a la sonicació de biofilms adherits en esferes de vidre.

<i>PROTOCOL SONICACIÓ</i>	
<i>Temps de sonicació</i>	1 sonicació de 3 min.
<i>Bany d'ultrasons</i>	Proporció constant (10-15) entre potencia (W) i volum del bany (L).
<i>Nivell de l'aigua dins el bany</i>	Treballar amb un nivell mínim dins del bany d'ultrasons (5-6 cm.).
<i>Situació del recipient</i>	No reposar sobre el fons. Deixar reposar sobre peça de vidre.
	Ha d'existir un volum mínim a partir del fons del bany d'ultrasons
	El nivell del bany d'ultrasons ha de superar en 1 cm el nivell intern del recipient
<i>Material del recipient</i>	Preferible en vidre, degut a la millor transmissió de les ones d'ultrasons.
<i>Esquema</i>	

### 2.2.8. Avaluació de la reproductibilitat de la formació de biofilms

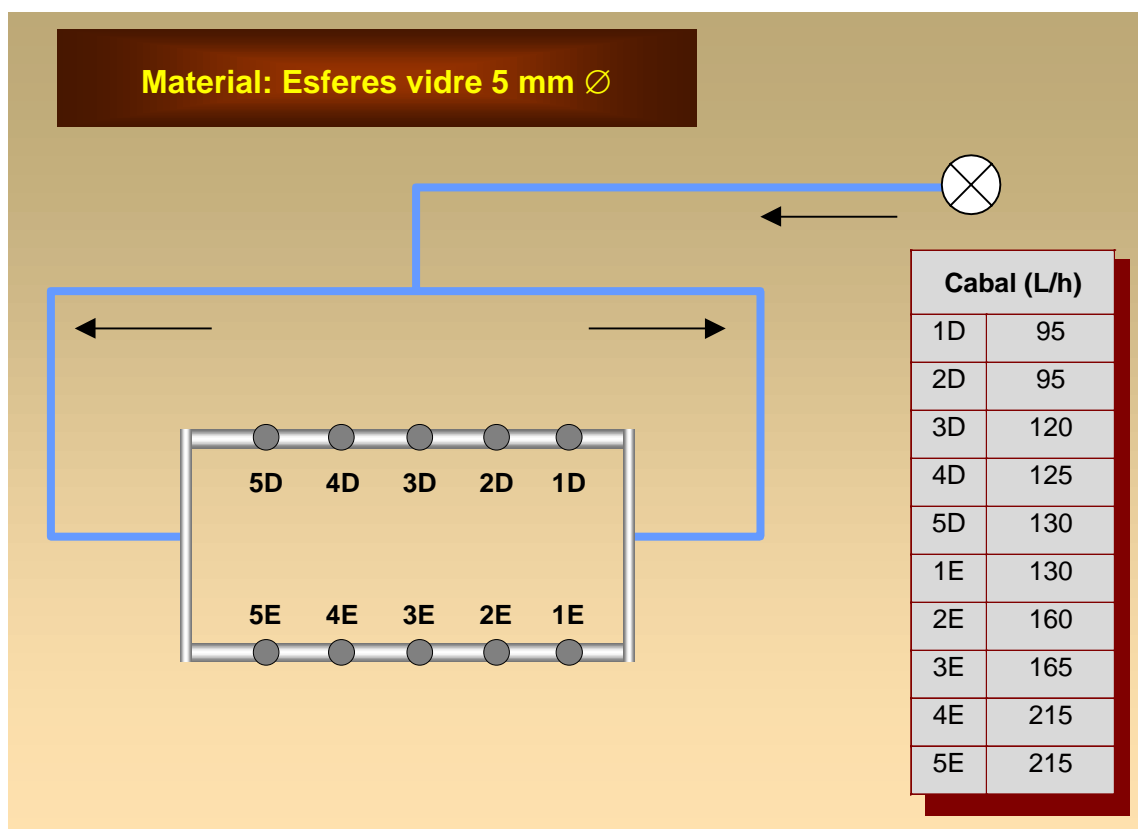
S'ha intentat assegurar al màxim la reproductibilitat dels diferents experiments realitzats, procurant que el desenvolupament i la recuperació dels biofilms es produís sempre sota les mateixes condicions. Tot i això, és inevitable que es produeixin certes variacions, atribuïbles sobretot a canvis en les condicions ambientals de l'aigua al llarg de l'any i, en menor mesura, a oscil·lacions mínimes de cabal entre els mostrejadors.

Els efectes acumulatius dels diferents errors s'han mesurat comparant, en primer lloc, la recuperació de bacteris de reactors exposats de forma simultània al contacte amb l'aigua subterrània, durant el mateix període de temps i en les mateixes condicions ambientals. Per això, un total de 10 mostrejadors es van exposar a l'aigua subterrània del pou d'Alfons el Magnànim, a l'estació experimental de Sant Martí (Besós), durant 65 dies. Passat aquest temps, es va realitzar el recompte dels bacteris presents al biofilm de la forma habitual, utilitzant l'agar R2A i filtració per membrana (veure 3.2.4). Aquest experiment no ens permet atribuir els errors a cap factor en particular, malgrat que ens dona una idea de la importància relativa dels errors produïts durant tot el procés.

### 2.2.9. Efecte de l'esforç de cisalla en el desenvolupament del biofilm

S'han realitzat dos experiments per determinar com influeix la variació de l'estrès de cisalla en el desenvolupament dels biofilms al sistema experimental. L'esforç o estrès de cisalla augmenta amb la velocitat de l'aigua que circula pel reactor (veure Figura 2.1) fet que repercutirà negativament sobre la formació dels biofilms (Zelver et al. 1984, Lewandowski & Stoodley 1995). A més, aquest paràmetre afecta a altres processos que contribueixen a la formació dels biofilms, com són el transport de nutrients, la unió i separació de cèl·lules a la superfície (Peyton & Characklis 1993), i fins i tot la pròpia estructura dels biofilms (Bryers & Characklis 1981, Stoodley et al. 1993). També és important saber de quina forma es produeix la variació de l'esforç de cisalla. Alguns estudis remarquen que canvis progressius afecten molt menys al desenvolupament dels biofilms que si es produeixen variacions brusques (Peyton & Characklis 1993). Per tots aquest motius, s'ha agafat l'esforç de cisalla a la interfase superfície-biofilm determinat a partir de l'equació 2.20, com a factor bàsic per determinar el potencial de formació de biofilms.

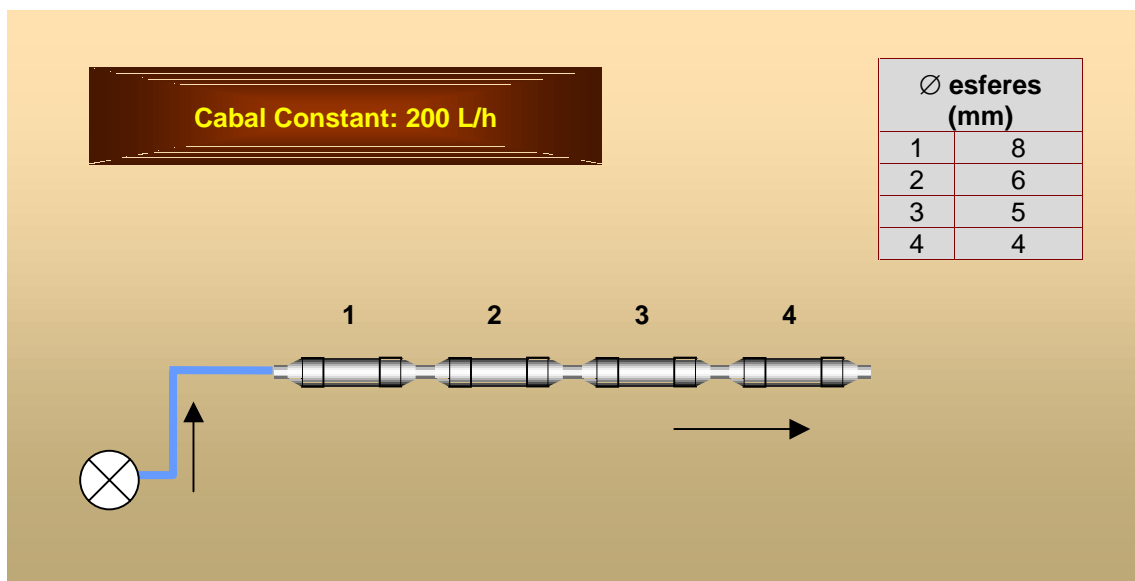
En el primer experiment realitzat s'han sotmès 10 reactors de llit empacat d'igual porositat (plens d'esferes de vidre de 5 mm de diàmetre) a diferents velocitats del flux. Després d'esterilitzar el sistema a l'autoclau s'han deixat els reactors en contacte de forma simultània amb l'aigua de la mina de Ribatallada durant 16 i 25 dies. Els diferents cabals es van ajustar simultàniament gràcies a claus d'esfera situades just abans dels reactors (veure Figura 2.12). Tots els reactors han estat sotmesos a les mateixes condicions ambientals al llarg de l'experiment. S'ha realitzat el recompte de viables dels biofilms desenvolupats, de la forma habitual.



**Figura 2.12.** Experiment per determinar la influència de l'esforç de cisalla sobre el desenvolupament del biofilm variant el cabal i a porositat constant.

Tenint en compte que el sistema experimental està basat en reactors de llit empacat fix, la porositat del medi de suport influirà d'una forma important sobre la velocitat del fluid, l'esforç de cisalla i, per tant, sobre el desenvolupament dels biofilms. Per aquest motiu, s'ha realitzat un segon experiment (veure Figura 2.13) on s'ha variat la porositat del medi de suport, afegint esferes de diferent diàmetre dins dels reactors, tenint en compte que com més gran sigui el diàmetre de les esferes que utilitzem major serà la porositat i menor la velocitat mitjana del flux. Les diferents porositats s'han aconseguit adaptant 4 mostrejadors en sèrie, cada un d'ells amb una porositat característica diferent. Es van afegir esferes de vidre de 8 mm de diàmetre al primer reactor, 6 mm al segon reactor, 5 mm al tercer i 4 mm al quart.

Després d'esterilitzar tot el sistema de la manera habitual es van deixar 30 dies en contacte amb l'aigua subterrània de l'estació experimental de CASSA a Sabadell, a cabal constant (200 L/h). Passat el temps d'exposició a l'aigua es va realitzar el recompte de viables dels biofilms desenvolupats, de la forma habitual.



**Figura 2.13.** Experiment per determinar la influència de l'esforç de cisalla sobre el desenvolupament del biofilm variant la porositat de 4 reactors de llit empacat i mantenint el cabal constant a l'entrada.

#### 2.2.10. Influència del biofilm en la hidrodinàmica del medi porós

La influència del biofilm en el règim hidràulic es pot calcular mesurant la porositat en les diferents etapes del seu desenvolupament (Cunningham et al. 1991). En primer lloc es mesura la porositat mitjana del llit net (sense biofilm), de la manera explicada anteriorment (veure 2.2.4). Posteriorment es calcula la porositat del llit empacat amb biofilm,  $\epsilon_r$ , amb l'equació 2.30, coneixent el gruix mitjà del mateix a partir de les mesures realitzades amb microscòpia confocal (veure 4.2.3).

Finalment, la influència del biofilm en el règim hidràulic també s'ha determinat mesurant in situ la pèrdua de càrrega que es produeix al reactor de llit empacat degut a la pròpia formació del biofilm. Per això, s'ha realitzat un muntatge idèntic al descrit a la Figura 2.7, instal·lant al reactor un element-T d'acer inoxidable amb rosca per poder adaptar el captor de pressió. Mantenint el cabal constant a l'entrada del reactor durant la duració sencera de l'experiment (100 dies), s'ha mesurat la variació de pressió produïda amb la colonització del medi porós gràcies a un captor de pressió Wika (WIKA 909.40.500, Klingenberg, Germany). Les mesures s'han procurat realitzar en les mateixes condicions i a la mateixa hora (10:00 a.m.), als 15, 25, 35, 50 i 100 dies.

Totes les dades obtingudes de porositat i pèrdua de càrrega, junt amb les mesures del cabal s'han utilitzat per calcular la pèrdua de càrrega i el factor de fricció del medi porós (Cunningham et al. 1991). S'han comparat els valors mesurats del factor de fricció ( $f$ ) amb els corresponents valors teòrics calculats a partir de les equacions corresponents segons el tipus de règim del flux (veure 2.1.1).

#### 2.2.11. Anàlisi estadística de les dades

Totes les dades que s'han obtingut al llarg d'aquest treball es van entrar en un full de càlcul (Microsoft Excel 98). S'han realitzat comparacions estadístiques amb un test-t o mitjançant una prova d'anàlisi de la varianza (ANOVA), considerant les diferències significatives a partir d'un nivell del 5%. La majoria d'anàlisis de la varianza s'han realitzat amb el paquet estadístic SPSS (SPSS v.9.0.1, 1999) a través del model lineal general. Les dades dels recomptes i densitats cel·lulars s'han transformat logarítmicament, de forma prèvia a la realització de les ANOVA, per estabilitzar les seves variacions al llarg del temps.

D'altra banda, el nombre de reactors que es pot situar a cada sistema experimental està limitat per diferents factors, com el cabal que ha de circular per l'interior de cada un d'ells. Això ha estat un factor limitant important en les cinètiques de colonització al llarg del temps, perquè no permetia realitzar el nombre adequat de rèpliques per cada variable estudiada.

Per aquest motiu s'ha utilitzat un disseny experimental que tracta d'optimitzar al màxim el nombre de rèpliques utilitzades al llarg del període de duració de l'experiment i, al mateix temps, assegura la disposició aleatòria de cada reactor dins del sistema experimental, de forma que els resultats no depenguin de la posició dels reactors.

Coneixent els factors estudiats així com la duració de l'experiment, s'ha assignat a cada un dels reactors un nombre correlatiu ordenat del primer a l'últim reactor (sèrie ordenada). Posteriorment, es genera una seqüència de nombres aleatoris (sèrie aleatòria) amb el mòdul d'anàlisi de Microsoft Excel. Els nombres aleatoris generats substitueixen la seqüència original i serveixen per situar definitivament cada un dels reactors en el sistema experimental definitiu.

Si els reactors es sotmeten a tractaments diferents que impliquen variacions en les condicions experimentals (per exemple, canviant el flux), també s'aleatoritza el tractament que correspon a cada un dels reactors.

Una vegada les mostres s'han processat de la forma habitual (veure 2.2.7 i Figura 2.10), es quantifica el nombre de microorganismes presents als biofilms desenvolupats al medi de suport dels reactors, a partir del recompte de viables (veure 3.2.4). Les dades dels recomptes de viables en placa han representat generalment la mitjana de 3 plaques per cada dilució apropiada, expressant els resultats en  $Ufc\ mL^{-1}$  per les mostres planctòniques i en  $Ufc\ cm^{-2}$  per les mostres del biofilm. En els gràfics s'acostuma a indicar, a més de les mitjanes, l'error estàndard associat a la mitjana (SE) en forma de barra.

Els resultats per als recomptes microscòpics s'han obtingut a partir de l'observació de 10 camps microscòpics. Quan el nombre total de cèl·lules era inferior a les 400, s'examinaven més de 10 camps.



## 2.3. Resultats

### 2.3.1. Rendiment del reactor de llit empaquetat

Les especificacions del reactor, les condicions d'operació i el seu rendiment es detallen a la Taula 2.5, calculats després de mesurar volumètricament el volum de porus del reactor ( $8,45 \pm 0,13$  mL), i determinar la porositat segons l'equació 2.1:

$$\varepsilon = \frac{V_P}{V_T} = \frac{8,45}{15,97} = 0,5288$$

El sistema s'ha dissenyat de cara a aconseguir un flux turbulent a cada una de les estacions experimentals utilitzades en la monitorització del desenvolupament de biofilms, ja que el règim turbulent és força més rellevant hidrodinàmicament que el flux laminar en sistemes de distribució d'aigua i a la indústria.

**Taula 2.5.** Principals paràmetres del reactor de medi porós (llit empaquetat fix) de 1/2" de diàmetre (ple d'esferes de 5 mm com a medi porós) utilitzat per a l'experimentació de camp.

Paràmetres	Valor	Unitat
Longitud del reactor de mostreig	6,900	cm
Diàmetre del reactor de mostreig	1,580	cm
Àrea de la secció transversal del reactor, $A_{cs}$	1,961	cm <sup>2</sup>
Volum del reactor, $V_{tot}$	15,974	cm <sup>3</sup>
Diàmetre de les esferes de vidre, $d_p$	0,500	cm
Nombre d'esferes de vidre per reactor	115	
Àrea total del medi porós (esferes de vidre)	90,321	cm <sup>2</sup>
Àrea de deposició del tub del reactor	34,249	cm <sup>2</sup>
Àrea de deposició total	124,57	cm <sup>2</sup>
Volum del medi porós (esferes de vidre)	7,527	cm <sup>3</sup>
Volum de buits, $V_v$	8,448	cm <sup>3</sup>
Porositat, $\varepsilon$	0,5288	
Àrea de Pas, $A_p$	1,04	cm <sup>2</sup>
Perímetre mullat, $P_p$	11	cm
Radi Hidràulic (Relació $A_p/P_p$ )	0,094	cm
Permeabilitat, $k$	11,73	cm/s
Nombre de Reynolds porós, $Re$	1493,28	
Esforç de cisalla, $\tau$	4,38	N/m <sup>2</sup>
Factor de fricció, $f$	1,75	
Cabal volumètric, $Q$	100000,0	cm <sup>3</sup> /h
Velocitat superficial del fluid, $v_o = Q / A_{cs}$	5,1e4	cm/h
Temps de residència, $\theta = V_v/Q$	0,005	min
Taxa de dilució, $D=Q/V=1/\theta$	11837,87	h <sup>-1</sup>

A partir de la porositat i l'àrea transversal del reactor es determina l'àrea de pas o àrea hidràulica, el perímetre total de pas de l'aigua i el radi hidràulic mitjà o relació  $A_p/P_p$  (veure 2.1.1). Coneixent el diàmetre de les tuberies del reactor, la porositat, la velocitat i les característiques del medi porós, és possible determinar els diferents valors per l'esforç de cisalla, la pèrdua de pressió i la pèrdua de càrrega a través d'un reactor de llit empaquetat.

A la Taula 2.6 s'observa com varien els principals paràmetres hidrodinàmics teòrics del reactor de llit empaquet fix utilitzat al sistema experimental, en funció del cabal utilitzat. En primer lloc s'ha determinat el tipus de règim del flux a través del reactor de llit empaquet, a partir del nombre de Reynolds modificat ( $Re'$ ; eq. 2.13).

En condicions de flux turbulent ( $Re' > 1.000$ ) s'ha calculat el factor de fricció i la pèrdua de càrrega corresponent a partir de l'equació de Burke-Plummer (eq. 2.18), mentre que en un règim de transició (valors  $10 < Re' < 1.000$ ) s'ha utilitzat l'equació d'Ergun (eq. 2.19). Finalment, s'ha obtingut l'esforç de cisalla a partir de la velocitat superficial característica.

Si observem els paràmetres hidrodinàmics calculats per cada un dels reactors de llit empaquet utilitzats, veurem que en les condicions d'utilització al camp a partir de l'aigua subterrània (cabal de 125 L/h i velocitat mitjana de 0,335 m/s), s'ha establert un flux turbulent a través del medi porós, amb un nombre de Reynolds porós de 1867, un factor de fricció modificat de 1,75 i una pèrdua de càrrega de 0,25 m. Les condicions hidrodinàmiques utilitzades resulten en un esforç de cisalla de 6,85 N m<sup>-2</sup> per a cada reactor de llit empaquet utilitzat.

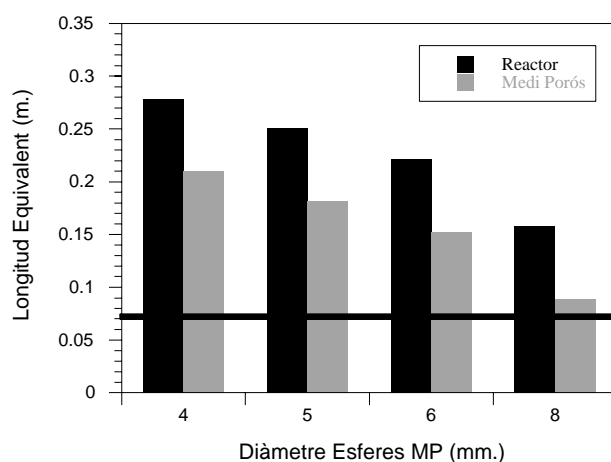
**Taula 2.6.** Principals paràmetres hidrodinàmics pel reactor de llit empaquet fix de 1/2" de diàmetre i amb esferes de 5 mm com a medi porós (model teòric).

$V_0$ (m s <sup>-1</sup> )	Q (L/h)	$V_m$ (m s <sup>-1</sup> )	Reynolds (porós)	Factor Fricció	$h_f$ (m)	Esforç cisalla (N m <sup>-2</sup> )
0,001	1	0,003	14,93	6,48	0,0001	0,002
0,007	5	0,013	74,66	2,70	0,0006	0,017
0,014	10	0,027	149,33	2,22	0,0020	0,056
0,071	50	0,134	746,64	1,84	0,0415	1,155
0,106	75	0,201	1119,96	1,75	0,09	2,47
0,142	100	0,268	1493,28	1,75	0,16	4,38
0,156	110	0,295	1642,61	1,75	0,19	5,30
<u>0,177</u>	<u>125</u>	<u>0,335</u>	<u>1866,60</u>	<u>1,75</u>	<u>0,25</u>	<u>6,85</u>
0,213	150	0,402	2239,92	1,75	0,35	9,86
0,283	200	0,536	2986,56	1,75	0,63	17,53
0,354	250	0,670	3733,20	1,75	0,98	27,39
0,425	300	0,804	4479,84	1,75	1,42	39,45
0,708	500	1,340	7466,40	1,75	3,94	109,57
1,063	750	2,009	11199,61	1,75	8,86	246,54
1,417	1000	2,679	14932,81	1,75	15,76	438,29

Es pot establir que la presència en el medi porós de zones amb porus estrets i velocitats elevades, i zones amb porus amples i baixes velocitats, permet simular en geometria i flux continu el comportament d'una canonada al llarg del temps, amb les oscil·lacions de cabal estacionals i diàries. Entre els diferents paràmetres hidrodinàmics importants, la velocitat i l'esforç de cisalla són els que estableixen la similitud hidràulica. En el cas d'una tuberia llisa i per a un sol fluid, l'aigua, els únics paràmetres que afecten el valor de l'esforç de cisalla són la velocitat del flux i el diàmetre, a partir dels quals es calcula el cabal. En aquest sentit, un esforç de cisalla de 6,85 N m<sup>-2</sup> al medi porós (veure Taula 2.6) ofereix unes condicions hidrodinàmiques que engloben les que es poden trobar a les canonades de les xarxes de distribució urbanes i domiciliàries, amb uns valors de velocitat de l'aigua entre 1,25-1,50 m s<sup>-1</sup>, tal com es pot veure a la Taula 2.2.

Referent a la similitud cinemàtica, el gradient de velocitats no és homogeni en el medi porós com ho és a la canonada. No obstant, en un sistema de distribució real tampoc s'estableix un gradient homogeni de velocitats al llarg del temps. És evident que la velocitat i el gradient de velocitats canvien segons l'hora del dia i també segons l'època de l'any (o els dies de la setmana). En el disseny de canonades d'abastament d'aigua s'acostumen a utilitzar velocitats al voltant de  $1 \text{ m s}^{-1}$ , entre  $0,5$  i  $2 \text{ m s}^{-1}$  (Mayol 1983) en funció del diàmetre, la llargada i el tipus de servei que realitzi la canonada, recomanant-se valors superiors a  $0,6 \text{ m s}^{-1}$  (Steel 1972) per evitar la formació de dipòsits de fang. Tanmateix, el funcionament real al llarg de les 24 hores del dia i dels diferents dies de la setmana fa que els valors encara presentin majors oscil·lacions. Així, no és gens estrany observar valors propers a  $0 \text{ m s}^{-1}$  a la nit quan el consum es redueix, i puntes de l'ordre de  $2,5 \text{ m s}^{-1}$  durant els màxims de demanda del dia. En aquest sentit, sistemes com les petites xarxes de reg per jardins poden estar durant períodes força grans de temps amb valors propers als  $0 \text{ m s}^{-1}$ .

Referent a la similitud geomètrica el medi porós ofereix una superfície de creixement força més gran que una canonada, ja que a la superfície mullada del reactor s'ha d'incloure la superfície de totes les esferes que integren el medi de suport. Suposant que les condicions hidrodinàmiques són anàlogues en el medi porós i la tuberia del reactor, la superfície del reactor de llit empaquet equival a una longitud equivalent de tuberia. De fet, es pot calcular la longitud necessària en una tuberia llisa per obtenir la mateixa superfície que amb el reactor de medi porós (veure Figura 2.14). Per a cada un dels reactors estàndards utilitzats (tuberia de  $1/2''$  i esferes de  $5 \text{ mm}$  de diàmetre com a medi porós), s'obté una mostra de  $124,57 \text{ cm}^2$ , dels quals uns  $90,32 \text{ cm}^2$  corresponen a l'àrea de les esferes i  $34,25 \text{ cm}^2$  a l'àrea de la paret de la tuberia de  $1/2''$ . Tanmateix, de cara a optimitzar el procés de separació dels microorganismes adherits al material de suport només s'ha realitzat la sonicació del medi porós del llit empaquet, separant prèviament les esferes de la tuberia que les conté. Per aquest motiu, l'àrea de deposició útil aprofitable correspondria només a l'àrea de les esferes del medi porós del llit empaquet ( $90,32 \text{ cm}^2$ ). Coneixent l'àrea de deposició útil s'ha calculat la longitud de tuberia equivalent, és a dir, s'ha calculat quina longitud de tuberia equival a la superfície obtinguda amb un reactor de llit empaquet format per una tuberia del mateix diàmetre més un medi porós al seu interior. A la Figura 2.14 s'observen els valors obtinguts utilitzant medis porosos formats per esferes de diferent diàmetre ( $4, 5, 6$  i  $8 \text{ mm}$ ), empaquetades dins d'un reactor de  $1/2''$  de diàmetre. Per poder realitzar la comparació es representa amb una línia la longitud escollida pel reactor ( $0,069 \text{ m}$ ). El reactor estàndard utilitzat amb esferes de  $5 \text{ mm}$  de diàmetre i tuberia de  $1/2''$ , presenta una longitud equivalent de  $25,1 \text{ cm}$  tenint en compte tot el reactor, i de  $18,2 \text{ cm}$  quan s'agafa només l'àrea de deposició útil, és a dir, la superfície de les esferes. Per tant, entre els avantatges fonamentals de la utilització dels reactors de llit empaquet cal destacar la gran superfície que presenten en un espai molt reduït.



**Figura 2.14.** Longitud de tuberia equivalent a la superfície obtinguda amb un reactor de llit empaquet. Càlculs realitzats a partir de la superfície total del reactor, o només amb el medi porós que conté. La barra negra indica la longitud escollida pel reactor ( $L=0,069 \text{ m}$ ).

### 2.3.2. Calibratge en laboratori del sistema

En el primer assaig de calibratge s'ha caracteritzat el comportament hidrodinàmic d'un sol reactor de llit empaquet, i s'ha comparat amb el que passa amb un reactor de tuberia sense medi porós. La Figura 2.15 mostra la variació de la pèrdua de càrrega en funció del cabal, al sistema experimental format per un reactor de llit empaquet de 1/2" de diàmetre, mesurant amb un captor de pressió Wika (veure Figura 2.7). L'experiment s'ha repetit amb el reactor ple del material de suport (esferes de 5 mm de diàmetre), amb el reactor sense el medi porós i, finalment, amb el reactor sense medi porós i sense les dues malles que el retenen. Les dades obtingudes s'han ajustat a una funció quadràtica tal com es mostra a la mateixa Figura 2.15 i a la Taula 2.7. Això permet calcular la importància del medi porós i altres components del reactor de llit empaquet, com les malles o l'efecte de l'ampliació de la tuberia, en la pèrdua de càrrega total del reactor. En primer lloc, s'ha determinat la pèrdua de càrrega produïda per les dues malles presents a cada reactor, coneixent la pèrdua de càrrega mesurada en el reactor sense medi porós:

$$\Delta h_i = k \cdot Q^2$$

$$\Delta h_{tub+malles} = \Delta h_{tub} + (2 \cdot \Delta h_{malla})$$

$$2 \cdot \Delta h_{malla} = \Delta h_{tub+malles} - \Delta h_{tub} = (k_{tub+malles} - k_{tub}) \cdot Q^2$$

Substituint a l'equació anterior els valors de k obtinguts al mesurar la pèrdua de càrrega del reactor sense medi porós (veure Taula 2.7), es determina la pèrdua de càrrega produïda per les dues malles del reactor de llit empaquet:

$$2 \cdot \Delta h_{malla} = (k_{tub+malles} - k_{tub}) \cdot Q^2 = (2.669 \times 10^{-6} - 1.353 \times 10^{-6}) \cdot Q^2$$

$$\Delta h_{malles-reactor} = 2 \cdot \Delta h_{malla} = 1.316 \times 10^{-6} \cdot Q^2$$

Coneixent l'efecte de les malles en la pèrdua de càrrega total del reactor de llit empaquet es pot determinar l'efecte del medi porós, de la manera que segueix:

$$\Delta h_{reactor} = \Delta h_{medi-porós} + \Delta h_{tub} + \Delta h_{malles}$$

$$\Delta h_{medi-porós} = \Delta h_{reactor} - \Delta h_{tub} - \Delta h_{malles} = (k_{reactor} - k_{tub} - k_{malles}) \cdot Q^2$$

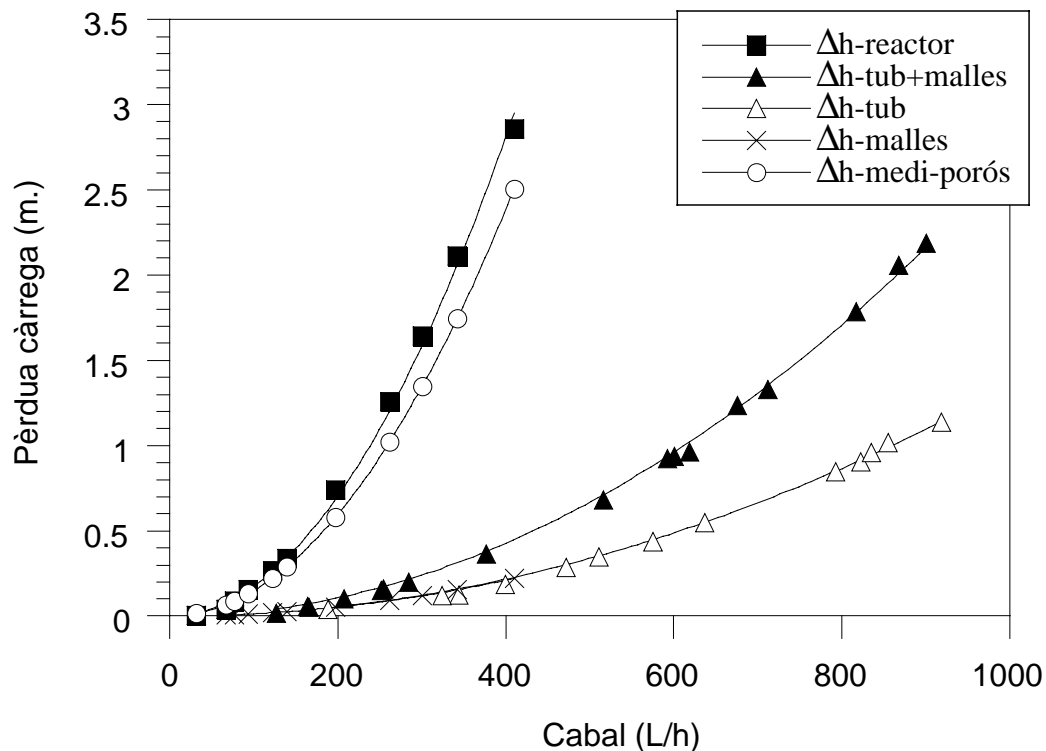
$$\Delta h_{medi-porós} = (1.758 \times 10^{-5} - 1.353 \times 10^{-6} - 1.316 \times 10^{-6}) \cdot Q^2 = 1.491 \times 10^{-5} \cdot Q^2$$

A la Figura 2.15 es representa l'efecte dels diferents factors estudiats en la pèrdua de càrrega del sistema, afegint les dades mesurades ( $\Delta h_{reactor}$ ,  $\Delta h_{tub+malles}$ ,  $\Delta h_{tub}$ ), així com les dades calculades a partir d'aquestes ( $\Delta h_{medi-porós}$ ,  $\Delta h_{malles}$ ). Les dades de pèrdua de càrrega mesurades de la forma descrita anteriorment (veure Taula 2.7), s'han comparat amb els valors teòrics calculats. La Taula 2.8 resumeix les principals equacions utilitzades en el càlcul teòric de la pèrdua de càrrega produïda en els reactors de llit empaquet fix (de Nevers 1991, Sotelo 1994, Middleman 1998).

**Taula 2.7.** Ajust dels valors obtinguts de la pèrdua de càrrega a una funció quadràtica\*, i càlcul del coeficient k per determinar l'efecte del medi porós i de les malles en la pèrdua de càrrega del reactor.

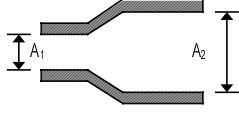
	k	R	$\chi^2$
<b>1er. Assaig (EUOOT)</b>			
$\Delta h_{\text{ reactor (teòrica)}}$	$9,539\text{e-}06 \pm 3,646\text{e-}08$	0,99986	0,00076
$\Delta h_{\text{ reactor (mesurada)}}$	$1,758\text{e-}5 \pm 2,016\text{e-}07$	0,99878	0,02318
$\Delta h_{\text{ tub + malles (mesurada)}}$	$2,669\text{e-}06 \pm 1,638\text{e-}08$	0,99934	0,01136
$\Delta h_{\text{ tub (mesurada)}}$	$1,353\text{e-}06 \pm 1,138\text{e-}08$	0,99872	0,00471
$\Delta h_{\text{ malles (calculada)}}$	$1,316\text{e-}06$		
$\Delta h_{\text{ medi-porós (calculada)}}$	$1,491\text{e-}05$		
<b>2on. Assaig (EUETIT)</b>			
$\Delta h_{\text{ reactor (mesurada)}}$	$2,653\text{e-}5 \pm 2,611\text{e-}07$	0,99946	0,00114
$\Delta h_{\text{ tub + malles (mesurada)}}$	$3,923\text{e-}06 \pm 1,727\text{e-}07$	0,99021	0,00738
$\Delta h_{\text{ medi-porós (calculada)}}$	$2,261\text{e-}05$		

\* $\Delta h = k \cdot Q^2$



**Figura 2.15.** 1er. assaig de calibratge del reactor de 1/2" amb medi porós: variació de la pèrdua de càrrega en funció del cabal i de cada un dels components del reactor.

**Taula 2.8.** Fórmules utilitzades per al càlcul teòric de la pèrdua de càrrega del reactor de llit empaquet ple d'esferes de vidre de 5 mm de diàmetre.

Paràmetre	Fórmula utilitzada	Descripció
$h_f$ medi porós	$h_f = f \cdot \frac{L \cdot (1 - \varepsilon) \cdot v_0^2}{d_p \cdot \varepsilon^3 \cdot g}$	Burke-Plummer (eq. 2.18)
		Ergun (eq. 2.19)
$h_f$ tuberia 1/2"	$h_{f-tur} = f_{tur} \cdot \frac{L}{d} \cdot \frac{v^2}{2g}$	Eq. 2.30 pel flux turbulent
$h_f$ ampliació (Borda-Carnot)	$h_f = \left( \frac{A_2}{A_1} - 1 \right)^2 \cdot \frac{V_2^2}{2 \cdot g}$	 <p>on <math>A_2 = 0,0158</math> i <math>A_1 = 0,00869</math></p>

A part de les pèrdues de càrrega originades pel medi porós i per la canonada del reactor de 1/2", s'han intentat quantificar les pèrdues locals més importants. Aquestes pèrdues locals poden originar-se per canvis en la geometria del sistema, com en el cas de les ampliacions o per alteracions del flux provocades, entre d'altres, per les malles que retenen el medi porós. La Taula 2.9 mostra els valors mesurats de la pèrdua de càrrega del reactor de llit empaquet, així com els de cada component del reactor (medi porós, tuberia de 1/2" i malles). A la mateixa taula es mostren els valors teòrics calculats pels principals components del reactor, així com pel reactor sencer, segons les fórmules descrites a la Taula 2.8. Aquestes dades es representen a la Figura 2.16 (part superior), on es mostra la influència del reactor modificant la pèrdua de càrrega en funció del cabal. A la mateixa Figura 2.16 (part inferior), s'observa el mateix efecte pels dos components més importants del reactor, el medi porós i de la tuberia del reactor.

Els valors de pèrdua de càrrega mesurats pel reactor han concordat en gran mesura amb els valors calculats ( $r = 0,9988$  a la Figura 2.17a) dels 0 als 400 L/h. La concordança ha estat especialment bona en el rang de cabals utilitzats, dels 0 als 150 L/h, on les diferències entre els valors mesurats i els teòrics de la pèrdua de càrrega mai han superat els 0,05 m. Si s'agafa només el medi porós com a referència, els valors de pèrdua de càrrega mesurats també han concordat en gran mesura amb els valors calculats ( $r = 0,9999$  a la Figura 2.17b). En aquest cas, les diferències entre els valors mesurats i els teòrics de la pèrdua de càrrega mai han superat els 0,1 m. entre els 0-400 L/h. En el cas de la tuberia del reactor ( $r = 0,99936$  a la Figura 2.17c) la concordança ha estat lleugerament inferior, encara que en el rang de cabals utilitzats entre 0 i 150 L/h les diferències no han superat mai els 0,05 m.

En un segon assaig de calibratge es va utilitzar el sistema experimental representat a la Figura 2.8 per calcular la pèrdua de càrrega a partir de l'equació 2.35. La Figura 2.18 (part superior) mostra la variació de la pèrdua de càrrega en funció del cabal en el sistema experimental format per un reactor de llit empaquet de 1/2" de diàmetre. L'experiment s'ha repetit amb el reactor ple del material de suport (esferes de 5 mm de diàmetre) i amb un reactor sense el medi porós. Les dades obtingudes s'han ajustat a una funció quadràtica de la mateixa forma que en l'assaig anterior, obtenint els valors de  $k$  que es mostren a la Això permet calcular la importància del medi porós en la pèrdua de càrrega total del reactor.

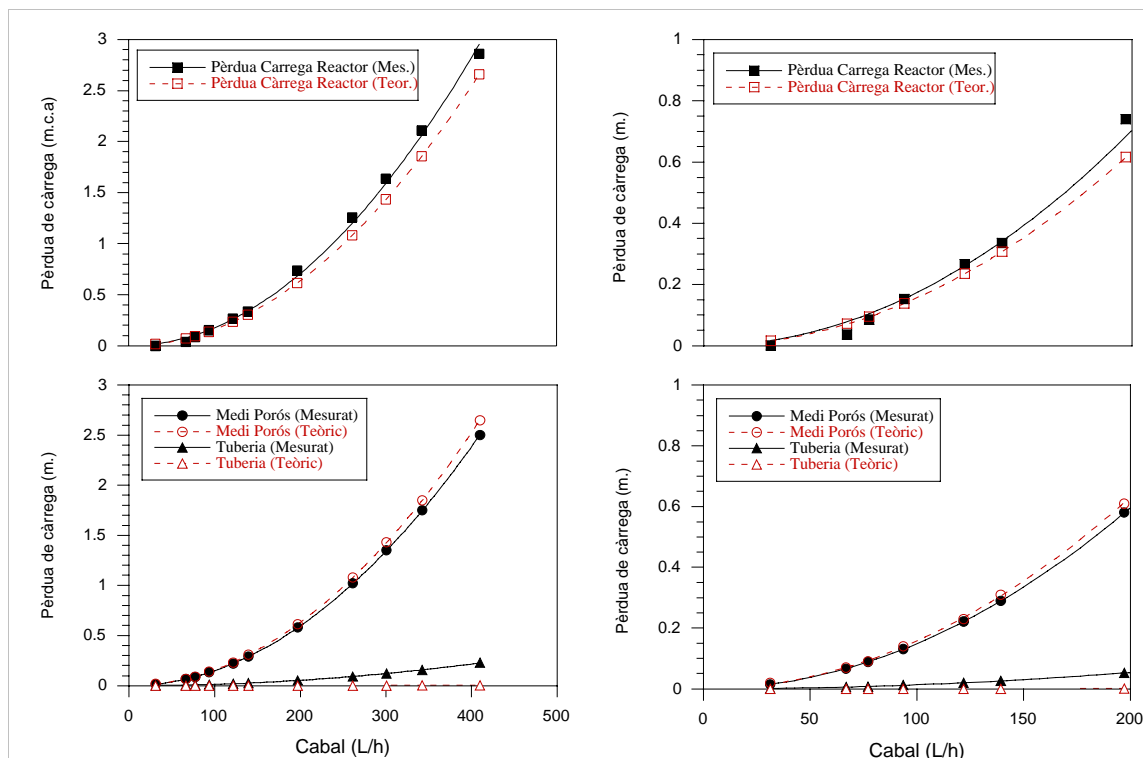
Cal destacar que les diferències entre els valors teòrics i els mesurats pel medi porós han resultat superiors en aquest segon assaig. Mentre que en el primer assaig les diferències no superaven els 0,1 m durant tot el rang de cabals determinats (0-400 L/h), en aquest segon experiment les diferències arriben a 0,15 m als 150 L/h, i a un màxim de 0,25 m als 200 L/h (veure Figura 2.18, part superior).

**Taula 2.9.** Variació de la pèrdua de càrrega (m) del reactor en funció del cabal, segons les dades mesurades (1) o teòriques (2).

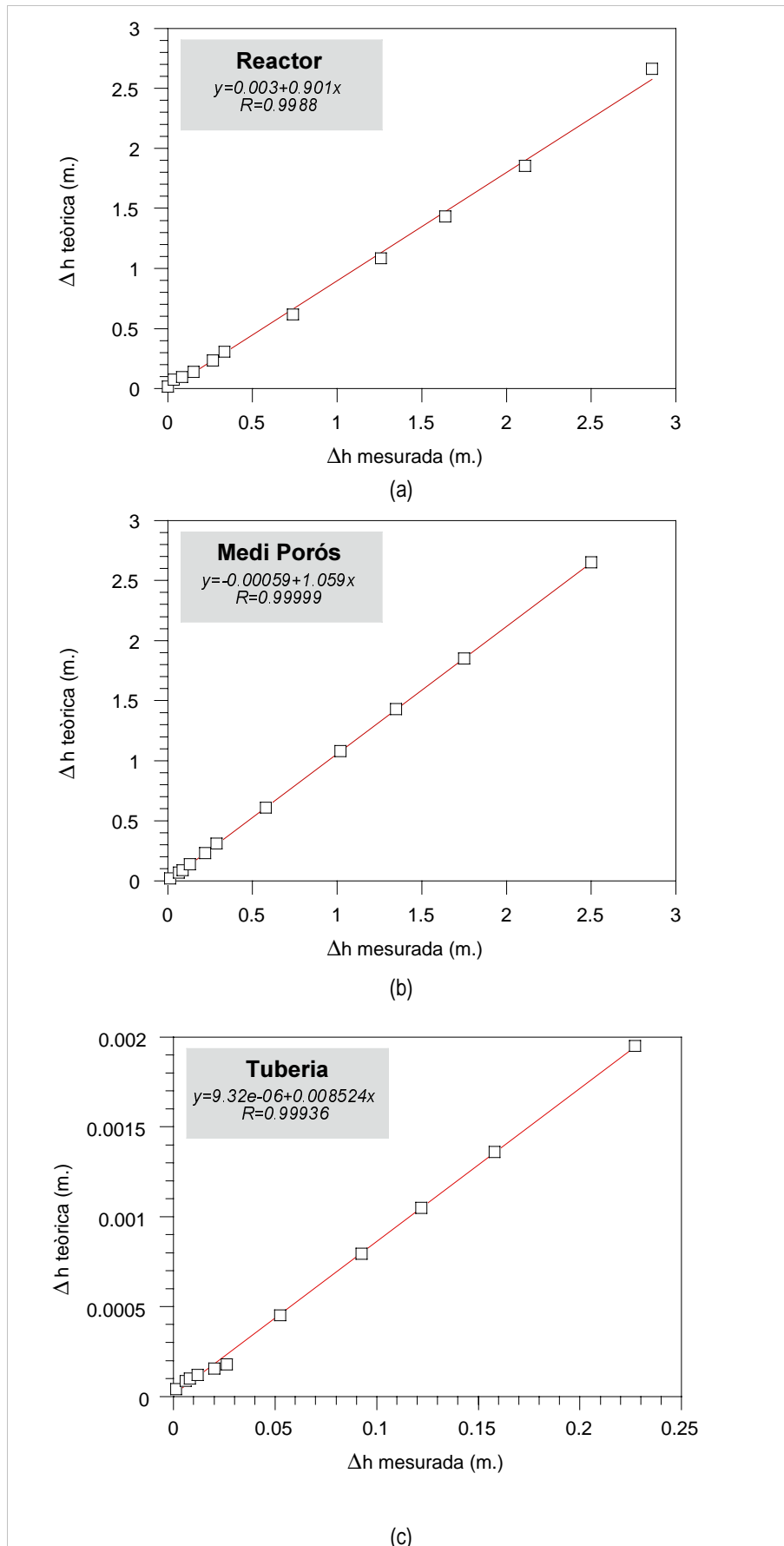
<b>(1) DADES MESURADES</b>						
Cabal (L/h)	Re(porós)	$\Delta h_{\text{medi-porós}}$	$\Delta h_{\text{tuberia}}$	$\Delta h_{\text{malles}}$	Suma $\Delta h$	$\Delta h_{\text{reactor}}$
31,3	466,9	1,46E-02	1,32E-03	1,29E-03	1,72E-02	9,94E-04
66,7	996,4	6,64E-02	6,03E-03	5,86E-03	7,83E-02	3,68E-02
77,2	1153,1	8,89E-02	8,07E-03	7,85E-03	1,05E-01	8,58E-02
93,6	1398,2	1,31E-01	1,19E-02	1,15E-02	1,54E-01	1,53E-01
121,9	1820,8	2,22E-01	2,01E-02	1,96E-02	2,61E-01	2,67E-01
139,3	2080,2	2,89E-01	2,63E-02	2,55E-02	3,41E-01	3,36E-01
197,2	2944,3	5,80E-01	5,26E-02	5,12E-02	6,83E-01	7,40E-01
261,5	3904,2	1,02E+00	9,25E-02	9,00E-02	1,20E+00	1,26E+00
300,8	4491,6	1,35E+00	1,22E-01	1,19E-01	1,59E+00	1,64E+00
342,2	5110,4	1,75E+00	1,58E-01	1,54E-01	2,06E+00	2,11E+00
409,8	6120,1	2,50E+00	2,27E-01	2,21E-01	2,95E+00	2,86E+00

<b>(2) DADES TEÒRIQUES</b>						
Cabal (L/h)	Re(porós)	$\Delta h_{\text{medi-porós}}$	$\Delta h_{\text{tuberia}}$	$\Delta h_{\text{ampliació}}$	$\Delta h_{\text{reactor}}$	
31,3	466,9	0,02	4,02E-05	6,70E-05	0,017	
66,7	996,4	0,07	8,59E-05	3,05E-04	0,073	
77,2	1153,1	0,09	9,94E-05	4,09E-04	0,095	
93,6	1398,2	0,14	1,21E-04	6,01E-04	0,139	
121,9	1820,8	0,23	1,57E-04	1,02E-03	0,236	
139,3	2080,2	0,31	1,79E-04	1,33E-03	0,307	
197,2	2944,3	0,61	4,52E-04	2,67E-03	0,616	
261,5	3904,2	1,08	7,95E-04	4,69E-03	1,083	
300,8	4491,6	1,43	1,05E-03	6,20E-03	1,433	
342,2	5110,4	1,85	1,36E-03	8,03E-03	1,855	
409,8	6120,1	2,65	1,95E-03	1,15E-02	2,661	



**Figura 2.16.** Influència del medi porós i de la tuberia en la variació de la pèrdua de càrrega (m) en funció del cabal, en el primer assaig de calibratge. Comparació dels valors mesurats en l'assaig de calibratge (línies contínues) i els valors teòrics (línies discontinües). A la dreta es representen els mateixos gràfics agafant una escala de cabals de 0 a 200 L/h.

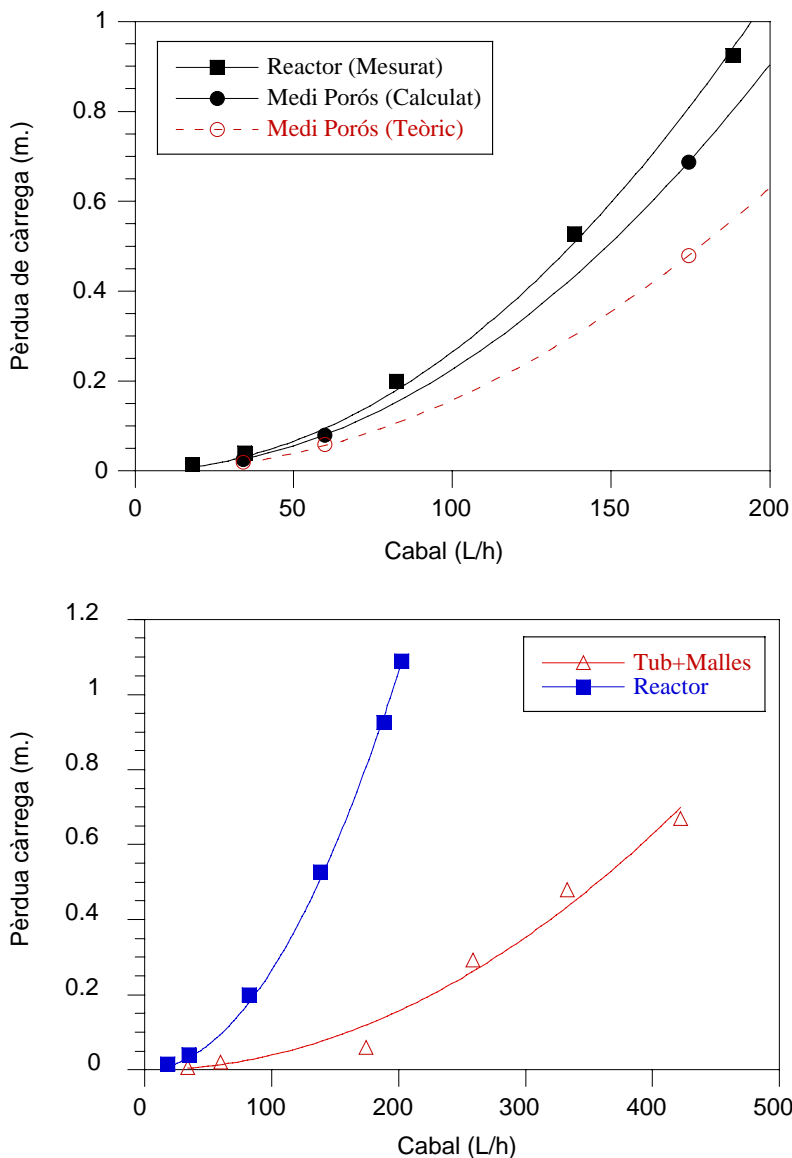


**Figura 2.17.** Comparació dels valors mesurats de la pèrdua de càrrega (m.) en l'assaig de calibratge i els valors teòrics, al reactor de llit empaquet, medi porós i tuberia.



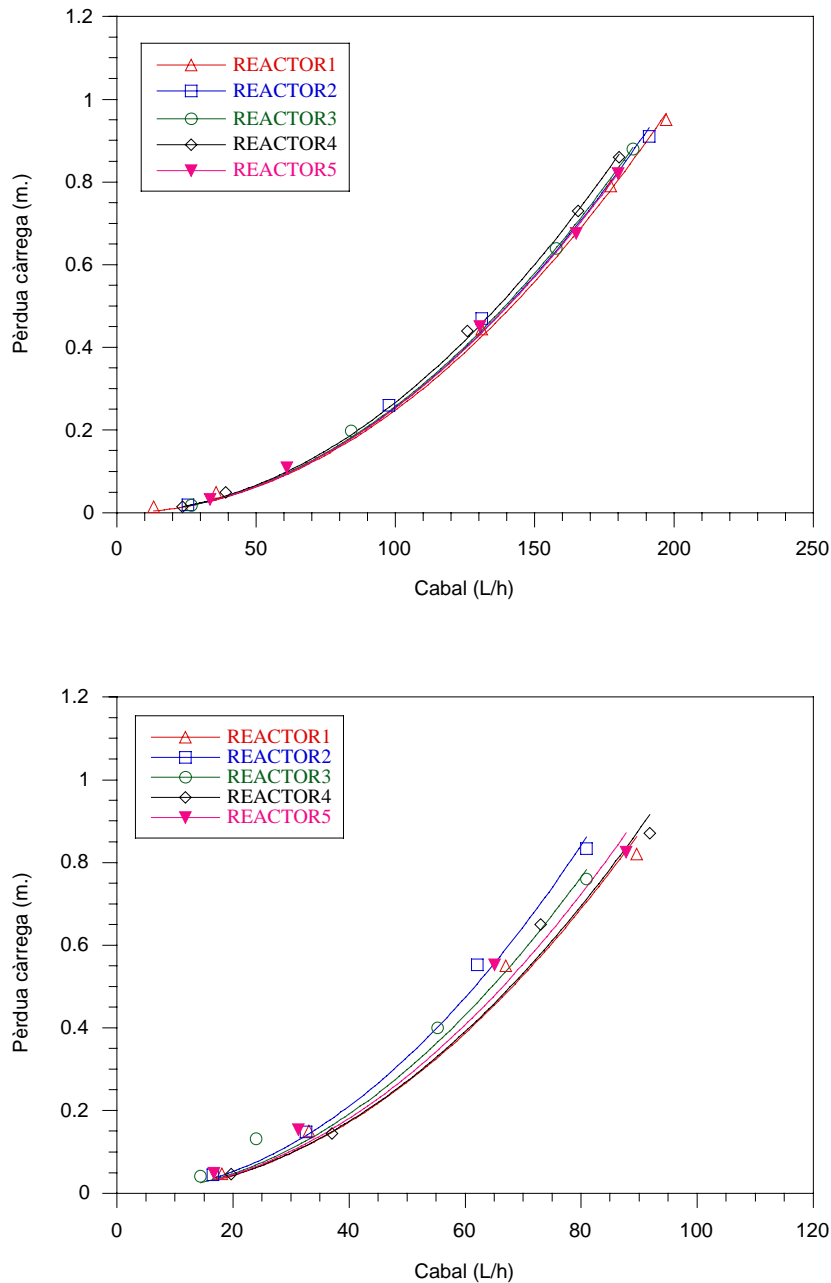
D'altra banda, les diferències obtingudes entre el reactor i el medi porós han estat similars en els dos assaigs. Tanmateix, tant en un cas com en l'altre, a igual cabal els valors de pèrdua de càrrega han estat sempre superiors en el segon assaig, encara que les diferències no han estat notables (menys de 0,35 m). Indubtablement, l'assaig 1 (Figura 2.16) ha donat uns valors més propers al model teòric.

Una vegada s'ha caracteritzat el comportament hidrodinàmic d'un sol reactor de llit empaquet, s'ha determinat la influència de connectar diferents reactors en paral·lel. Per fer-ho, s'ha utilitzat el sistema experimental descrit a la Figura 2.9, connectant en primer lloc 5 reactors alhora i mesurant-ne la pèrdua de càrrega. A la part inferior de la Figura 2.19 s'observa la variació de la pèrdua de càrrega en funció del cabal quan es connecten 5 reactors de llit empaquet amb el seu medi porós a la vegada i en paral·lel, mentre que a la part superior s'observa la variació de la pèrdua de càrrega en funció del cabal quan s'obre un sol reactor cada vegada. En aquest últim cas, tots els reactors s'han comportat de la mateixa manera sense apreciar-se diferències significatives entre ells. En aquest sentit, el sistema experimental assegura una bona homogeneïtat en el comportament hidrodinàmic entre els diferents reactors.



**Figura 2.18.** Segon assaig de calibratge del reactor de 1/2" amb medi porós: variació de la pèrdua de càrrega en funció del cabal. Part Superior, Comparació entre els valors mesurats i els valors teòrics pel medi porós. Part Inferior, Variació de la pèrdua de càrrega en el reactor de llit empaquet amb i sense el medi porós.

Quan el pas de l'aigua s'obre alhora per a tots els 5 reactors, les diferències han augmentat molt lleugerament (veure Figura 2.19, part inferior). En aquest cas, el sistema utilitzat per mesurar la pèrdua de càrrega ha permès mantenir als 5 reactors alhora, un cabal màxim de 100 L/h. El fet de trobar-se en el límit màxim d'utilització del sistema, pot haver afectat les mesures realitzades. Tot i així, les diferències són pràcticament negligibles en tots els reactors, exceptuant el segon reactor, on a igual cabal s'ha produït una pèrdua de càrrega lleugerament superior a la resta.



**Figura 2.19.** Assaig de calibratge quan es connecten en paral·lel 6 reactors de 1/2" amb medi porós: variació de la pèrdua de càrrega en funció del cabal. A dalt, quan s'obre un sol reactor cada vegada; a sota, quan s'obren els sis reactors alhora.

### 2.3.3. Efecte del material de suport

S'ha investigat l'efecte del material de suport dels reactors de llit en la colonització dels biofilms. Tots els materials esfèrics es van colonitzar ràpidament després de la seva inserció dins dels reactors de llit empaquetat. La Figura 2.20 mostra el desenvolupament del biofilm al llarg del temps, a les superfícies d'esferes de vidre, acer inoxidable 316, acer-crom i ABS (copolímer d'estirè, butadiè i acrilonitril).

Observant la gràfica del recompte de bacteris viables incubats en R2A (Figura 2.20- part superior), s'observen diferències significatives en la colonització dels diferents materials ( $P < 0,01$ ), encara que aquestes depenen també del temps de contacte ( $P = 0,001$ ). Així, als 14 dies l'ABS ha presentat una colonització significativament superior a la resta, arribant a  $9,14 \times 10^3$  ufc  $\text{cm}^{-2}$ . La resta de materials ha mostrat valors quasi 2 log inferiors, presentant el vidre el mínim amb  $1,83 \times 10^2$  ufc  $\text{cm}^{-2}$ .

Dels 14 als 36 dies s'ha produït un augment significatiu de colonització en tots els materials, exceptuant el cas de l'acer inox. 316. Així, l'acer-crom ha augmentat de forma considerable – una mica menys de 2 log –, passant a ser el material més colonitzat als 36 dies, amb  $1,41 \times 10^4$  ufc  $\text{cm}^{-2}$ . Curiosament, l'ABS amb  $1,36 \times 10^4$  ufc  $\text{cm}^{-2}$  pràcticament no ha augmentat respecte del valor obtingut als 16 dies d'exposició. Per la seva part, el vidre ha augmentat quasi 1 log, arribant a un màxim de  $1,13 \times 10^3$  ufc  $\text{cm}^{-2}$ , mentre que l'acer inoxidable ha experimentat una molt lleugera disminució, passant dels  $2,60 \times 10^2$  ufc  $\text{cm}^{-2}$  als  $1,31 \times 10^2$  ufc  $\text{cm}^{-2}$ .

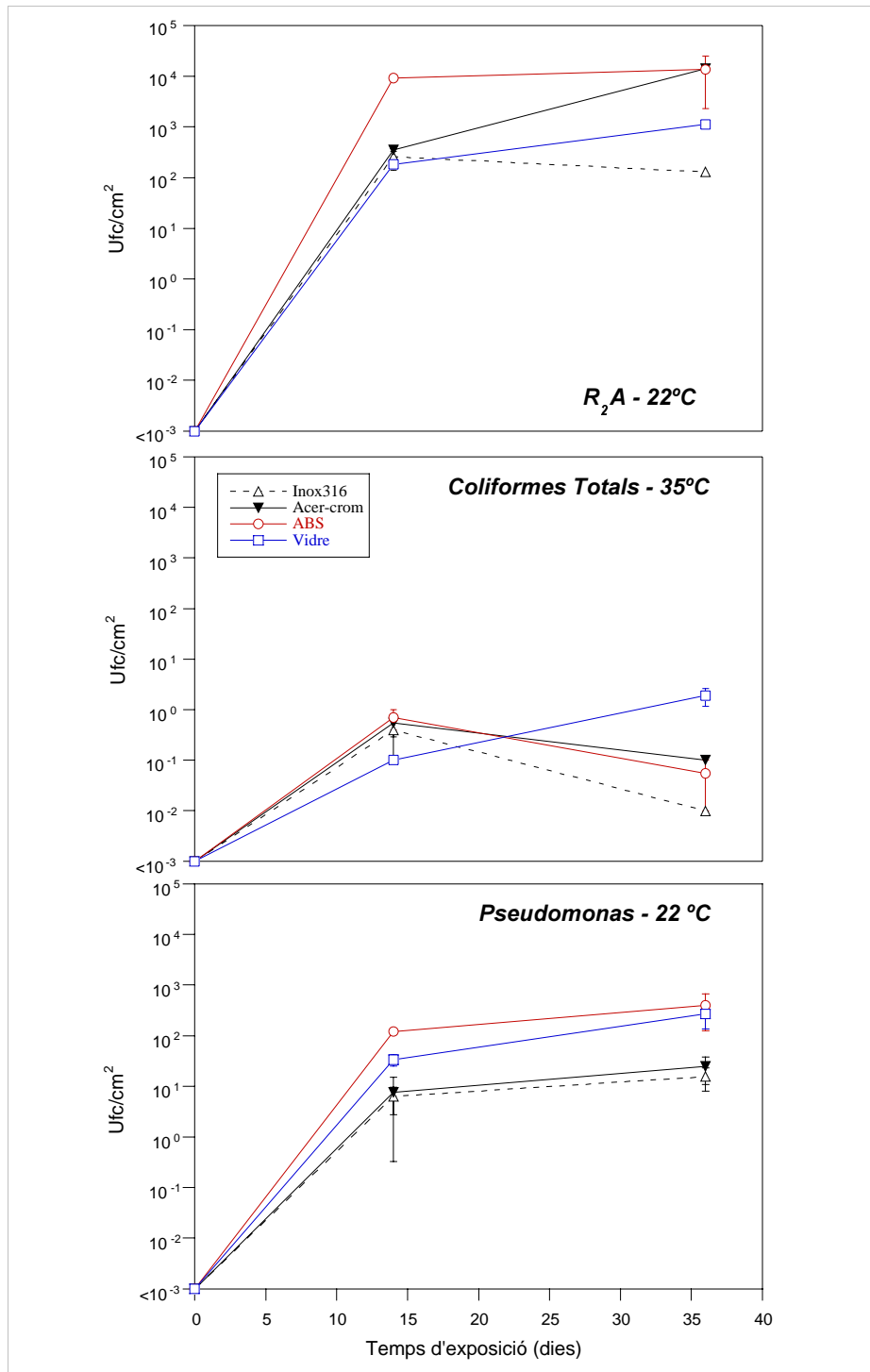
Quan s'analitzen els bacteris del grup *Pseudomonas* (Figura 2.20, part inferior) s'han observat diferències significatives de colonització en els diferents materials test utilitzats ( $P = 0,01$ ). El material més colonitzat ha estat l'ABS ( $4,0 \times 10^2$  ufc  $\text{cm}^{-2}$ ), seguit amb valors similars del vidre ( $2,70 \times 10^2$  ufc  $\text{cm}^{-2}$ ). Tant l'acer al crom ( $2,46 \times 10^1$  ufc  $\text{cm}^{-2}$ ) com l'inoxidable ( $1,57 \times 10^1$  ufc  $\text{cm}^{-2}$ ) s'han mostrat com els materials menys idonis per a facilitar la colonització dels bacteris del grup *Pseudomonas*, presentant valors 1 log inferiors als del vidre. D'altra banda, en general s'ha observat un augment de la colonització en tots els materials al llarg del temps, encara que els valors al final del període de contacte no han estat significativament més alts ( $P = 0,095$ ).

En el cas dels coliformes totals (Figura 2.20, centre), la manca d'homogeneïtat de les variàncies ha impedit realitzar l'anàlisi corresponent. Tanmateix, sembla clar que els coliformes han disminuït al llarg del temps en tots els materials, exceptuant en el cas del vidre, on ha augmentat fins arribar a un màxim de  $1,91 \times 10^0$  ufc  $\text{cm}^{-2}$  al final del període de contacte.

Per poder comparar entre els diferents materials i determinar la facilitat de colonització microbiana de cada un d'ells, s'ha obtingut una ratio de colonització. Aquesta proporció s'ha obtingut a partir del recompte de bacteris viables mesurat per cada material al final del període d'exposició a l'aigua, i es compara amb el mateix valor que han presentat les esferes de vidre. S'ha agafat el vidre com a material estàndard i amb un valor de referència de 1, per poder comparar la capacitat de colonització entre els diferents materials. A la Figura 2.20 s'observa com l'ABS i l'acer-crom han presentat una proporció de colonització semblant, més elevada que el vidre (12,50 per l'acer-crom i 12,02 per l'ABS). Pel contrari, l'acer-inox ha presentat un valor de la ratio inferior al del vidre (0,12).

Tanmateix, si s'agafen les dades de colonització pels coliformes totals els resultats han estat completament diferents. En les condicions experimentals d'aquest cas, el vidre ha estat sens dubte el material que més ha facilitat la colonització dels coliformes totals, amb una ratio de colonització 200 vegades més gran que l'acer-inoxidable, 30 vegades major que l'ABS i fins i tot 20 vegades major que l'acer-crom.

Malgrat que la colonització del vidre pels bacteris heteròtrofs ha estat aproximadament 10 vegades inferior a la produïda a l'ABS o a l'acer-crom, els nivells observats en aquest material són suficientment alts ( $1,13 \times 10^3$  ufc  $\text{cm}^{-2}$ ) com per poder quantificar el desenvolupament del biofilm. D'altra banda, l'elevat ratio de colonització del vidre respecte dels coliformes totals augmenta encara més el valor d'aquest material, com a suport amb una sensibilitat adequada per a l'estudi del desenvolupament de biofilms en reactors de llit empaquetat.



**Figura 2.20.** Desenvolupament del biofilm a les superfícies d'esferes de vidre, acer inoxidable 316, acer-crom i ABS (copolímer d'estirè, butadiè i acrilonitril).

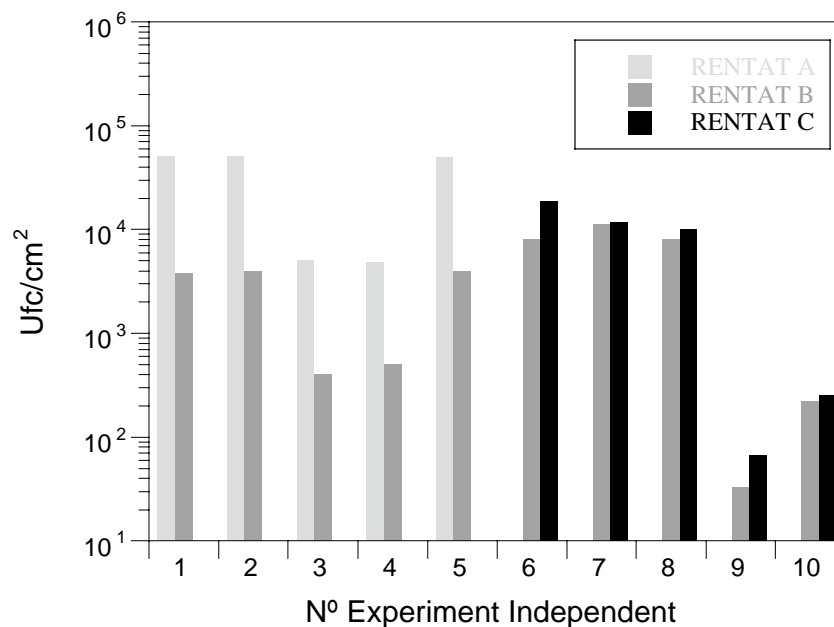
**Taula 2.10.** Comparació de la capacitat de colonització exhibida pels diferents materials utilitzats.

Material	Recompte viables (ufc cm <sup>-2</sup> )	Ratio colonització	Coliformes totals (ufc cm <sup>-2</sup> )	Ratio colonització
Vidre	1,13E+03	1,00	1,91E+00	1,00
ABS	1,36E+04	12,02	5,50E-02	0,03
Acer-crom	1,41E+04	12,50	1,00E-01	0,05
Acer-Inox	1,31E+02	0,12	1,00E-02	0,005

### 2.3.4. Processat de les mostres: rentat i sonicació

S'ha comparat la idoneïtat dels tres tipus de rentats utilitzats per separar els microorganismes planctònics no adherits de forma irreversible (veure Figura 2.11), de les mostres obtingudes a partir de cada reactor de llit empacat. En 10 experiments independents i exposant els reactors a l'aigua del pou d'Alfons el Magnànim (Sant Martí), s'ha comparat el nombre de microorganismes que seguien adherits formant biofilms al medi de suport. Agafant els reactors en parelles es va quantificar el nombre de microorganismes presents als biofilms, segons si es realitzava el rentat A o el B (experiments 1 a 5), i el rentat B o el C (experiments 6-10).

Comparant els tres tipus de tractament entre si és evident que el rentat B és força més complert que el rentat A, ja que inclou més passos i la seva capacitat per separar els microorganismes no adherits de forma irreversible ha estat significativament superior ( $P=0,029$ ). Així, en els experiments realitzats comparant el nombre de microorganismes que creixen en placa (recompte de viables en R2A, 22 °C durant 7 dies), els recomptes més baixos s'han obtingut amb el rentat B (veure Figura 2.21).



**Figura 2.21.** Recompte dels microorganismes presents al biofilm a la superfície de les esferes de vidre, en 10 experiments independents (incubació en R2A a 22°C i 7 dies).

Respecte als tractaments B i C les metodologies força diferents presenten avantatges i desavantatges per cada cantó, malgrat que la major rapidesa del rentat B el fan preferible. Quan es comparen entre si els tractaments B i C (experiments 6 a 10, Figura 2.21), els recomptes de viables han estat sempre menors en el primer cas, encara que les diferències no han estat significatives ( $P=0,779$ ). Per tant, el rentat B és capaç de separar més microorganismes no adherits que els altres dos tipus de tractaments, alhora que és un tractament força senzill i ràpid d'executar.

Agafant el rentat B com a tractament control s'ha comparat amb els altres dos tipus de tractaments, calculant la proporció o ratio del recompte de viables per a cada un d'ells - en ufc/cm² -. D'aquesta forma s'han trobat diferències significatives ( $P<0,001$ ) entre els rentats A-B i A-C (Taula 2.11) després de realitzar un test-t-Student. Així, amb el rentat A s'han aconseguit valors de recomptes de viables 10 vegades superiors (mitjana de  $12,28 \pm 1,51$  Ufc/cm²) als obtinguts amb el rentat B.

Comparant el rentat B amb el rentat C s'han observat recomptes lleugerament superiors en aquest últim, encara que les diferències existents no han estat significatives ( $P=0,779$ ). Per tant, el rentat C ha presentat una menor capacitat per separar els microorganismes adherits de forma reversible al medi porós. A més, la complicació i el temps necessari per a realitzar aquest mètode desaconsellen la seva aplicació, com ho demostra el major coeficient de variació en el rentat C (veure Taula 2.11).

**Taula 2.11.** Comparació de les tres tècniques de separació dels microorganismes adherits al medi porós dels reactors, on es representa la proporció de ufc/cm<sup>2</sup> del tractament experimental comparat amb el tractament control (rentat B).

Nº. EXP.	RENTAT A	RENTAT B	RENTAT C
1	13,63	1,00	2,38
2	12,91	1,00	1,12
3	12,45	1,00	1,25
4	9,70	1,00	2,00
5	12,69	1,00	1,27
Mitjana $\pm$ S.D.	12,28 $\pm$ 1,51	1,00	1,60 $\pm$ 0,55
CV	12,29 %		34,38 %

Per tant, el rentat B és el que ha presentat una major capacitat per separar els microorganismes planctònics no adherits de forma irreversible. Per aquests motius, ha estat el tractament control escollit per aplicar de forma rutinària en el processament previ de cada mostra de biofilm.

Després de descartar el rentat C es va analitzar la quantitat de microorganismes presents als lixiviat resultants de la realització dels rentats A i B. Les aigües de rentat es van recollir amb ampolles Schott estèrils, se'n va determinar el contingut de microorganismes realitzant el recompte de viables en R2A de la forma habitual. Les mostres es van sotmetre al rentat B, tal com s'especifica a la Figura 2.11, incubant-se de la forma habitual per quantificar-ne el recompte de viables. Al mateix temps es va incubar el lixiviat resultant del final del rentat B, i el lixiviat resultant del segon pas del rentat B (que equival al Rentat A). Aquestes tres mostres es van incubar en paral·lel per calcular els percentatges de cada una de les fraccions i poder comparar la seva importància relativa.

Assumint que durant algun dels passos del processament es pot produir una petita reducció en el nombre de viables, com en el procés de sonicació (Camper et al. 1985), les dades de la Taula 2.12 mostren com el nombre de microorganismes que es perden degut al rentat no ha superat de mitjana el 6% respecte del total de viables present a la mostra.

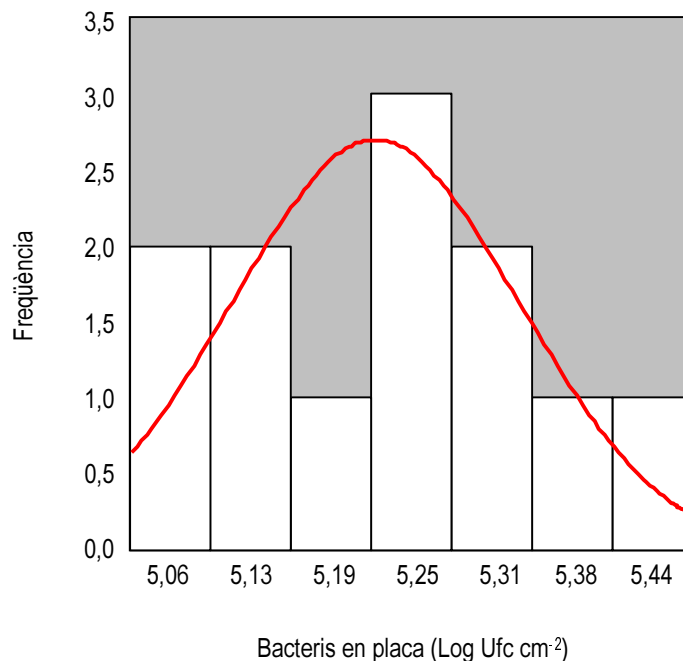
**Taula 2.12.** Percentatge de microorganismes presents als lixiviat resultants dels rentats A i B, i al final del procés (percentatge del nombre de ufc/cm<sup>2</sup>), respecte del total de viables presents al biofilm desenvolupat (creixement en Agar R2A, 22°C).

Nº. EXP.	% Lix. Rentat A	% Lix. Rentat B	% Adherits
1	2,08	2,11	95,81
2	0,99	1,86	97,16
3	0,79	4,72	94,49
4	3,00	5,41	91,59
Mitjana $\pm$ S.D.	1,71 $\pm$ 1,03	3,52 $\pm$ 1,80	94,76 $\pm$ 2,38
CV	60,23 %	51,14 %	2,51 %

### 2.3.5. Reproductibilitat de la colonització del material de suport.

La diferència en el recompte dels microorganismes a partir de les diferents rèpliques de les mostres de biofilm o de mostres planctòniques ha estat mínima en la majoria dels casos, suggerint que la variació del mostreig en placa després de la dilució seriada i posterior filtració va ser mínima (veure 3.2.4). La Figura 2.22 mostra la distribució del recompte de bacteris totals en placa en la colonització de les esferes de vidre a partir de l'aigua freàtica del pou d'Alfons el Magnànim (Sant Martí, Besós). El recompte després de 65 dies ha oscil·lat de  $1.18 \times 10^5$  ufc  $\text{cm}^{-2}$  fins a  $2.62 \times 10^5$  ufc  $\text{cm}^{-2}$  amb un rang de  $1.45 \times 10^5$  ufc  $\text{cm}^{-2}$  (0.14 log), amb una mitjana de  $1,72 \times 10^5$  ufc  $\text{cm}^{-2}$ , una desviació típica de  $4,48 \times 10^4$  ufc  $\text{cm}^{-2}$  i un error estàndard de  $1,29 \times 10^4$  ufc  $\text{cm}^{-2}$ . Després de la transformació logarítmica de les dades s'observa com la població segueix una distribució normal (Figura 2.22).

Amb aquest experiment es demostra que la variació en la formació de biofilms al medi porós (esferes de vidre) dels reactors de llit empaquet és suficientment petita. Per tant, els nivells de reproductibilitat són acceptables i es pot utilitzar el sistema experimental en la comparació del desenvolupament de biofilms en aigües d'origen diferent, per comparar la colonització de diferents materials o variant certes condicions ambientals o hidrodinàmiques.



**Figura 2.22.** Distribució dels recomptes de viables transformats logarítmicament (R2A, 22°C-7 dies) dels biofilms formats al medi porós dels reactors de llit empaquet, després de 65 dies de contacte amb l'aigua del pou d'Alfons el Magnànim (Sant Martí, Besós). La línia marca la corba normal.

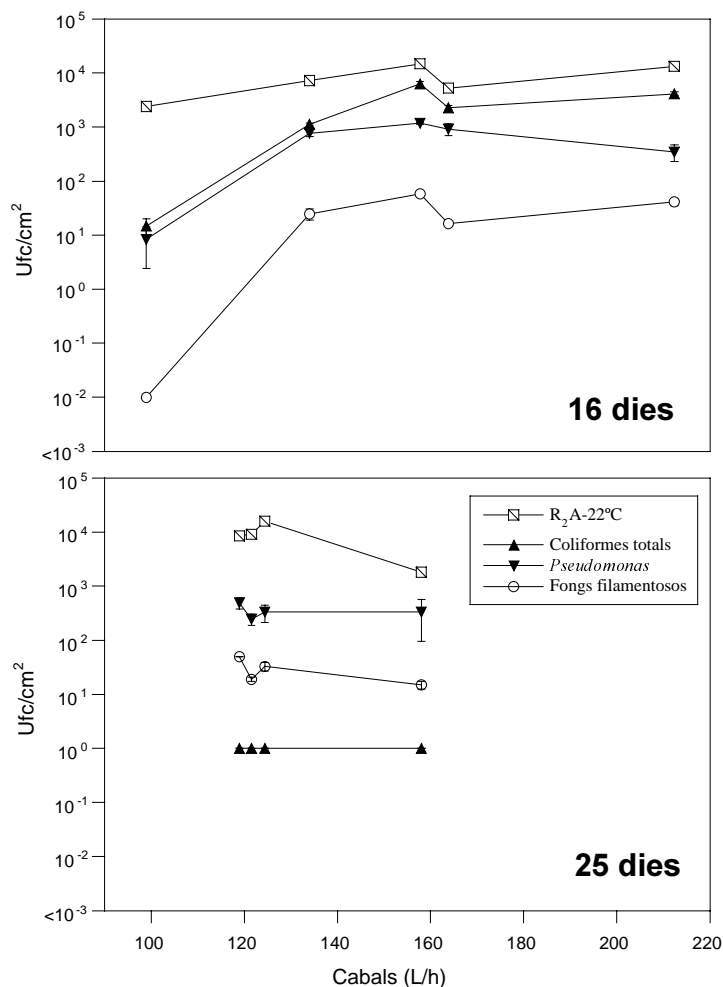
### 2.3.6. Efecte de l'estrès de cisalla

S'ha estudiat la influència de diferents règims del flux en la colonització microbiana del material de suport. S'han sotmès 10 reactors de llit empaquet d'igual porositat a diferents velocitats del flux a partir de l'aigua subterrània de la mina de Ribatallada, a l'estació de CASSA a Sabadell, gràcies al sistema experimental descrit a la Figura 2.12. La progressió del desenvolupament del biofilm s'ha quantificat realitzant recomptes de viables en diferents medis de cultiu de la forma habitual (veure 3.2.4), per determinar el nombre de bacteris totals (Agar R2A-22°C), coliformes totals (Agar Chromocult-35°C), *Pseudomonas* (Agar GSP-22°C) i fongs filamentosos (Agar Sabouraud + gentamicina).

En biofilms joves l'increment del cabal ha afavorit la colonització microbiana del material de suport dels reactors (Figura 2.23-part superior). De fet, després de 16 dies de contacte amb l'aigua freàtica la colonització del medi de suport dels reactors ha estat significativament més gran en augmentar el cabal en els bacteris totals ( $P < 0,001$ ), *Pseudomonas* ( $P = 0,008$ ), coliformes totals ( $P < 0,001$ ) i fongs filamentosos ( $P < 0,001$ ).

De forma coincident en tots els grups de microorganismes s'ha observat un increment del desenvolupament del biofilm en augmentar el cabal de 100 a 160 L/h. Posteriorment, s'ha observat un valor llindar de cabal (160 L/h-11,22 N m<sup>-2</sup>), per sota del qual s'afavoreix el desenvolupament del biofilm. Per sobre d'aquest valor llindar s'ha produït un període desfavorable per a la colonització (0,5 log de reducció). Aquesta etapa ha desaparegut posteriorment en augmentar encara més el cabal fins a 210 L/h (variant l'esforç de cisalla de 11,22 N m<sup>-2</sup> a 19,33 N m<sup>-2</sup>), restituint els valors de colonització presents a nivells inferiors de cabal, per sota del punt d'inflexió als 160 L/h.

El cabal no ha presentat el mateix efecte en biofilms desenvolupats després de 25 dies de contacte amb l'aigua freàtica (Figura 2.23-part inferior). En les mateixes condicions hidrodinàmiques i amb el mateix esforç de cisalla, l'efecte d'aquest en contra de la colonització microbiana i el desenvolupament dels biofilms ha estat major en augmentar el temps d'exposició. Així, en el rang de cabals estudiats no s'han observat increments significatius en la colonització, més aviat els nivells han tendit a mantenir-se o a disminuir lleugerament.



**Figura 2.23.** Efecte del règim del flux (variació del cabal) en la colonització microbiana del medi de suport dels reactors de llit empaquetat.



**Taula 2.13.** Variació dels paràmetres hidrodinàmics als reactors de llit empaquet (porositat = 0,5288, esferes de 5 mm de diàmetre com a medi de suport), al variar el cabal.

Cabal (L/h)	Permeabilitat (cm s <sup>-1</sup> )	Reynolds	h <sub>r</sub> (m)	Esforç Cisalla (N m <sup>-2</sup> )
100	11,73	1493,28	0,16	4,38
120	9,78	1791,94	0,23	6,31
135	8,69	2015,93	0,29	7,99
160	7,33	2389,25	0,40	11,22
210	5,59	3135,89	0,69	19,33

D'altra banda, en alguns grups microbians estudiats els nivells màxims han estat força diferents en els dos casos (16 i 25 dies). Cal destacar la disminució observada en els bacteris heteròtrofs (de  $1,59 \times 10^4$  ufc cm<sup>-2</sup> als 16 dies a  $1,83 \times 10^3$  ufc cm<sup>-2</sup> als 25 dies), i en els coliformes totals ( $6,37 \times 10^3$  ufc cm<sup>-2</sup> als 16 dies, per  $1,00 \times 10^0$  ufc cm<sup>-2</sup> després de 25 dies).

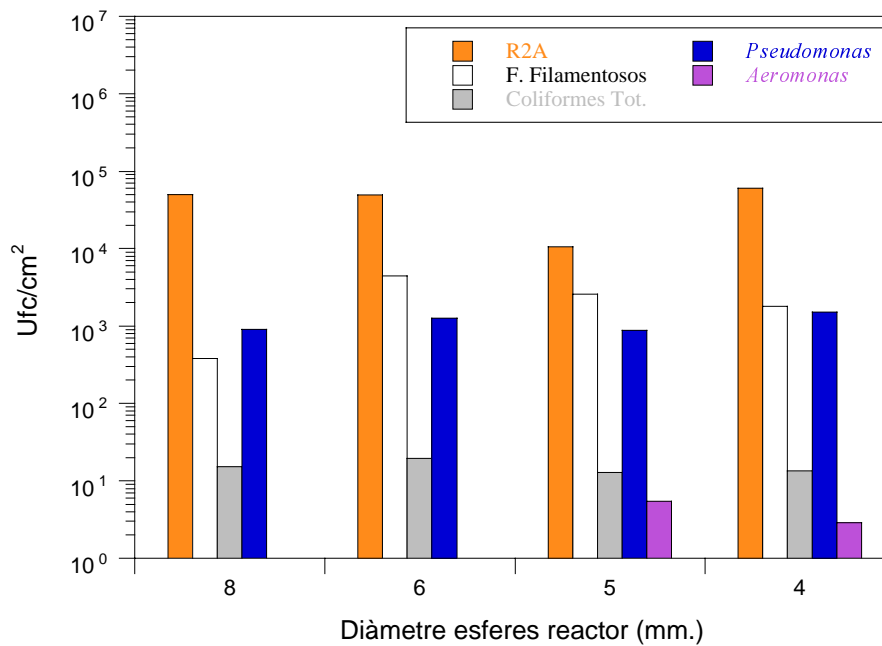
En segon lloc, s'han adaptat 4 reactors de llit empaquet amb porositats diferents en un sistema en sèrie (Figura 2.13), i s'han deixat 30 dies en contacte amb l'aigua de la mina de Ribatallada, a l'estació experimental de CASSA a Sabadell. La Taula 2.14 mostra la variació dels principals paràmetres hidrodinàmics a cada un dels 4 reactors disposats en sèrie.

El nombre de bacteris heteròtrofs (incubació en R2A, 22°C) ha mantingut uns valors similars a tots els reactors, exceptuant una lleugera disminució al tercer reactor (Figura 2.24) que no ha estat significativa ( $P > 0,5$ ). El mateix ha passat en els altres grups microbians estudiats, com *Pseudomonas* i coliformes totals, on tampoc s'han observat diferències significatives entre els diferents reactors, malgrat que els nivells més alts s'han presentat al segon reactor, format per esferes de 6 mm de diàmetre com a medi de suport.

Sembla clar que el rang de porositats utilitzat en aquest sistema (de 0,5206 a 0,6001) no ha estat el suficientment ampli com per variar de forma significativa les condicions hidrodinàmiques del sistema, tal com s'aprecia a la Taula 2.14. D'altra banda les condicions experimentals utilitzades en aquest cas han mantingut un mateix esforç de cisalla a tots els reactors. Per aquest motiu, no era d'esperar l'existència de diferències significatives entre els diferents paràmetres microbiològics estudiats.

**Taula 2.14.** Variació dels paràmetres hidrodinàmics als reactors de llit empaquet connectats en sèrie.

Reactor	∅ esferes (mm.)	Porositat	K (cm s <sup>-1</sup> )	Reynolds	h <sub>r</sub> (m)	Esf. cisalla (N m <sup>-2</sup> )
1	8	0,6001	8,89	3518,88	0,37	17,53
2	6	0,5677	7,37	3255,16	0,47	17,53
3	5	0,5288	5,86	2986,56	0,63	17,53
4	4	0,5206	5,59	2935,35	0,67	17,53



**Figura 2.24.** Desenvolupament de biofilm en reactors connectats en sèrie de diferent porositat, als 30 dies d'exposició a l'aigua freàtica de la mina de Ribatallada (estació experimental de CASSA, a Sabadell).

### 2.3.7. Influència del biofilm en la hidrodinàmica del medi porós

A partir de les dades obtingudes amb microscòpia confocal també ha estat possible determinar l'àrea específica del biofilm al reactor (veure 2.1.3 i eq. 2.31). Per fer-ho, és necessari conèixer el gruix mitjà del biofilm ( $L_f$ ) mesurat microscòpicament (veure 4.2.3), la porositat mitjana pel llit empaquetat net sense biofilm ( $\epsilon_0$ ) determinada volumètricament (veure 2.1.3), el radi de les esferes ( $R_p$ ) i el nombre d'esferes en contacte amb una determinada esfera ( $n$ ). S'han realitzat els càlculs de l'àrea específica on el biofilm pot créixer per unitat de volum del reactor (Taula 2.15), agafant els valors per als dos sistemes més freqüents d'empaquetament, amb  $n=6$  per a un empaquetament regular i  $n=12$  per a un empaquetament romboèdric (veure 2.1.3). D'altra banda, utilitzant l'equació 2.30 es pot determinar la porositat mitjana del llit empaquetat amb biofilm,  $\epsilon_f$ .

**Taula 2.15.** Àrea específica del biofilm i porositat mitjana del reactor de llit empaquetat ple d'esferes de 5 mm de diàmetre com a medi de suport (Estació experimental de Sant Martí, porositat = 0,5288).

Temps exp. (dies)	Gruix (m)	Nombre de Coordinació	Àrea específica	Porositat amb biofilm
27	4,46E-06	6	282,47	0,52754
65	6,04E-06	6	282,38	0,52709
92	1,02E-05	6	282,14	0,52593
27	4,46E-06	12	281,71	0,52754
65	6,04E-06	12	281,35	0,52710
92	1,02E-05	12	280,42	0,52594

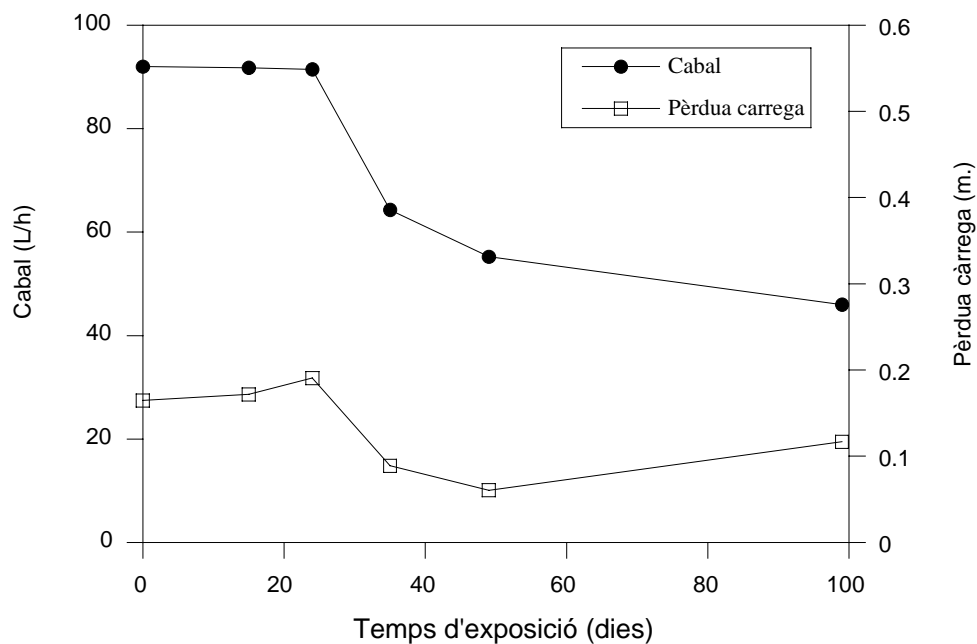
L'acumulació del biofilm en els reactors de llit empaquet ha resultat en una disminució significativa ( $P=0,03$ ) de la porositat mitjana (Taula 2.15). Agafant el nombre de coordinació per a un empaquetament compacte ( $n=12$ ), a partir d'un valor inicial mesurat volumètricament de 0,5288, la presència del biofilm ha fet disminuir la porositat del seu valor inicial fins a 0,5275 als 27 dies, 0,5271 als 65 dies i 0,5259 al final del temps d'exposició de 92 dies.

En segon lloc, es va mesurar el cabal i la pèrdua de càrrega produïda en un reactor de llit empaquet, en un experiment que es va realitzar durant 100 dies amb aigua de la mina de Ribatallada (estació experimental de CASSA a Sabadell), de la mateixa forma que el muntatge experimental de la Figura 2.7. La metodologia emprada ha estat el suficientment sensible com per captar diferències al llarg del temps en la pèrdua de càrrega.

En primer lloc cal observar que el cabal ha sofert una disminució al llarg del temps, encara que aquesta no ha estat significativa ( $P=0,05$ ). Durant els primers 25 dies el cabal s'ha mantingut pràcticament sense variacions (de 91,75 a 91,50 L/h). A partir d'aquest moment en canvi, el cabal ha anat davallant fins a 64,31 L/h als 35 dies, 55,25 L/h als 50 dies, arribant als 45,97 L/h al final de l'experiment (100 dies). És evident que mantenint la baixada del cabal de sortida del reactor s'ha d'atribuir a la formació del biofilm, el qual ajuda a produir l'obturació dels reactors disminuint la seva capacitat de transport. Considerant que el captor de pressió permet la mesura de diferències de pèrdua de càrrega en les condicions experimentals utilitzades, un augment en la pèrdua de càrrega mesurada ens podria indicar l'increment de la colonització microbiana dels reactors, sempre que es pugui assegurar un mateix cabal tant a l'entrada com a la sortida del reactor.

En aquest sentit, sembla evident que la colonització microbiana als reactors de llit empaquet pot arribar a modificar el seu règim hidràulic, incrementant la pèrdua de càrrega que es produeix al sistema. Així, en els períodes on el cabal s'ha mantingut pràcticament constant (veure Figura 2.25), durant els primers 25 dies de l'experiment i dels 50 als 100 dies de contacte, s'ha observat com la pèrdua de càrrega ha augmentat.

És evident que la reducció del cabal pot haver afectat a la pèrdua de càrrega, disminuint-ne el seu valor ( $r=0,836$ ). Així, dels 25 als 35 dies d'exposició a l'aigua freàtica la pèrdua de càrrega va disminuir 0,1 m (de 0,19 a 0,09 m), arribant a un mínim de 0,06 m als 50 dies (veure Figura 2.25).



**Figura 2.25.** Evolució al llarg del temps de la pèrdua de càrrega i el cabal. Variació d'aquests paràmetres amb el desenvolupament del biofilm, al llarg del temps d'exposició a l'aigua freàtica de l'estació experimental de CASSA a Sabadell.

## 2.4. Discussió

### 2.4.1. Idoneïtat de la tècnica utilitzada

El sistema experimental per al mostreig i la monitorització de la formació de biofilms en sistemes aquàtics ha permès el desenvolupament de biofilms model a la superfície de suports inerts de característiques ben definides. L'aplicació d'aquest sistema en experiments de calibratge al laboratori i en experiments de camp en diferents zones de mostreig, ha permès analitzar els avantatges i limitacions de l'aplicació de la tècnica in situ:

1. *El sistema experimental permet obtenir el màxim de mostra de biofilm amb el mínim espai necessari.* La configuració en llit empaquetat fix permet la producció de biofilms obtenint el màxim de superfície de mostreig en el mínim espai possible. Això és especialment important per als experiments de camp, on l'espai es converteix sovint en un factor limitant. En aquest aspecte, la premissa general ha estat obtenir un sistema que ocupés el mínim d'espai, per facilitar la seva instal·lació i utilització. Per aquest motiu, s'ha triat un reactor de llit empaquetat format per un tub de 1/2" (1,580 cm) de diàmetre i una longitud total de 6,9 cm, ple d'esferes de vidre de 5 mm de diàmetre com a medi de suport estàndard. D'aquesta forma s'obté un mostrejador petit però alhora amb una gran superfície de mostreig, manejable, que es pot esterilitzar fàcilment a l'autoclau i que es pot situar en espais reduïts. La gran superfície de deposició que presenten les esferes que constitueixen el medi de suport (90,321 cm<sup>2</sup> per mostrejador, tenint en compte només el material de suport), augmenta la capacitat de formació dels biofilms dins del reactor de llit empaquetat, alhora que s'obtenen mostres més grans que les obtingudes amb sistemes similars formats per sistemes de canonada. De fet, el medi porós ofereix una superfície de creixement força més gran que una canonada, ja que a la superfície mullada del reactor s'ha d'incloure la superfície de totes les esferes que integren el medi de suport. El reactor estàndard utilitzat, amb esferes de 5 mm de diàmetre i tuberia de 1/2", presenta una longitud equivalent de 18,2 cm quan s'agafa només l'àrea de deposició útil, és a dir, la superfície de les esferes. D'altra banda, l'establiment d'un temps de residència el suficientment curt impedeix el creixement de cèl·lules planctòniques dins del reactor, a no ser que s'adhereixin a la superfície del medi de suport.
2. *Les característiques específiques del sistema s'han optimitzat pel treball de camp.* Una de les especificacions clares del sistema experimental havia d'ésser la limitació en quan a la grandària. S'ha dissenyat i construït un reactor el suficientment petit com per facilitar la seva manipulació i instal·lació en experiments de camp, així com per reduir al màxim els cabals d'aigua a utilitzar. De fet, el nombre de mostrejadors no pot ser molt elevat perquè augmentarien les dimensions del sistema així com el cabal necessari per mantenir les mateixes condicions hidrodinàmiques.
3. *La configuració en llit empaquetat fix permet la producció de biofilms controlant el gradient de velocitats.* El gradient de velocitats no és homogeni en el medi porós com ho és a les canonades, malgrat que en un sistema de distribució real tampoc s'estableix un gradient homogeni de velocitats al llarg del temps, variant segons l'hora del dia i l'època de l'any (o els dies de la setmana). En petites xarxes de reg per jardins, les oscil·lacions de la velocitat al llarg del temps encara poden ser més importants. En el nostre sistema, la variació del cabal d'entrada permet obtenir el gradient de velocitats adequat –semblant al que s'estableix en una canonada –, una vegada s'ha escollit la porositat del reactor. En les cinètiques de colonització, una vegada conegut el règim de flux necessari per obtenir una velocitat determinada dins del reactor, s'ha mantingut fix el cabal d'entrada durant tot el temps de l'experiment. En aquests experiments realitzats a cabal constant, el principal paràmetre a controlar ha estat el cabal. S'ha optat per escollir el medi de bombament idoni utilitzant les bombes que presentaven menys oscil·lacions brusques de cabal. Així mateix, s'ha controlat el cabal del sistema i el de cada reactor amb vàlvules d'esfera, mesurant-se de forma volumètrica.

4. *Les condicions hidrodinàmiques dins del reactor/mostrejador no s'han d'allunyar de les que es troben habitualment a l'interior de canonades.* El sistema experimental havia de simular al màxim les condicions que es poden produir a qualsevol xarxa de distribució d'aigua. De forma rutinària s'ha mantingut un règim de flux turbulent dins del sistema experimental, perquè aquest règim és força més rellevant hidrodinàmicament que el flux laminar en sistemes de distribució d'aigua i a la indústria. Les condicions d'utilització al camp habituals per cada reactor (cabal de 125 L/h i velocitat mitjana de 0,335 m/s), han establert d'entrada un flux turbulent a través del medi porós, amb un nombre de Reynolds porós de 1866,6 i una pèrdua de càrrega de 0,25 m, condicions que resulten en un esforç de cisalla de 6,85 N m<sup>-2</sup> per cada reactor de llit empaquet utilitzat. La presència del medi de suport a l'interior del reactor de llit empaquet amb zones on es troben de forma simultània porus estrets i velocitats elevades, i zones amb porus amples i baixes velocitats, permet simular en geometria i flux continu el comportament d'una canonada al llarg del temps. En aquest sentit, la velocitat -expressada generalment com a velocitat superficial- i l'esforç de cisalla són els que estableixen la similitud hidràulica. Així, un esforç de cisalla de 6,85 N m<sup>-2</sup> al medi porós ofereix unes condicions hidrodinàmiques que engloben les que es poden trobar a les canonades de les xarxes de distribució urbanes i domiciliàries, amb uns valors de velocitat de l'aigua entre 1,25-1,50 m s<sup>-1</sup>. D'altra banda, la pèrdua de càrrega obtinguda en els reactors de llit empaquet no és significativa enfront de les condicions reals existents als sistemes de distribució d'aigua, ni resulta un valor limitant per les bombes d'extracció d'aigua disponibles al mercat.
5. *El sistema experimental ha d'assegurar al màxim la reproductibilitat en la recuperació del biofilm del medi de suport.* S'ha procurat dissenyar el sistema i la metodologia experimental utilitzada de forma que la recuperació dels biofilms es produís sota les mateixes condicions. Tot i això, és inevitable que es produeixin certes variacions, atribuïbles sobretot a canvis en les condicions ambientals de l'aigua al llarg de l'any. La diferència en el recompte dels microorganismes a partir de les diferents rèpliques de les mostres de biofilm –de reactors exposats de forma simultània durant el mateix període de temps, i en les mateixes condicions ambientals- ha estat mínima en la majoria dels casos, suggerint que els efectes acumulatius dels diferents errors produïts durant tot el procés són pràcticament negligibles. Per tant, els nivells de reproductibilitat són acceptables i es pot utilitzar el sistema experimental en la comparació del desenvolupament de biofilms en aigües d'origen diferent.
6. *S'han ajustat les dades hidrodinàmiques obtingudes a partir dels reactors de llit empaquet a un model teòric.* Per poder determinar les condicions hidràuliques reals dels reactors de llit empaquet es van realitzar una sèrie d'assajos de calibratge al laboratori, quantificant la pèrdua de càrrega que es produeix al sistema experimental format pels reactors de llit empaquet. Els valors de pèrdua de càrrega mesurats pel reactor i pel medi porós han concordat en gran mesura amb els valors teòrics. D'altra banda, la connexió de diferents reactors en paral·lel pràcticament no varia el comportament de cada un dels reactors individuals.
7. *El medi de suport i els altres elements del reactor i del sistema experimental no han de modificar de manera significativa el desenvolupament del biofilm.* En aquest sentit, el material a utilitzar no ha d'alterar la formació natural dels biofilms incrementant el desenvolupament dels biofilms o perjudicant el creixement microbià per la presència de productes tòxics. Per aquest motiu, s'han desestimat la majoria de materials plàstics pels problemes que presenten en alliberar partícules orgàniques que poden ser utilitzades per microorganismes del biofilm, augmentant de forma significativa el seu desenvolupament. Tampoc s'han utilitzat elements de coure, ja que poden presentar un cert efecte antimicrobià i redueixen la capacitat d'adherència (Assanta et al. 1998). Com que tant les parets internes com les externes estan en contacte permanent amb l'aigua, s'ha escollit l'acer inoxidable austenític AISI 316 com a material dels reactors per la seva gran resistència a la corrosió, a agents químics com el clor, per suportar bé les condicions d'esterilització per calor amb l'autoclau i per tractar-se d'un material relativament hidrofílic (Sommer et al. 1999). D'altra banda, el vidre no afavoreix especialment el creixement dels microorganismes, malgrat que es tracta d'un material assequible, econòmic i molt adequat per poder comparar el desenvolupament dels biofilms, ja que ha estat un dels materials més utilitzats per estudiar

l'adherència microbiana a superfícies. En l'experiment de calibratge realitzat, la colonització pels bacteris heteròtrofs en el vidre ha estat aproximadament 10 vegades inferior a l'obtinguda en l'ABS o l'acer-crom, i lleugerament superior a l'acer inoxidable, encara que els nivells trobats en el vidre han estat el suficientment alts ( $1,13 \times 10^3$  ufc  $\text{cm}^{-2}$ ) com per poder quantificar el desenvolupament del biofilm. D'altra banda, l'elevat ratio de colonització del vidre respecte dels coliformes totals -200 vegades més gran que l'acer-inoxidable, 30 vegades major que l'ABS i fins i tot 20 vegades major que l'acer-crom-, augmenta encara més el valor d'aquest material com a suport amb una sensibilitat adequada per a l'estudi del desenvolupament de biofilms en reactors de llit empacat.

8. *El processat previ ha de recuperar el màxim de biofilm sense alterar les mostres.* En primer lloc, s'ha realitzat un rentat per separar els microorganismes planctònics que no estaven adherits de forma irreversible a sobre del material de suport. Dels tres tipus de rentats que s'han provat s'ha escollit el tractament més senzill i ràpid d'executar i, alhora, el que ha presentat una major capacitat per separar els microorganismes planctònics adherits de forma reversible. Tanmateix, el nombre de microorganismes no adherits que es perden degut al rentat no ha superat en cap cas el 6% respecte del total de viables adherits al medi de suport. Després del rentat, les mostres s'han sotmès a un bany d'ultrasons per separar els microorganismes del material de suport, analitzant-se el líquid resultant de la forma habitual. S'han seguit les recomanacions del Grup Europeu d'Estudi de les Biomasses Adherides, realitzant una única sonicació de les mostres durant 3 minuts.

#### 2.4.2. Efecte de l'estrès de cisalla

L'esforç o estrès de cisalla augmenta amb la velocitat de l'aigua que circula pel reactor, influint negativament sobre la formació dels biofilms i afectant el transport de nutrients i la unió i separació de les cèl·lules damunt la superfície. Amb 16 dies de contacte amb l'aigua i de forma coincident en tots els grups de microorganismes s'ha observat un valor llindar de cabal ( $160 \text{ L/h}$ - $11,22 \text{ N m}^{-2}$ ), per sota del qual s'afavoreix el desenvolupament del biofilm. Per sobre d'aquest valor llindar s'ha produït un període desfavorable per a la colonització, que ha desaparegut posteriorment en augmentar encara més el cabal fins a  $210 \text{ L/h}$  (variant l'esforç de cisalla de  $11,22 \text{ N m}^{-2}$  a  $19,33 \text{ N m}^{-2}$ ).

És evident que l'augment inicial del cabal produeix un increment en el nombre de cèl·lules planctòniques que es poden adherir al material de suport, així com en els nutrients que arriben al biofilm. De fet, ja s'ha comentat anteriorment com l'acció del flux ajuda a mantenir la reposició de nutrients necessaris per sostenir el creixement de les cèl·lules que formen part del biofilm. Sovint l'esforç de cisalla incrementa de forma significativa la utilització de diferents macromolècules (Confer & Logan 1991).

Tanmateix, és indubtable que en les condicions experimentals utilitzades on ha predominat el flux turbulent, en biofilms joves o pioners el transport de nutrients és el factor limitant primordial. En aquest sentit, l'augment del cabal per sobre d'un determinat nivell incrementarà indubtablement el transport de substàncies nutritives, però alhora incrementarà de forma important la separació de cèl·lules que ja formen part del biofilm. El punt d'inflexió trobat podria respondre per tant a un augment de la separació cel·lular del medi de suport. L'increment del cabal per sobre del llindar incrementa o manté els nivells de colonització, perquè el major nombre de cèl·lules i nutrients que arriben al biofilm podrien contrarestar l'efecte de la separació cel·lular.

Aquests valors no s'han obtingut amb 25 dies de contacte. L'efecte continuat de la velocitat del flux sembla haver presentar un major efecte reduint la colonització microbiana als 25 dies que no pas als 16. Per tant, en les mateixes condicions hidrodinàmiques i amb el mateix esforç de cisalla, l'efecte d'aquest en contra de la colonització microbiana i el desenvolupament dels biofilms ha estat major en augmentar el temps d'exposició. Per tant, en biofilms que ja han passat la fase pionera de colonització, l'efecte del flux afavorint l'erosió passa a ser el factor limitant principal en el desenvolupament dels biofilms.

### 2.4.3. Influència del biofilm en la hidrodinàmica del medi porós

El desenvolupament del biofilm en el reactor de llit empaquet i la seva acumulació en el medi porós ha resultat en una disminució significativa de la porositat mitjana al llarg del temps. Aquesta reducció de l'espai de porus lliures pot afectar les característiques hidrodinàmiques del medi.

De fet, la influència del biofilm en el règim hidràulic també s'ha determinat mesurant in situ la pèrdua de càrrega que es produeix al reactor de llit empaquet per la pròpia formació del biofilm. Sempre que es mantingui el mateix cabal tant a l'entrada com a la sortida del reactor, un augment en la pèrdua de càrrega mesurada del reactor ens podria indicar l'increment de la colonització microbiana dels reactors. En l'experiment realitzat a l'estació de CASSA (Sabadell) a partir de l'aigua freàtica de la mina de Ribatallada, la pèrdua de càrrega s'ha incrementat durant els primers 25 dies de contacte, quan el cabal s'ha mantingut pràcticament constant. També ha augmentat posteriorment dels 50 als 100 dies de contacte, malgrat una lleugera reducció del cabal.

En aquest sentit, sembla evident que la colonització microbiana als reactors de llit empaquet pot arribar a modificar el seu règim hidràulic, incrementant la pèrdua de càrrega que es produeix al sistema. La detecció d'aquest fenomen és possible de forma relativament simple, mesurant la pèrdua de càrrega amb un captor de pressió.

Tanmateix, la formació del biofilm també pot arribar a alterar el cabal inicial, disminuint-lo al produir-se l'obturació dels reactors. Altres autors ja han comentat prèviament com els biofilms tenen un efecte directe en el flux incrementant el fregament del sistema i disminuint el flux a les canonades (Brading et al. 1995). Això pot suposar un problema quan es pretenen realitzar cinètiques de colonització a temps llargs. Seria interessant poder establir un temps determinat, per sota del qual el reactor manté el mateix règim de flux malgrat la colonització. Això implicaria segurament, establir aquest temps de saturació estàndard pel reactor i mostrejar sempre en aquestes condicions, malgrat que no s'hagi arribat a la fase estacionària de desenvolupament.

## 2.5. Bibliografía

- Alonso, C., Suidan, M.T., Sorial, G.A., Smith, L., Biswas, P., Smith, P.J. & R. Brenner. 1997. Gas treatment in trickle-bed biofilters: biomass, how much is enough?. *Biotechnol. Bioeng.* 54(6): 583-593.
- Assanta, M.A., Roy, D. & D. Montpetit. 1998. Adhesion of *Aeromonas hydrophila* to water distribution system pipes after diferent contact times. *J. Food Protection.* 61(10): 1321-1329.
- Bear, J. 1972. *Dynamics of fluids in porous media.* Dover Pub. New York.
- Brading, M.G., Jass, J. & H.M. Lappin-Scott. 1995. Dynamics of bacterial biofilm formation. In *Microbial Biofilms*, ed. H.M. Lappin-Scott & J.W. Costerton. pp. 46-63. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- Bryers, J. & W.G. Characklis. 1981. Early fouling biofilm formation in a turbulent flow system: overall kinetics. *Wat. Res.*, 15, 483-491.
- Camper, A.K., LeChevallier, M.W., Broadaway, S.C. & G.A. McFeters. 1985. Evaluation of procedures to desorb bacteria from granular activated carbon. *J. Microbiol. Meth.* 3:187-198.
- Characklis, W.G. & K.C. Marshall. 1990. *Biofilms.* New York: Wiley.
- Characklis, W.G., McFeters, G.A. & K.C. Marshall. 1990. Physiological ecology in biofilm systems. In *Biofilms*, ed. W.G. Characklis & K.C. Marshall, pp. 341-393. New York, Wiley.
- Confer, D.R. & B.E. Logan. 1991. Increased bacterial uptake of macromolecular substances with fluid shear. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3093-3100.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D., Korber, D. & H.M. Lappin-Scott. 1995. *Microbial Biofilms.* Annu. Rev. Microbiol. 49:711-745.
- Crane. 1989. *Flujo de fluidos en válvulas, accesorios y tuberías.* McGraw-Hill. México.
- Cunningham, A.B., Characklis, W.G., Abedeen, F. & D. Crawford. 1991. Influence of biofilm accumulation on porous media hydrodynamics. *Env. Sci. Technol.* 25(7): 1305-1310.
- de Beer, D., Stoodley, P. & Z. Lewandowski. 1994. Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 44:636-641.
- de Nevers, N. 1991. *Fluid mechanics for chemical engineers.* 2<sup>nd</sup>. ed. McGraw-Hill. New York.
- Daugherty, R.L. & A.C. Ingersoll. 1954. *Fluid mechanics with engineering applications.* Int. Student ed. 5<sup>th</sup>. ed. McGraw-Hill.
- Domek, M.J., LeChevallier, M.W., Cameron, S.C. & G.A. McFeters. 1984. Evidence for the role of copper in the injury process of coliform bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 48(2): 289-293.
- Ergun, S. 1952. *Chem. Eng. Progress.* 48, 89.
- Goodfellow. 1996. *Goodfellow, Catalogue 1996/1997.* Goodfellow Cambridge Ltd.
- Keevil, C.W., Rogers, J. & J.T. Walker. 1995. Potable-water biofilms. *Microbiol. Eur.* 3(6):10-14.
- Leva, M. 1959. *Fluidization.* McGraw-Hill Series in Chemical Engineering. McGraw-Hill, New York.
- Levy, Y. c/o Chairman. 1997. Standard method to evaluate aquatic biofilms. *In International Conference on Biofilms in Aquatic Systems*, 1997, Warwick, UK.
- Lewandowsky, Z. & P. Stoodley. 1995. Flow induced vibrations, drag force and pressure drop in conduits covered with biofilm. *Wat. Sci. Tech.*, 32, 8, 19-26.
- Mayol, J.Ma. 1997a. *Tuberías. Tomo I: Materiales, cálculos, hidráulicos, cálculos mecánicos.* 2a. ed. Colección Obras Hidráulicas. Bellisco, Madrid.
- Mayol, J.Ma. 1983. *Tuberías. Tomo II: Instalaciones de conducción, distribución y saneamiento. Aplicaciones de cálculo por ordenador.* Editores Técnicos Asociados, Barcelona.
- Mayol, J.Ma. 1997b. *Tuberías. Tomo III: Economía de las instalaciones, montajes, anexos y tablas.* 2a. ed. Colección Obras Hidráulicas. Bellisco, Madrid.
- Middleman, S. 1998. *An introduction to fluid dynamics. Principles of analysis and design.* John Wiley & Sons. New York.
- Munson, B.R., Young, D.F. & T.H. Okiishi. 1990. Viscous flow in pipes. In *Fundamentals of fluid mechanics.* Ed. B.R. Munson, pp. 465-559. Wiley. New York.



- Petzoldt, H. 1993. Investigation of biofilm development in different systems. *In Quantification of fixed biofilm*. Technical Report, Technology Centre Kalsruhe.
- Peyton, B.M. & W.G. Characklis. 1993. A statistical analysis of the effect of substrate utilization and shear stress on the kinetics of biofilm detachment. *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 728-735.
- Piriou, P. 1997. Protocol to compare the efficiency of 3 technics (direct-ultrasound-sand) for biofilm measurement. Raport intern, 6è protocol, Grup Europeu de Treball de l'Estudi de les Biomasses Adherides.
- Sommer, P., Martin-Rouas, C. & E. Mettler. 1999. Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination. *Food Microbiol.* 16: 503-515.
- Sotelo, G. 1994. *Hidráulica General*. Vol. 1. Fundamentos. Ed. Limusa-Noriega Editores. México.
- Steel, E.W. 1972. *Abastecimiento de agua y alcantarillado*. 4a. ed. Ed. Gustavo-Gili.
- Stoodley, P., Cunningham, A., Lewandowski, Z., Boyle, J. & H. Lappin-Scott. 1993. Biofilm structure and influence on biofouling under laminar and turbulent flows. Center of Biofilm Engineering Report.
- Tchobanoglous, G. 1969. A study of the filtration of treated sewage effluent. Doctoral dissertation. Stanford University, Palo Alto, Ca.
- Zelver, N., Characklis, W.G., Robinson, J.A., Roe, F.L., Dicit, Z., Chapple, K. & A. Ribaudó. 1984. Tube material, fluid velocity, surface temperature and fouling: a field study. Report. Cooling Tower Institute, Houston.