

UNIVERSIDAD DE GRANADA



INSTITUTO DEL AGUA

**ELIMINACIÓN DE METALES PESADOS DE AGUAS
SUBTERRÁNEAS MEDIANTE SISTEMAS DE LECHOS
SUMERGIDOS:
ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS BIOPELÍCULAS**

TESIS DOCTORAL

**RAMIRO VÍLCHEZ VARGAS
2005**

UNIVERSIDAD DE GRANADA



INSTITUTO DEL AGUA

**ELIMINACIÓN DE METALES PESADOS DE AGUAS
SUBTERRÁNEAS MEDIANTE SISTEMAS DE LECHOS
SUMERGIDOS:
ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS BIOPELÍCULAS**

TESIS DOCTORAL

RAMIRO VÍLCHEZ VARGAS
2005

UNIVERSIDAD DE GRANADA

INSTITUTO DEL AGUA

**ELIMINACIÓN DE METALES PESADOS DE AGUAS
SUBTERRÁNEAS MEDIANTE SISTEMAS DE LECHOS
SUMERGIDOS:
ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS BIOPELÍCULAS**

Memoria para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias por Ramiro Vílchez
Vargas, Licenciado en Ciencias (Químicas):

Ramiro Vílchez Vargas

DIRECTORES

Dña. M^a Belén Rodelas González
Investigadora del Programa Ramón y Cajal
Departamento de Microbiología
Instituto del Agua
Universidad de Granada

Dr. D. Jesús J. González López
Catedrático de Microbiología
Departamento de Microbiología
Instituto del Agua
Universidad de Granada

GRANADA 2005

| | |
|---|----|
| ÍNDICE..... | i |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.- Metales pesados como contaminantes..... | 4 |
| 2.- Toxicidad de los metales pesados: Empleo de biomarcadores..... | 5 |
| 3.- Sistemas para la eliminación de los metales pesados..... | 7 |
| 4.- Procesos de bioadsorción..... | 17 |
| 5.- Influencia de los metales pesados en el metabolismo bacteriano..... | 20 |
| 6.- Influencia del pH en la bioacumulación de metales pesados..... | 22 |
| 7.- Biopelículas Microbianas..... | 25 |
| 7.1.- Morfología de las biopelículas..... | 29 |
| 7.2.- Inducción a la formación de biopelículas..... | 34 |
| 7.3.- Las biopelículas como mecanismo de biorresistencia..... | 36 |
| 7.4.- Composición química y microbiológica de las biopelículas..... | 37 |
| 7.5.- Biodiversidad en las biopelículas..... | 40 |
| 7.5.1.- Diversidad procariota..... | 41 |
| OBJETIVOS..... | 49 |
| MATERIAL Y MÉTODOS..... | 51 |
| 1.- Diseño del biofiltro..... | 53 |
| 1.1.- Ubicación de la planta piloto y descripción del biofiltro..... | 53 |
| 1.2.- Aireación..... | 54 |
| 1.3.- Caudal..... | 54 |
| 1.4.- Periodicidad en la toma del agua de pozo..... | 54 |
| 1.5.- Lavado del sistema..... | 55 |
| 2.- Análisis del agua de pozo..... | 55 |

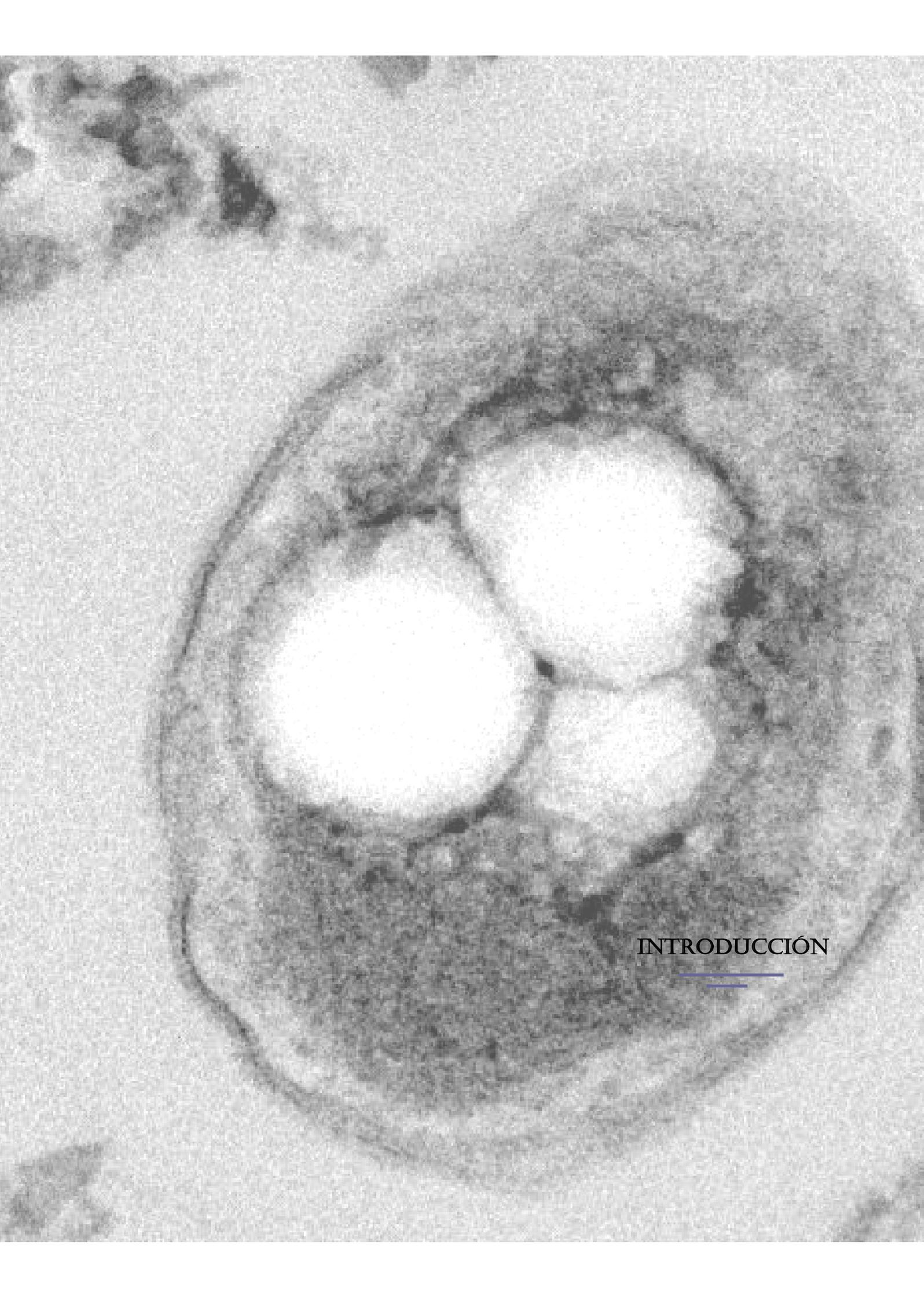
| | |
|---|----|
| 2.1.- Determinaciones biológicas..... | 55 |
| 2.1.1.- Mesófilos totales..... | 55 |
| 2.1.2.- Demanda biológica de oxígeno..... | 56 |
| 2.2.- Determinaciones químicas..... | 57 |
| 2.2.1.- Demanda química de oxígeno..... | 57 |
| 2.2.2.- Determinación de fosfatos..... | 57 |
| 2.2.3.- Determinación de nitratos, nitritos, sulfatos y cloruros..... | 58 |
| 2.2.4.- Determinación del ión amonio..... | 59 |
| 2.2.5.- Determinación de metales..... | 60 |
| 2.2.5.1.- Absorción atómica por cámara de grafito..... | 60 |
| 2.2.5.2.- Absorción atómica mediante generador de hidruros..... | 61 |
| 2.2.5.3.- Emisión atómica por llama de acetileno..... | 61 |
| 2.2.5.4.- Absorción atómica por llama de acetileno..... | |
| 3.- Caracterización de influentes y efluentes..... | 62 |
| 3.1.- Determinación de sacarosa..... | 62 |
| 3.2.- Determinación de metales pesados..... | 63 |
| 4.- Análisis químico del soporte empleado como relleno en el biorreactor..... | 63 |
| 4.1.- Determinación de fosfatos..... | 63 |
| 4.2.- Determinación de metales pesados mediante absorción atómica..... | 64 |
| 4.3.- Determinación de metales pesados mediante rayos X..... | 64 |
| 5.- Caracterización de las biopelículas..... | 65 |
| 5.1.- Determinaciones químicas..... | 65 |
| 5.1.1.- Peso de volátiles en las biopelículas..... | 65 |
| 5.1.2.- Obtención y análisis del exopolímero presente en las biopelículas.... | 65 |
| 5.1.2.1.- Glúcidos totales..... | 70 |

| | |
|---|----|
| 5.1.2.2.- Proteínas totales..... | 71 |
| 5.1.2.3.- Ácidos urónicos..... | 72 |
| 5.1.2.4.- Restos acetilos..... | 73 |
| 5.1.3.- Adenosintrifosfato..... | 75 |
| 5.1.4.- Presencia o ausencia de metal pesado en la biopelícula..... | 75 |
| 5.2.- Determinaciones microbiológicas..... | 76 |
| 5.2.1.- Extracción de la biopelícula del relleno..... | 76 |
| 5.2.2.- Mesófilos..... | 76 |
| 5.2.3.- Actividades enzimáticas en la biopelícula..... | 76 |
| 5.2.3.1.- Fosfatasa ácida total..... | 77 |
| 5.2.3.2.- Fosfatasa básica total..... | 77 |
| 5.2.3.3.- Rodanasa..... | 78 |
| 5.2.3.4.- Deshidrogenasa..... | 79 |
| 5.2.3.5.- Arilsulfatasa..... | 79 |
| 5.3.- Análisis estadístico..... | 79 |
| 5.4.- Microscopía electrónica y análisis de las biopelículas por rayos X..... | 80 |
| 5.4.1.- Microscopía de barrido electrónico..... | 80 |
| 5.4.2.- Microscopía electrónica de transmisión..... | 81 |
| 5.5.- Biodiversidad: Estudios de las comunidades bacterianas presentes en las biopelículas..... | 82 |
| 5.5.1.- Extracción del ADN bacteriano..... | 82 |
| 5.5.2.- Amplificación de fragmentos del gen codificante del ARNr 16S..... | 84 |
| 5.5.3.- Concentración del producto de la PCR anidada..... | 87 |
| 5.5.4.- Separación de las muestras mediante TGGE..... | 87 |
| 5.5.5.- Reamplificación de las bandas separadas mediante TGGE..... | 89 |

| | |
|---|-----|
| 5.5.6.- Purificación y secuenciación de los fragmentos de ADN reamplificados..... | 90 |
| 5.5.7.- Análisis informático de las secuencias..... | 90 |
| 6.- Elección de los cationes..... | 91 |
| 7.- Periodicidad en las determinaciones realizadas..... | 92 |
| RESULTADOS..... | 95 |
| 1.- Determinaciones preliminares..... | 95 |
| 1.1.- Caracterización del relleno..... | 95 |
| 1.2.- Caracterización del influente..... | 96 |
| 2.- Establecimiento de los parámetros de control..... | 97 |
| 2.1.- Caudal de influente..... | 98 |
| 2.2.- Caudal de aire..... | 98 |
| 2.3.- Fuente de carbono..... | 98 |
| 2.4.- Formación de la biopelícula..... | 98 |
| 2.5.- Funcionamiento de la planta..... | 98 |
| 3.- Capacidad de eliminación de metales pesados por los biofiltros..... | 99 |
| 3.1.- Comportamiento del biofiltro en presencia de ión cúprico..... | 99 |
| 3.2.- Comportamiento del biofiltro en presencia de ión plumboso..... | 101 |
| 3.3.- Comportamiento del biofiltro en presencia de ión crómico..... | 102 |
| 3.4.- Comportamiento del biofiltro en presencia de ión <i>m</i> -arsenito..... | 103 |
| 4.- Influencia de los metales pesados sobre las características químicas y microbiológicas de las biopelículas formadas en los biofiltros..... | 104 |
| 4.1.- Peso de volátiles en las biopelículas..... | 105 |
| 4.2.- Sustancias poliméricas extracelulares en las biopelículas..... | 110 |
| 4.3.- Niveles de Adenosintrifosfato (ATP) en los microorganismos presentes en las biopelículas..... | 118 |

| | |
|---|-----|
| 4.4.- Concentración de sacarosa en los biofiltros..... | 123 |
| 4.5.- Mesófilos..... | 125 |
| 4.6.- Actividades enzimáticas..... | 129 |
| 4.7.- Análisis de correlación múltiple entre las variables estudiadas en los biofiltros..... | 134 |
| 4.7.1.- Biofiltro control..... | 134 |
| 4.7.2.- Biofiltro contaminado con cobre (II)..... | 135 |
| 4.7.3.- Biofiltro contaminado con plomo (II)..... | 136 |
| 4.7.4.- Biofiltro contaminado con cromo (III)..... | 136 |
| 4.7.5.- Biofiltro contaminado con arsénico (III) - en forma de <i>m</i> -arsenito -..... | 137 |
| 4.8.- Estudio microscópico de la estructura de las biopelículas..... | 138 |
| 4.8.1.- Características estructurales de las biopelículas formadas en el biofiltro con influente sin contaminación (biofiltro control)..... | 138 |
| 4.8.2.- Características estructurales de las biopelículas formadas en el biofiltro con influente contaminado con cobre (II)..... | 140 |
| 4.8.3.- Características estructurales de las biopelículas formadas en los biofiltros con influente contaminado con ión plomo (II)..... | 149 |
| 4.8.4.- Características estructurales de las biopelículas formadas en los biofiltros con influente contaminado con ión crómico..... | 156 |
| 4.8.5.- Características estructurales de las biopelículas formadas en los biofiltros con influente contaminado con ión <i>m</i> -arsenito..... | 160 |
| 4.9.- Estudios de biodiversidad..... | 163 |
| 4.9.1.- Amplificación y separación de fragmentos del gen codificante del ARN ribosómico 16S mediante PCR y TGGE..... | 163 |
| 4.9.1.1.- Biofiltro control..... | 163 |

| | |
|---|------------|
| 4.9.1.2.- Biofiltro con influente contaminado con cobre (II)..... | 165 |
| 4.9.1.3.- Biofiltro con influente contaminado con plomo (II)..... | 168 |
| 4.9.1.4.- Biofiltro con influente contaminado con cromo (III)..... | 170 |
| 4.9.1.5.- Biofiltro con influente contaminado con arsénico (III) (en la forma de <i>m</i> -arsenito)..... | 173 |
| 4.9.2.- Alineamientos de las secuencias parciales del ADNr 16S y árboles filogenéticos de las poblaciones microbianas desarrolladas en las biopelículas de los biofiltros estudiados..... | 175 |
| DISCUSIÓN..... | 187 |
| CONCLUSIONES..... | 203 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 205 |
| ANEXO I..... | 211 |



INTRODUCCIÓN



En los ecosistemas acuáticos y terrestres existe un aporte natural de iones metálicos que es asimilable por el medio, ya que muchos de estos elementos son necesarios para el desarrollo de los seres vivos. Elementos como el cromo, manganeso, níquel, cobalto, cobre, zinc, molibdeno, vanadio o hierro en forma de cationes más estables, participan en funciones catalíticas. Sin embargo, para que puedan ser empleados por los microorganismos deben estar a niveles traza en el medio (Erlinch, 1997). Este equilibrio se ha visto afectado por la actividad humana, debido a la cual, los aportes al medio natural de los iones metálicos se han incrementado considerablemente. Este aporte antropogénico presenta diferentes vías, entre las que destacan como mayoritarias las operaciones mineras y de fundición (Groenendijk, 1990; Costa, 1990), los vertidos de aguas residuales urbanas (Erlinch, 1997), los vertidos industriales (Kasan, 1987), los desechos de la manipulación de metales (Iñarra, 1989) y el uso de fertilizantes y pesticidas (Beiger, 1986; Basiric, 1982).

La contaminación por metales pesados puede llegar a afectar a todo tipo de ecosistemas acuáticos debido a su permanencia en el medio natural tras el vertido. Pueden alcanzar acuíferos (Zoller, 1994) por infiltración de estos compuestos, dependiendo en muchos casos de factores como el pH del medio o del propio vertido. Pueden alcanzar zonas húmedas o lagunas por escorrentía o incluso por la alimentación desde acuíferos o ríos. El transporte de estas sustancias a través del agua y su carácter recalcitrante, hace que se puedan arrastrar, alcanzando cualquier ecosistema acuático. La presencia de estos metales pesados en el agua va a condicionar su uso. Así, se puede ver afectada su utilización como captación de agua de abastecimiento, limitando recursos hídricos fundamentales en regiones semiáridas como Andalucía, puede afectar a la explotación pesquera, a los usos recreativos y como no al equilibrio del ecosistema, causando la muerte y desaparición de muchas especies.

Entre estos elementos se pueden considerar como más tóxicos el cadmio, el mercurio, el estaño, el plomo, el talio, el arsénico, el cinc, el cobre, el cromo y el níquel, los cuales presentan efectos tóxicos derivados de su acción sobre grupos funcionales vitales, desplazamiento de elementos esenciales del lugar de coordinación, modificaciones estructurales de algunos lugares activos o la ruptura de biomembranas. Todos estos efectos nocivos afectan a los seres vivos.

La inexistencia de vías naturales para la asimilación de estos compuestos (sustancias recalcitrantes) hace que se acumulen, redistribuyéndose en el medio natural e introduciéndose en la cadena trófica, donde pueden alcanzar niveles tóxicos para los seres vivos. Estos compuestos tienen notables implicaciones en la salud de los seres humanos y de

los animales, en agricultura, en los procesos biológicos y en la biotecnología (Hughes, 1989), por lo que pueden causar serios problemas medio ambientales, sociales y económicos. Los vertidos de este tipo de sustancias, independientemente de su origen, afectan negativamente a los seres vivos que componen los ecosistemas afectados, llegando incluso al ser humano a través de los productos de consumo, entre los que se encuentra el agua.

Todos estos problemas demandan una solución que pasa por descender la contaminación, la cual en muchas ocasiones se produce por causas accidentales, o eliminar los compuestos contaminantes del agua. Con este fin se han empleado diferentes tecnologías, tales como la precipitación química mediante sulfuro o hidróxidos, extracción con disolventes, electrodiálisis, intercambio iónico u ósmosis inversa (Brierley, 1986; Marañón, 1990). Todos estos sistemas son efectivos, pero algunos de ellos no son siempre adecuados y su aplicación supone un alto coste energético y de reactivos.

El uso de microorganismos como bioadsorbentes de metales pesados es una alternativa a los métodos existentes para la eliminación de estos compuestos. Dentro de este campo se han empleado microorganismos como hongos, bacterias o algas (Kapoor, 1998; Scoot, 1998), los cuales se han llegado a aplicar tanto vivos como muertos para retener este tipo de sustancias. La utilización de microorganismos para la eliminación de metales del medio natural se comenzó a aplicar hace 30 años (Broda, 1972) y hoy día se conocen qué factores, como la composición de la pared celular de los microorganismos, la composición química de la célula o los factores físico-químicos externos, juegan un papel importante en la bioacumulación de estos compuestos.

Los procesos de bioacumulación presentan ciertas ventajas frente al resto de sistemas aplicables (Parker, 1998), tales como la captura rápida y eficaz del metal, adsorción selectiva, una rápida producción de la biomasa y una reutilización de ésta a bajo coste.

Por otro lado, la bioacumulación puede llevarse a cabo tanto por microorganismos vivos o muertos, así como por productos derivados de su metabolismo tales como polisacáridos, proteínas y polifosfatos (Kambe-Hohjoh, 1997). Atendiendo a ésto, los diferentes mecanismos de bioacumulación microbiana pueden requerir metabolismo celular y por lo tanto requieren energía celular (acumulación intracelular, precipitación o reducción) o de procesos pasivos (bioadsorción, mineralización). Todos estos procesos se pueden aplicar mediante cultivos suspendidos o por sistemas de células inmovilizadas.

Los procesos de cultivo suspendidos o fangos activos, se vienen aplicando con éxito en muchos de los procesos de depuración de aguas residuales, al igual que los sistemas de células inmovilizadas o de biopelícula, sin embargo los segundos ofrecen una serie de

ventajas frente a los primeros (CEDEX, 1998), tales como una menor superficie para las instalaciones, bajo costo de montaje y funcionamiento, menor sensibilidad a los tóxicos, menor producción de ruidos y olores y la eliminación de la decantación secundaria en las instalaciones.

Por otro lado, la cantidad de biomasa activa es superior en los procesos de células inmovilizadas, ventaja que sumada a las anteriores hace al proceso de biopelícula más atractivo a la hora de eliminar sustancias como metales pesados de aguas contaminadas. En estos sistemas se hace circular el agua a través de un medio poroso, donde con anterioridad se ha desarrollado una biopelícula, responsable del proceso depurador. En bibliografía hay descritos numerosos tipos de sistemas de biopelícula, tales como: contactores biológicos, lechos fluidos, lechos agitados o filtros sumergidos, siendo estos últimos los más aceptados (Jansen, 1993).

Nuestro grupo de investigación, junto con la Cátedra de Tecnologías del Medio Ambiente (Ingeniería Civil), viene trabajando desde 1991 en la aplicación de los filtros sumergidos para la depuración de aguas residuales urbanas, aguas residuales industriales y en eliminación de nitrato de aguas subterráneas (Gómez, 1996; Hontoria, 1998; González-López, 1998). Mediante estos estudios se ha demostrado la idoneidad de estos sistemas para la depuración de una gran variedad de efluentes, lo cual nos lleva a pensar en la posibilidad de aplicarlo en descontaminación de efluentes ricos en metales pesados mediante bioadsorción de éstos.

La problemática anteriormente mencionada demanda una tecnología limpia, capaz de retirar estos compuestos del agua, permitiendo de nuevo su uso y el equilibrio de los ecosistemas. Los procesos biológicos de bioadsorción, aplicados mediante sistemas de biopelícula (filtros sumergidos), aparecen como alternativa viable que permite restaurar las zonas afectadas. Este sistema precisa de un estudio de su capacidad de bioadsorción de metales, así como de la influencia que sobre el proceso tienen factores como pH, oxigenación, temperatura, nutrientes, contenido en metales o caudales del proceso, con la finalidad de establecer cuales son los parámetros de diseño para elaborar un filtro biológico que sobre soporte móvil, nos permita tratar aguas contaminadas en el punto geográfico donde se encuentren. Igualmente se precisa conocer la composición de la biopelícula bioadsorbente, para su inertización y correcta gestión tras el tratamiento.

1.- Metales pesados como contaminantes

El proceso acelerado de industrialización que se ha producido en los países en vías de desarrollo combinado con su rápido crecimiento demográfico y el empleo de técnicas de agricultura intensiva, han provocado un incremento en los niveles de polución de sustancias consideradas nocivas o tóxicas para los seres vivos. Sustancias químicas tales como los pesticidas o bifenoles han irrumpido en el medio ambiente e incrementado su concentración en la última mitad de siglo. La baja eficacia en los procesos de producción industriales (como los que tienen lugar en plantas generadoras de energía, industrias petroquímicas o químicas), o la inadecuada gestión de las industrias de tratamiento de residuos, producen considerables aportes de metales pesados (tales como plomo, cobre, cadmio, cobalto, cinc o níquel) al medio ambiente (Wood, 1974; Charlesworth, 1999).

La presencia de depósitos de cenizas derivados de los procesos de combustión del carbón en las plantas termoeléctricas podría ser una posible fuente de contaminación de metales pesados. Trazas de estos contaminantes, como el cadmio, plomo o cinc, pueden tener su origen en estos residuos de combustión, y pueden migrar o infiltrarse a acuíferos interaccionando y disolviéndose con el agua subterránea (Dawson, 1998). Tal transporte hidrogeoquímico y los posteriores procesos de interacción con el medio pueden afectar la composición del agua y por consiguiente producir un efecto directo en el ecosistema.

El uso de lodos o biosólidos como abonos de suelos puede ser otra fuente de contaminación por metales pesados. En el Reino Unido se destinaron a abonado 526.000 toneladas de los 1,12 millones de toneladas de fango seco producido y en la actualidad se destinan 846.000 toneladas lo que indica un aumento progresivo en el uso de fangos secos en la agricultura (Gendebein, 1999). Sin embargo, diversos tipos de lodos presentan baja solubilidad y movilidad de los metales pesados en agua, lo que produce una acumulación de éstos en los suelos. Con el fin de preservar la calidad de los suelos, la unión europea ha fijado límites de concentración para cada uno de los metales pesados (CEC, 1986). Esta preocupación deriva de las interacciones que pueden tener lugar entre el suelo y este tipo de contaminantes (Gove, 2001), incluyendo la adsorción en “clatratos” y la unión con sustancias orgánicas dando lugar a complejos con altas energías de enlace, haciendo que los metales pesados se conviertan en recalcitrantes para el medio ambiente, o la precipitación en óxidos, hidróxidos y carbonatos. Dada la complejidad de los suelos y su heterogeneidad química, es difícil cuantificar la relativa importancia de las diferentes interacciones que pueden tener lugar. Ciertos cationes como cinc, plomo, cobre o níquel

quedan adheridos a un amplio tipo de suelos (Buchter, 1989), mientras que otros cationes requieren la presencia de sustancias orgánicas (Beckett, 1978), produciéndose su lixiviación cuando la cantidad de materia orgánica en el suelo no alcanza ciertos valores.

Dado que los metales pesados pueden cerrar el ciclo llegando a las aguas potables, tanto la Unión Europea como los Estados Unidos (mediante la Agencia de Protección Medioambiental) limitan la presencia de estos contaminantes en las aguas de uso humano. De acuerdo con la normativa europea, la legislación española limita la presencia de metales pesados en éstas (Real Decreto 1138/1990 B.O.E. 20 de Septiembre de 1990) estableciendo el nivel guía y la concentración máxima admisible para cada uno de ellos, dependiendo de su toxicidad, (Tabla 1).

Tabla 1: Niveles guía y concentraciones máximas permitidas para los metales pesados

| Metal µg/L | Nivel Guía µg/L | CMP* µg/L | Metal µg/L | Nivel Guía µg/L | CMP* µg/L |
|---------------|--------------------|--------------|---------------|--------------------|--------------|
| Hierro | 50 | 200 | Berilio | --- | --- |
| Manganeso | 20 | 50 | Cadmio | --- | 5 |
| Cobre | 100 | --- | Cromo | --- | 50 |
| Cinc | 100 | --- | Mercurio | --- | 1 |
| Cobalto | --- | --- | Níquel | --- | 50 |
| Bario | 100 | --- | Plomo | --- | 50 |
| Plata | --- | 10 | Antimonio | --- | 10 |
| Arsénico | --- | 50 | Selenio | --- | 10 |

*Concentración máxima permitida

2.- Toxicidad de los metales pesados: Empleo de biomarcadores

Los seres vivos requieren un gran número de metales pesados para llevar a cabo sus reacciones metabólicas, si bien es cierto que sus necesidades se limitan a trazas y no de todos ellos, ya que algunos metales pesados pueden inhibir enzimas debido a sus semejantes propiedades químicas, como por ejemplo la inhibición que produce el ión cadmio en enzimas que necesitan como cofactor el ión cinc, o la asimilación del estroncio en los humanos por su gran parecido químico con el ión calcio.

La respuesta de un ser humano tras un contacto con un metal pesado puede producir efectos agudos o crónicos dependiendo de la duración de dicho contacto y puede producir dermatitis, como pigmentación, hiperqueratosis y ulceraciones, afecciones respiratorias,

cardiovasculares, gastrointestinales, hematológicas, hepáticas, renales, neurológicas, trastornos en el desarrollo, consecuencias en la reproducción, enfermedades inmunológicas, genéticas o efectos mutagénicos o carcinogénicos.

Uno de los metales pesados que produce todos estos efectos es el arsénico. El arsénico (III) presenta mayor toxicidad que el arsénico (V) debido a que interacciona directamente con las enzimas que intervienen en el ciclo del ácido cítrico, tiene lugar una inactivación de la Piruvato Deshidrogenasa por una complejación el ión As (III). El sistema enzimático implicado comprende varias enzimas y cofactores, una de estas enzimas contiene una proteína que presenta restos sulfhidrilo en carbonos α y β , el arsénico reacciona con estos grupos y se origina un complejo cíclico de seis átomos produciéndose la inactivación de la enzima, por lo que no se produce ATP y la concentración de piruvato en sangre aumenta. (Suzuki, 2002).

La toxicidad de los compuestos del arsénico decrece en el orden: arsina > compuestos inorgánicos de arsénico (III) > arsénico (V). En condiciones aerobias las especies de arsénico (V) son las predominantes y las más estables, las cuales presentan afinidad por el hierro o manganeso para formar sales insolubles, las cuales tienen menos movilidad y por lo tanto son menos tóxicas. En condiciones anaerobias, el arsénico es reducido a arsina y metilarsina mediante bacterias como *Escherichia coli*, *Flavobacterium sp.*, *Methanobacterium sp.* y hongos como *Aspergillus glaucus* o *Candida humicola*.

Otro metal pesado que presenta gran toxicidad y al que no se conoce ninguna función biológica es el cadmio, siendo las bacterias las que presentan mayor sensibilidad a este catión. Altas concentraciones de cadmio (II) en suelos (500 mg/Kg) produce una disminución en el contenido de ATP y una inhibición de la actividad fosfatasa alcalina (Landi, 2000; Moreno, 2001).

Los metales pesados pueden reducir la actividad enzimática al interactuar con el complejo enzima-sustrato mediante diversos mecanismos: produciendo la desnaturalización de la proteína con actividad enzimática, formando enlaces covalentes con el centro activo o inhibiendo la biosíntesis de la enzima. Los metales pesados también pueden cambiar la estructura celular al interactuar con los restos fosfatos, de cisteína o de histidina de las proteínas presentes en la pared celular (Megharaj, 2003).

Diversas bacterias a lo largo de su evolución han desarrollado tolerancia a multitud de contaminantes y pueden coexistir en ambientes con altas concentraciones de sustancias tóxicas, entre ellas los metales pesados, debido a ello se pueden emplear como biosensores. Desde el año 1987 se están estudiando este tipo de sondas que integra un componente

biológico con un traductor electrónico convirtiendo una señal bioquímica en una respuesta eléctrica cuantificable. La ventaja de estos biosensores radica en una medición continua y a tiempo real de la o las variables para las que hayan sido diseñados, por lo que son de extrema utilidad en las plantas de biotratamiento de aguas residuales y en las de agua potable. En el caso concreto de detección de contaminación por metales pesados, se emplea la bioluminiscencia como biorespuesta. Bacterias como *Pseudomonas fluorescens* HK44 o *E. coli* HB101 pUCD607 son sometidas a manipulaciones genéticas dirigidas para introducir en su genoma el gen responsable de la bioluminiscencia de la bacteria marina *Photobacterium phosphoreum*, de forma que cuando hay presencia de metales pesados en el medio dicho gen se expresa y emiten fluorescencia, que es medida y cuantificada a tiempo real. Esta técnica se ha empleado con éxito para la detección de ión mercurio, ión cinc y combinaciones de iones como cinc-cobre-cadmio, cromato-cobre-arseniato, antimoniato-arsenito y cadmio-plumboso (Souza, 2001). Estos estudios han arrojado paralelamente resultados de interacciones sinérgicas entre combinaciones de los iones cinc-cobre y cinc-cadmio (Preston, 2000).

3.- Sistemas para la eliminación de los metales pesados

El tratamiento de efluentes contaminados es un proceso, a veces, más complicado que cualquier otro proceso de fabricación o manufactura de productos, debido a que las aguas a tratar pueden tener una composición muy variable en cuanto a componentes orgánicos o inorgánicos, acidez o basicidad extremas, presencia de sustancias volátiles, etc, por lo tanto son pocos los procesos que permiten la descontaminación de efluentes cumpliendo a la vez requisitos como pueden ser los costes económicos, flexibilidad en cuanto a la cantidad tanto de efluente a tratar como a la carga contaminante de éste, continuidad del sistema, mínima supervisión y mantenimiento y suficiente selectividad en cuanto a la descontaminación de los metales considerados.

Numerosas industrias como las dedicadas a procesos de galvanizado, producción de componentes electrónicos, de química “fina” o las farmacéuticas producen grandes cantidades de efluentes contaminados con altas concentraciones de metales pesados tóxicos para el medio ambiente y los procesos que se pueden emplear en cada una de ellas variarán en cuanto a la cantidad, tanto de efluente a tratar, como de la carga contaminante presente. Procesos como el de adsorción sobre carbón activo, electrolisis, intercambio iónico, filtración a través de membrana, precipitación en forma de hidróxidos o sulfuros o

extracción con disolventes, presentan ventajas e inconvenientes que tendrán que ser tenidas en cuenta dependiendo de las características del efluente a tratar (Eccles 1999). Las características generales de las tecnologías mencionadas se resumen en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Características generales de las tecnologías empleadas en la descontaminación de metales pesados

| Tecnología aplicada | Características generales | | | | |
|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------|---|-----------------------------------|---|
| | Tolerancia a los cambios de pH | Selectividad a los metales | Influencia de los sólidos en suspensión | Tolerancia a sustancias orgánicas | Niveles de metal óptimos soportables mg/L |
| Adsorción sobre carbón activo | Baja | Moderada | Muy alta | Pueden inactivar el carbón | < 10 |
| Electrolisis | Alta | Moderada | Baja | Alta | >10 |
| Intercambio iónico | Baja | Alta | Muy alta | Inactivan la resina | < 100 |
| Filtración por membrana | Baja | Moderada | Muy alta | Intolerancia | > 10 |
| Precipitación por hidróxidos | Alta | Baja | Baja | Alta | > 10 |
| Precipitación por sulfuros | Baja | Depende del pH | Baja | Alta | > 10 |
| Extracciones orgánicas | Media | Alta | Muy alta | Intolerancia | > 100 |

A las características de las tecnologías citadas anteriormente hay que añadir los costes; así, para una planta depuradora con capacidad para 15.000 m³/día el proceso de precipitación conlleva 8 euros/m³, adsorción sobre carbón activo 250 euros/m³, microfiltración 11 euros/m³ y el intercambio iónico 75 euros/m³ (Fabián, 1992).

Ribera-Utrilla et al. (2003) comparan procesos de adsorción sobre carbón activo con iones plumboso, cadmio y cromato y estudian la influencia de la presencia de bacterias (*Escherichia coli*) sobre la superficie del carbón activo, obteniendo mejores resultados en cuanto a la adsorción de los iones plomo (II) y cadmio (II) en presencia de bacteria, mientras que con el ión cromato obtienen mejores resultados en el proceso de adsorción sobre carbón activo sin presencia de *E. coli*. Las fotografías de microscopía electrónica (**Figuras 1 y 2**) muestran la superficie de carbón activo sin bacteria (**Figura 1**) y la superficie de carbón activo tras un tratamiento con un cultivo de *E. coli* con 10⁷ UFC/cm³.

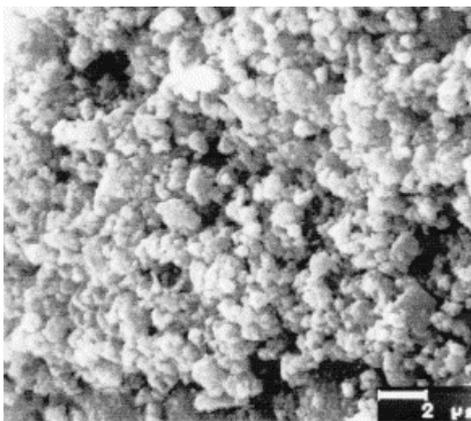


Figura 1: Microscopía electrónica de barrido de la superficie de carbón activo. Ribera-Utrilla et al. (2003)

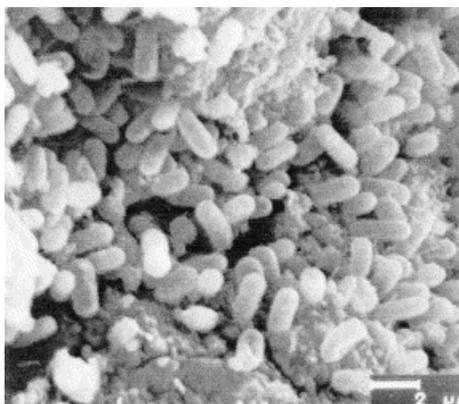


Figura 2: Microscopía electrónica de barrido de la superficie de carbón activo con *E. coli*. Ribera-Utrilla et al. (2003)

En el estudio citado (Ribera-Utrilla et al., 2003) se encuentra que en presencia de bacteria las concentraciones de iones plumboso y cadmio (II) disminuyen un 14 % y un 5,5 % respectivamente frente a un 7 % y un 3,5 % de disminución en ausencia de *E. coli*. La concentración de ión cromato, sin embargo, disminuye un 21 % en presencia de microorganismo frente a un 26 % en ausencia del mismo. Los autores concluyen en que estos resultados son debidos a las interacciones de los cationes con las moléculas orgánicas presentes en la pared celular bacteriana así como con las moléculas que constituyen el exopolímero excretado por éstas. La presencia de bacteria en la superficie de carbón activo disminuye su porosidad y aumenta su densidad superficial de carga negativa lo cual explica los buenos resultados obtenidos con iones cargados positivamente (cationes plumboso y cadmio) así como los resultados negativos obtenidos con el anión cromato.

El empleo de membranas sintéticas unidas a moléculas con grupos funcionales capaces de unirse a cationes de metales pesados ha sido de igual modo ampliamente estudiado. Denizli et al. (2000) trataron el monoclorotriazinil (Cibacron Blue F3GA),

molécula empleada como tinte, que presenta una estructura química mostrada en la **Figura 3**, con membranas constituidas por polivinilalcohol, cuya fotografía electrónica de barrido se muestra en la **Figura 4**, y estudiaron la adsorción sobre este complejo de metales pesados.

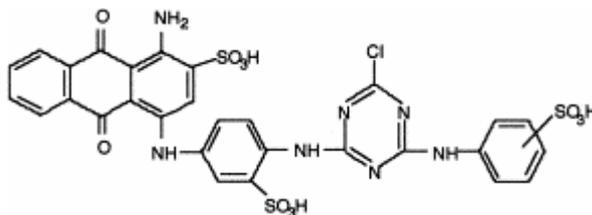


Figura 3: Estructura química de Cibacron Blue F3GA (Denizli et al., 2000)

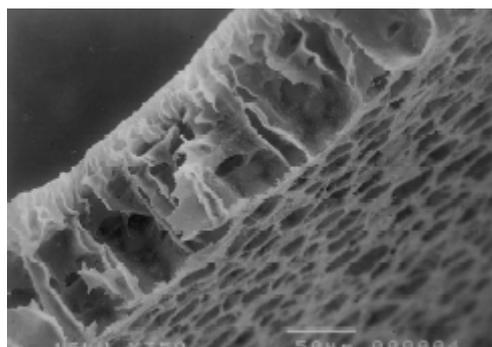


Figura 4: Fotografía de microscopía electrónica de barrido de la membrana de polivinilalcohol (Denizli et al., 2000)

Este tipo de membranas retienen iones cúprico, mercurio, plumboso y cadmio y presentan distinta afinidad por cada uno de los iones objeto de estudio. La adsorción en condiciones no competitivas disminuye en el siguiente orden: Cd (II) > Pb (II) > Hg (II) > Cu (II), no obstante todos estos iones son retenidos mayoritariamente en los primeros cinco minutos de contacto y su concentración en la fase acuosa permanece prácticamente constante a partir de este tiempo. Este perfil de adsorción es un ejemplo de cinética de adsorción logarítmica, tal y como se puede observar en las **Figuras 5 y 6**.

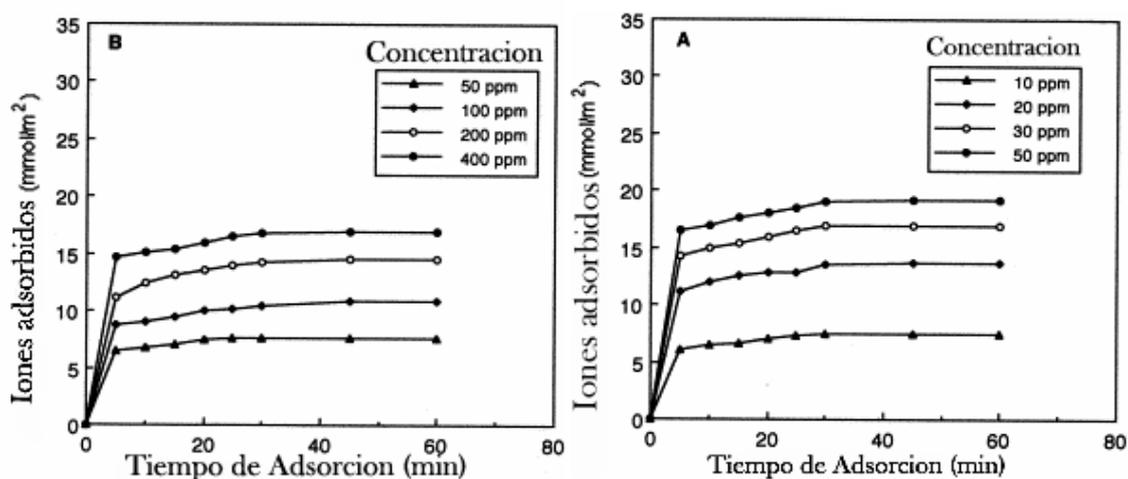


Figura 5: Cinética de adsorción de ión mercuríco (B) y de ión cúprico (A). Denizli (2000)

La regeneración de estas membranas tiene lugar con ácido nítrico 0,1 M (Denizli et al., 2000) lo cual produce un residuo líquido con concentraciones mayores a las iniciales y de pH marcadamente ácido.

Todas estas limitaciones de los procesos físico-químicos descritos (adsorción sobre carbón activo y membranas sintéticas entre otros) conducen a aplicar tecnologías basadas en procesos biológicos, debido a que los microorganismos tienen la capacidad de adaptarse a multitud de agentes contaminantes, tanto orgánicos como inorgánicos y, si bien es cierto que los microorganismos no pueden destruir los metales pesados, sí pueden influir en su movilidad en el medio ambiente, modificando sus características químicas y/o físicas. Es por ello que desde el año 1986 se están empleando procesos de bioadsorción en la descontaminación de efluentes con metales pesados (Gadd, 1986) y desde ese año se ha avanzado mucho en tecnologías destinadas a emplear los microorganismos como agentes descontaminantes.

Autores como Nuhoglu et al., (2002) han estudiados la adsorción del ión cúprico empleando el alga *Ulothrix zonata*. En las condiciones ensayadas, pH = 4,5, T^a = 20 °C y 150 rpm, se obtienen unos rendimientos de adsorción que varían desde el 20 % cuando la concentración de ión cúprico es de 50 mg/L hasta un 80 % cuando su concentración es de 5 mg/L (Figura 6). Estos autores describen el proceso de adsorción mediante el modelo de Langmuir. La capacidad de estos sistemas para la retención de cobre la obtienen con el parámetro Q₀, obteniendo valores de 176.20 mg de cobre/g de alga, lo que indica la alta afinidad de este ión por adherirse a la superficie del alga.

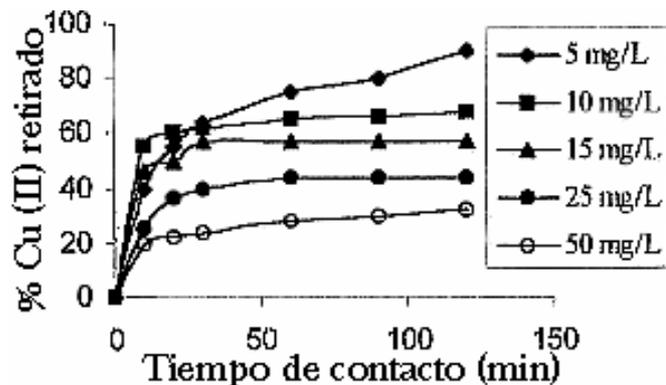


Figura 6: Capacidad de eliminación de ión Cúprico por *U. zonata* (Nuhoglu et al., 2002)

Los sistemas destinados a emplear microorganismos para descontaminar efluentes se denominan fangos activos, si los microorganismos están libres en el seno del fluido, lechos fluidificados, si los microorganismos están adheridos a un soporte el cual está en suspensión, y filtros sumergidos si el soporte está totalmente sumergido en el fluido. No obstante, existen variantes como pueden ser los biodiscos o biocilindros, en los que el soporte giratorio al que está adherida la película biológica está sumergido parcialmente en el efluente a tratar (Gómez-Villalba, 2003).

Los estudios llevados a cabo sobre descontaminación de fluidos mediante microorganismos revelan que los metales pesados presentan gran afinidad por los flóculos microbianos, adhiriéndose a ésta en cortos periodos de tiempo. Se han realizado hasta la fecha estudios de adsorción de metales pesados en fangos activos (Chua, 1999; Arican, 2002; Sag, 2003), lechos fluidificados (Sag, 2003) y biocilindros (Costley, 2001).

Iones como Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{3+} y Pb^{2+} se adhieren a los microorganismos presentes en los fangos activos y alcanzan valores máximos de saturación a los 0,5 minutos de contacto. En el estudio realizado por Chua et al. (1999) se contaminó un agua residual sintética con estos cationes y se observó que esta afinidad varía en función de los cationes, siendo el ión cúprico el que presenta mayor afinidad seguido del crómico, el cinc y el ión plumboso (Chua, 1999).

Otros autores han estudiado la eliminación del ión níquel (II) en fangos activos a diferentes tiempos de retención (Arican, 2002), obteniendo cinéticas de adsorción similares a las mostradas en la **Figura 7**.

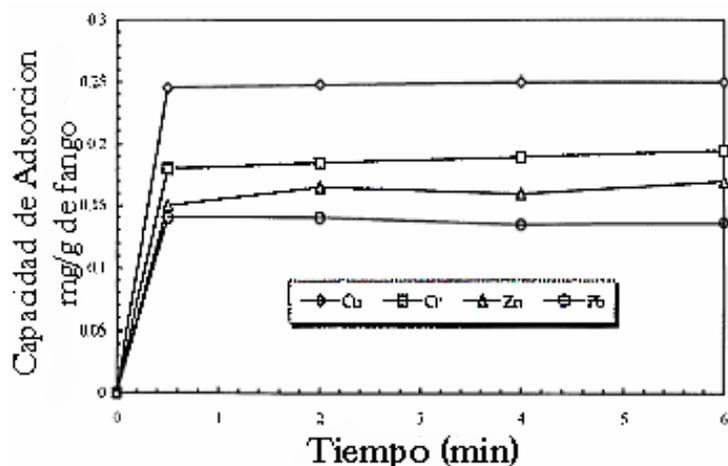


Figura 7: Adsorción de metales pesados por fangos activos (Chua et al., 1999)

La adsorción de los cationes cobre (II), zinc y cadmio en concentraciones de 100 mg/L ha sido estudiada empleando contactores biológicos rotativos y efluentes sintéticos, obteniendo un 32 % de adsorción para el ión cadmio, un 78 % para el cúprico y un 53 % para el cinc. En la **Figura 8** se muestran los resultados de eliminación de estos metales en función de los días de funcionamiento, que constituyeron el primer y el segundo ciclos de funcionamiento continuo del biodisco (Costley, 2001). En la **Figura 8** se puede observar que el biodisco necesita un periodo de adaptación antes de funcionar a pleno rendimiento en cuanto a la eliminación de contaminante, siendo este periodo de tiempo diferente para cada catión.

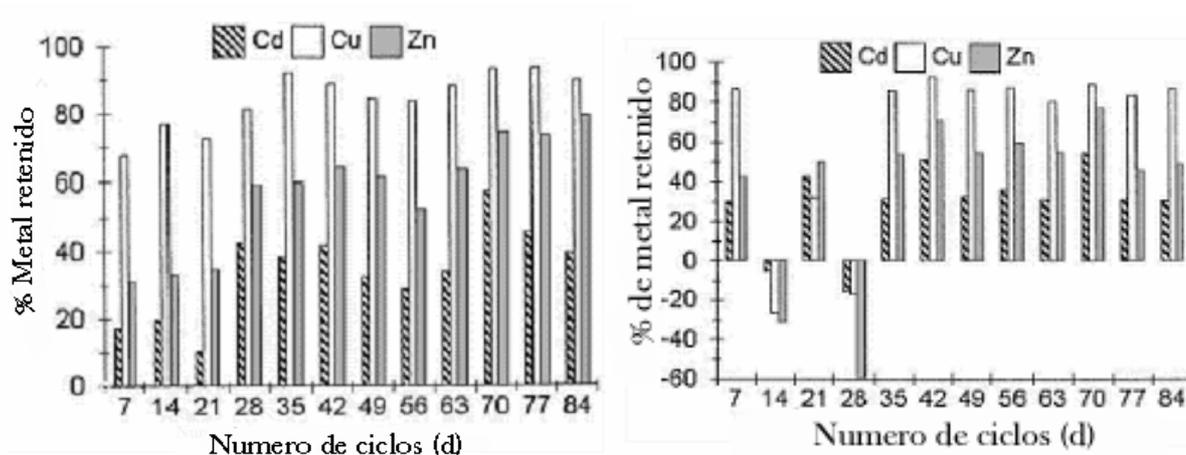


Figura 8: Porcentaje de metal retirado de un efluente sintético contaminado con Cd^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} por la biopelícula durante 87 días (primer ciclo Figura 8A y segundo ciclo Figura 8B). (Costley et al., 2001).

Los microorganismos que se desarrollaron sobre estos biodiscos en las condiciones empleadas por estos autores durante el primer ciclo de funcionamiento se muestran en la **Figura 9**. Se puede observar la microbiota presente en estos sistemas antes del lavado (**Figura 9A**) y después del lavado (**Figura 9B**). Durante la fase de adsorción predominan bacterias, organismos filamentosos y hongos, mientras que en la fase de lavado la población bacteriana disminuye considerablemente, debido a que los hongos y los organismos filamentosos están más fuertemente adheridos al soporte, no obstante se observa un posterior aumento de la población bacteriana en el segundo ciclo de adsorción (**Figura 10**) (Cosley, 2001).

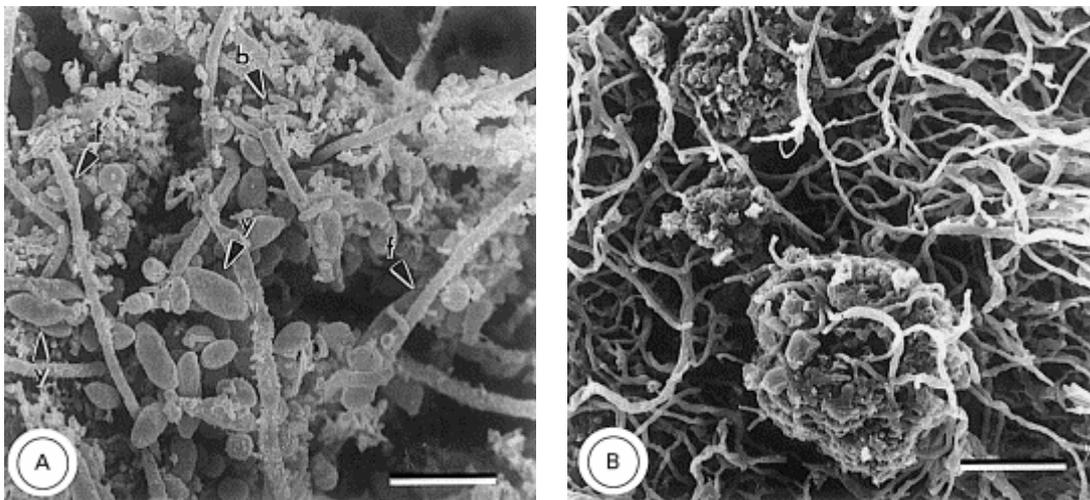


Figura 9: Microbiota presente en los biodiscos antes y después del lavado. La escala de la **Figura 9A** representa $6\mu\text{m}$ y la de la **Figura 9B** $11\mu\text{m}$. Se señalan bacterias (b), organismos filamentosos (f) y hongos (y). (Cosley et al., 2001)

Durante el funcionamiento de estos sistemas biológicos se observa un gran equilibrio dinámico en la microbiota que se desarrolla sobre el soporte, aumentando o disminuyendo la cantidad de unos microorganismos con respecto a otros dependiendo de la fase en la que se encuentre el biodisco.

Los sistemas de filtros sumergidos aerobios permiten el desarrollo de película fija con el soporte sumergido en el flujo a tratar, manteniendo una corriente continua de aire que es inyectado por su base. Estos biofiltros reducen el volumen de los reactores biológicos a la vez que mejoran significativamente el rendimiento de los procesos biológicos que se llevan a cabo a lo largo del recorrido del influente. En estos reactores biológicos se distinguen tres fases: una fase sólida, constituida por un material granular sobre el cual se fija la biomasa encargada de llevar a cabo el proceso de bioadsorción; una fase líquida, en la que está

inmerso el material soporte y que se renueva continuamente con la llegada de influente nuevo, y una fase gaseosa constituida por las burbujas de aire que se insufla desde la base.

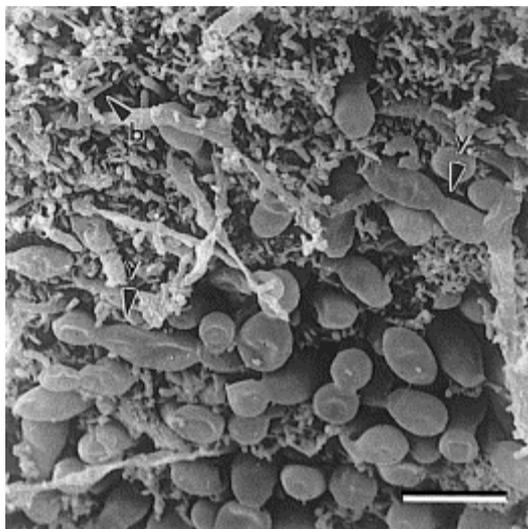


Figura 10: Microbiota presente en el segundo ciclo de adsorción (Cosley et al., 2001).

De las tres fases diferenciables en este tipo de biofiltros, quizás es el soporte sólido el que puede influir en mayor grado en la formación de la película fija. En principio es deseable una gran adherencia de la biopelícula al material soporte aunque esto traiga consigo problemas de atascamiento por una sobreacumulación de biopelícula o presentar dificultades para el desprendimiento durante el lavado. Los factores que influyen sobre la adherencia son principalmente físicos (la forma y rugosidad superficial) y fisico-químicos (estructura microscópica, composición elemental, carga eléctrica e hidrofilia). Dicho material soporte se puede clasificar en función de su origen, encontrándose soportes de origen natural (arena, paja, piedra, grava, arcilla granulada, pizarra, cenizas de carbón...) o de origen sintético (PVC, plexiglás, espuma de poliuretano, porcelana, caucho...) y en función de la superficie que soporta la biopelícula, encontrándose medios granulosos sin forma definida (arena, piedra de cuarzo, coque, piezas de corcho...), medios granulosos con forma definida (anillos Rashing, soportes Intalox...), medios en forma de varas y cuerdas (varas o tiras de madera, cuerdas con numerosos anillos de fibras radiales...), medios en forma de bloques porosos (tubos agujereados, tubos de plástico poroso...) o medios enmarañados (maraña de plástico); (Gálvez, 2001).

Por tanto, las características del medio soporte determinan la adherencia de la biopelícula y por tanto la eficacia del proceso que tenga lugar en el biofiltro sumergido (Tejero, 2002), siendo los principales requisitos: alto grado de adherencia; escasa resistencia

al flujo del agua, superficie específica; alta porosidad; estabilidad química y biológica; capacidad para atrapar sólidos en suspensión; durabilidad y resistencia mecánica a la destrucción y abrasión; tamaño granular uniforme o espaciado uniforme de placas permitiendo uniformidad del flujo a través del lecho; densidad similar a la del agua para que no provoque una pesada carga sobre las estructuras sumergidas o sobre el fondo del tanque, facilitando de esta forma las operaciones de lavado; inerte; de bajo coste y fácil de transportar, fabricar y construir.

Las ventajas de los filtros sumergidos frente a otros sistemas biológicos derivan de su diseño y componentes (Tejero, 2002) puesto que producen mayor cantidad de biomasa en un menor volumen, permitiendo por tanto una disminución de espacio, una puesta en marcha rápida, una capacidad mayor de depuración, soportan variaciones moderadas de caudal y de carga contaminante, etc. Las desventajas son debidas a la naturaleza del relleno y del crecimiento y degeneración de la biopelícula formada; así, estos sistemas necesitan lavados a contracorriente y tienen una altura limitada. La densidad del relleno empleado limita la altura del lecho, puesto que en el proceso de lavado a contracorriente se tiene como limitación la potencia impulsora de la bomba de agua que ha de ser capaz de arrastrar tanto a la biopelícula formada en exceso como a los sólidos en suspensión que se han ido acumulando durante el ciclo de funcionamiento del biofiltro.

La importancia del lavado en estos sistemas es, por tanto, manifiesta, debido a que durante el funcionamiento del filtro se va produciendo su colmatación debido al crecimiento de las poblaciones microbianas generadoras de la biopelículas, provocando la aparición de zonas anaeróbicas dentro de éstas y facilitándose su desprendimiento, que así mismo incrementarán la pérdida de carga del sistema y la disminución de calidad del efluente. Las fases empleadas en el lavado son tres: de esponjado (exclusivamente aire), de lavado (aire y agua) y de aclarado (sólo agua), (Gálvez, 2001).

El empleo de sistemas biológicos para la descontaminación de efluentes con metales pesados se debe a las características que presentan los microorganismos para llevar a cabo procesos de bioadsorción y formar biopelículas, mecanismos que conducen a la retención y/o transformación de sustancias dañinas para el medio ambiente.

4.- Procesos de bioadsorción

El término bioadsorción es ampliamente empleado para describir aquellos procesos de formación de enlaces entre el metal y componentes celulares, lo que produce la retirada del metal pesado del medio. En los últimos años se ha extendido el uso de bacterias y biopolímeros capaces de incorporar cargas contaminantes a su material celular, siendo empleados para la biorremediación de zonas contaminadas por metales pesados (Gadd, 2000; Diles, 1999; Gutnick, 2000).

Los microorganismos han coexistido desde el principio de su existencia con los metales pesados, esto se refleja en el amplio número de enzimas que necesitan la presencia de cationes divalentes para realizar su función metabólica. Las propiedades químicas de los metales son empleadas por los enzimas para realizar reacciones de catálisis o para mantener la estructura tridimensional de éstas. Estos metales son requeridos en cantidades ínfimas para el normal funcionamiento metabólico de las células, las cuales están dotadas de complejos mecanismos de homeóstasis para asegurar la presencia, y no el exceso, de los metales en el interior celular. Muchos otros metales pesados no parecen desempeñar función biológica alguna, pudiendo algunos ser tóxicos, debido a la gran afinidad que presentan por los grupos sulfhidrilos presentes en las proteínas, uniéndose a éstos e inactivando su actividad biológica.

Por tanto y desde un punto de vista fisiológico, los metales se pueden incluir en tres grandes categorías: Los metales que son esenciales y básicamente no tóxicos, como son los iones sodio, potasio, calcio y magnesio; los metales esenciales pero tóxicos en exceso, como pueden ser el hierro, manganeso, cinc, cobre, cobalto, níquel y molibdeno, y los metales tóxicos como el mercurio, arsénico o cadmio.

Una célula necesita adquirir del entorno circundante la cantidad necesaria de los metales esenciales y para ello su material genético la dota de multitud de mecanismos para interaccionar con el medio ambiente, los cuales aseguran la adaptación a ambientes hostiles y cambiantes, así como mecanismos para impedir la entrada a la célula de los metales que les resulta tóxicos. Es por ello que se cree que la tolerancia de los microorganismos a coexistir con metales pesados ocurrió en un momento muy temprano en la evolución (Silver, 1998).

La respuesta de los microorganismos cuando se encuentran en ambientes contaminados con metales pesados es diversa y engloba mecanismos de precipitación, transporte enzimático y formación de metalotioninas, proteínas de unos 60 aminoácidos y

ricas en cisteína (Mergeay, 1997). Aquellos microorganismos tolerantes a metales pesados presentes en el medio en altas concentraciones (superiores a 0,01 M) presentan la capacidad de precipitarlos eliminando su toxicidad al retirarlos del medio acuoso. Los microorganismos acidófilos y los quimiolitotrofos, como *Thiobacillus sp.* y *Archaea*, presentan los citados mecanismos de defensa cuando se exponen a altas concentraciones de metales pesados. Una concentración entre 1 μM y 10mM inducen en los microorganismos como *E. coli*, *Alcaligenes sp.* y *Desulfovibrio sp.*, la puesta en marcha de mecanismos regulados enzimáticamente para exportar al exterior celular los metales pesados que han sido capaces de entrar al interior celular. En presencia de metales pesados, los microorganismos producen metalotioninas las cuales confieren resistencia a altas concentraciones de metales pesados.

Los procesos descritos que son empleados por los microorganismos para su adsorber e inmovilizar los metales pesados son muy diversos (Valls 2002). El metal pesado, cargado positivamente, puede interactuar con los restos aminoacídicos o lipídicos, cargados negativamente, y establecer fuerzas de naturaleza electrostática, permaneciendo unido a la pared celular externa de los microorganismos (Sousa, 1998).

El metal puede interactuar en el interior de las células con enzimas involucradas en procesos redox y aumentar o disminuir su estado de oxidación, para posteriormente ser modificado químicamente y transformado en compuestos orgánicos los cuales serán integrados en un ciclo metabólico y excretados al exterior (McLean, 2001). Las bacterias contienen un número de enzimas capaces de transformar ciertos metales mediante oxidación, reducción, metilación o alquilación. La resistencia al mercurio de *P. putida* es debida a la presencia de la enzima mercurio reductasa, siendo capaz de reducir el 90 % de una concentración inicial de 40 mg/L de este catión en 24 horas (Okino, 2000), otro microorganismo en el que esta actividad enzimática está presente es *E. coli* BL308. El arsénico, selenio y telurio son metaloides tolerados por ciertas bacterias y hongos gracias a la capacidad de éstos para metilarlos en condiciones anaerobias formando los derivados volátiles dimetílicos o trimetílicos (Michalke, 2000) retirándolos del medio. En el caso del arsénico tiene lugar la reducción de arseniato a arsenito seguido de una metilación formando la dimetilarsina (Tamaki, 1992). La mayoría de los metales volátiles cuando están formando compuestos orgánicos exhiben mayor toxicidad que si están en forma inorgánica, puestos que son lipofílicos y por consiguiente presentan mayor actividad biológica. El arsénico y el selenio son dos excepciones a esta característica, siendo menos tóxicos cuando están metilados que cuando están en forma de sales inorgánicas.

El metal pesado puede interactuar con proteínas y formar complejos catión-proteínas, los cuales son introducidos en el interior celular (Valls, 2000). La existencia de proteínas quelantes, ricas en restos de cisteína, histidina y glicina en la pared celular, compleja metales y los retira del medio (Langley, 1999).

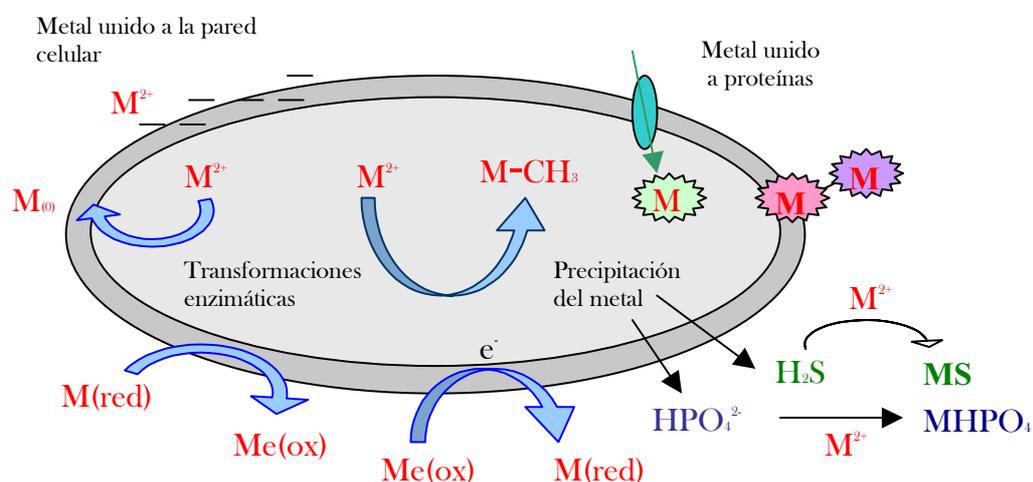


Figura 11: Mecanismos de eliminación de metales pesados mediados por bacterias (Valls, 2002)

Algunos metales pesados presentan la propiedad de formar precipitados insolubles con iones sulfuro o fosfato, en estos casos se activa un mecanismo por el cual la bacteria es capaz de formar polisulfuros o polifosfatos, retirando el metal pesado del medio (Glasauer, 2001). Uno de los casos mejor estudiados de mecanismo de precipitación de metales mediante bacterias es la inmovilización de éstos mediante el empleo de sulfato reductoras (Labrenz, 2000). El ión cromato es reducido a ión crómico e inmovilizado por bacterias sulfato reductoras, consiguiéndose rendimientos del 90 % en 48 horas (Smith, 2000). El ión cadmio es tolerado en altas concentraciones por *Klebsiella planticola* y retirado del medio en forma de sulfuro de cadmio en cantidades considerables en condiciones anaeróbicas. Estos mecanismos de tolerancia suelen estar contenidos en plásmidos, lo cual facilita el intercambio entre bacterias de los genes responsables de hacer resistentes a los microorganismos frente a este tipo de contaminantes. Un esquema de todos estos procesos descritos se resume en la **Figura 11**.

5.- Influencia de los metales pesados en el metabolismo bacteriano

Cuando una bacteria entra en contacto con un tóxico se producen cambios en sus reacciones metabólicas con el fin de neutralizar al agente biocida. Así pueden verse afectadas algunas actividades enzimáticas, los niveles de adenosintrifosfato (ATP) o pueden producirse cambios en la composición de los exopolímeros bacterianos.

Los factores que pueden decidir si un metal pesado es tóxico para una bacteria o no dependen del medio ambiente que rodea al microorganismo. Autores como Brynhildsen et al., (1988) estudiaron los efectos de la concentración de glucosa en la toxicidad presentada por cadmio (II), cobre (II), mercurio (II) y cinc (II) sobre *Klebsiella sp.* y concluyeron que el microorganismo presenta resistencia variable a los metales pesados cuando se desarrolla en medios con diferentes concentraciones de glucosa, por lo que una misma concentración de metal, dependiendo del medio en el que se esté desarrollando, puede ser tóxica o no serlo.

La presencia de metal pesado produce, incluso en concentraciones de $\sigma\text{g/L}$, cambios en las actividades de multitud de enzimas, dependiendo del metal pesado estudiado y de su concentración, dicha actividad puede verse inhibida o aumentada.

Schwedt et al., (1998) estudiaron el comportamiento de las actividades fosfodiesterasa I y fosfatasa ácida frente a veintitrés cationes, obteniendo unos incrementos en la actividad fosfodiesterasa I para el magnesio y cinc, en concentraciones de 10 mg/L y una inhibición en el caso del cadmio y berilio a igual concentración. En el caso de la actividad fosfatasa ácida fueron el ión mercurio (II) y cúprico (en concentraciones de 10 mg/L) los que presentaron una fuerte inhibición frente a esta enzima. Geiger et al., (1997) describen que el ión cúprico (en concentración de 200 σM) es un fuerte inhibidor de las actividades celulasa y η -glucosidasa y que esta inhibición alcanza un máximo cuando el pH del medio es de 5,5.

La presencia de algunos metales pesados inducen la formación de fosfato mediante un complejo sistema enzimático localizado en la membrana plasmática en donde intervienen las enzimas polifosfatokinasa (PPK) y polifosfatasa (PPX) además de ATPasas, las cuales emplean como fuente de fósforo el ATP (Keasling, 2000), **Figura 12.**

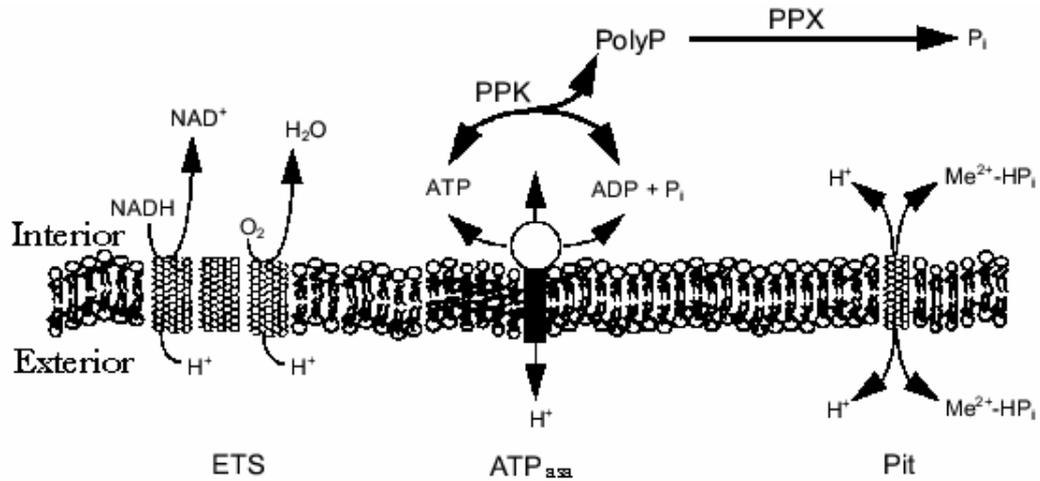


Figura 12: Movilización de Fosfato inorgánico a partir de ATP (Kearling, 2000)

Este fósforo inorgánico, en forma de fosfato, se emplea para inmovilizar al metal pesado en la superficie celular produciendo su detoxificación (Aiking et al., 1984). Los organismos en presencia de metal pesado, invierten el flujo de fosfato, que normalmente se produce de fuera hacia dentro de la célula y producen así una precipitación del agente tóxico en la pared celular, produciendo la inactivación del metal pesado (Montgomery, 1995). En la **Figura 13** se muestra este mecanismo de defensa contra el catión uranilo empleado por *Pseudomonas aeruginosa*. En la **Figura 14** se muestra el aspecto que presentan estos microorganismos cuando se resuspenden en una disolución de nitrato de uranilo 1 mM. Se puede observar que la superficie presenta tonalidad oscura debido a la densidad electrónica del uranio (Kearling, 2000).

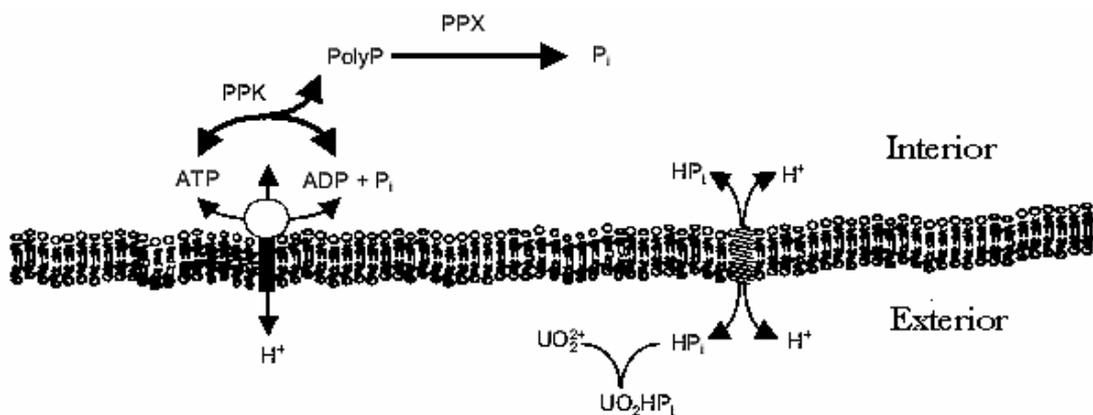


Figura 13: Inmovilización del catión uranilo en la superficie exterior de la pared celular (Kearling, 2000)

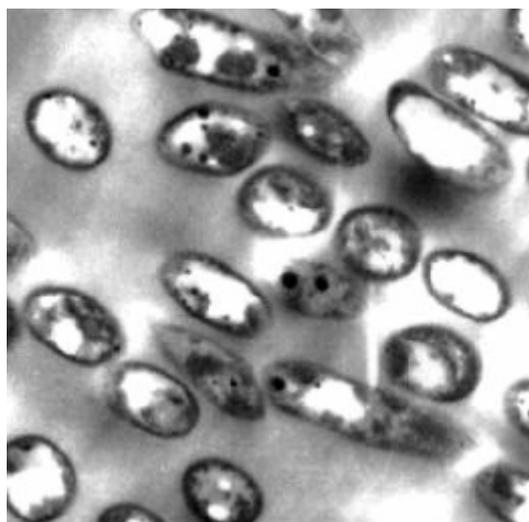


Figura 14: Microfotografía de transmisión de células de *P. aeruginosa* en presencia de nitrato de uranilo (Keasling, 2000)

6.- Influencia del pH en la bioacumulación de metales pesados

La naturaleza de ácidos de Lewis de los cationes derivados de los metales pesados conlleva que se vean influenciados por el pH del medio. Así, en función de la acidez o basicidad del medio y de los aniones presentes en la disolución, pueden estar formando multitud de sales neutras, ácidas o básicas. Remoudaki et al. (2003) realizan un estudio sobre la solubilidad de níquel (II), cinc (II), cobre (II) y hierro (III), en aguas de origen residual urbano en función del pH, obteniendo unos diagramas en los que se representan la concentración de las especies poco solubles en función del pH. En las Figuras 15 y 16 se muestran los diagramas obtenidos para el hierro (III) y cobre (II) (Remoudaki et al., 2003). Para la realización de dichos diagramas se eligió una serie de aniones los cuales son los más habituales en las aguas residuales.

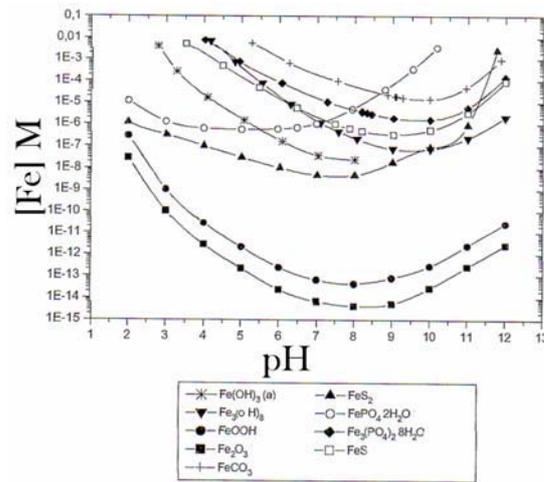


Figura 15: Diagrama de solubilidad del hierro en función del pH en presencia de iones fosfato, sulfuro y carbonato (Remoudaki et al., 2003)

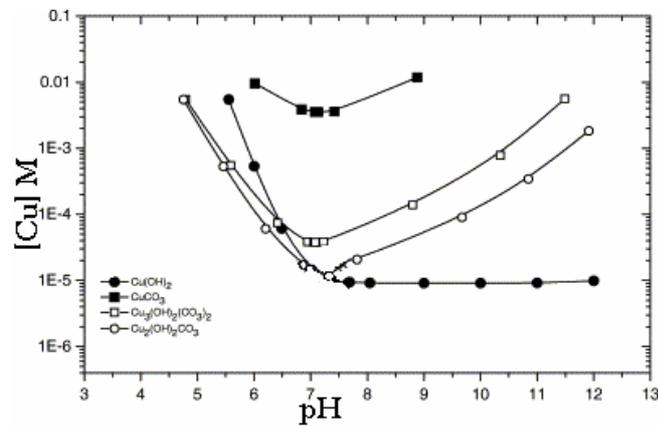


Figura 16: Diagrama de solubilidad para el ión cúprico en función del pH en presencia de iones carbonato (Remoudaki et al., 2003)

La adsorción de los metales pesados sobre los organismos en general se ve afectada por tanto por el pH del medio. Tiemann et al. (2002) estudian las interacciones de metales pesados sobre tejidos inactivados de *Solanum elaeagnifolium* (una planta que crece en suelos con alto contenido en metales pesados) encontrando que las condiciones de pH óptimo en el que se lleva a cabo la mayor adsorción es el rango comprendido entre 5,0 y 6,0 tal y como se muestra en la **Figura 17**.

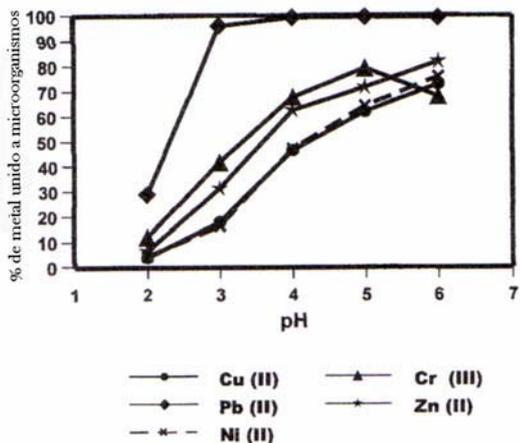


Figura 17: Efecto del pH en la adsorción de cobre (II), cromo (III), plomo (II), níquel (II) y cinc (II) sobre biomasa de *Solanum elaeagnifolium* (Tiemann et al., 2002)

Resultados análogos (Figura 18) han sido obtenidos por otros autores cuando han estudiado la adsorción de metales pesados como cobre (II), plomo (II) y cinc (II) sobre bacterias gram negativas de la familia *Enterobacteriaceae* (Ngwenya et al., 2003).

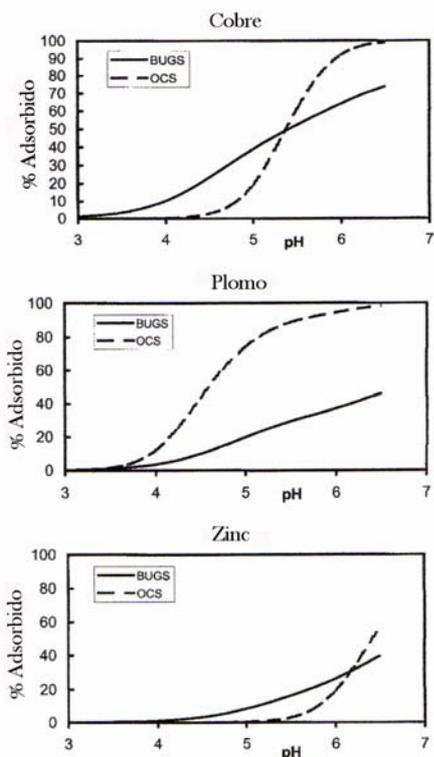


Figura 18: Adsorción en función del pH sobre bacterias gram negativas (Ngwenya et al., 2003)

7.- Biopelículas Microbianas

La génesis del término “biopelícula” comienza allá por el siglo XVIII, cuando Antonie Van Leeuwenhoek habla de ciertos agregados de “animálculos” presentes en muestras de sarro humano y que observó mediante las técnicas microscópicas de la época. Aproximadamente dos siglos después, en 1934, Claude Zobel examina poblaciones marinas empleando microscopía directa y concluye que estas bacterias son capaces de adherirse a una superficie formando así una población estable. En 1964, Ralph Mitchell y Kevin Marshall estudian la formación de una biopelícula por bacterias en cultivo puro y distinguen entre una fase inicial donde la bacteria se adhiere a la superficie de forma reversible y una segunda fase donde se establece una unión irreversible. Posteriormente se ha demostrado como la bacteria sufre cambios en su fenotipo cuando, adherida a una superficie, forma parte integrante de una biopelícula (Costerton, 1999).

En la actualidad está bien establecido el hecho de que el estilo de vida bacteriano más común en los ambientes naturales es aquel en que las bacterias se adhieren a una superficie formando una estructura conocida como biopelícula (Decho, 2000; Danese et al., 2000; Watnick et al., 2000) donde encuentran las necesidades fundamentales para su desarrollo (Gómez et al., 2000). De hecho, podemos considerar que las bacterias que no se encuentren formando parte de una biopelícula constituyen la fase inicial de la formación de otra en una nueva superficie (Watnick et al., 2000). Por lo tanto, podemos hablar de biopelícula o “*biofilm*”, como una estructura compleja formada por agregados celulares (grupos de células densamente empaquetados) y huecos intersticiales, adherida a un material o interfase que puede ser de naturaleza abiótica (rocas, metales, vidrios, plásticos, etc.) o biótica (mucosa intestinal, plantas, etc.) (Lewandowski et al., 1994). Su estructura es morfológica y fisiológicamente distinta a la de bacterias libres, utilizándose incluso mediadores químicos intercelulares para desarrollar la película (De Beer et al., 1996; Davies et al., 1998; Watnick et al., 2000; Decho, 2000; Costerton, 2000; Geesey, 2001).

Mediante microscopía óptica y electrónica se ha podido estudiar la formación de la biopelícula observándose la complejidad tanto microbiológica como física de estas colectividades. Los procesos que conlleva su formación son similares tanto para ambientes acuáticos naturales como para los desarrollados en aguas residuales (Gálvez, 2001). Se ha demostrado como la colonización bacteriana de una superficie y la estructura de la biopelícula que va a formar están controladas por factores varios como; la hidrodinámica, el genotipo de las células que la forman y la química de la superficie (Geesey, 2001). Las fases

que determinan la formación de una biopelícula madura son diversas y complejas (Figura 19).

Según Lawrence et al. (1995) se pueden establecer fases diferenciadas en la formación de una biopelícula: En primer lugar las bacterias perciben la proximidad de la superficie, en el caso de las células planctónicas esta percepción está mediada por la emisión al medio de señales moleculares que difunden a través del medio y generan un gradiente de concentración, el cual indica, cuando aumenta, la proximidad de una superficie (Costerton, 1999). Las bacterias se unen a una superficie u otra en función de que el medio donde se encuentren sea rico o no en nutrientes, es decir, cuando el medio es rico en nutrientes se unen a cualquier superficie pero cuando ocurre lo contrario se fijan sobre una superficie rica en éstos (Watnick et al., 2000). Esta adaptación asegura a la bacteria el acceso a los nutrientes en ambientes tanto ricos como pobres en éstos. Una vez detectada la superficie los microorganismos se han de transportar hacia la misma, y ello puede tener lugar mediante transporte difusivo (movimiento Browniano), transporte convectivo de las células o mediante transporte activo donde las células bacterianas se mueven cerca de la superficie del soporte pudiendo haber un choque casual con la superficie o quimiotaxis en respuesta a un gradiente de concentración en la región interfase (Costerton, 1999).

La fase de adhesión comienza con un proceso reversible en el que las células llegan a la superficie, se adhieren a ella por un tiempo limitado y se separan después. La desorción se puede producir debido a factores físicos, químicos y/o biológicos. En este proceso hay un intercambio continuo en el que se intercambian células libres y fijadas, siendo difícil establecer distinción entre la actividad de las células adheridas y las libres. En el momento en el que hay bacterias que se unen de forma irreversible a la superficie tiene lugar el acondicionamiento físico de la misma, depositando sustancias nutritivas (macromoléculas orgánicas) que atraen a las bacterias y permiten su adherencia y crecimiento (Lawrence et al., 1995). La adhesión microbiana varía en función de las características de la superficie (Geesey et al., 2001) dependiendo de su carácter hidrofóbico-hidrofílico, del área de superficie (Atlas y Bartha, 2001) así como del tipo de microorganismos colonizadores y del pH del medio. En esta fase, las bacterias emplean flagelos y pilis para moverse a lo largo de la superficie hasta que contactan con otras bacterias, formando una microcolonia o aumentando la ya existente (O'Toole et al., 1998; Pratt et al., 1998; Watnick et al., 1999; Costerton, 2000). Para la adhesión irreversible las bacterias cuentan con fimbrias, que median adhesiones de tipo específico, y con sustancias poliméricas extracelulares (EPS), que median adhesiones de tipo inespecífico (Costerton, 1999). La adhesión específica mediante

fimbrias juega un papel crucial en la formación de biopelículas sobre tejidos, puesto que se basa en la interacción de la fimbria con receptores específicos de la superficie. La unión entre estas estructuras proteicas es mecánicamente débil, pero es la que determina el alineamiento de las bacterias en las biopelículas. La adhesión firme requiere de la unión inespecífica determinada por el EPS sintetizado (Costerton, 1999; Watnick et al., 1999; Gálvez, 2001).

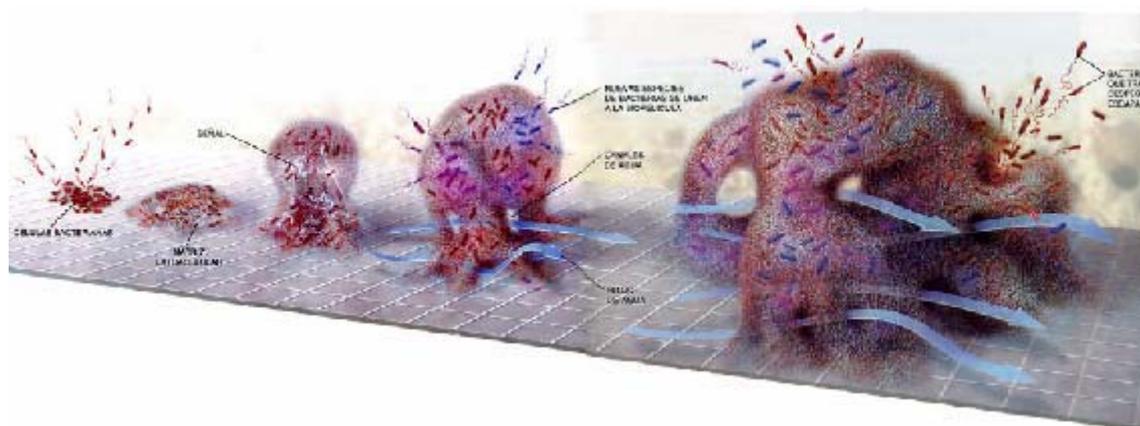


Figura 19: Fase de formación de una biopelícula (Costerton, 2001)

Para que las bacterias puedan ser miembros de una biopelícula han de reprimir la síntesis de flagelos que desestabilizarían la estructura, y activar la síntesis de exopolisacáridos que la refuerzan (Watnick et al., 2000). Esto evidencia que la unión bacteria-biopelícula altera la expresión de algunos genes para maximizar la supervivencia de la bacteria (Prigent et al., 1999). Probablemente, para la mayoría de las especies bacterianas las células que se establecen en una superficie y se comprometen a ser parte de una biopelícula adoptan un fenotipo profundamente diferente al de las células planctónicas (Costerton, 1999). Esta diferenciación responde a la expresión de determinados genes únicamente en las condiciones favorables para formar la biopelícula. Dicha expresión está regulada por mecanismos de comunicación célula-célula, tales como el mecanismo denominado *quorum sensing* (Costerton, 1999; Kolter et al., 1998; Decho, 2000; Watnick et al., 2000). Este mecanismo regulador permite a las bacterias monitorizar la densidad de sus poblaciones y requiere la acumulación en el medio de compuestos señales permeables a través de la membrana celular. Cuando se alcanza un nivel umbral de concentración, la molécula señal interacciona con proteínas activadoras de la transcripción y se induce la expresión de genes en respuesta a la densidad celular. Las moléculas señal mejor conocidas pertenecen a la

familia de las *N*-Acil-homoserina lactonas (AHLs) (Rodelas et al., 1999) (**Figura 20**) aunque también se han descrito moléculas con otras estructuras, como la bradióxetina (Bedmar, E. J., et al., 2001; Stacey, G., et al., 2002; Navascués, B., et al., 2004). Así, este mecanismo permite a un grupo de células microbianas comportarse como una “unidad coordinada”, influyendo en actividades microbianas tan importantes como: patogénesis, transferencia de plásmidos de conjugación, bioluminiscencia y actividad de enzimas extracelulares (Decho, 2000). Davis et al. (1998) demuestran como mutantes de *P. aeruginosa* incapaces de producir AHLs no pueden formar una biopelícula estable y madura. Tras la adsorción irreversible se produce un incremento en el número de células de la biopelícula a expensas del sustrato, sin descartar que a su vez las células puedan también producir o formar cantidades importantes de productos, excretando algunos de ellos, como por ejemplo el EPS que queda constituyendo parte de la biopelícula o las moléculas señal propias de las bacterias presentes en la biopelícula.

Cuando las biopelículas alcanzan su madurez y máximo grosor, se puede considerar que el crecimiento neto de la microbiota es cero. En estas circunstancias las bacterias no se dividen pero son viables y cultivables. Así en las biopelículas maduras la división celular es infrecuente, al contrario que en las células planctónicas quienes consumen nutrientes para su multiplicación fundamentalmente, utilizando esa energía en exceso para producir exopolisacárido que podría ser digerido por las células en momentos de carencia (Watnick et al., 2000). A partir de este momento la biopelícula funciona como un conjunto de microorganismos a la vez independientes y relacionados entre sí, captando células libres y presentes en el medio acuoso (Decho, 2000). La captura de macromoléculas orgánicas y células microbianas podría considerarse como un proceso normal de floculación influyendo el tamaño de la partícula, así como la fuerza y la composición iónica. Las biopelículas maduras sufren pérdidas de partes de ella que vuelven al agua, estas células vuelven a su estado libre quizás para formar otros agregados (Costerton, 2001). Esto puede ser debido al esfuerzo constante del fluido (erosión), a la acción mecánica de otras partículas que chocan contra la biopelícula (abrasión) y al desprendimiento de capas de biopelículas (desprendimiento masivo) debido a la pérdida de cohesión o de adherencia de la biopelícula. El crecimiento neto de las biopelículas es el resultado de un balance entre colonización, multiplicación y desadsorción; unas condiciones óptimas en el crecimiento determinarán por tanto, el desarrollo óptimo de una biopelícula (Lewandowski et al., 1999).

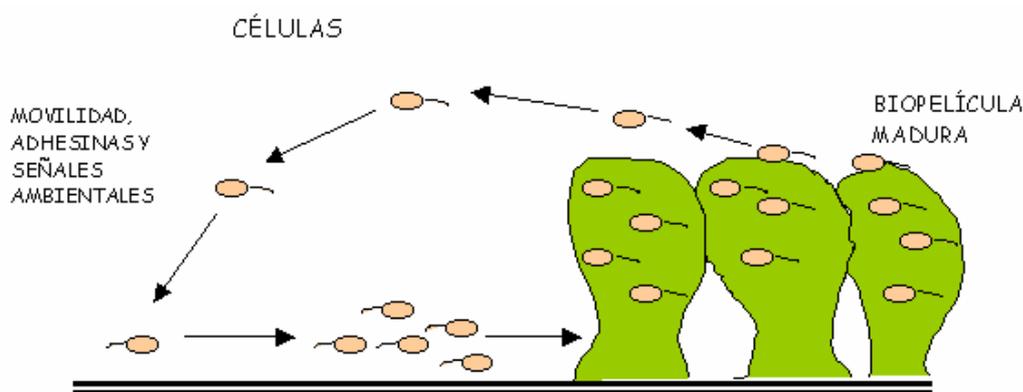


Figura 20: Construcción de una biopelícula. Bacterias planctónicas libres se unen a una superficie. Comunicación célula-célula previa a la formación de una biopelícula.

7.1.- Morfología de las biopelículas

La unidad básica estructural de las biopelículas es la microcolonia, la cual está constituida por células en un 10-25 % y por EPS en un 75-90 % (Costerton, 1999; Danese et al., 2000). La matriz extracelular es más densa en el área próxima al núcleo de la microcolonia de forma que las células bacterianas que se encuentran dentro de la matriz se caracterizan por un escaso movimiento Browniano. Las microcolonias presentan un aspecto de ‘champiñón’ donde la mayoría de las células están en la corona y sólo unas pocas forman el tallo. Para Okabe et al., (1998) la biopelícula, formada por multitud de microcolonias entrelazadas, presenta macroporos de diámetro comprendido entre 20 y 200 μm , y microporos entre los agregados formados por las microcolonias. Esto da como resultado una estructura similar a una malla diseñada para facilitar el transporte de substratos y productos y resistir a las fuerzas externas debido al flujo del agua.

La estructura de las biopelículas puede ser de tres tipos:

• **Modelo del canal de agua.** Después de colonizar la superficie, las células sufren cambios fenotípicos y producen, entre otras moléculas estructurales, exopolisacáridos (EPS). Algunas poblaciones bacterianas constituyen estructuras en forma de cono formando una biomasa filamentosa que soporta multitud de microcolonias (Okabe et al., 1998). Esta fusión microorganismo-EPS deja una red de canales de agua que llega hasta la base de la biopelícula (Figura 21). La importancia de estos canales se ha llegado a comparar al *sistema circulatorio* de un organismo superior, por su estructura, grado de homeostasis, relación espacial óptima con los organismos que conviven y el intercambio de nutrientes y metabolitos entre la comunidad y la fase fluida (Wimpenny y Colasanti, 1997). Para Danese

et al. (2000) ejerce una función fundamental de entrada de nutrientes y salida de productos de desecho celulares.

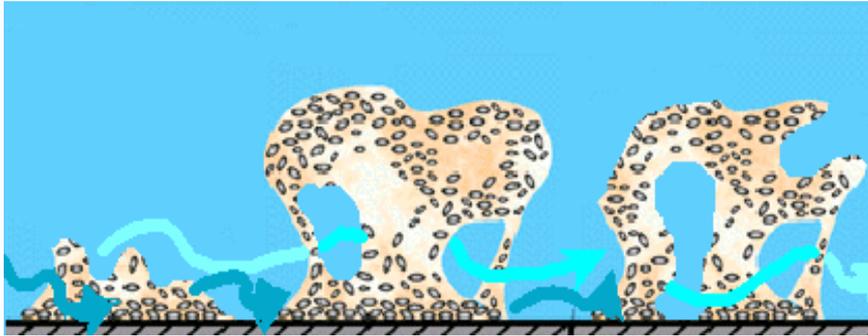


Figura 21: Modelo del canal de agua

∄ **Modelo del mosaico heterogéneo.** Típicas de los sistemas de distribución de agua. Es un caso extremo del modelo del canal de agua. Consiste en microcolonias formando tallos unidos al soporte por la base pero generalmente bien separados de sus vecinos. Usualmente también puede haber una base muy fina de células individuales unidas a la superficie formando una capa de 5 μm de espesor. La diferencia con el modelo de canales es que en este caso, debido a la separación entre las torres microbianas, no se llegan a formar los canales (Figura 22).

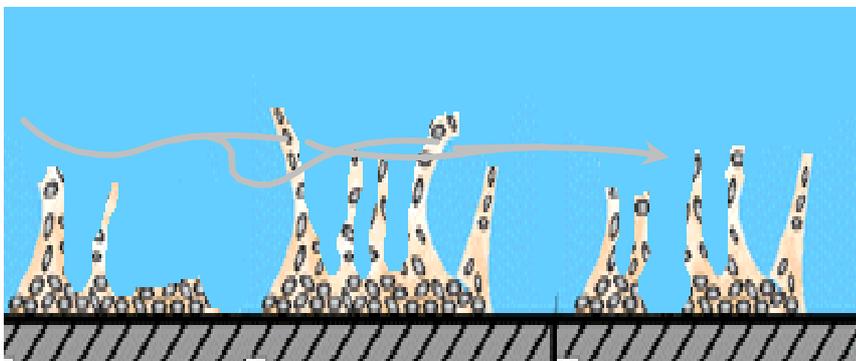


Figura 22: Modelo del mosaico heterogéneo

∄ **Modelo de película densa.** Este es el modelo que toma la placa dental y catéteres médicos. Su estructura no tiene canales de agua o porosidad alguna. Sí hay, sin embargo, alguna organización estructural. Incluye numerosas colonias del mismo tipo de bacteria. Además hay ejemplos de asociaciones específicas (Figura 23).

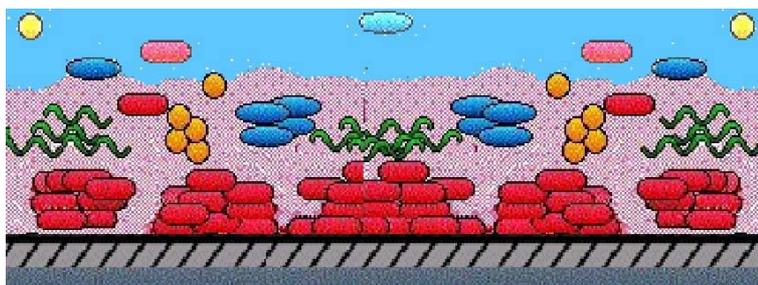


Figura 23: Modelo de película densa

En este modelo hay relación entre la estructura y la concentración de los nutrientes. Siendo la densidad de la biopelícula incrementada en un orden de magnitud con una profundidad de 10 σm , cambiando la porosidad desde un 85-95 % en la parte superior a un 65-70 % en la parte inferior, así como el tamaño del poro, siendo aproximadamente 2 σm en la capa superior y de 0,3 σm en la capa inferior.

Estos cambios en la biopelícula afectan a sus propiedades, por ejemplo con respecto a la difusión del oxígeno ya que ésta varía del 90 % en la superficie interfase líquido/biopelícula a un 25 % en la superficie del sustrato. En relación a la profundidad también las poblaciones microbianas sufren cambios, la relación células vivas/biomasa total disminuye desde 70-90 % en la superficie a un 30-40 % en las capas inferiores y esencialmente los microorganismos aeróbicos metabólicamente activos se localizan en los 100 σm superficiales de las biopelículas.

En los distintos modelos de biopelículas antes mencionados parece existir alguna relación entre la estructura y la concentración de nutrientes presente. En el caso del mosaico heterogéneo la concentración de nutrientes es mínima (<1 mg/L), mientras que para el modelo de película densa la concentración puede llegar a 15-20 g/L. Esta relación, tipo de estructura / concentración de nutriente, ha sido estudiada basándose en la formación de colonias por *Bacillus licheniformis* creciendo sobre distintas concentraciones de nutrientes. Así, cuando este microorganismo se cultiva en medios ricos se puede observar la formación de colonias redondeadas y mucosas, típico de biopelículas con estructura de película densa. Por otro lado, si esta bacteria se desarrolla en medios limitantes origina colonias arracimadas formando ramificaciones, ajustándose esta disposición canalizada a los modelos de biopelícula mosaico heterogéneo y canal de agua. Además de los aspectos nutricionales que afectan a las condiciones de desarrollo de la estructura de las biopelículas, hay otros factores que pueden afectar a la heterogeneidad estructural de las biopelículas (Lazarova et al., 1992; Loosdrecht et al., 1995; Grady et al., 1999; Wimpenny et al., 2000) como son los que aparecen en la **Tabla 3** (Wimpenny et al., 2000).

Tabla 3: Factores que influyen en la morfología de las biopelículas (Wimpenny et al., 2000)

| | |
|--|--|
| Factores genotípicos | Genotipo específico de los microorganismos. Expresión de los genes que codifiquen proteínas de superficie. Expresión de sistemas señal. Formación de EPS. Dinámicas de crecimiento de los microorganismos; tasa de crecimiento específica, afinidad por el sustrato, coeficientes de rendimiento. Expresión de factores genéticos no relacionados directamente con la formación de la biopelícula (motilidad y quimiotaxis, etc.) |
| Factores físico-químicos | Composición y rugosidad del material soporte. Composición de sustratos. Temperatura, pH, potencial hídrico, presión, efectos radiactivos. Característica hidrodinámica del sistema. |
| Procesos estocásticos | Colonización inicial; adherencia. Cambios aleatorios en factores bióticos y abióticos. |
| Interacciones entre microorganismos | Competición, neutralismo y cooperación |
| Procesos mecánicos | Desprendimiento debido a las turbulencias del fluido, abrasión. |
| Cambios temporales | Cambios periódicos diarios y anuales en el ambiente biótico y abiótico, luz, temperatura, pH, P _{O₂} . |

Por otro lado el espesor de una biopelícula es función de la cantidad de nutrientes disponibles, del tipo de soporte, de los tipos de microorganismos que la forman, del pH, temperatura, resistencia de la biopelícula, rugosidad del soporte y edad.

Una biopelícula puede evolucionar hasta un espesor máximo, resultado entre el crecimiento y el desprendimiento, o bien oscilar en un rango consecuencia de la variación brusca del espesor debido a los desprendimientos masivos. Por tanto el espesor puede variar tremendamente encontrándose rangos desde prácticamente el tamaño de unas células en una biopelícula en formación hasta más de 30 mm en películas maduras. En biopelículas autotrofas los valores normales son de 100 μ m y en biopelículas heterótrofas de 2-5 mm.

Una biopelícula es una estructura heterogénea. Estudios sobre biopelículas maduras han puesto de manifiesto como la heterogeneidad de las mismas afecta a su actividad (Bishop, 1997; De Beer et al., 1997; Suci et al., 1997; Wimpenny y Colasanti, 1997; Picioreanu et al., 1998; Xinmin et al., 2000).

La distribución de las bacterias que forman una biopelícula no se realiza al azar sino que cada una ocupa aquella posición donde sus necesidades se satisfacen más (Watnick et al., 2000). Cuando en una misma biopelícula conviven bacterias heterótrofas y autótrofas, ambas competirán por la posición dentro de la biopelícula puesto que requieren el oxígeno como aceptor de electrones. La importancia de esta competición determinará su posición en el interior de la estructura multicelular. Si tomamos el modelo de película densa donde los

nutrientes se mueven por difusión al interior, existirá un gradiente de concentración de sustrato (Grady et al., 1999), y las bacterias crecerán más deprisa en la superficie. Por otro lado, la biopelícula se desarrolla con un grosor constante cuando se alcanzan condiciones de estado estacionario ya que existe una migración de partículas desde el interior al exterior donde las fuerzas de corte de la superficie las eliminará (Lewandowski et al., 1999).

Para especies que no compitan por nutrientes, pero sí por espacio, su distribución dependerá de su velocidad de crecimiento dentro de la biopelícula. La especie de mayor velocidad de crecimiento dominará las capas superficiales y la de menor dominará las más interiores. En las zonas más profundas de la biopelícula la concentración de sustrato para la especie rápida habrá disminuido tanto (la situación limitante de nutriente conlleva un descenso en su desarrollo) que el crecimiento de ambas se simultanea. Las bacterias heterótrofas tienen una constante de saturación menor para el oxígeno que las autótrofas, significando que los heterótrofos pueden disminuir la concentración de oxígeno dentro de la biopelícula hasta el punto de inhibir el crecimiento de los autótrofos. Esto pone en desventaja a este grupo microbiano disminuyendo las zonas donde pueden crecer cuando las dos especies compiten por un nutriente. Este fenómeno ha sido experimentalmente verificado en películas aeróbicas: los organismos heterótrofos suelen estar en el exterior, mientras que las bacterias de crecimiento lento están en el interior (Watanabe et al., 1990; Van Benthum et al., 1997; Okabe et al., 1996; Tjihuis et al., 1996).

Una biopelícula se desarrolla en un fluido a partir de diferentes nutrientes (materia orgánica o CO₂ como fuente de carbono), oxígeno, elementos traza, etc. Estas sustancias penetran en el interior de la biopelícula por difusión o convección (vía canales) donde son metabolizadas por los microorganismos. Si las sustancias orgánicas en el fluido son coloidales o en suspensión tienen que ser hidrolizadas hasta moléculas de bajo peso molecular (Hoppe, 1991). Los productos finales del metabolismo son transportados hacia fuera (la fase líquida), en dirección opuesta a los sustratos.

Tanto los nutrientes como el oxígeno deben atravesar una capa líquida pegada a la superficie de la biopelícula que tiene baja turbulencia y por tanto baja transferencia para pasar desde el seno del fluido hasta el interior.

Si se analizan las concentraciones de nutrientes y oxígeno en profundidad en la biopelícula puede verse que éstas disminuyen desde el seno del líquido a la capa líquida estancada y después aun más en su interior, si uno de los dos reactantes desapareciese la capa mas profunda no será activa y por tanto surge el concepto de capa biológicamente activa para denominar esta capa superficial.

Cuando es el oxígeno el que desaparece se produce anoxia y tanto en este caso como cuando la concentración de sustrato se hace muy pequeña se pueden producir disminuciones en la cohesión y adherencia (formación de gases (CH_4), lisis celular, etc.) que pueden provocar en última instancia desprendimientos masivos de las biopelículas.

Normalmente la concentración de oxígeno disuelto en el fluido y en contacto con la biopelícula es un factor limitante en muchos ecosistemas estableciéndose en profundidad una zona anóxica que es poco efectiva en la transformación de materia orgánica en comparación con la zona óxica.

En la zona anaeróbica se producen fermentaciones, formación de H_2S a partir de SO_4^{2-} y procesos de reducción de nitritos y/o nitratos generados en la capa óxica ó aeróbica con lo que se puede afirmar que en muchos casos coexisten actividades metabólicas aeróbicas y anaeróbicas en una misma biopelícula.

7.2.- Inducción a la formación de biopelículas

Numerosas condiciones ambientales son las responsables de inducir la formación de biopelículas en las bacterias, y desde un punto de vista causa-efecto, el medio ambiente induce a la expresión de ciertos genes y a la represión de otros (Gihigo, 2003), produciendo en última instancia, que las bacterias se encuentren en la naturaleza formando biopelículas, las cuales, les aseguran un hábitat estable y con inercia a los cambios producidos en el entorno natural que rodea a estos microorganismos.

El fenotipo de las bacterias cambia desde el primer momento en que se comienza la formación de una biopelícula hasta que se alcanza el estado de madurez de ésta, lo cual habilita para la adaptación que supone el cambio de vivir como microorganismo independiente a vivir en comunidad.

Una vez que la bacteria entra en contacto con la superficie se altera la expresión de genes promotores para conseguir que la interacción célula-superficie sea estable (Geesey, 2001; Otto y Silhavy, 2002). Se han descrito la existencia de proteínas y de genes reguladores, denominados *Cpx* y *Envz/OmpR*, presentes en *E. coli*, los cuales inducen la formación de pseudopilis involucrados en los procesos de adhesión a la superficie e intervienen en los procesos de osmolaridad (Hung et al., 2001) (**Figura 24**).

En la fase siguiente a la adhesión a la superficie, entran en juego multitud de promotores, genes y enzimas encargados de formar la biopelícula. El regulador *OmpR* se une y activa el promotor de *csgD*, el cual regula positivamente la transcripción de *csgAB* y *adrA* (Chirwa y Herrington, 2003); el primero de ellos, codifica una serie de estructuras

rizadas, una forma especializada de pili, que sirven de unión entre microorganismos en la primigenia biopelícula, y el gen *adrA* codifica la regulación de la biosíntesis de celulosa, un componente de la matriz polimérica extracelular de las biopelículas formadas por *E. coli* y *Salmonella typhimurium* bajo algunas condiciones de crecimiento (Chirwa y Herrington, 2003) (Figura 24).

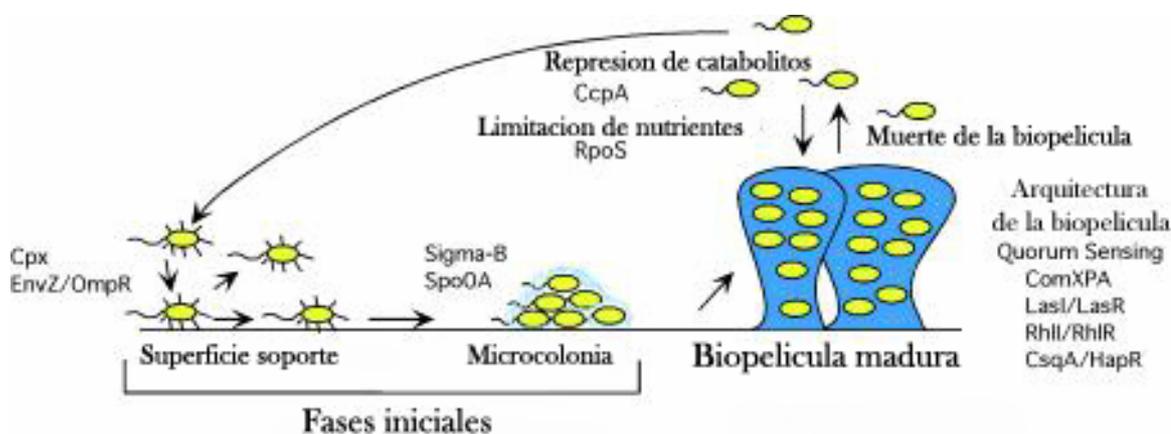


Figura 24: Modelo de la regulación para la formación de una biopelícula (Stanley et al., 2004)

Una vez que el número de bacterias es lo suficientemente grande, comienzan a formar microcolonias y es en esta fase donde comienzan a existir interacciones célula-superficie y célula-célula por lo que una vez más el fenotipo de los microorganismos constituyentes de la biopelícula ha de cambiar de nuevo para adaptarse al nuevo entorno. En *Staphylococcus aureus* y en *Staphylococcus epidermis*, la formación de microcolonias está mediada por la producción de polisacáridos intercelulares adhesivos (PIA). Numerosos factores ambientales influyen en la producción de estos polímeros, como pueden ser la concentración de glucosa, condiciones de anaerobiosis, alta osmolaridad o limitación de hierro o etanol (Gotz, 2002). Muchos de los factores medioambientales que incrementan la producción de los PIA llevan a incrementar la expresión de los genes que codifican las enzimas responsables de su biosíntesis. En *Staphylococcus sp* se denominan *icaADBC*. Estos genes a su vez, están regulados por moléculas como Sigma-B o Spo0A, las cuales necesitan mecanismos de fosforilación, dependientes de factores medioambientales, para poder activarse (Figura 24).

Una vez que la biopelícula alcanza su madurez comienzan una nueva serie de transcripciones genéticas encaminadas a la estabilización, tanto espacial como temporal, de la biopelícula. Un factor de suma importancia es la profundidad de la biopelícula, y como tal, está regulada por multitud de genes. En *Bacillus subtilis* la profundidad se reduce por la represión de catabolitos a través del factor de transcripción CcpA (Stanley et al., 2003). La

actividad de este factor depende del estado de fosforilación del sistema enzimático fosfotransferasa, el cual activa la función glucolítica de la célula. Los mecanismos por los cuales se regulan todos estos procesos no están del todo comprobados, aunque los últimos estudios apuntan a que se deben a una respuesta a diferentes condiciones medioambientales tales como la limitación de nutrientes (Venturi, 2003). Estas condiciones en las que hay limitación de nutrientes activarían a su vez otros genes que regularían a los anteriores, provocando como resultado final una disminución en la profundidad de la biopelícula (**Figura 24**). Es en esta fase donde la regulación por *quorum sensing* adquiere la máxima importancia puesto que la biopelícula se tiene que adaptar a los cambios del medio circundante y esto requiere mecanismos controlados por multitud de factores (Zhu y Mekalanos, 2003; Hammer y Bassler, 2003; Miller et al., 2002).

7.3.- Las biopelículas como mecanismo de biorresistencia

Los mecanismos de tolerancia en los microorganismos hacia los metales pesados incluyen uniones covalentes con la pared celular o con polímeros extracelulares y proteínas, formación de sulfuros insolubles del metal, volatilización o transporte activo al exterior celular, y todos estos mecanismos de defensa contra agentes tóxicos se incrementan en la biopelícula.

Una bacteria como parte integrante de una biopelícula es considerablemente más resistente a agentes tóxicos que como célula individual principalmente por cinco factores:

∅La biopelícula como tal es una barrera física que impide la difusión de agentes tóxicos. El mecanismo propuesto de resistencia es que el glicocálix crea un impedimento para que el agente antimicrobiano difunda hasta las bacterias (Stewart et al., 1998). La difusión a través de una biopelícula se ve afectada por las interacciones iónicas que se establecen entre la molécula que difunde y la matriz, por lo que la naturaleza polianiónica de ésta crea una barrera que dificulta la difusión de los cationes hasta las células (Costerton y Lashen, 1984).

∅El número de bacterias concentradas en una biopelícula es muy superior y ofrece la posibilidad de liberar enzimas en concentraciones mayores a las que podrían ser liberadas en medio libre, estas enzimas serían las responsables de modificar los agentes microbianos y transformarlos a formas no tóxicas. El fenómeno se estudia normalmente desde el punto de vista de la biodegradación. Los compuestos aromáticos derivados del fenol, que se emplean como biocidas, son degradados por ciertas bacterias (Ma et al, 1998). Ejemplos de mecanismos de resistencia mediados por enzimas incluyen la resistencia a metales pesados y

a formaldehído entre otros. El mercurio, antimonio, níquel, cadmio, arseniato, cobalto, cinc, plomo, telurito, cobre, cromato y plata son algunos de los metales pesados que son inactivados mediante acción enzimática. Dicha detoxificación, se basa usualmente en la reducción del ion a metal empleando una maquinaria enzimática que se encuentra codificada por genes, localizados bien en plásmidos o bien en el cromosoma, cuya expresión se activa por la presencia de metal pesado.

∅ Desde el punto de vista químico, la biopelícula posee grupos químicos que por sí solos neutralizan al agente antimicrobiano. Uno de los mecanismos, por tanto, empleados por los microorganismos para inmovilizar a los metales pesados consiste en biosintetizar moléculas orgánicas con grupos químicos capaces de interactuar electrostáticamente con éstos mediante un pseudo intercambio iónico (Wase, 1997), produciendo una biomineralización del metal pesado (Barkay, 2001). Estos grupos químicos son principalmente: grupos carboxilo, presente en los ácidos urónicos; sulfonato, presente en el ácido cisteico; fosfato, presente en polisacáridos; hidroxilo, localizado en la tirosina; amino, grupo funcional de la histidina; imino, presente en péptidos, e imidazol, localizado en la histidina. Desde este punto de vista, la biopelícula se puede considerar como una resina de cambio iónico, pues capta los iones y libera protones al medio.

∅ El nivel metabólico en una biopelícula aumenta la resistencia contra agentes biocidas debido a que la principal función no es multiplicarse, sino asegurar la persistencia de la biopelícula, lo que supone aunar esfuerzos para contrarrestar aquello que le es tóxico (Huang et al., 1995)

∅ Al estar los microorganismos coexistiendo en un mismo hábitat ponen en marcha la maquinaria genética capaz de neutralizar el agente microbiano, de forma que incluso se puede llegar a decir que se produce un cambio en el fenotipo de la biopelícula (Cloete, 2003).

7.4.- Composición química y microbiológica de las biopelículas

Una biopelícula microbiana consiste en células unidas a un medio soporte, embebidas en una matriz polimérica de naturaleza orgánica y origen microbiano. Una descripción detallada de los componentes de las biopelículas microbianas incluiría una biomasa molecular, sustancias poliméricas extracelulares, productos de lisis celular y productos de hidrólisis.

∅ Biomasa celular: El contenido de biomasa celular de las biopelículas es muy variable, pudiendo oscilar entre el 10 y el 90 % de la materia orgánica. Atlas y Bartha

(2001) indican que los tipos de microorganismos que forman parte de las biopelículas son extremadamente diversos y suelen ser un reflejo del hábitat donde se desarrollan, y que la mayoría de la biomasa está constituida por bacterias, quienes además son las primeras en aparecer en una biopelícula en formación, luego lo harán los protozoos seguidos de las algas y finalmente los metazoos.

Las bacterias son los componentes más abundantes y dentro de éstas predominan aquellas que tienen la capacidad de desarrollar crecimientos zoogleales, donde las bacterias están embebidas en una matriz común que ellas mismas secretan y donde viven en simbiosis (Percival et al., 1998). Los géneros más comunes son *Achromobacterium*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* y *Zooglea*. También se pueden encontrar formas filamentosas como *Sphaerotilus*, y en el caso de aguas que contengan compuestos amoniacales, bacterias nitrificantes (*Nitrosomonas* y *Nitrobacter*).

EPS: Los microorganismos que componen la biopelícula están unidos por una matriz de polímeros extracelulares, formada por polímeros orgánicos que son producidos y excretados por los microorganismos que la componen. El EPS está compuesto por una gran diversidad de sustancias orgánicas, entre otras por mananos, glucanos, ácidos urónicos, manosa, galactosa, xilosa, glicoproteínas, etc. (Frolund et al., 1996) en una concentración que varía en función de las condiciones medioambientales y de los microorganismos que la excretan (Grady et al., 1999).

Los carbohidratos se han identificado como el componente mayoritario del EPS de muchos cultivos puros (Cessutti et al., 1999; Sutherland et al., 1996). Los hidratos de carbono se encuentran formando homopolisacáridos (compuestos por un solo tipo de azúcar) o heteropolisacáridos (presentan en su estructura de dos a cinco azúcares diferentes), pudiendo llevar sustituyentes orgánicos e inorgánicos. Estos monosacáridos son similares a los encontrados en polisacáridos de animales y plantas. La D-glucosa, D-galactosa y D-manosa están presentes en muchos polisacáridos, al igual que 6-desoxihexosas como L-ranosa. La cantidad de monómeros de azúcar que posee es importante para las propiedades de cohesión del EPS y para la facilidad de éste para formar agregados (Decho, 2000).

El EPS también pueden contener ADN (Tsuneda et al., 2001; Zhang et al., 1999), el cual procede de la lisis celular, por eso grandes cantidades de ADN nos indican que se está produciendo mucha lisis celular durante el proceso de extracción del EPS.

La naturaleza polianiónica del EPS es debida a la presencia de grupos piruvato y ácidos urónicos (Lindberg, 1990; Sutherland et al., 1990; Decho, 2000). Algunas poseen

sulfato y fosfato, quienes contribuyen en la capacidad quelante del EPS (Sutherland et al., 1990).

Las funciones que ejerce el EPS son consecuencia de su naturaleza biológica y de sus características químicas y físicas, que las hacen ser el principal agente estructural de las biopelículas (Decho, 2000). Entre sus características se encuentran las de:

- Permitir establecer y mantener asociaciones entre microorganismos y entre éstos y su medio ambiente (Decho, 2000).

- En la biopelícula la división celular es muy baja, en su lugar el exceso de energía lo emplean en sintetizar EPS, de tal forma que estas constituyen una fuente de reserva de energía y carbono (Decho, 2000; Lui et al., 2002).

- Protege a las exoenzimas, enzimas secretados por la bacteria que no están en contacto directo con la membrana celular y cuya función es la de hidrolizar moléculas orgánicas de alto peso molecular (Hoppe, 1991).

- En la mayoría de los casos el EPS actúa como protector. Así, la presencia de exopolisacáridos confiere a la célula bacteriana una protección frente a la desecación dada la capacidad de estos polímeros de retener agua debido a su carácter hidrófilo (Whitfield et al., 1993; Potts, 1994).

- Actúa como una esponja donde quedan atrapados y concentrados moléculas orgánicas e iones del medio acuoso. Este proceso favorece la concentración de nutrientes bacterianos en el interior de la biopelícula (Decho, 2000; Guibaud et al., 2003).

- Juega un papel crucial en la floculación (Frolund et al., 1996; Rudd et al., 1984) de los fangos activos y en la estructura de los flóculos que lo forman (Schmidt et al., 1996).

- Capacidad quelante de metales tóxicos y otros contaminantes (Decho, 2000).

- Confieren a la célula protección frente a agentes líticos, fagocíticos, ataque de protozoos e incluso frente a los bacteriófagos. Además inhiben la acción de determinados agentes antimicrobianos.

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

¿Productos de hidrólisis: Considerando la diversidad de macromoléculas que existen en las biopelículas es fácil imaginar la gran variedad de productos de hidrólisis que en ella existirán.

7.5.- Biodiversidad en las biopelículas

El término “biodiversidad” fue acuñado en 1986 por Walter Rosen (Sarkar y Margules, 2002), nacido de la contracción de las palabras inglesas para “diversidad biológica” (*biological diversity*). Si el concepto de diversidad hace referencia al grado de variabilidad o diferencia en un conjunto de entidades, la diversidad biológica o biodiversidad se refiere por lo tanto a la variabilidad de la vida en todas sus formas y procesos. Según el *Convenio sobre la Diversidad Biológica*, elaborado durante la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo, celebrada en Brasil en junio de 1992 y suscrito en la actualidad por 157 países, por diversidad biológica se entiende “la variabilidad de organismos vivos de cualquier fuente, incluidos, entre otras cosas, los ecosistemas terrestres y marinos y otros ecosistemas acuáticos y los complejos ecológicos de los que forman parte; comprende la diversidad dentro de cada especie, entre las especies y de los ecosistemas”.

Una definición tan amplia conlleva cierta confusión en la utilización del término biodiversidad, que sin embargo se hizo muy popular desde el momento de su introducción, y en nuestros días protagoniza una gran profusión de textos científicos. El concepto representa la forma en que los seres vivos se organizan e interaccionan entre ellos, en una escala que va desde la más sencilla de las interacciones, a nivel de genes o cromosomas, a las que tienen lugar a nivel de los organismos y los ecosistemas. La biodiversidad se puede definir por lo tanto en términos de genes, especies o ecosistemas, correspondiendo a tres niveles jerárquicos de organización biológica (**Tabla 4**). Entendida en su acepción más amplia, la biodiversidad tiene como principal objeto de estudio las poblaciones (conjunto de individuos de una misma especie que viven en un lugar determinado), porque sobre ellas convergen tanto la diversidad genética como la taxonómica o la ecológica.

Tradicionalmente, el principal vehículo para el conocimiento de la biodiversidad ha sido el constituido por la taxonomía y sistemática biológica, es decir la ordenación en un sistema jerarquizado de los distintos tipos de seres vivos en grupos (taxones) y la clasificación de los mismos atendiendo a su origen filogenético. Quizá por esta razón y por el hecho de que el mundo viviente ha sido considerado mayoritariamente por los biólogos y ecólogos en términos de especies, el término biodiversidad encuentra su uso más común como sinónimo

de la diversidad taxonómica, en particular la riqueza de especies en distintos grupos taxonómicos que forman parte de un determinado hábitat.

Tabla 4: Diversidad del mundo vivo (Pascual, 1997)

| Diversidad dentro de cada especie (genética) | Diversidad entre las especies (taxonómica) | Diversidad de los ecosistemas (ecológica) |
|--|--|---|
| | Reinos | Bioregiones |
| | Phila | Paisajes |
| | Familias | Ecosistemas |
| | Géneros | Hábitats |
| | Especies | Nichos |
| Poblaciones | Poblaciones | Poblaciones |
| Individuos | Individuos | |
| Cromosomas | | |
| Genes | | |

7.5.1.- Diversidad procariota.

Los conocimientos de la diversidad de los microorganismos procariotas y su papel en el mundo vivo son muy limitados, debido a que las técnicas microbiológicas tradicionales se basan en la observación microscópica y cultivo de los microorganismos en el laboratorio, que con el paso del tiempo se han mostrado insuficientes para su identificación y clasificación.

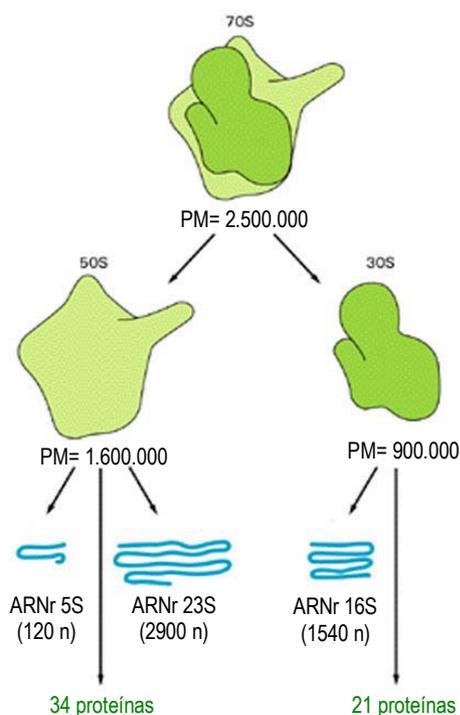


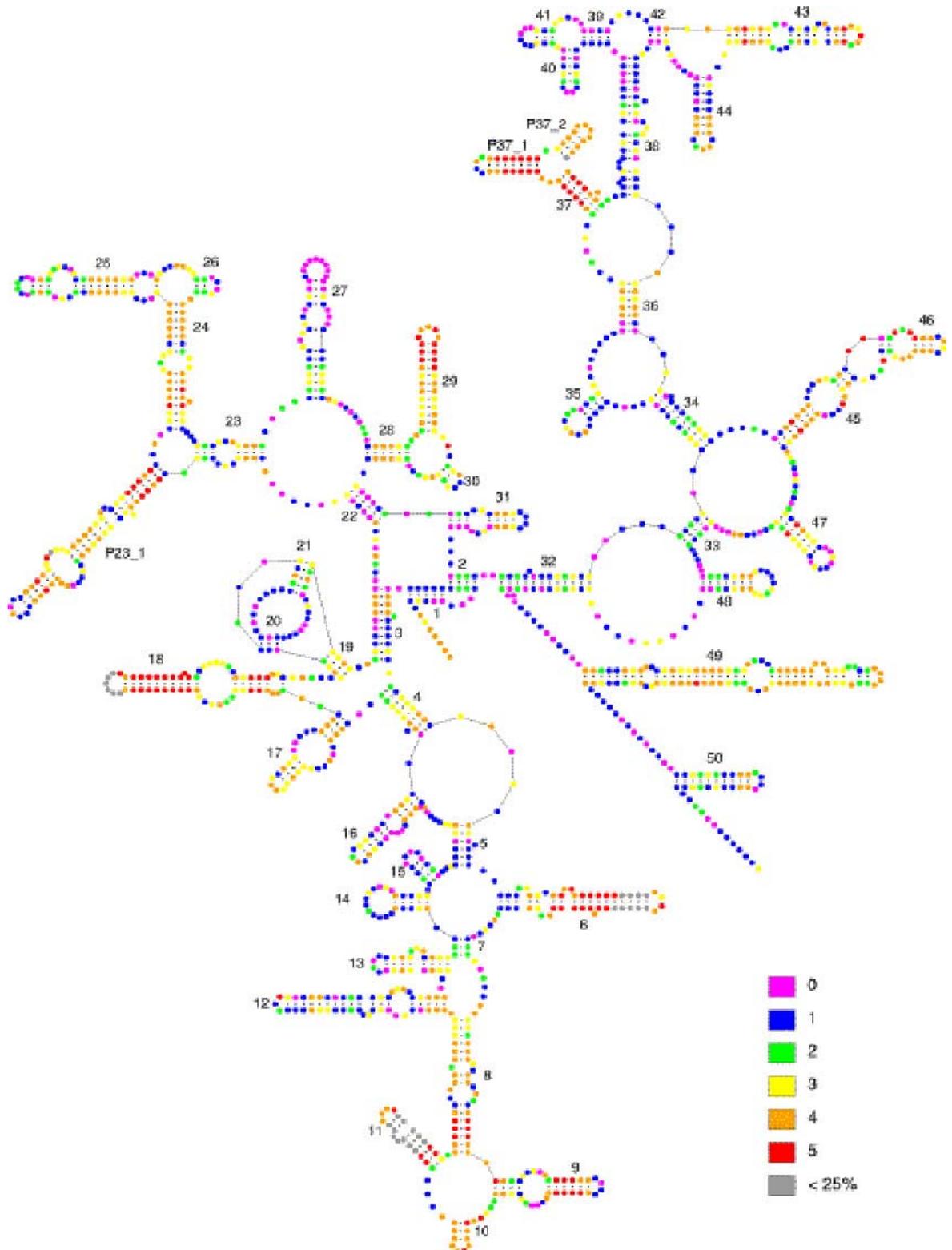
Figura 25: Estructura y componentes del ribosoma procariota.

Debido a las particularidades de los microorganismos, como son su pequeño tamaño y simplicidad estructural, la clasificación basada enteramente en la observación de caracteres morfológicos es muy poco fiable. La clasificación en función de propiedades fisiológicas y bioquímicas es imposible, puesto que se estima que un 99 % de la totalidad de los distintos microorganismos que existen en la naturaleza no ha sido jamás aislado ni cultivado en condiciones de laboratorio (Muyzer, 1999). Esto se debe en gran parte a la falta de conocimientos sobre los requerimientos reales de los mismos en condiciones naturales, que nos impide emular estas condiciones en el laboratorio, así como al desconocimiento de posibles interdependencias entre organismos en sus *hábitats* naturales (Muyzer y Smalla, 1998). Por tanto, la diversidad procariota conocida representa sólo la punta de un iceberg, y en las últimas dos décadas se ha hecho manifiesta la necesidad de introducir nuevas técnicas que proporcionen el complemento necesario a los métodos microbiológicos tradicionales, para poder obtener información más precisa sobre la importancia de la diversidad bacteriana en el mantenimiento de los ecosistemas.

El desarrollo de la biología molecular ha permitido el estudio de la diversidad procariota desde un punto de vista diferente: el nivel genético. La taxonomía moderna tiende a agrupar los microorganismos en función de la similitud entre sus genes, que a la vez es un reflejo de su proximidad evolutiva (Woese, 1987). Hablando de modo general, los métodos de identificación a nivel de ADN generan una huella dactilar genética de los microorganismos que, de manera similar a un código de barras, resulta útil para su identificación y clasificación. Se han diseñado múltiples métodos agrupados en diferentes categorías, que difieren en su fundamento, poder de discriminación, rango taxonómico al que son aplicables, reproducibilidad y asequibilidad para su interpretación y estandarización (Vanechoutte, 1996; Savelkoul et al., 1999; Muyzer, 1999).

Una de las aproximaciones más extendidas para explorar la diversidad procariota a nivel genético se basa en la clonación y secuenciación de los genes que codifican el ARN 16S (**Figura 25**) de la subunidad pequeña del ribosoma bacteriano (ADNr 16S).

Este gen cumple los requisitos para actuar como una buena sonda evolutiva, al tratarse de un gen de distribución universal que posee una función constante, que cambia con suficiente lentitud como para permitir detectar relaciones muy antiguas, y de un tamaño relativamente pequeño (aproximadamente 1,5 Kb) que ha facilitado su secuenciación, especialmente antes de la introducción generalizada de los métodos de secuenciación automática a partir de mediados de los años 90.

Figura 26: Mapa de variabilidad del ADNr de *E. coli*.

La secuencia del ADNr 16S tiene una estructura de mosaico, presentando una alternancia de regiones altamente conservadas en el reino procariota y regiones hipervariables que sólo están conservadas entre los individuos evolutivamente muy próximos (**Figura 26**). Esa estructura ha permitido el diseño de cebadores universales para la aplicación de estrategias de PCR (Weisburgh et al., 1991), que posibilitan la clonación de fragmentos de los ADNr 16S de microorganismos a partir de ADN total extraído de muestras naturales, y de este modo profundizar en el conocimiento de la diversidad de las comunidades microbianas en los ecosistemas naturales (Muyzer y Smalla, 1998).

Sin embargo, a pesar de que estos estudios proporcionan una exploración de la diversidad microbiana superior a la que se vislumbra con los métodos tradicionales dependientes del cultivo de los microorganismos, tienen dos claras desventajas: la clonación es un método laborioso y poco práctico para múltiples muestras y por lo tanto es difícil de aplicar para el estudio de la dinámica de las poblaciones, constantemente influenciadas por las fluctuaciones naturales de los parámetros ambientales o las perturbaciones introducidas por la actividad humana sobre el medio ambiente. Por ello, recientemente se han desarrollado otras técnicas de huella genética más adecuadas para estos propósitos (**Figura 27**).

En 1993, Muyzer et al. introdujeron la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE) en el campo de la ecología microbiana. Esta técnica, junto con su homóloga TGGE (electroforesis en gel con gradiente de temperatura), fue inicialmente diseñada para distinguir mutaciones genéticas, y permite la separación de fragmentos de ADN de igual tamaño pero de distinta secuencia de nucleótidos.

El fundamento de la técnica se basa en la disminución de la velocidad electroforética que sufren las moléculas de ADN de doble cadena cuando se encuentran parcialmente desnaturadas, debido a cambios de la forma física de la molécula que afectan a su movilidad cuando migran en la matriz de un gel que contenga un gradiente lineal de desnaturantes del ADN.

El gradiente desnaturante se crea bien a partir de sustancias químicas (DGGE) o bien mediante un rango de temperaturas (TGGE), que es más fácilmente reproducible, y por tanto proporciona resultados más comparativos (Riesner et al., 1989).

Cuando la electroforesis de una mezcla de fragmentos de ADN amplificados con cebadores universales a partir de ADN total extraído de una muestra ambiental se realiza en condiciones adecuadas en geles de poliacrilamida bajo un gradiente lineal de desnaturantes químicos o de temperaturas, las moléculas con distinta secuencia se

desnaturalizan parcialmente a distintas alturas del gradiente, y por tanto se detienen en su migración electroforética en distintas posiciones en el gel (Muyzer y Smalla, 1998; Muyzer, 1999). De esta forma, se obtienen perfiles de la composición de la población en la muestra de partida. Una vez separadas, las bandas correspondientes a distintas secuencias de ADN pueden reamplificarse con los mismos cebadores universales y ser secuenciadas, permitiendo la comparación de las nuevas secuencias con las ya conocidas y depositadas en las bases de datos, y de esta forma es posible establecer su afiliación taxonómica.

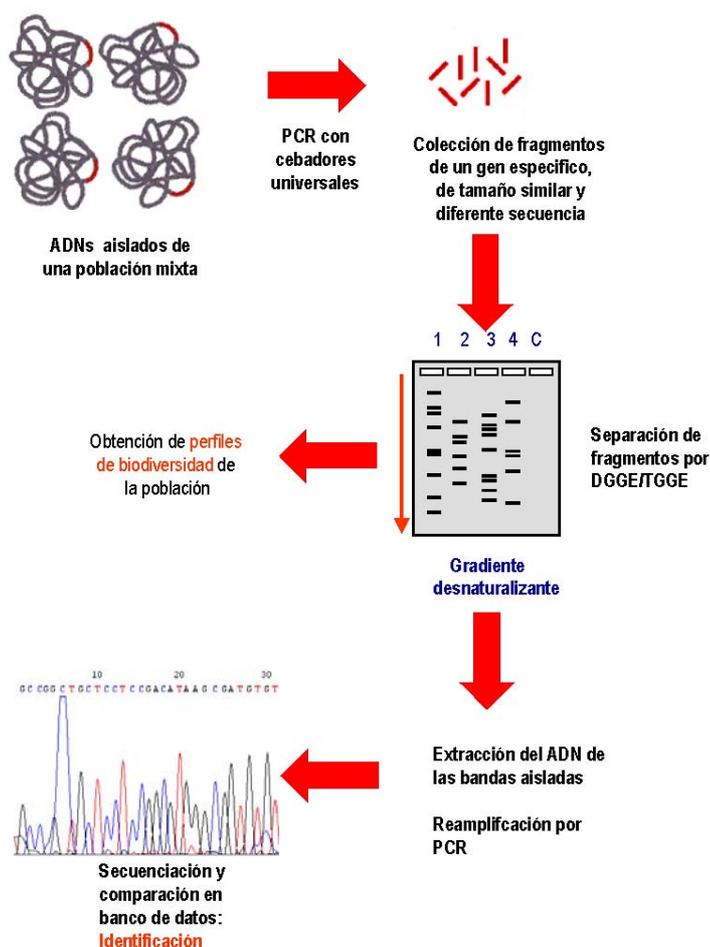


Figura 27: Esquema de la aplicación de la técnica de DGGE/TGGE a estudios de la biodiversidad microbiana de los ecosistemas.

Las ventajas de esta técnica son múltiples: permite investigar la diversidad de una población microbiana natural sin necesidad de aislar y estudiar individualmente sus componentes, posibilita la identificación de los microorganismos hasta nivel de especie, es apta para el análisis simultáneo de un elevado número de muestras, y permite comparar los perfiles de biodiversidad de la población evaluando diferencias espaciales y temporales en

un determinado nicho ecológico, así como el impacto producido por la introducción de agentes externos. Hoy día se considera una técnica de elección para la caracterización de poblaciones naturales, en las que un porcentaje elevado de los microorganismos presentes pueden ser no cultivables (Muyzer, 1999).

Las técnicas de DGGE/TGGE son de una gran versatilidad y admiten numerosas variantes en su aplicación, siendo su principal limitación el tamaño máximo de los fragmentos a separar (<500 pb). La opción inicial (y aun la más utilizada) se basa en la amplificación de fragmentos del ADNr 16S de los integrantes de la población objeto de estudio, aunque existen numerosas variaciones de la técnica puestas a punto por diferentes laboratorios a lo largo de la última década. Las regiones hipervariables escogidas con más frecuencia para estos estudios son la V3 y V6 (**Figura 28**), para las cuales se han diseñado parejas de cebadores universales (Muyzer et al., 1994; Heuer et al., 1997).

La desventaja de emplear estos cebadores universales para el ADNr 16S es la limitación física para separar un elevado número de fragmentos en la superficie del gel, conduciendo a patrones de población muy ricos en complejidad, pero que dificultan el aislamiento de bandas individuales para su reamplificación y secuenciación, y que aportan información únicamente acerca de los microorganismos predominantes en una comunidad determinada (Muyzer y Smalla, 1998). En otros casos, se han diseñado parejas de cebadores que han permitido la amplificación selectiva de fragmentos del ADNr 16S de los siguientes grupos específicos microbianos:

- € Actinomicetos (Heuer et al., 1997)
- € Micobacterias (Cheung y Kinkle, 2001)
- € Cianobacterias (Nübel et al., 1997)
- € *Agrobacterium-Rhizobium* (Muyzer y Smalla, 1998)
- € Bacterias reductoras de sulfatos (Teske et al., 1996)
- € Metanotrofos (Murrell y Radajewsky, 2000)
- € Bacterias oxidadoras de amonio (Kowalchuk et al., 1997).

En muchas ocasiones, estos estudios han aplicado estrategias de PCR anidada, empleando un primer par de cebadores específico de grupo, seguido de un segundo par de cebadores universales, para obtener finalmente fragmentos de un grupo de población determinado que reúnan los requisitos para ser susceptibles de separación mediante DGGE/TGGE (Muyzer y Smalla, 1998; Gomes et al., 2001).

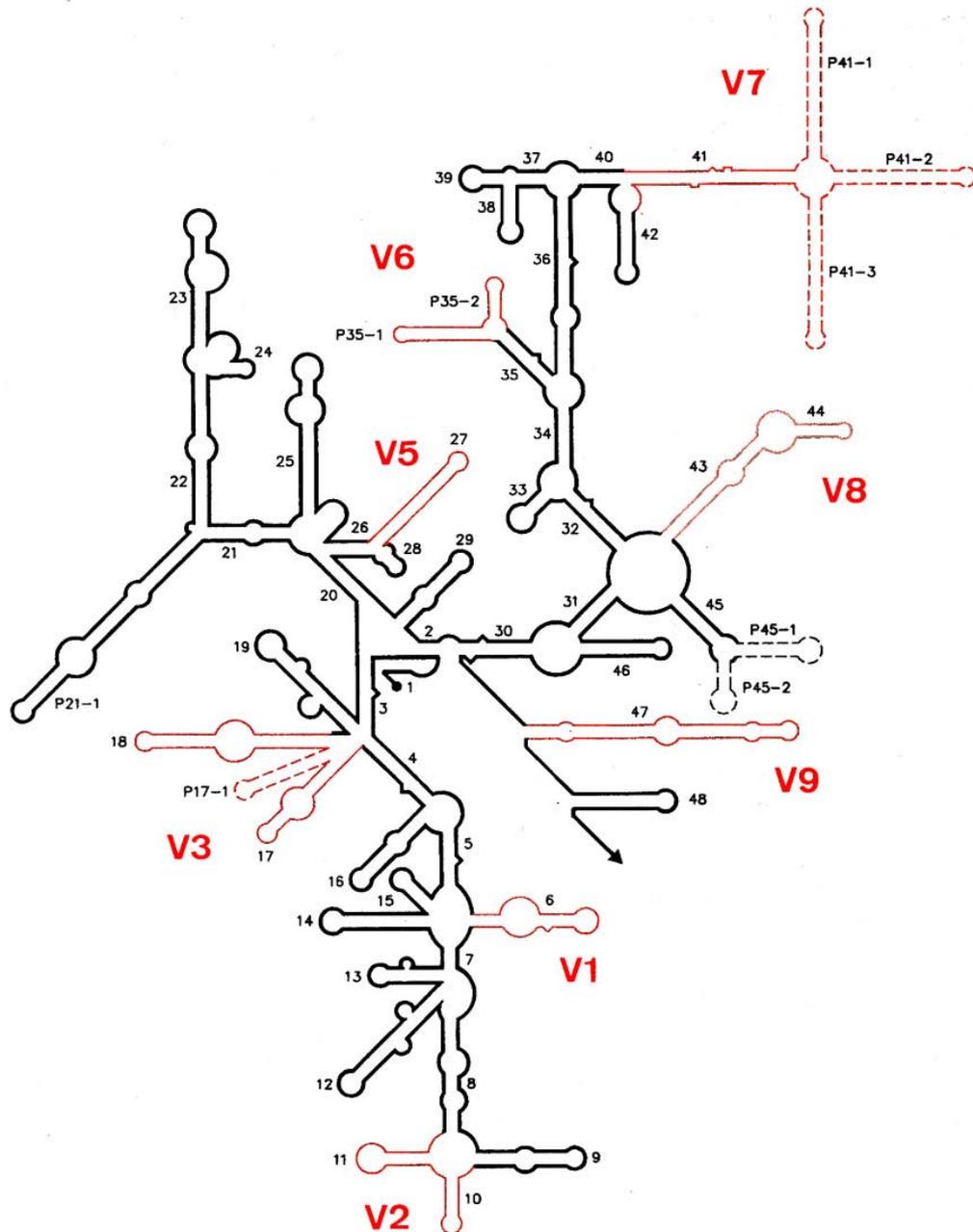


Figura 28: Regiones hipervariables presentes en el ARN 16S procariótico, denominadas V1 a V9 y resaltadas en rojo. Neefs et al (1990).

Recientemente, este tipo de investigaciones han dado un nuevo giro, enfocándose hacia el estudio de la biodiversidad de grupos microbianos con papeles ecológicos concretos, empleando genes funcionales como base del estudio. Esta aproximación proporciona patrones de la diversidad genética para el gen funcional del que se trate, permitiendo el estudio de actividades específicas de determinadas poblaciones y facilitando tanto la discriminación entre microorganismos filogenéticamente cercanos pero con

diferentes papeles ecológicos, como grupos funcionales constituidos por microorganismos filogenéticamente heterogéneos. Ejemplos de esta aplicación son el estudio de los siguientes grupos microbianos:

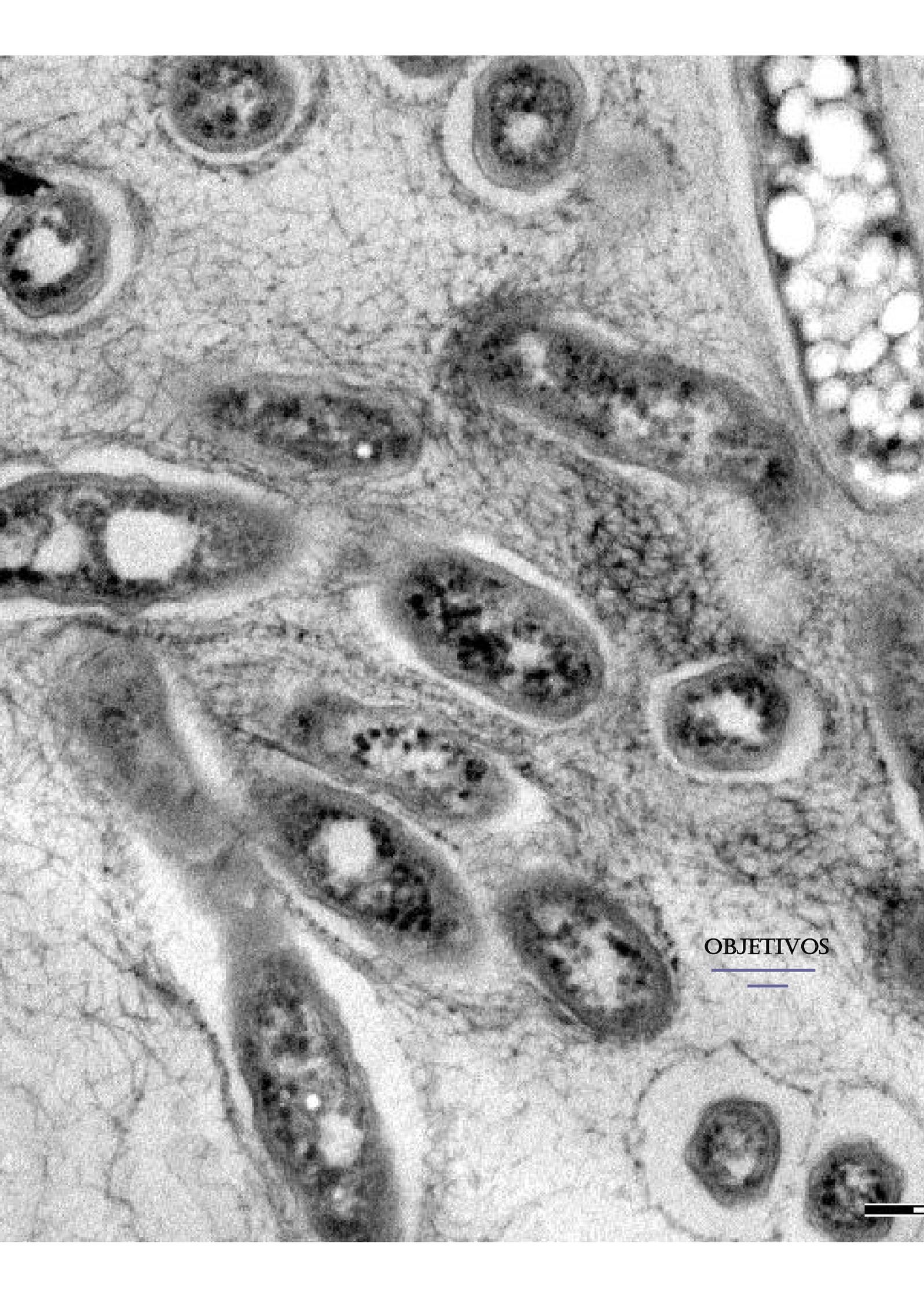
∄ Reductores de sulfato, mediante amplificación de fragmentos del gen codificante de la enzima hidrogenasa [NiFe] (Wawer et al., 1997)

∄ Degradadores de fenol, mediante amplificación de los genes codificantes de las enzimas fenol-hidrolasas (Watanabe et al., 1998)

∄ Oxidadores de amonio, mediante ampliación del gen *amoA*, estructural para la subunidad ζ de la enzima amonio-monooxigenasa (Rothauwe et al., 1997; Nicolaisen y Ramsing, 2002; Gómez Villalba, 2003)

∄ Desnitrificantes, mediante amplificación del gen *nosZ*, codificante de la enzima óxido nitroso reductasa (Scala y Kerkhof, 1998; Gómez Villalba, 2003).

Mediante todas las variantes mencionadas, las técnicas de DGGE/TGGE se han aplicado en numerosos estudios para establecer la importancia de la diversidad bacteriana total o de determinados grupos funcionales, así como la dinámica de estas poblaciones, en diversos hábitats: aguas termales (Ward et al., 1998), dunas y sedimentos costeros (Kowalchuk et al., 1997; Muyzer, 1999; Nicolaisen y Ramsing, 2002), suelos agrícolas (Gomes et al., 2001; Nicolaisen y Ramsing, 2002), suelos contaminados con pesticidas (Engelen et al., 1998), aguas (dulces y marinas) y suelos contaminados con hidrocarburos o derivados del petróleo (Chang et al., 2000; Ralebitso et al., 2000; Cheung y Krinkle, 2001), fangos activos para eliminación de fenol (Watanabe et al., 1998, 1999) o nitrógeno en aguas (Nicolaisen y Ramsing, 2002), reactores de tratamiento de aguas residuales de la industria farmacéutica (Lapara et al., 2002), o pinturas murales biodeterioradas (Gurtner et al., 2000).



OBJETIVOS

Los sistemas de filtros sumergidos han sido aplicados con éxito al tratamiento de aguas, empleando biopelículas capaces de biodegradar materia orgánica, compuestos inorgánicos de nitrógeno o sustancias recalcitrantes como polifenoles. Las biopelículas, consistentes en una matriz polimérica donde quedan embebidos microorganismos, pueden ejercer una función bioadsorbente de compuestos tales como los metales pesados. Esta propiedad nos lleva a plantearnos el aplicar los sistemas de filtros sumergidos para la eliminación de metales pesados de masas acuosas contaminadas, tales como las aguas subterráneas. Con un tratamiento de este tipo se puede evitar que otras masas acuosas alimentadas por el agua contaminada puedan verse afectadas, por lo que se evitan los graves daños ecológicos producidos por este tipo de contaminación. Por otro lado se permite aplicar el agua para muchos usos, entre ellos el abastecimiento.

Para lograr este objetivo principal, nos planteamos desarrollar una investigación con los siguientes objetivos parciales:

- 1°-Formación de biopelículas bioadsorbentes, en función de su capacidad para retener metales pesados.
- 2°-Estudio de las necesidades en aportes de nutrientes, para el mantenimiento de la actividad biológica en la biopelícula.
- 3°-Estudio químico y microbiológico de la biomasa obtenida del filtro biológico.
- 4°-Estudio morfológico, mediante microscopía electrónica, de las biopelículas formadas en los biofiltros.
- 5°-Estudio de la capacidad de acumulación de metales pesados en la biopelícula.
 - 5.1.-Rendimientos de eliminación de los metales pesados del influente.
 - 5.2.-Localización de los metales en la biopelícula.
- 6°-Estudios de biodiversidad de las poblaciones bacterianas desarrolladas en los biofiltros.

Esta investigación nos permitirá conocer los mecanismos que emplea la microbiota integrante de una biopelícula para la inmovilización de metales pesados, así como el empleo de lechos sumergidos como sistemas capaces de la bioadsorción de estas especies químicas de alto carácter recalcitrante, y su posterior utilización en el tratamiento de aguas contaminadas, evitando con ello daños significativos en los ecosistemas acuáticos y terrestres.



MATERIAL Y MÉTODOS

Para desarrollar los objetivos propuestos fue necesario en primer lugar diseñar un biofiltro, empleando como relleno un soporte arcilloso previamente utilizado en nuestro Grupo de Investigación (Zamorano, 1995) y sobre éste, formar una biopelícula a partir de agua de pozo enriquecida con sacarosa como fuente de carbono. A continuación se eligieron una serie de parámetros para analizar a lo largo de los ciclos de funcionamiento de los biofiltros y una vez establecida la metodología óptima a seguir se procedió a contaminar el influente, enriquecido con sacarosa, con diferentes metales pesados, empleando los nitratos, en el caso de los iones cúprico, cromoico y plumboso, o la sal de sodio, en el caso del ión *m*-arsenito.

1.- Diseño del biofiltro

En primer lugar se procedió a diseñar la planta piloto y a establecer parámetros como la aireación, el caudal del influente y la periodicidad en la toma de éste y el lavado del sistema.

1.1.- Ubicación de la planta piloto y descripción del biofiltro.

El trabajo con plantas piloto es un paso necesario previo a diseñar plantas de mayor tamaño, puesto que permite operar con facilidad y aplicar modificaciones en su diseño, así como disponer de todos los dispositivos analíticos y de control cercanos. Nuestra planta piloto se encontraba en las instalaciones del Instituto del Agua de la Universidad de Granada.

Para realizar el estudio, se diseñó y construyó una planta de 0,5 m de altura y un diámetro interno de 0,15 m. Los puntos de muestreo se situaron numerados del 1 al 6, tal como se muestra en la **Figura 29**. El punto de muestreo 0 fue la entrada de influente, el punto de muestreo n°1 fue el más próximo a la entrada del influente y el punto 4 el más alejado de ésta. Estos cuatro puntos se situaron a distancias de 10 cm uno del otro. El punto 5 se empleó para el lavado del biofiltro a contracorriente, no siendo un punto de muestreo. El punto 6 fue la salida del biofiltro.

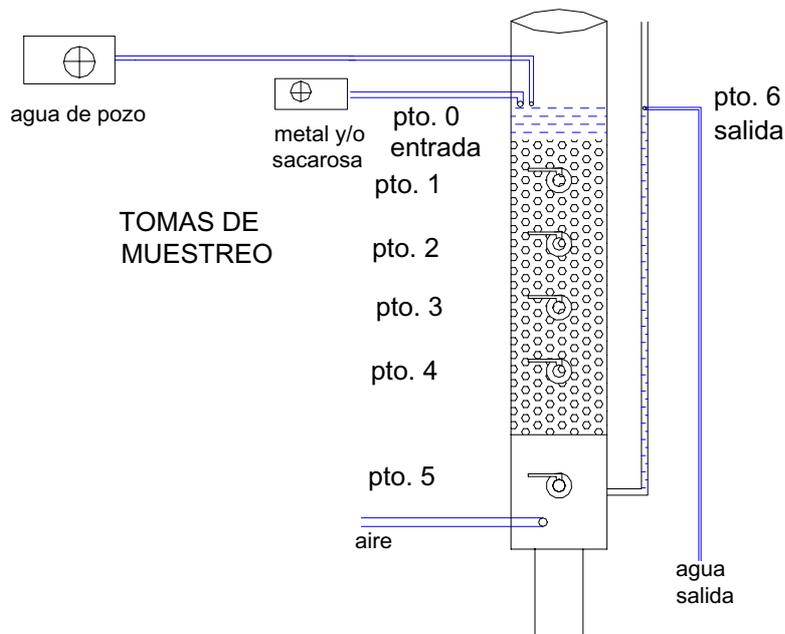


Figura 29: Esquema del biofiltro

La entrada de influente tuvo lugar por la parte superior produciendo un flujo descendente y la entrada de aire por la parte inferior, a contracorriente.



Figura 30: Aspecto del biofiltro ubicado en las instalaciones del Instituto del Agua de la Universidad de Granada

1.2.- Aireación

La medida del caudal de aire en el biofiltro se llevó a cabo de forma continua mediante un rotámetro, tipo “DynaVal Air”, calibrado entre 0,5 y 5,0 L/h.

1.3.- Caudal

Para el bombeo de agua de entrada y del nutriente, junto con el metal pesado en el caso de los biofiltros con influentes contaminados, se emplearon dos bombas peristálticas “Ismatec”. Tanto el caudal de agua subterránea como el de la fuente de carbono (disuelta en agua destilada) se calcularon empleando un cronómetro y una probeta, midiendo el volumen en un tiempo determinado.

1.4.- Periodicidad en la toma del agua de pozo

El agua subterránea empleada en este estudio provenía de un pozo situado en la Estación Depuradora de Aguas Subterráneas (EDAR) de “Los Vados”, propiedad de la Empresa Municipal de Aguas y Saneamiento de Granada, Sociedad Anónima, EMASAGRA, S.A.. La frecuencia de muestreo del agua subterránea era semanal, este agua se recogió en un tanque de almacenamiento de 200 L y de ahí pasó al biofiltro donde se

unía en su entrada con la sacarosa y con el catión en el caso de los biofiltros con influentes contaminados.

1.5.- Lavado del sistema

Se empleó la siguiente secuencia de lavado, previamente optimizada en nuestro Grupo de Investigación (Gálvez, 2003):

Primero: Esponjado con aire ($80 \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{h}$) durante 30 s

Segundo: Lavado con agua y aire ($15 \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{h}$ y $60 \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{h}$) durante 30 s

Tercero: Aclarado con agua ($15 \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{h}$) durante 30 s

Para el correcto funcionamiento del sistema, el lavado se realizó con una periodicidad de diez días.

2.- Análisis del agua de pozo

Inicialmente se caracterizó el agua subterránea que iba a ser empleada como influente en el biofiltro, realizándose las determinaciones biológicas y químicas cuya metodología se cita a continuación.

2.1.- Determinaciones biológicas

Como determinaciones biológicas se realizaron recuento de mesófilos totales y demanda biológica de oxígeno (D.B.O.₅).

2.1.1.- Mesófilos Totales

Para el recuento de estos microorganismos se empleó el método de filtración por membrana (APHA, 1989).

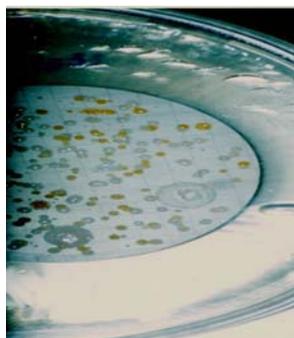


Figura 31: Aspecto del filtro sobre medio TSA a las 48 h de cultivo.

Esta técnica está basada en la filtración de las muestras o de sus diluciones, a través de filtros con tamaño de poro de 0,45 μm . Posteriormente, se coloca el filtro sobre el medio de cultivo y se incuba durante 48 h a 30 $^{\circ}\text{C}$, procediéndose, tras este periodo de tiempo, al recuento de todas las colonias que se han desarrollado, expresándose los resultados en forma de unidades formadoras de colonias por mililitro (U.F.C/mL).

El medio de cultivo empleado para esta determinación fue el de Triptosa Soja Agar (TSA, Difco).

2.1.2.- Demanda Biológica de Oxígeno (D.B.O.₅)

Para la determinación de la D.B.O.₅ se midió el consumo de oxígeno producido en un sistema cerrado, consecuencia de la actividad biológica oxidativa generada por los microorganismos. Para ello, en un frasco Winkler de 300 mL con tapón esmerilado se añadieron 0,25 mL de reactivo I (8,5 g de dihidrógenofosfato de potasio, 28,5 g de monohidrógenofosfato potásico, 67,16 g de monohidrógenofosfato sódico dodecahidrato y 1,7 g de cloruro de amonio todo ello en 1 L de agua destilada), 0,25 mL de reactivo II (22,5 g de cloruro de magnesio en 1 L de agua destilada), 0,25 mL de reactivo III (36,5 g de cloruro cálcico dihidrato en 1 L de agua destilada) y 0,25 mL de reactivo IV (0,29 g de cloruro férrico en 1 L de agua) y a continuación se añadió un volumen conocido de muestra problema (que depende de la DQO de la muestra) enrasando a 300 mL con agua destilada saturada de oxígeno. Se midió la concentración de oxígeno, con la ayuda de un manómetro previamente calibrado, incubándose a 20 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 días empleando un frigotermostato. Transcurrido dicho tiempo se midió la concentración de oxígeno manteniendo en agitación magnética. El mismo proceso se realizó con un blanco no adicionado de muestra problema.

El valor de D.B.O.₅ se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{D.B.O.}_5 \text{ (mg O}_2\text{/l)} = \frac{[(\text{OD}_i - A) - \text{OD}_5]}{V_m} \times V_f$$

OD_i: Oxígeno disuelto de la muestra tras la preparación del ensayo; OD₅: Oxígeno disuelto de la muestra tras los cinco días; V_m: volumen adicionado de muestra; V_f: Volumen del frasco donde se realiza la determinación; A: Factor del blanco, obtenido mediante la expresión: A= ODB_i - ODB₅; ODB_i: Oxígeno disuelto del blanco tras la preparación del ensayo; ODB₅: Oxígeno disuelto en el blanco tras cinco días.

2.2.- Determinaciones químicas

El agua de pozo se sometió inicialmente a un análisis químico con la finalidad de saber si contenía algún componente que pudiera interferir en los ensayos posteriores cuando se contaminase con metales pesados. Por ello, se realizaron análisis de D.Q.O., contenido en fosfatos, nitratos, nitritos, sulfatos, cloruros, amonio, sodio, potasio, calcio, magnesio, y los metales pesados que posteriormente se iban a emplear en los diferentes biofiltros: cromo, cobre, plomo y arsénico. En las diferentes determinaciones se emplearon las técnicas y las metodologías más adecuadas en función de las propiedades químicas y físicas de los analitos.

2.2.1.- Demanda química de oxígeno (D.Q.O.)

La D.Q.O. es una forma de estimar la materia orgánica presente en una muestra de agua, a través de la determinación por vía química de la cantidad de oxígeno necesario para oxidarla, expresada en mg/L de oxígeno. Con esta técnica se logra la oxidación de más del 95 % de los compuestos orgánicos presentes en la muestra.

El procedimiento se basa en una fuerte oxidación de la materia orgánica, empleando para ello un oxidante como el dicromato potásico en medio sulfúrico en exceso. Este método es aplicable a un gran número de muestras siendo a su vez de fácil manipulación

La determinación de la D.Q.O. se realizó mediante colorimetría con dicromato potásico digiriendo 2,5 mL de muestra problema con 1,5 mL de una disolución I (15,322 g de dicromato potásico, 167 mL de ácido sulfúrico y 33,3 g de sulfato mercuríco en 1 L de agua destilada) y 3,5 mL de disolución II (10,12 g de sulfato de plata en 1 L de ácido sulfúrico concentrado). La digestión tuvo lugar a 170 °C durante 2 h. Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 600 nm y el valor obtenido se llevó a una recta de calibración externa.

La recta de calibrado se realizó empleando disoluciones de concentración creciente y conocida de ftalato ácido de potasio y tratándolas como si fueran muestras.

2.2.2.- Determinación de fosfatos

Para la cuantificación de fosfatos se siguió la metodología descrita por Murphy y Riley (1962) y empleada en anteriores trabajos de investigación en el Instituto del Agua (De Vicente, 2004).

El método usado se basa en la reacción que tiene lugar en disolución entre el ión fosfato y el molibdato amónico en medio ácido para dar ácido fosfomolibdico, que a su vez se reduce con ácido ascórbico a azul de molibdeno, cuya intensidad de color es medible por

espectrofotometría. Para eliminar las interferencias debidas a la presencia de silicatos en la muestra, se añade tartrato de antimonio-potasio, ya que esta sal doble compleja estas sales y las retira del medio.

Los reactivos empleados son:

Disolución A: Molibdato amónico: se disuelven 15 g de molibdato amónico tetrahidrato en 500 mL de agua bidestilada.

Disolución B: Ácido sulfúrico: se disuelven 140 mL de ácido sulfúrico concentrado en 900 mL de de agua bidestilada.

Disolución C (extemporánea): Ácido ascórbico: se disuelven 27 g de este ácido en 700 mL de agua.

Disolución D (extemporánea): Tartrato de antimonio-potasio: Se disuelven 0,34 g de esta sal doble en 250 mL de agua bidestilada.

Con estos reactivos se preparó extemporáneamente el reactivo necesario para la cuantificación de fosfatos, mezclando 100 mL de la disolución A, 250 mL de la disolución B, 100 mL de la disolución C y 50 mL de la disolución D.

A 50 mL de muestra se le añaden 10 mL del reactivo preparado, se deja en reposo de 5 a 10 min. y se mide en un espectrofotómetro a 882 nm en celdillas de 1 cm o 10 cm. El blanco de reactivos se preparó igual que con las muestras pero adicionando agua destilada.

La recta de calibrado se elaboró con disoluciones de concentración creciente y conocida, entre 4 σ g de fósforo/L y 800 σ g de fósforo/L, realizando el mismo procedimiento que el seguido con las muestras.

2.2.3.- Determinación de nitratos, nitritos, sulfatos y cloruros

La metodología utilizada para la determinación de estos aniones, fue la empleada en anteriores trabajos de investigación en el Instituto del Agua (Kaltoum, 2003). La cuantificación se realizó mediante cromatografía iónica, empleando para ello un cromatógrafo marca "DIONEX" modelo DX-300.

Para la separación de los aniones se empleó la columna cromatográfica "Ionpac AS 14" (4 x 250 mm), compuesta por una resina pelicular intercambiadora de aniones cuya base esta compuesta por divinilbenceno funcionalizada con grupos amonio en su superficie. El equipo esta provisto adicionalmente de una precolumna "Ionpac AS" (4 x 5 mm) para proteger la columna analítica.

Como fase móvil se empleó una disolución reguladora de pH constituida por carbonato de sodio 3,5 mM y bicarbonato de sodio 1,0 mM en agua miliQ. Se trabajó en isocrático a un flujo de 1,3 mL/min.

Una vez filtrada la muestra a través de filtros de 0,22 μ m de diámetro de poro (Chromafilr Einmalfitra de 25 mm de diámetro), se inyectó un volumen suficiente para limpiar el bucle del inyector cuya capacidad es 0,1 cm³.

Los aniones separados en la columna pasan a través de una supresora de membrana (AMM-II), por la que fluye continuamente una solución regeneradora ácida 0,1 M de ácido sulfúrico, con un flujo fijado en 2,5 mL/min. En esta membrana se elimina la interferencia de los carbonatos (presentes en la fase móvil) transformándose en ácido carbónico de baja conductividad, dejando inalterados a los aniones que se van a cuantificar.

La detección se realizó mediante un detector de conductividad y compensación de temperatura (ajustado a 2,5 μ S/cm) y se cuantifican empleando un integrador (DIONEX 4400) el cual, recibe la señal del cromatógrafo, evalúa las áreas correspondientes y traza los cromatogramas.

Los aniones se identificaron a partir del tiempo de retención y su cuantificación se realizó mediante una recta de calibración externa.

Los rangos de concentración para las rectas de calibrado de los diferentes aniones fueron los siguientes:

- ∅ Cloruro: de 3 a 20 mg/L
- ∅ Nitrito: de 1 a 5 mg/L
- ∅ Nitrato: de 1 a 10 mg/L
- ∅ Sulfato: de 3 a 20 mg/L

La preparación de todas las disoluciones se realizó partiendo de patrones estándar de 1000 mg/L, calidad Merck.

2.2.4.- Determinación del ión amonio

La metodología llevada a cabo para la determinación de estos aniones fue la empleada en anteriores trabajos de investigación en el Instituto del Agua (Kaltoum, 2003).

Para la cuantificación de amonio se usó la misma metodología que la empleada en el apartado anterior para la cuantificación de los aniones. En este caso, se empleó una columna de separación de cationes CS 12A (4 x 250) con una fase estacionaria compuesta por un polímero de divinilbenceno funcionalizada con grupos carboxilato en su superficie. El eluyente utilizado fue una disolución 20 mM de ácido sulfúrico. Se empleó una membrana

supresora “CSR-ultra-4mm”, la cual produce una supresión, a diferencia de los aniones, eléctrica en lugar de química.

La fase móvil se fijó a un flujo de 1 mL/min y el detector se ajustó a 1 σ S/cm. La intensidad de corriente en la supresora se mantuvo a 100 mA.

Para la elaboración de la recta de calibrado se empleó una disolución madre de 1000 mg/L (Merck), realizándose diluciones hasta un rango de concentración comprendido entre 1 mg/L a 5 mg/L, en el que la respuesta del detector es lineal con respecto a la concentración.

Los sistemas de detección y cuantificación, así como la preparación de las muestras, son los mismos que los empleados en el apartado anterior.

2.2.5.- Determinación de metales

El agua de pozo se analizó mediante absorción atómica para determinar la cantidad de metales pesados presentes en ella y comprobar que no contenía concentraciones de éstos que pudieran interferir en experiencias posteriores. Se analizaron los iones cúprico, crómico y plumboso mediante absorción atómica en cámara de grafito y el ión *m*-arsenito mediante generación de hidruros. Los iones sodio y potasio, debido a su alta concentración en aguas subterráneas, fueron analizados mediante emisión atómica empleando llama de acetileno. Para los iones alcalino-térreos, calcio y magnesio, se empleó absorción atómica de llama de acetileno.

2.2.5.1.- Absorción atómica por cámara de grafito

La determinación de los metales pesados se efectuó mediante absorción atómica electrotérmica, mediante cámara de grafito, debido a que esta técnica permite la cuantificación de la mayoría de los elementos metálicos con sensibilidad y límites de detección de 20 a 1000 veces superiores a los de las técnicas de llama convencionales. Esas mejoras tienen su origen en el aumento del tiempo de permanencia de los átomos, en su estado fundamental electrónico, en el trayecto óptico. Otra de las ventajas de esta técnica es que sólo son necesarios 20 σ L de muestra en cada inyección.

Para el análisis de los metales cromo, cobre y plomo se empleó un equipo de absorción atómica con horno de grafito marca “Perkin-Elmer” modelo 4100-ZL. La cuantificación se realizó, en todos los casos, siguiendo las condiciones experimentales del fabricante en lo que respecta a ciclos de horno, apertura de rendija, tiempo de lectura y concentración de los modificadores de matriz.

Las rectas de calibrado se realizaron con patrones estándar de concentración 1000 mg/L en cada uno de los cationes analizados y los rangos de concentración y las longitudes de onda, a la que se realizó la medida, fueron los siguientes:

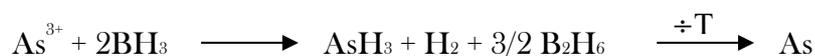
∉ Cromo: desde 1 σ g/L a 25 σ g/L, ζ =357,9 nm

∉ Cobre: desde 1 σ g/L a 25 σ g/L, ζ =324,8 nm

∉ Plomo: desde 4 σ g/L a 50 σ g/L, ζ =283,3 nm

2.2.5.2.- Absorción atómica mediante generador de hidruros

El principio químico en el que se basa la cuantificación de arsénico mediante generador de hidruros es la reacción que tiene lugar entre los iones arsenito y/o arsénico con el borohidruro de sodio (calidad Sigma) en medio acuoso-básico.



Para realizar la determinación se empleó un equipo de absorción atómica Perkin-Elmer modelo 2380 y acoplado a él un sistema generador de hidruros Perkin-Elmer modelo MHS-10.

El rango lineal para este tipo de cuantificación es entre 0,1 σ g/L y 2,0 σ g/L para un volumen de muestra de 50 σ L.

Las medidas se realizaron a 193,7 nm y el resto de los parámetros experimentales se siguieron de acuerdo con el fabricante.

2.2.5.3.- Emisión atómica por llama de acetileno

Los iones alcalinos sodio y potasio, debido a su alta concentración en aguas subterráneas, se determinaron mediante llama de acetileno. Se empleó la modalidad de emisión atómica, en lugar de absorción, porque estos iones presentan una configuración electrónica en la que solamente poseen un electrón en su última capa, el cual puede promocionar fácilmente a niveles electrónicos superiores, emitiendo luz cuando dichos electrones regresan a su estado fundamental. Para la cuantificación se empleó un equipo Perkin-Elmer modelo 2380.

La determinación del sodio se realizó a 589,0 nm y con una apertura de rendija de 0,2 nm. La recta de calibración se preparó a partir de disolución estándar (calidad Merk) de 1000 mg/L de ión sodio y el rango de concentraciones empleado fue desde 0,1 mg/L hasta 0,5 mg/L de ión sodio, en el cual la respuesta del equipo es lineal con respecto a su concentración.

La determinación del ión potasio se realizó midiendo a 766,5 nm empleando una apertura de rendija de 1,4 nm. La recta de calibración se preparó a partir de disolución estándar (calidad Merk) de 1000 mg/L de ión potasio y el rango de concentraciones empleado fue desde 0,05 mg/L hasta 2,0 mg/L de ión potasio, en el cual la respuesta del equipo es lineal con respecto a su concentración.

2.2.5.4.- Absorción atómica por llama de acetileno

Los iones calcio y magnesio se cuantificaron empleando un equipo de absorción atómica Perkin-Elmer modelo 2380.

El ión calcio se cuantificó a 422,7 nm con una apertura de rendija de 0,7 nm. El rango lineal en el que se realizó la recta de calibración fue el comprendido entre 0,1 mg/L y 5,0 mg/L. Para la realización de la recta de calibrado se empleó disolución estándar (calidad Merck) de 1000 mg/L de ión calcio y se llevaron a cabo diluciones hasta alcanzar las concentraciones finales deseadas.

El ión magnesio se cuantificó a 285,2 nm con una apertura de rendija de 0,7 nm. El rango lineal en el que se realizó la recta de calibración fue el comprendido entre 0,01 mg/L y 0,5 mg/L. Para la realización de la recta de calibrado se empleó disolución estándar (calidad Merck) de 1000 mg/L de ión magnesio y se llevaron a cabo diluciones hasta alcanzar las concentraciones finales deseadas.

3.- Caracterización de los influentes y efluentes

Durante el funcionamiento de los biofiltros, se realizaron determinaciones de la concentración de sacarosa y de metales pesados en la entrada y salida. Además, se tomaron muestras en los cuatro puntos de muestreo dispuestos en el biorreactor (**Figura 29**) para obtener más información acerca de la variación en la concentración de estos analitos.

3.1.- Determinación de sacarosa

Para la determinación de la concentración de sacarosa en los influentes, efluentes y en las diferentes tomas de muestreo, se empleó el método espectrofotométrico descrito por Roe-Papadopoulos (1954) modificado. Se empleó el reactivo que lleva su nombre preparado con 0,1 g de resorcinol (Sigma) y 0,25 g de tiourea (Sigma), enrasándose a un volumen final de 100 mL con ácido acético glacial (reactivo análisis). La modificación

consistió en añadir ácido etilendiamíntetraacético sal disódica (EDTA-disódico) 0,1 M tanto a las muestras como a los patrones de la recta de calibrado.

Tabla 5: Recta de calibrado para la determinación de la concentración de sacarosa

| mg/L de fructosa | 10 | 30 | 50 | 70 | Blancos | | Muestra |
|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|---------|-----|---------|
| μl disolución fructosa 100 mg/L | 500 | 500 | 500 | 500 | 0 | 0 | 0 |
| μl Muestra | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 500 |
| μl EDTA disódico 0.1 M | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 |
| μl Agua destilada | 0 | 0 | 0 | 0 | 500 | 500 | 0 |
| μl Reactivo de Roe-Papadopoulos | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 |
| ml Ácido clorhídrico 37 % | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |

Como patrones externos se emplearon disoluciones madre de fructosa de 10, 30, 50 y 70 mg/L que equivalen a 18,55, 55,66, 92,77 y 129,90 mg/L de sacarosa respectivamente.

En la **Tabla 5** se muestra la cantidad de reactivos empleados tanto para la elaboración de las rectas de calibrado como para el análisis de las diferentes muestras.

Tras la adición de los reactivos, las muestras se incubaron durante 13 min a 80°C midiéndose la absorbancia en espectrofotómetro a 515 nm.

3.2.- Determinación de los metales pesados

Las determinaciones de los metales pesados cobre, cromo y plomo se realizaron de la forma descrita en los **apartados 2.2.5.1**. El arsénico se determinó según la metodología descrita en el **apartado 2.2.5.2**.

4.- Análisis químico del soporte empleado como relleno en el biorreactor

El soporte empleado como relleno en el biorreactor se analizó antes de comenzar con el funcionamiento de los biofiltros para conocer la naturaleza química del mismo. Se realizaron determinaciones de los metales pesados que iban a ser empleados en estudios posteriores y de fosfatos.

4.1.- Determinación de fosfatos

Para realizar la digestión del soporte arcilloso se siguió la metodología descrita por Pardo et al. (1999) y empleada en el Instituto del Agua en anteriores trabajos de

investigación (De Vicente, 2004). El procedimiento se basa en calcinar 0,2 g de muestra, (pudiéndose pesar más si la concentración de fosfatos es baja), a 450 °C durante 24 h. A continuación se sometió a extracción ácida, empleando ácido clorhídrico 3,5 N (reactivo análisis), con agitación orbital de 150 rpm durante 24 h. Con esto se consigue la extracción de los fosfatos presentes en la muestra. Por último se realizó una dilución 1:50 (para llevar la concentración del ácido a valores que no provoquen interferencia en el método analítico posterior) y se trata la muestra de forma análoga a como se indicó en el **apartado 2.2.2**.

4.2.- Determinación de metales pesados mediante absorción atómica

Para la determinación de los iones crómico, plumboso, cúprico y arsenioso fue necesario previamente realizar una digestión ácida del soporte. Para ello, se siguieron los siguientes pasos:

Primero: En un tubo de teflón se pesaron 200 mg de “esquisto” (material soporte), previamente pulverizado y se le añadieron 15 mL de agua miliQ y 12 mL de ácido nítrico concentrado (calidad analítica). La mezcla se llevó a ebullición lenta, en un baño de arena, hasta casi sequedad.

Segundo: Se añadieron 15 mL de ácido nítrico y se repitió el proceso de evaporación.

Tercero: Cuando la mezcla se enfrió, se añadieron 20 mL de ácido perclórico (calidad analítica) y 1 mL de ácido fluorhídrico (calidad analítica) y se llevó a ebullición lenta hasta transparencia.

Cuarto: Una vez fría, a la mezcla se le añadieron 50 mL de agua miliQ y 3 mL de ácido nítrico.

Quinto: En baño de arena se evaporó la disolución hasta un volumen final de 5 mL.

Sexto: Una vez fría la mezcla, se añadieron 10 mL de ácido clorhídrico 17 % p/v (calidad analítica) calentándose de nuevo durante 15 min.

Séptimo: La disolución se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min

Octavo: Por último se enrasó con agua miliQ a 50 mL.

El análisis de los metales pesados cromo, plomo y cobre, se realizó según la metodología descrita en el **apartado 2.2.5.1** y para el análisis del arsénico se procedió de acuerdo a lo descrito en el **apartado 2.2.5.2**.

4.3.- Determinación de metales pesados mediante rayos X.

El microanálisis mediante rayos X permitió realizar un análisis cualitativo de los esquistos arcillosos empleados como relleno en el biorreactor. Tal análisis fue realizado por

el Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada empleando sistemas de microanálisis por energía de dispersión de rayos X (EDRX).

5.- Caracterización de las biopelículas

En el estudio de los diferentes biofiltros se realizó una caracterización de las biopelículas que se formaban tanto sin carga contaminante como en presencia de los distintos metales pesados ensayados. Ambas determinaciones se han dividido en dos grandes bloques: determinaciones químicas y determinaciones microbiológicas.

5.1.- Determinaciones químicas

Las determinaciones químicas realizadas en las biopelículas fueron: Contenido de volátiles, obtención y análisis de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y cuantificación de ATP intracelular.

5.1.1.- Peso de volátiles en las biopelículas

En una cápsula de porcelana tarada en una balanza capaz de pesar hasta décimas de miligramo, se introdujo un peso conocido de relleno (con biopelícula) que osciló entre 20 y 30 g. Posteriormente se llevó a estufa a 100 °C durante toda una noche y una vez frío se pesó el conjunto (cápsula de porcelana y relleno con biopelícula seco). A continuación, se introdujo en mufla a 550 °C durante toda una noche. Trascurrido este tiempo se dejó enfriar pesándose de nuevo. La diferencia entre las dos pesadas es el contenido de sustancias volátiles de la muestra, en nuestro caso la biopelícula, habiendo hecho un blanco con relleno inerte previamente.

Para calcular los mg de peso seco (volátiles) por gramo de relleno se tomó la pesada resultante de restar el peso de relleno tras 24 h a 100 °C a la tara de la cápsula, para evitar la interferencia de la presencia aleatoria de agua en la biopelícula.

5.1.2.- Obtención y análisis del exopolímero presente en las biopelículas

En las biopelículas formadas en este estudio existen dos tipos de exopolímeros celulares, el primer tipo de exopolímero, denominado “no cohesivo”, es aquel que está poco adherido a la microbiota presente en la biopelícula desprendiéndose fácilmente tras un proceso poco agresivo. El segundo tipo de exopolímero formado por la microbiota,

denominado “cohesivo”, es aquel que aun siendo extracelular, está unido a los microorganismo presentes en la biopelícula, requiriendo procesos más agresivos para su separación.

Para el aislamiento de ambos tipos de exopolímeros se tomó como material de partida las aguas de lavado a contracorriente del biofiltro (**Figura 32**), pues están enriquecidas de material celular y extracelular que se han desprendido tras el proceso de lavado.

Las aguas de lavado tienen un volumen aproximado de 25 L, las cuales se dejaron decantar en porciones de 2 L recogiendo el decantado. Al final de este proceso, los 25 L iniciales se concentraron en un volumen aproximado que en ningún caso sobrepasaron los 2 L. Sobre esta suspensión enriquecida en biopelícula se aplicaron consecutivamente los dos procesos que conducirían al aislamiento en primer lugar del exopolímero “no cohesivo” (**Figura 34**) y en un segundo lugar al exopolímero “cohesivo” (**Figura 35**). Ambos procesos de aislamiento de exopolímero son modificaciones del método original empleado por Azeredo (1999).

La suspensión obtenida del agua de lavado se sometió a sonicación durante 2 min y posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 1,5 h. El sobrenadante se recogió y el pellet se resuspendió en igual volumen de agua destilada que el inicial, repitiéndose el proceso. Ambos sobrenadantes obtenidos se unieron y se añadieron de dos a tres volúmenes de etanol de 96 % a -80 °C. Se dejó reposar toda la noche a 4 °C y el exopolímero “no cohesivo” flocculó formando grupos esponjosos en la superficie del líquido. El exopolímero así obtenido se secó a temperatura ambiente con corriente de argón. A continuación, se redisolvió en agua destilada y se sometió a diálisis durante un periodo de 24 h, liofilizando la disolución resultante cuyo contenido salino había disminuido considerablemente gracias al proceso de diálisis.



Figura 32: Aspecto del agua de lavado



Figura 33: Aspecto del Pellet 4

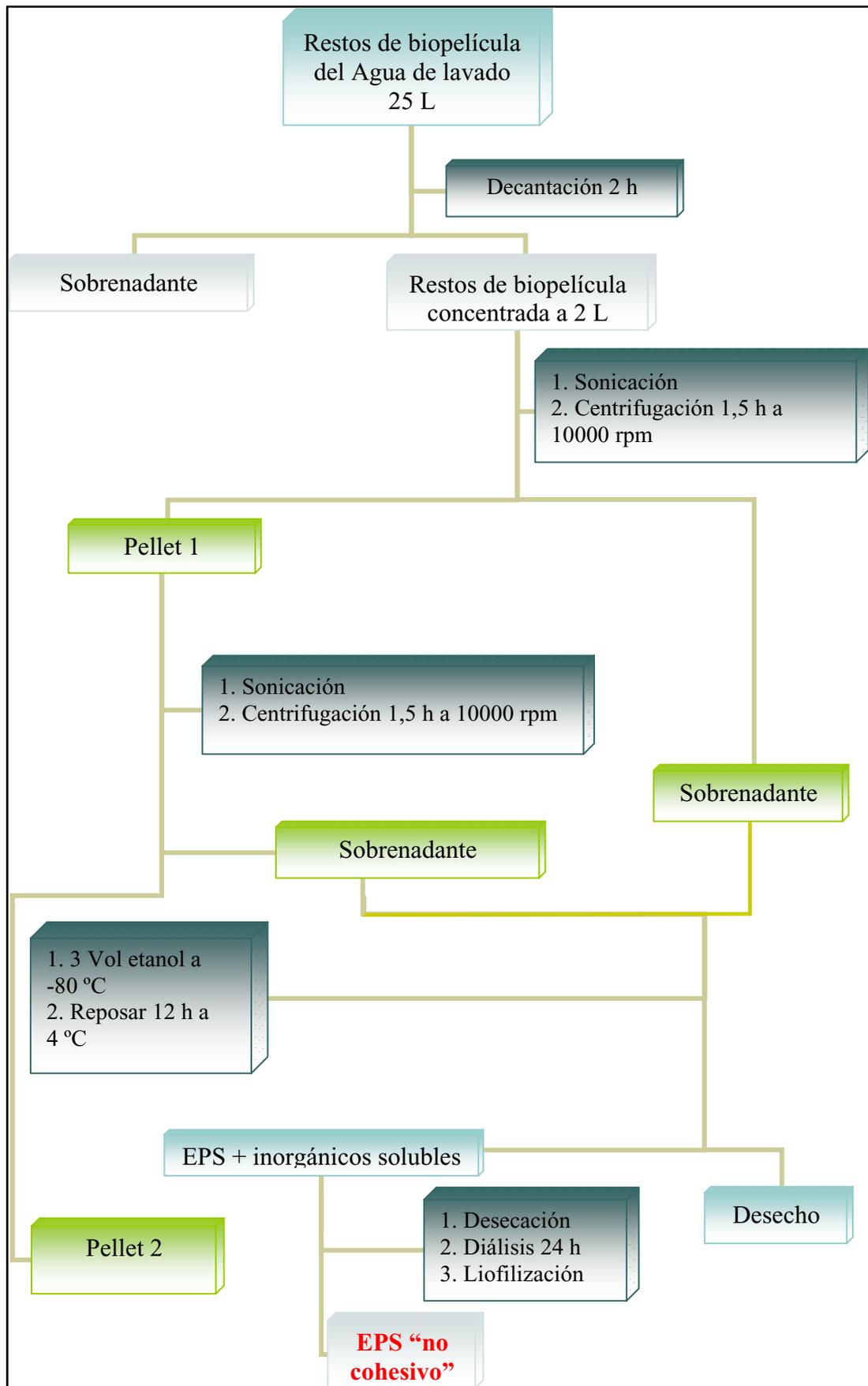


Figura 34: Esquema para la obtención del EPS “no cohesivo”

Al líofilo obtenido, tras los procesos anteriormente descritos, se le realizaron los análisis de glúcidos totales, proteínas, ácidos urónicos y restos acetilos.

El pellet 2, producto final de las dos extracciones anteriores, se resuspendió en igual volumen de agua destilada que el inicial. Se incubó a 80 °C durante 2 h, tras las cuales se sonicó durante 15 min y por último se mantuvo en agitación orbital a 200 rpm durante 24 h. Finalmente, se centrifugó a 10000 rpm durante 1 h, recogiendo el sobrenadante y repitiendo el proceso con el pellet. Al término de todo el proceso se unieron ambos sobrenadantes y se añadieron de dos a tres volúmenes de etanol de 96 % a -80 °C, dejándose reposar toda una noche a 4 °C. Transcurrido este tiempo, el exopolímero “cohesivo” flocculó en forma de grupos esponjosos en la superficie del líquido, procediéndose de igual forma a como se hizo con el exopolímero “no cohesivo” y realizando los mismos análisis.

El pellet resultante de la última extracción (**Figura 33**) se pesó y se mantuvo a 120 °C durante 24 h para eliminar el agua, transcurrido este tiempo se pesó y posteriormente se mantuvo a 550 °C pesándose de nuevo. La diferencia de pesadas dio el peso seco de volátiles presente en el decantado de las aguas de lavado.

A los exopolímeros (EPS) obtenidos mediante ambos métodos se le analizaron los glúcidos totales, las proteínas totales, los ácidos urónicos y los grupos acetilos.

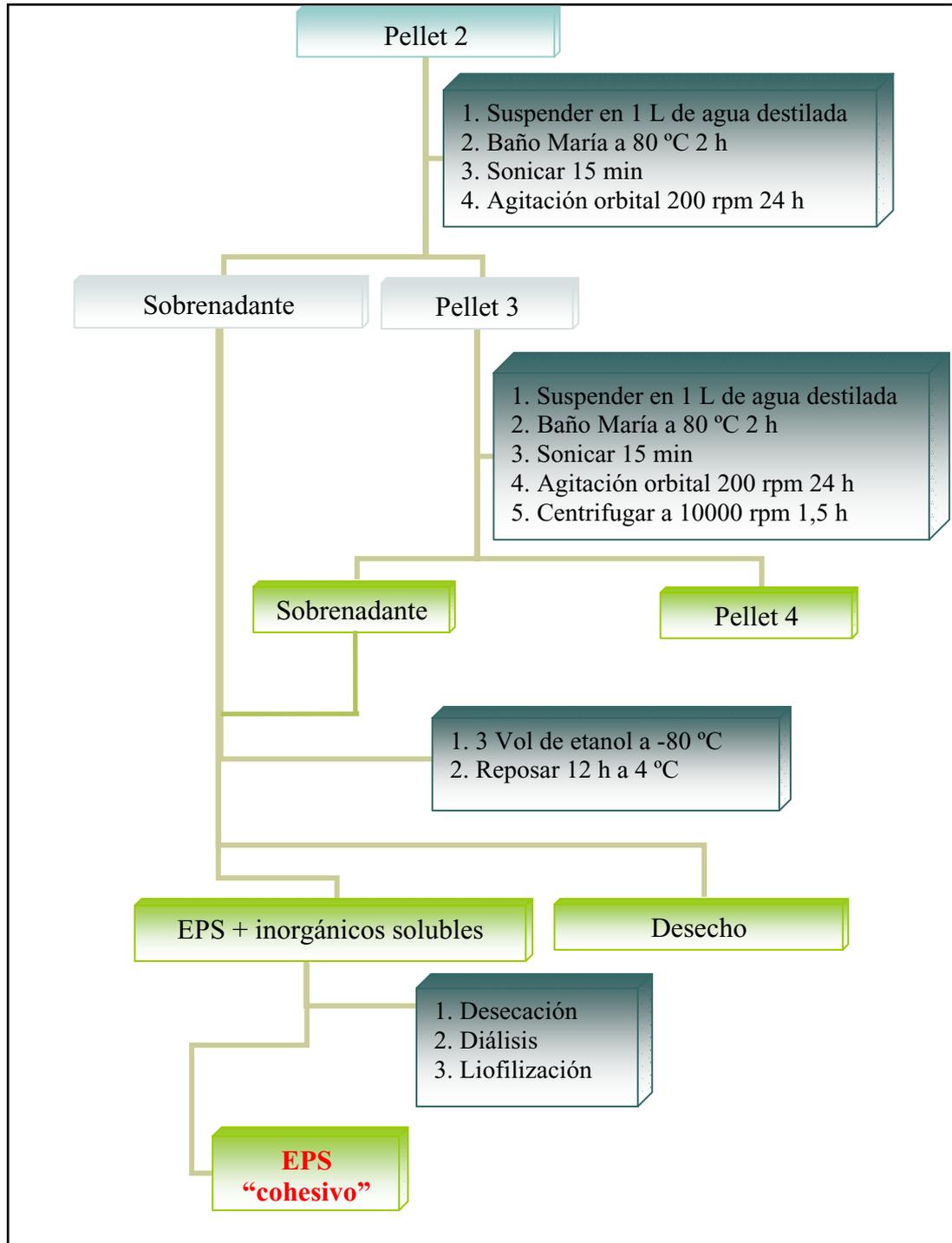


Figura 35: Esquema para la obtención del EPS "cohesivo"

5.1.2.1.- Glúcidos totales

Se siguió la metodología de Dubois (1956) modificada empleando ácido sulfúrico al 96 % y fenol al 5 % (p/v) y añadiendo 100 μL de EDTA 0,1 M, en el caso de haber habido presencia de metales pesados, tanto a las muestras como a los patrones.

Se preparó una disolución en agua destilada del exopolímero, facilitándose para ello una leve calefacción a 60 °C en recipiente cerrado herméticamente y sonicación, hasta total disolución.

La concentración de exopolímero empleada para hacer la analítica de glúcidos fue de 4 mg/L para el exopolímero “cohesivo” y de 10 mg/L para el exopolímero “no cohesivo” y el volumen de muestra empleado varió entre 10 y 30 μL para el exopolímero “cohesivo” y entre 50 y 100 μL para el exopolímero “no cohesivo”, realizándose el análisis por triplicado para cada muestra.

En la **Tabla 6** se muestran los volúmenes que se emplearon para la realización de la recta de calibrado externa, empleándose como patrón una disolución acuosa de glucosa de 1000 mg/L.

Tabla 6: Recta de calibrado utilizada para la determinación del contenido en glúcidos totales en el EPS

| Puntos de la recta de calibrado | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Blancos | | Muestra |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|---------|-----|--|
| μL disolución glucosa 1000 mg/L | 10 | 15 | 20 | 25 | 50 | 0 | 0 | 0 |
| μL Muestra | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10-30 (4 mg/mL) 50-100 (10 mg/mL) |
| μL EDTA disódico 0.1 M | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| μL Agua destilada | 90 | 85 | 80 | 75 | 50 | 100 | 100 | 90-70 50-0 |
| μL Fenol 5 % | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |
| mL Ácido sulfúrico 96 % | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

La adición del ácido sulfúrico se realizó bruscamente para propiciar el aumento de temperatura de la mezcla y facilitar de esta forma la reacción entre los grupos aldehído de los glúcidos y el fenol. Se esperó a que se enfriaran los tubos y se midió la absorbancia a 490 nm.

Una vez obtenidas las absorbancias, se representaron frente a los mg de glucosa presente en los patrones y se correlacionaron con los presentes en las muestras obteniéndose por último los gramos de glúcidos presentes en 100 g de los exopolímeros analizados.

5.1.2.2.- Proteínas totales

Se siguió la metodología descrita por Bradford (1976) modificada, empleando 50 μL de reactivo para el ensayo de proteínas *Bio-Rad*, en vez de 250 μL como en el protocolo original.

En este caso, se añadió tanto a los patrones como a la muestra una disolución de EDTA disódico-cation contaminante 0.1 M-0.1 %, siendo el catión contaminante en cada caso diferente dependiendo de la muestra analizada.

Se preparó una disolución en agua destilada del exopolímero, facilitándose para ello una leve calefacción a 60 °C en recipiente cerrado herméticamente y sonicación, hasta total disolución.

La concentración de exopolímero empleada para hacer la analítica de glúcidos fue de 10 mg/L para ambos exopolímeros, “cohesivo” “no cohesivo”, y el volumen de muestra empleado varió entre 10 y 30 μL para el exopolímero “cohesivo” y entre 100 y 150 μL para el exopolímero “no cohesivo”. De cada muestra se hicieron tres réplicas.

En la **Tabla 7** se muestran los volúmenes que se emplearon para la realización de la recta de calibrado externa, empleándose como patrón una disolución acuosa de albúmina sérica bovina de 100 mg/L.

El reactivo de Bradford se añadió agitándose en vortex para homogenizar la mezcla, midiéndose la absorbancia a 590 nm.

Una vez obtenidas las absorbancias, se representaron frente a los mg de albúmina sérica bobina y se correlacionaron con los presentes en las muestras, obteniendo finalmente el tanto por ciento de proteínas en los exopolímeros.

Tabla 7: Recta de calibrado para la determinación del contenido proteico en el exopolímero

| | Ptos. Recta de Calibrado | | | | | | | | | | Blancos | | Muestras | |
|---------------------------------------|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------|-----|----------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | | | |
| μL Albúmina | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| μL Muestra | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10-30 | 100-150 |
| μL EDTA- M ⁺ | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| μL Agua Dest. | 765 | 755 | 745 | 735 | 725 | 715 | 705 | 695 | 685 | 675 | 775 | 775 | 765-745 | 675-625 |
| Reactivo Bradford | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |

5.1.2.3.- Ácidos urónicos

Se siguió la metodología descrita por Blumenkratz (1973), modificada para evitar la interferencia de los metales pesados.

Los reactivos empleados fueron:

- Disolución en hidróxido de sodio al 0,5 % (p/v) de meta-hidroxibifenilo al 0,15 % (p/v).

- Disolución en ácido sulfúrico al 96 % comercial de tetraborato de sodio a 12,5 mM. Se requiere agitación durante 24 h a temperatura ambiente para su total disolución.

- Disolución acuosa de EDTA disódico 0,1 M y del nitrato del metal correspondiente al 0,1 %. Modificación del método para evitar la interferencia de los metales pesados.

Para el exopolímero “no cohesivo” se empleó la técnica de patrón externo, empleando una disolución madre de ácido glucurónico 1000 mg/mL.

Se preparó una disolución en agua destilada del exopolímero, facilitándose para ello una leve calefacción a 60 °C en recipiente cerrado herméticamente y sonicación, hasta total disolución.

La concentración de exopolímero empleada para hacer la cuantificación fue de 10 mg/L para el exopolímero “no cohesivo” y el volumen de muestra empleado varió entre 100 y 150 µL. De cada muestra se hicieron tres réplicas.

En la **Tabla 8** se muestran las cantidades de reactivos empleadas para la realización de la recta de calibrado.

Tabla 8: Recta de calibrado utilizada para la determinación del contenido en ácidos urónicos en el exopolímero

| | Puntos recta de calibrado | | | | | Blancos | | Muestra |
|--|---------------------------|-----|-----|-----|-----|---------|-----|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| µL Albúmina 1 g/mL | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| µL Muestra | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100-150 |
| µL EDTA-Na ⁺ | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| µL Agua Dest. | 130 | 110 | 90 | 70 | 50 | 150 | 150 | 50-0 |
| mL Ácido sulfúrico tetraborato sódico | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 |
| <i>m</i> -hidroxibifenilo | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

La adición de *m*-hidroxibifenilo se realizó justamente antes de tomar la lectura de absorbancia a 590 nm.

Una vez tomadas las lecturas del espectrofotómetro, se representan frente a los mg de ácido glucurónico y se correlacionan con las presentes en las muestras, calculando el tanto por ciento de ácidos urónicos presentes en el exopolímero.

Para el análisis del exopolímero “cohesivo” se eligió la metodología de patrón interno, preparando una disolución de la muestra con una concentración de 10 mg de exopolímero/mL. El volumen de muestra necesario para realizar el análisis varió entre 15-40 μL . La disolución madre fue ácido glucurónico 1000 mg/L empleando para elaborar la recta unos volúmenes comprendidos entre 20 y 80 μL .

En la **Tabla 9** se muestra la secuencia de reactivos así como sus cantidades. A la misma muestra, denominada 1, se le añaden volúmenes crecientes de disolución madre, dando lugar a los puntos en la recta de calibrado con patrón interno 1A, 1B, 1C y 1D, respectivamente y cuya composición se muestra en la **Tabla 9**.

Tabla 9: Análisis de ácidos urónicos en las SPE mediante adición de patrón interno

| Puntos de la recta | 1A | 1B | 1C | 1D |
|---|--------|-------|-------|-------|
| μL muestra | 15-40 | 15-40 | 15-40 | 15-40 |
| μL Albúmina 1 g/mL | 20 | 40 | 60 | 80 |
| μL EDTA- Na^+ | 50 | 50 | 50 | 50 |
| μL Agua Dest. | 115-90 | 95-70 | 75-50 | 55-30 |
| mL Ácido sulfúrico tetaborato sódico | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 |
| <i>m</i> -hidroxibifenilo | 100 | 100 | 100 | 100 |

La adición de *m*-bifenilo se realizó justamente antes de tomar la lectura de absorbancia a 590 nm y una vez tomada ésta se representan gráficamente la absorbancia frente a los mg de ácido glucurónico, obteniendo en el corte con abscisas los mg de ácidos urónicos presentes en la muestra.

5.1.2.4.- Restos acetilos

La determinación de los restos acetilos en los exopolímeros (EPS) de las biopelículas, se realizó mediante la metodología descrita por McComb y McCready (1957). Los reactivos empleados fueron:

- Disolución acuosa de hidróxido de sodio al 9,4 % (p/v).
- Disolución acuosa de hidroxilamina al 3,7 % (p/v).

- Solución A: preparada disolviendo 1,18 g de cloruro férrico tetrahidrato en 5 mL de ácido perclórico al 70 % comercial evaporándose a sequedad y diluyéndose la pasta obtenida en 100 mL de agua destilada. En ocasiones se requirió leve calefacción en baño María.

- Solución B: a 12 mL de solución A se le adicionaron 1,66 mL de ácido perclórico 70 % comercial, enfriándose con hielo y mezclándose con etanol absoluto frío (-20°C) hasta enrase a 100 mL.

- Disolución ácida de metanol, la cual fue preparada adicionando 7 mL de ácido perclórico 70 % comercial a -20 °C unos 70 mL de metanol absoluto enfriado a la misma temperatura y enrasando con metanol a 100 mL.

Para el análisis de los restos acetilos, se preparó una disolución en agua destilada del exopolímero, facilitándose para ello una leve calefacción a 60 °C en recipiente cerrado herméticamente y sonicación, hasta total disolución. La concentración de exopolímero empleada para hacer la analítica de los restos acetilos fue de 10 a 15 mg/L para el exopolímero “no cohesivo” y de 4 a 8 mg/L para el exopolímero “cohesivo”. El volumen de muestra empleado varió entre 500 y 800 μL para ambos exopolímeros. Cada muestra fue analizada por triplicado.

La recta de calibración externa se realizó preparando una disolución madre de 1000 mg de pentaacetato de β -D-glucosa por litro, pesándose 100 mg de esta sustancia, disolviéndola en 5 mL de etanol y enrasando a 100 mL con agua destilada. De esta disolución se prepararon otras de 40 (disolución 1A), 80 (disolución 1B), 100 (disolución 1C) y 140 (disolución 1D) mg de pentaacetato de β -D-glucosa/L. Enrasando 2, 4, 5 y 7 mL de disolución madre a 50 mL respectivamente. 0,8 mL de estas disoluciones contienen 24,2, 48,4, 60,5 y 84,7 σg de acetilo respectivamente. En la **Tabla 10** se muestra la secuencia de reactivos así como sus cantidades.

Tabla 10: Recta de calibrado para la determinación de los grupos acetilos en el EPS

| Puntos de la recta de calibrado. Disoluciones | 1A | 1B | 1C | 1D | Blanco | Muestra |
|--|----------------|------|------|------|--------|---------|
| μL de disoluciones patrón | 800 | 800 | 800 | 800 | 0 | 0 |
| μL de muestra | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 500-800 |
| μL Agua | 0 | 0 | 0 | 0 | 800 | 300-0 |
| μL hidroxilamina | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |
| μL disolución de hidróxido de sodio | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |
| μL de metanol ácido | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 |
| Solución B | Enrase a 10 mL | | | | | |

5.1.3.- Adenosintrifosfato (ATP)

Se empleó la metodología descrita por Karl (1980) modificada. 15 g de relleno (con biopelícula) se sumergieron en 5 mL de dimetilsulfóxido tamponado con hidrocloreuro de tris[hidroximetil]aminometano (Trizma ácido) y tris[hidroximetil]aminometano (Trizma básico) a pH 7,8. Esta disolución amortiguadora de pH está compuesta por 11 g de Trizma ácido, 4 g de Trizma básico por cada 200 mL de dimetilsulfóxido. Las muestras se sonicaron durante 15 min, agitándose posteriormente en vortex durante 5 min. A continuación se decantó el sobrenadante, se midió el volumen y se centrifugó éste a 3000 rpm durante 10 min. A 50 μ L del sobrenadante centrifugado se le añadió (dentro de un fotómetro de bioluminiscencia Turner), 50 μ L de ATP Mix, (Sigma Chem. Co.). Las unidades de emisión de luz se trasladaron a una recta de calibración externa.



Figura 36: Extracción con dimetilsulfóxido del ATP

La recta patrón se preparó con una disolución madre de 0,098 mg de ATP/mL y a partir de ésta se realizaron diluciones 1:2 hasta la dilución 10^{-7} . Empleándose Mix (Turner Desing) regenerado y sin diluir se obtuvieron respuestas dentro del rango del fotómetro desde la dilución 10^{-5} hasta la $10^{-2,5}$ por lo que se realizaron diluciones de ATP comprendidas entre $2 * 10^{-5}$ mg de ATP/50 μ L hasta $4 * 10^{-8}$ mg de ATP/50 μ L. La presencia de dimetilsulfóxido y de tris[hidroximetil]aminometano no interfirió en la reacción.

5.1.4.- Presencia o ausencia de metal pesado en la biopelícula

La biopelícula se analizó cualitativamente mediante Rayos X según lo descrito en el apartado 4.3.

En el caso del ión plomo fue necesario el estudio cuantitativo de la concentración de plomo en la biopelícula, para lo cual el relleno, con la biopelícula adherida en su superficie, fue sometido a digestión según lo descrito en el apartado 4.2 y posteriormente analizado mediante absorción atómica por cámara de grafito según lo descrito en el apartado 2.2.5.1.

5.2.- Determinaciones microbiológicas

Las determinaciones microbiológicas que se realizaron a las biopelículas de los distintos biofiltros fueron: Recuento de mesófilos, actividades enzimáticas y estudios de biodiversidad de poblaciones bacterianas. Todas estas determinaciones se realizaron empleando como muestra de partida la biopelícula suspendida en solución salina estéril, para lo que, previamente, se tuvo que realizar la extracción de la biopelícula del relleno.

De igual forma, se realizaron estudios de microscopía electrónica de barrido y transmisión de las biopelículas formadas en cada biorreactor.

5.2.1.- Extracción de la biopelícula del relleno

Se partió de una cantidad de soporte del biofiltro con biopelícula adherida, que podría variar entre 25 g y 50 g en función de la finalidad para la que realizara la extracción. De este material se logró extraer la biopelícula mediante:

Primero: Suspensión del material en 50 mL de solución salina estéril.

Segundo: Sonicación durante 1 min.

Tercero: Agitación orbital a 125 rpm durante 1 h.

Cuarto: Recuperación del relleno y repetición de los pasos primero a tercero.

Se reúnen las dos fracciones de la extracción obteniéndose al final la biopelícula recuperada en 100 mL de solución salina.

5.2.2.- Mesófilos

Para el recuento de mesófilos presentes en las biopelículas se partió en cada caso de la suspensión obtenida en el apartado 5.2.1, a la que se realizó sucesivas diluciones 1:10 (hasta 10^{-7}) con solución salina estéril 0,8 % en cloruro de sodio (p/v). Posteriormente se extendieron, mediante espátula de Dyglaski, 100 μ L de cada una de ellas sobre medio TSA. Las placas de Petri se incubaron 48 h a 30 $^{\circ}$ C en oscuridad. De cada dilución se realizaron tres réplicas

5.2.3.- Actividades enzimáticas en la biopelícula

Las actividades enzimáticas ensayadas fueron: Fosfatasa ácida y alcalina totales, Rodanasa, Deshidrogenasa y Arilsulfatasa.

5.2.3.1.- Fosfatasa ácida total

La metodología empleada fue una variante de la descrita por Berman (1970) empleando la dilución 1:10 de la suspensión obtenida en el **apartado 5.2.1.**

A 1 mL de la dilución anterior se le añadieron 2 mL de tampón acético / acetato 0,2 M pH 4,8, 1 mL de disolución acuosa de fosfato de *p*-nitrofenol hexahidrato al 1 %, incubándose 30 min en oscuridad a 37 °C. Transcurrido este periodo de tiempo de incubación, se detuvo la reacción mediante la adición de 2 mL de disolución de hidróxido de sodio 0,2 M, se centrifugó 10 min a 2500 rpm para eliminar las partículas en suspensión y se midió la absorción en espectrofotómetro a 410 nm. Se hicieron tres repeticiones de cada muestra.

La recta de calibrado externa se preparó con los mismos volúmenes de cada uno de los reactivos y concentraciones crecientes de *p*-nitrofenol, producto final de la reacción enzimática y responsable del color, enrasando finalmente a un volumen de 6 mL. La concentración de la disolución madre de *p*-nitrofenol fue de 0,6 mM. En la **Tabla 11** se muestran los volúmenes empleados para la elaboración de la curva de calibrado externa:

Tabla 11: Recta de calibrado para la determinación de la actividad fosfatasa ácida

| Puntos de la Recta de Calibrado: | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Vol. (μL) Dis. madre de <i>p</i> -nitrofenol 0,6 mM | 10 | 20 | 40 | 80 | 100 | 200 | 500 | 700 | 1000 |
| μL de Agua Destilada | 1990 | 1980 | 1960 | 1920 | 1900 | 1800 | 1500 | 1300 | 1000 |
| mL de tampón acético/acetato | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| mL de disolución de hidróxido de sodio | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |

5.2.3.2.- Fosfatasa básica total

La metodología empleada fue una variante de la descrita por Berman (1970) empleando la dilución 1:10 de la suspensión obtenida en el **apartado 5.2.1.**

A 1 mL de la dilución anterior se le añadieron 2 mL de disolución amortiguadora carbonato / bicarbonato 0,2 M pH 9,6, 1 mL de disolución acuosa de fosfato de *p*-nitrofenol hexahidrato al 1 %, incubándose 30 min en oscuridad a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se detuvo la reacción mediante adición de 2 mL de disolución de hidróxido de sodio 0,2 M, se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min para eliminar las

partículas en suspensión y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 410 nm. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

La recta de calibrado externa se preparó con los mismos volúmenes de cada uno de los reactivos y concentraciones crecientes de *p*-nitrofenol, producto final de la reacción enzimática y responsable del color, enrasando finalmente a un volumen de 6 mL, utilizándose una disolución madre de para-nitrofenol de concentración 0,6 mM.

En la **Tabla 12** se muestran los volúmenes empleados para la elaboración de la curva de calibrado externa.

Tabla 12: Recta de calibrado utilizada para la determinación de la actividad fosfatasa básica

| Puntos de la recta de calibrado | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Vol. (μL) Dis. madre de <i>p</i> -nitrofenol 0,6 mM | 10 | 20 | 40 | 80 | 100 | 200 | 500 | 700 | 1000 |
| μL de Agua Destilada | 1990 | 1980 | 1960 | 1920 | 1900 | 1800 | 1500 | 1300 | 1000 |
| mL de tampón carbonato/bicarbonato | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| mL de disolución de hidróxido de sodio | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |

5.2.3.3.- Rodanasa

Para el estudio de la actividad rodanasa se empleó una modificación de la metodología descrita por Tanabai (1970), empleando las muestras obtenidas en el **apartado 5.2.1**.

A 4 mL de suspensión se le añadieron 0,5 mL de tolueno, 8 mL de disolución 0,05 M de tris(hidroximetil)aminometano ajustada a pH 6 con ácido sulfúrico 0,2 N, 1 mL de sulfito de sodio 0,1 M y 1 mL de cianuro de potasio 0,1 M, incubándose a 37 °C durante una hora. La reacción se detuvo por la adición de 10 mL de sulfato de calcio-formaldehído (900 mL de disolución de sulfato de calcio dihidrato 0,01 M y 100 mL de formaldehído). La mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min para eliminar las partículas en suspensión, al sobrenadante se añadió 1 mL de reactivo de hierro (disolución de nitrato de hierro 0,2 M y ácido nítrico 0,01 N) midiéndose la absorbancia a 460 nm.

La recta de calibrado se preparó con los mismos componentes que las muestras problema, agua destilada en lugar de suspensión y sulfocianuro de potasio a diferentes concentraciones.

5.2.3.4.- Deshidrogenasa

La metodología empleada fue una modificación de la descrita por Casida et al. (1964) empleando la suspensión obtenida en el **apartado 5.2.1.**

A 6 mL de suspensión se añadió 1 mL de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio al 3 % (p/v) y se dejó incubar a 37 °C durante 24 h. Después de este tiempo, se mezclaron con 10 mL de metanol filtrándose a través de un algodón absorbente. El color rojo resultado de la producción de trifenilformazán se eliminó del algodón mediante repetidos lavados con metanol y se enrasó el volumen final a 100 mL con metanol adicional. Se midió la absorbancia a 475 nm y se comparó con una recta patrón externa.

La recta de calibrado se preparó con los mismos componentes que las muestras problema, agua destilada en lugar de suspensión y trifenilformazán a diferentes concentraciones.

5.2.3.5.- Arilsulfatasa

La metodología empleada fue una modificación de la descrita por Tanabai y Bremmer (1972) empleando la suspensión del **apartado 5.2.1.**

A 1 mL de suspensión se le añadieron 0,25 mL de tolueno, 4 mL de tampón acetato a pH 5,8 y 1 mL de *p*-nitrofenilsulfato 1 mM. Transcurrido el tiempo de incubación se detuvo la reacción mediante la adición de 1 mL de disolución de hidróxido de sodio 1 mM y cloruro de calcio 1 mM, se centrifugó para eliminar las partículas en suspensión a 3000 rpm durante 15 min y se midió en espectrofotómetro a 410 nm.

La recta de calibrado externa se preparó con los mismos componentes que las muestras problema, agua destilada en lugar de suspensión y para-nitrofenol a distintas concentraciones.

5.3.- Análisis estadístico

Los datos experimentales obtenidos en los apartados 5.1 y 5.2 se sometieron a tratamiento estadístico empleando el programa *Statgraphics versión 5.1 plus*. El tratamiento consistió en:

1. Análisis de la varianza (*anova*) de una vía o multifactorial con interacción, según la naturaleza de los datos obtenidos en cada una de las determinaciones.
2. Test de mínimas diferencias significativas (LSD) entre medias, y test de rango múltiple (t de Student) para la comparación por separado de las fuentes de variación en los análisis multifactoriales.

3. Coeficientes de Pearson de correlación lineal entre las variables estudiadas en cada uno de los biofiltros.

Los resultados se presentan en forma gráfica o en tablas de medias, indicándose en cada caso concreto el número de repeticiones. En todos los casos, se han calculado las mínimas diferencias significativas (LSD) considerando el 95 % ($P < 0,05$) como nivel de significación.

Las gráficas que muestran el rendimiento de eliminación de los metales pesados por lo biofiltros se han tratado estadísticamente mediante el programa informático *Microsoft Excel 2000*, calculándose las medias y las desviaciones standard de cada serie de datos.

5.4.- Microscopía electrónica y análisis de las biopelículas por rayos X

La biopelícula adherida al soporte formada en los diferentes biofiltros se observó tanto por microscopía electrónica de barrido como por microscopía electrónica de transmisión.

Tanto la preparación de las muestras como su posterior visualizado se realizaron en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, en las unidades de preparación de muestras biológicas, barrido electrónico y transmisión electrónica de alta resolución.

5.4.1.- Microscopía de barrido electrónico

El pre-tratamiento al que fueron sometidas las muestras para poder ser visualizadas en el equipo de microscopía electrónica de barrido fue el siguiente:

1.- Toma de muestras

2. Fijación de las muestras en una solución de glutaraldehído al 2,5 % en disolución reguladora de pH de fosfato pH = 7,4 durante 24 h y 4 ^\circ C .

3. Lavado de las muestras en la misma disolución tamponante. Tres cambios de 20 min a 4 ^\circ C .

4. Post-fijación con tetróxido de osmio al 2 % en oscuridad durante 1 h a temperatura ambiente.

5. Lavado en agua desionizada para eliminar los restos de tetróxido de osmio, tres cambios de 20 min cada uno.

6. Deshidratación en gradiente de concentraciones crecientes de etanol (reactivo análisis) comenzando con una disolución al 50 %, y a continuación con disoluciones al 70 % y 90 %. Por último se realizan dos cambios con etanol absoluto. El tiempo de inmersión en cada una de las disoluciones era de 20 min.

7. Desecación por el método del punto crítico (Anderson, 1951) con dióxido de carbono en un desecador de punto crítico Polaron CPD7501.
8. Recubrimiento de las muestras por evaporación de carbón (evaporador Hitachi).

5.4.2.- Microscopía electrónica de transmisión

Para observar las muestras mediante microscopía electrónica de transmisión es preciso llevar a cabo un tratamiento de éstas, el cuál es:

1. Toma de muestras
2. Fijación por inmersión de las muestras en una disolución de glutaraldehído (2,5 %) en tampón fosfato 0,1 M a pH = 7,4 durante 4 h a 4 °C.
3. Lavado en el mismo tampón, tres cambios de 20 min cada uno.
4. Post-fijación con tetróxido de osmio al 1 % durante 2 h.
5. Lavado.
6. Deshidratación por inmersión en gradiente con etanol, empleando cambios con disoluciones de etanol de concentración creciente. Se comienza con una disolución al 50 %, y se continúa con disoluciones al 70 % y 90 %. Por último se realizan dos cambios con etanol absoluto. El tiempo de inmersión en cada una de las disoluciones era de 20 min.
7. Infiltración en una mezcla 1:1 de etanol 100 % y resina Epon, durante 2 h en agitación.
8. Inclusión en resina pura Epon durante 24 h.
9. Polimerización a 60 °C.
10. Realización de cortes semifinos de 1 μm teñidos con azul de toluidina, y de cortes ultrafinos de 700Å teñidos con acetato de uranilo y/o citrato de plomo, en un ultramicrotomo Ultracut E.

Una vez fijadas las muestras, se realizó el estudio de microscopía electrónica en el Centro antes mencionado.

Se emplearon los siguientes equipos:

• Microscopía de transmisión: Marca PHILIPS modelo CM20 TEM/STEM equipado con microanálisis de energía dispersiva de rayos X (EDRX) marca EDAX y con cámara digital SIS MegaView III.

• Microscopía de barrido de Baja resolución: Marca ZEISS modelo DSM 950 equipado con un sistema de microanálisis por energía dispersiva de rayos X (EDRX) Oxford ISIS 300.

€Microscopía electrónica de barrido por emisión de campo FEG Marca LEO modelo 1530, equipado con un sistema de microanálisis por energía de dispersión de rayos X (EDRX) marca OXFORD modelo INCA 200

5.5.- Biodiversidad: Estudios de las comunidades bacterianas presentes en las biopelículas

Las biopelículas se sometieron a estudios de la biodiversidad bacteriana, para lo cual se empleó la técnica de electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE). Los pasos seguidos fueron los siguientes:

Primero: Extracción del ADN bacteriano total de las biopelículas.

Segundo: Amplificación de los fragmentos del gen codificante del ARN ribosómico 16S (ADNr 16S) mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Tercero: Separación de los fragmentos de distinta secuencia de ADN mediante TGGE.

Cuarto: Identificación de los fragmentos de ADN mediante secuenciación.

5.5.1.- Extracción del ADN bacteriano

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

A partir de la suspensión obtenida en el **apartado 5.2.1** se siguieron los siguientes pasos:

Primero: Se dejó decantar la arcilla de tamaño más grueso, tomándose 100 mL de solución salina con la biopelícula recuperada y se centrifugaron (50 mL por tubo) a 3500 rpm durante 30 min, obteniéndose un sedimento que se utilizó como material de partida para la extracción de ADN.

Segundo: El sedimento obtenido en cada uno de los tubos se resuspendió en 2 mL de suspensión de células (Solución I) y se incubó a 37 °C durante 10 min.

La solución I está compuesta por: Tris HCl pH 8 10 mM, EDTA 100 mM, sacarosa 0,35 M y lisozima (extemporánea) 20 mg/mL. 50 mL de solución I (sin lisozima) se preparan llevando a un volumen final de 50 mL una mezcla de 0,5 mL de Tris HCl pH 8, 10 mL de EDTA 0,5 M y 5,96 g de sacarosa. Una vez preparada la solución I se filtra y se le añade extemporáneamente la lisozima, en función del volumen a emplear, que vendrá dado por el número de muestras a procesar.

Tercero: A cada tubo se añadieron 3 mL de suspensión de lisis (Solución II) incubándose a 37 °C durante 60 min.

La composición de la solución II es: Tris HCl pH 8 100 mM, cloruro de sodio 0,3 M, EDTA 100 mM, SDS 2 % y extemporáneamente proteinasa K 200 µg/mL y η-mercaptoetanol al 2 %. Para 50 mL de solución II (exenta de proteinasa K y η-mercaptoetanol) se toman 5 mL de Tris HCl pH 8 1 M, 10 mL de EDTA pH 8 0,5 M, 0,87 g de cloruro de sodio y 1 g de SDS (ó 1 mL de SDS al 10 %) y se lleva a un volumen final de 50 mL. Extemporáneamente se añaden, por cada 10 mL de solución II, 20 µL de η-mercaptoetanol y 10 µL de proteinasa K (solución en *stock* de 20 mg/mL mantenida a -20 °C).

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

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

El *buffer* TE estéril se prepara con 1 mL de disolución 1 M de Tris HCl a pH 8 y 200 µL de disolución de EDTA 0,5 M pH 8, enrasándose a 100 mL, con lo que las concentraciones de Tris HCl y EDTA finales son 10 mM y 1 mM respectivamente.

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

La ARNasa libre de ADNasa se prepara disolviendo la ARNasa comercial en Tris HCl pH 7,5 y cloruro de sodio 15 mM, calentándose 15 min a 100 °C. Por último se alicuota y se conserva a -20 °C.

Sexto: El extracto acuoso se dividió en fracciones de 800 µL como máximo y se dispuso en tubos eppendorf, añadiéndosele a cada uno igual volumen de isopropanol para precipitar el ADN. Por último se deja reposar a -20 °C durante 30 min.

Séptimo: Las fracciones se sometieron a centrifugación a 13000 g durante 20 min y el sedimento obtenido se lavó (sin resuspender), añadiendo 500 µL de etanol al 70 % y centrifugando 2 min. Posteriormente, mediante succión a vacío se extrajo la mayor parte de etanol y se dejó secar completamente.

Octavo: Al sedimento de cada tubo se le añadió 50 σ L de *buffer* TE estéril, dejándose toda la noche a 4 \forall C para que se redisolvió el ADN.

Noveno: Comprobación en gel de agarosa al 0,8 % disuelta en *buffer* TAE o TBE, empleando el marcador escalera de 1 Kb (Gibco), realizándose la electroforesis a 80 V. Transcurrido el tiempo se revela con bromuro de etidio (20 σ L en 100 mL del buffer empleado para la preparación del gel) enjuagándose el gel en agua y fotografiándolo en un sistema de documentación de geles Gel Doc 2000 (Bisrad)

5.5.2.- Amplificación de fragmentos del gen codificante del ARNr 16S

Las muestras de ADN se sometieron a una reacción de PCR anidada, donde se realizaron dos reacciones consecutivas de amplificación, en la primera se amplificó una región correspondiente a casi la totalidad del gen (aproximadamente 1,5-1,6 Kb) y en la segunda una región interna de menor tamaño (aproximadamente 0,2 Kb) correspondiente a la región hipervariable V3 (nucleótidos 341 al 534, numeración de *Escherichia coli*, Muyzer et al. (1993)). Se empleó la estrategia de PCR anidada con la finalidad de obtener un mayor rendimiento en la amplificación, que permite obtener patrones de bandas más completos.

Para la primera PCR se emplearon los cebadores universales fD1 y rD1 (Weisburg et al., 1990), para la segunda PCR se emplearon los cebadores universales GC-P1 y P2 (Muyzer et al., 1993). La secuenciación del cebador GC-P1 esta basada en una región conservada del gen a la que se añade una cola de cuarenta pares de bases ricas en GC necesarias para la separación correcta mediante TGGE (Muyzer et al., 1993). En la **Figura 37** se muestra un esquema del procedimiento completo seguido. La secuencia de todos los cebadores empleados se muestra en la **Tabla 13**.

Tabla 13: Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR anidada

| CEBADOR | SECUENCIA (DE 5' A 3') |
|--------------------|---|
| fD1 | CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG |
| rD1 | CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC |
| GC-P1 ^A | CGCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCGGGGGCACGGGGGG CCTACGGGAGGCAGCAG |
| P2 | ATTACCGCGGCTGCTGG |

^AEn negrita se indica la cola rica en GC

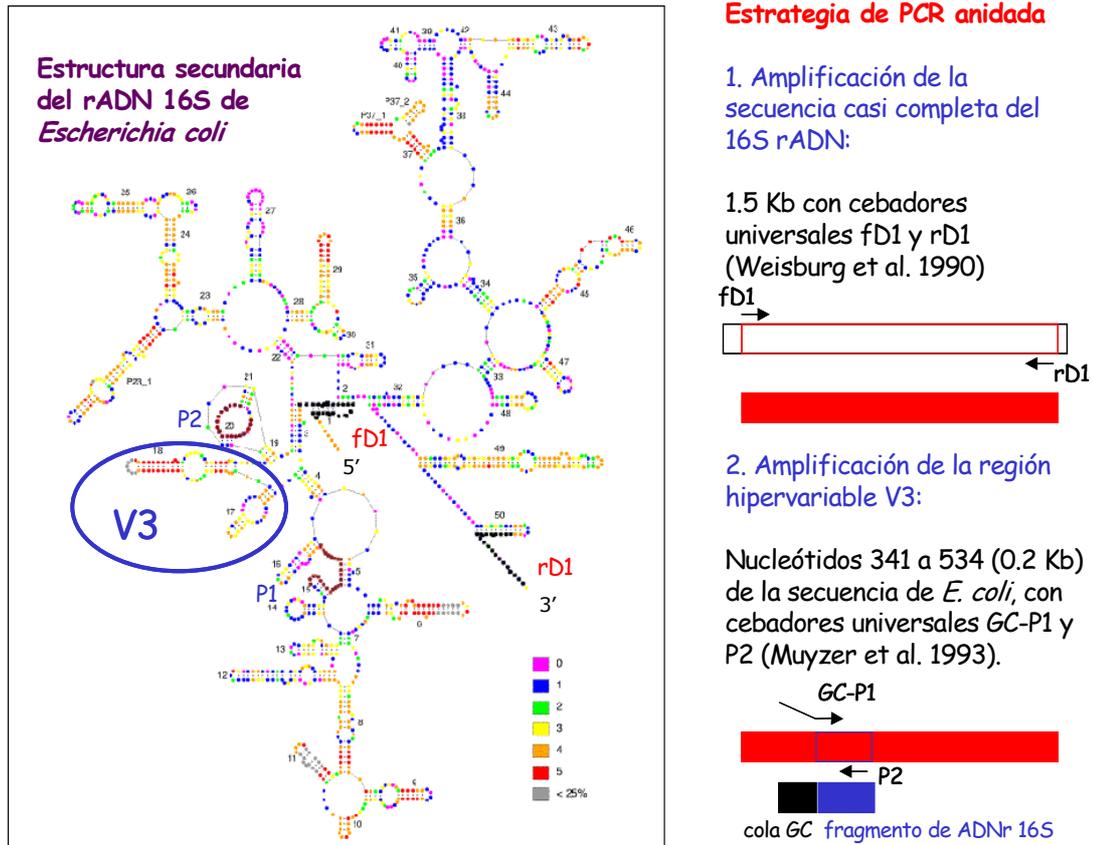


Figura 37: Esquema de la reacción de PCR anidada, donde se realizaron dos reacciones consecutivas de amplificación, en la primera se amplificó una región correspondiente a casi la totalidad del gen y en la segunda una región interna de menor tamaño.

La primera reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50 μ L. Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos seguidos fueron una modificación de los descritos por Vinuesa et al. (1998). En cada mezcla de reacción se utilizaron los reactivos que se indican en la **Tabla 14**.

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

- Desnaturalización inicial: 95 $^{\circ}$ C durante 7 min
- 25 ciclos que constan de:
 - Desnaturalización: 94 $^{\circ}$ C durante 1 min y 10 s.
 - Hibridación de los cebadores sobre el ADN molde desnaturalizado, *Annealing*: 56 $^{\circ}$ C durante 40 s.
 - Extensión: 72 $^{\circ}$ C durante 2 min.
- Extensión final: 72 $^{\circ}$ C durante 6 min y 10 seg.

4. Mantenimiento a 4 °C

Tabla 14: Reactivos empleados en la primera reacción de la PCR anidada, efectuada en un volumen final de 50 μ L.

| Reactivo | Volumen μ L |
|---|-----------------|
| PCR <i>Buffer</i> Gold 10x (Applied Biosystems) | 5 |
| MgCl ₂ 25 mM (Applied Biosystems) | 3 |
| Seroalbúmina bovina 10 mg/mL (N E Biolabs) | 1 |
| Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (Roche) 10 mM | 1 |
| Dimetilsulfóxido grado biología molecular (Sigma) | 2,5 |
| Cebador fD1 100 μ M (Sigma) | 0,2 |
| Cebador rD1 100 μ M (Sigma) | 0,2 |
| Ampli <i>Taq</i> Gold polimerasa (Applied Biosystems) | 0,2 |
| ADN molde | 1 |
| Agua bidestilada grado PCR | 37 |

Tras la reacción se tomaron alícuotas de 5 μ L y se comprobaron en gel de agarosa al 0,8 %, para confirmar la existencia de bandas amplificadas del tamaño esperado (1,5-1,6 Kb). Una vez comprobadas, las muestras fueron sometidas a una segunda PCR con el objetivo de amplificar la región V3. La segunda reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 100 μ L. Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos seguidos fueron una modificación de la técnica *touch down* descrita por Watanabe et al. (1998). En cada mezcla de reacción se utilizaron los reactivos que se indican en la **Tabla 15**.

Tabla 15: Reactivos empleados en la segunda reacción de la PCR anidada, efectuada en un volumen final de 100 μ L

| Reactivo | Volumen μ L |
|---|-----------------|
| PCR <i>Buffer</i> Gold 10X (Applied Biosystems) | 10 |
| MgCl ₂ 25 mM (Applied Biosystems) | 6 |
| Seroalbúmina bovina 10 mg/ml (N E Biolabs) | 2 |
| Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (Roche) 10 mM | 2 |
| Dimetilsulfóxido grado biología molecular (Sigma) | 5 |
| Cebador GC-P1 100 μ M, purificado mediante HPLC (Sigma) | 0,4 |
| Cebador P2 100 μ M, purificado mediante HPLC (Sigma) | 0,4 |
| Ampli <i>Taq</i> Gold polimerasa (Applied Biosystems) | 0,4 |
| ADN molde (producto de la primera PCR) | 1 |
| Agua bidestilada grado PCR | 73 |

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

1. Desnaturalización inicial: 94 ^\circ C durante 7 min
2. Treinta ciclos que consisten en:

Desnaturalización: 94 ^\circ C durante 1 min

Annealing: 65 ^\circ C durante 1 min

Esta temperatura se disminuyó automáticamente 1 ^\circ C cada 2 ciclos, hasta alcanzar 55 ^\circ C , temperatura a la cual se efectuaron 10 ciclos adicionales.

Extensión: 72 ^\circ C durante 2 min

3. Extensión final: 72 ^\circ C durante 10 min
4. Mantenimiento a 4 ^\circ C

Tras la reacción se tomaron alícuotas de 1 μL que se comprobaron en gel de agarosa al 3 %, para confirmar la existencia de bandas amplificadas del tamaño esperado (0,2 Kb).

5.5.3.- Concentración del producto de la PCR anidada

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

Para ello, se toma el volumen de la PCR (máximo 500 μL) se centrifuga en el cartucho a 500 g durante 15 min. A continuación se añaden de 15 a 20 μL de agua milliQ estéril y se invierte el cartucho en un tubo eppendorf nuevo centrifugándose a 13000 rpm durante 3 min.

5.5.4.- Separación de las muestras mediante TGGE

La electroforesis en gel con gradiente de temperatura se realizó empleando el sistema TGGE MAXI (Watman Biometra). Para la separación de los distintos fragmentos se emplearon geles desnaturizantes de poliacrilamida, preparado en agua bidestilada, con la composición que se indica en la **Tabla 16**.

Tabla 16: Composición del gel desnaturalizante de poliacrilamida empleado en la TGGE

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

Los geles se dejaron polimerizar durante 3 h antes de llevar a cabo la electroforesis.

Para la electroforesis se empleó *buffer* TAE (2X). Se cargaron 5 σ L de cada muestra más 1 σ L de *buffer* de carga (5x) de la siguiente composición: 0,5 % tritón X-100, 0,05 % azul de bromofenol, 0,05 % xilencianol, EDTA 10 mM y *buffer* TAE 10x.

Las condiciones de la electroforesis fueron las siguientes:

1. Migración inicial de las muestras:
 - ∅ Temperatura inicial de gradiente, $T_0 = 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$
 - ∅ Temperatura final de gradiente, $T_{10} = 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$
 - ∅ Voltaje 300 V
 - ∅ Duración 18 min
2. Establecimiento del gradiente de temperatura:
 - ∅ Temperatura inicial de gradiente, $T_0 = 43 \text{ }^{\circ}\text{C}$
 - ∅ Temperatura final de gradiente, $T_{10} = 63 \text{ }^{\circ}\text{C}$
 - ∅ Voltaje 0 V
 - ∅ Duración 10 min
3. Separación de muestras:
 - ∅ Temperatura inicial de gradiente, $T_0 = 43 \text{ }^{\circ}\text{C}$
 - ∅ Temperatura final de gradiente, $T_{10} = 63 \text{ }^{\circ}\text{C}$
 - ∅ Voltaje 125 V
 - ∅ Duración 18 h

Tras la electroforesis, se tiñeron con plata, empleando el kit “Gel Code Silver Staining” (Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Como patrón de separación para los fragmentos del gen ADNr 16S, se construyó un marcador de seis especies a partir de las cepas de colección que se muestran en la **Tabla 17**.

El proceso seguido para preparar el fragmento de ADN de los patrones fue idéntico al de las muestras.

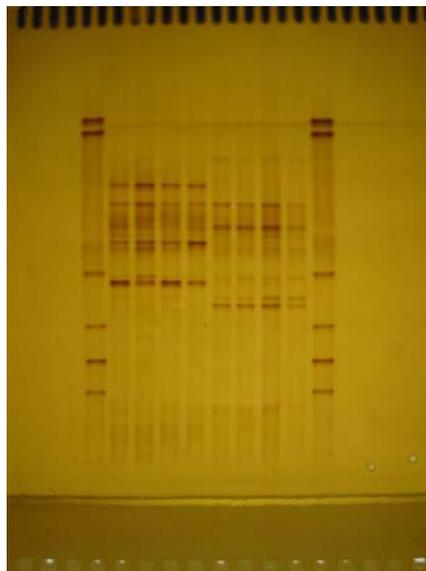


Figura 38: Aspecto de un gel de TGGE

Tabla 17: Listado de las cepas de colección que se emplearon como marcadores en la TGGE

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

ATTC: *American Type Cultura Collection*

5.5.5.- Reamplificación de las bandas separadas mediante TGGE

Las bandas individuales visualizadas en los geles mediante tinción con plata se punzaron en su parte central con una punta de pipeta estéril, y el fragmento así extraído se suspendió en 10 σ L de agua bidestilada estéril en tubos para PCR de 200 σ L. Partiendo de estos fragmentos como molde, se efectuó la reamplificación de cada banda individual mediante PCR, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.5.2. para la segunda reacción de PCR empleando como cebadores GC-P1 y P2.

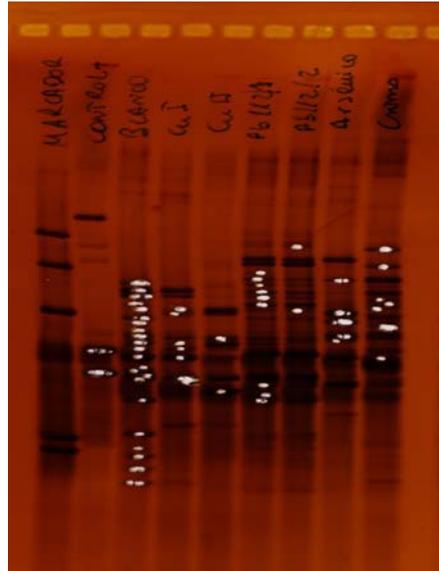


Figura 39: Aspecto de un gel de TGGE tras la extracción de bandas

5.5.6.- Purificación y secuenciación de los fragmentos de ADN reamplificados

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

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

5.5.7.- Análisis informático de las secuencias

Los datos de secuencia de ADN obtenidos fueron analizados con el programa informático de libre distribución *Chromas* v. 1.45. Para el alineamiento y la comparación de las secuencias de ADN de los distintos fragmentos obtenidos, se emplearon las herramientas de biocomputación *Align* (Krustal, 1983) y *WU-BLAST-n* v. 2.0 (Altschul et al., 1997), ambas disponibles en el servidor web del *European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk>). El programa *Clustal X* v. 1.8 (Jeanmougin et al., 1998) fue utilizado para la generación de alineamientos de las secuencias, empleando los parámetros por defecto. El programa *MEGA* (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) v. 2.1, creado por

Kumar, S. et al, se utilizó para el cálculo de las matrices de distancia entre las secuencias y la construcción de los árboles filogenéticos mediante el método *Neighbour-Joining* (Saitou y Nei, 1987). Los árboles se calcularon tomando como criterio la no inclusión de los huecos (*gaps*) del alineamiento. Los valores de confianza se calcularon mediante el método *Bootstrap* (n = 1000) (Felsenstein, 1985) y los porcentajes superiores al 50 % aparecen reflejados en los árboles correspondientes.

6.- Elección de los cationes

La elección de los iones cobre (II), plomo (II) y cromo (III) se realizó atendiendo a su comportamiento químico, dado que todos los metales pesados presentan mayor o menor toxicidad en seres vivos.

El ión cobre (II) presenta un hidróxido cuya constante de producto de solubilidad de $2,2 \cdot 10^{-20}$, por lo que es un catión muy sensible a los cambios de pH dado que precipita en forma de hidroxisales a pH próximos a 9, sin embargo las combinaciones de este catión con los aniones sulfato y cloruro son solubles, permitiendo la presencia de este catión en efluentes en los que estos aniones están presentes debido por un lado a la solubilidad en agua de estas sales y la formación de complejos de este catión con estos aniones y el agua.

El ión plomo (II) presenta un hidróxido con una constante de producto de solubilidad del mismo rango que el ión cúprico ($1,1 \cdot 10^{-20}$) sin embargo las combinaciones con cloruro, sulfato o carbonato dan lugar a sales insolubles en agua con constantes de producto de solubilidad de $1,6 \cdot 10^{-5}$, $1,6 \cdot 10^{-8}$ y $7,5 \cdot 10^{-14}$ respectivamente, por lo tanto no es de esperar la presencia de este catión, Pb^{2+} , en efluentes en los que estos aniones están presentes. No obstante, se escogió dicho catión debido a que sí puede presentarse formando micropartículas insolubles, compuestas por carbonatos, cloruros o sulfatos de plomo (II), las cuales son igualmente contaminantes porque se pueden volver a disolver si las condiciones del entorno cambian en cuanto a pH o disminución de la concentración de los aniones anteriormente mencionados. Es por ello por lo que han de ser eliminadas del influente.

El ión cromo (III) presenta un hidróxido cuya constante del producto de solubilidad es de $6,3 \cdot 10^{-31}$, por lo que al igual que el ión cúprico, catión divalente, su concentración en agua está muy influenciada por el pH. Se escogió este catión por ser trivalente y poder realizar un estudio comparativo entre éste y los dos anteriores.

7.- Periodicidad en las determinaciones realizadas

Para poder realizar un estudio comparativo entre los diferentes biofiltros fue de suma importancia establecer el momento en el que se iban a realizar las diferentes determinaciones, tanto químicas como microbiológicas.

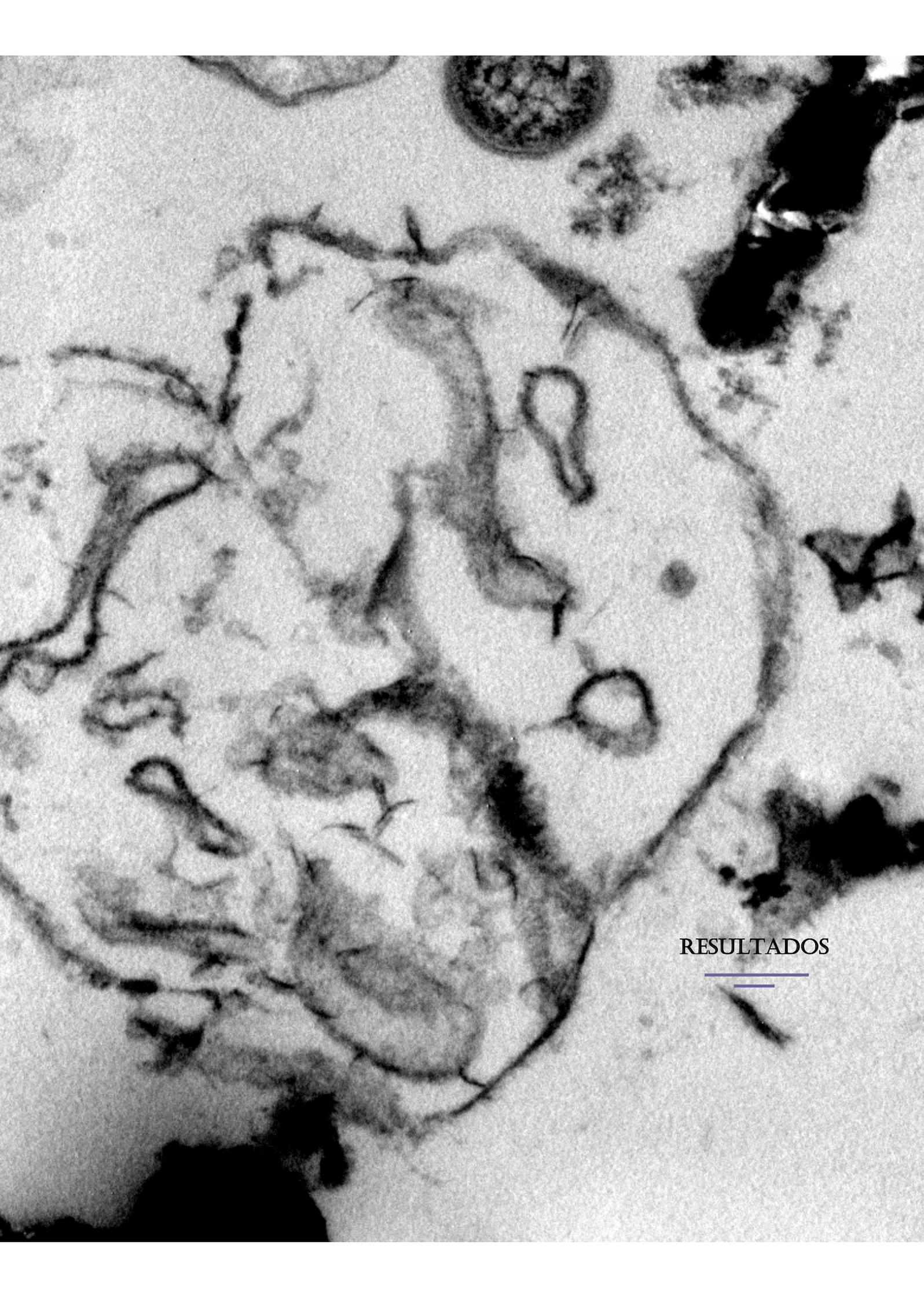
Tabla 18: Periodicidad en las determinaciones realizadas

| | Controles | Cobre (II) | Plomo (II) | Cromo (III) | <i>m</i> -arsenito |
|--|---------------------|--------------|-------------------|--------------|--------------------|
| Duración de la experiencia | 14 meses | 7 meses | 4 meses | 2 meses | 70 días |
| Ciclos del biofiltro | 10 * 4 | 21 | 13 | 6 | 7 |
| D E T E R M I N A C I O N E S Q U Í M I C O - M I C R O B I O L Ó G I C A S | | | | | |
| Peso de Volátiles | Día 5 de ciclo | | | | |
| Obtención de EPS | Día 10 de ciclo | | | | |
| Adenosintrifosfato (ATP) | Día 7 de ciclo | | | | |
| Concentración de sacarosa | Días 1 y 9 de ciclo | | | | |
| Concentración de metal pesado | ----- | Diario | | | |
| Recuento de mesófilos | Día 8 de ciclo | | | | |
| Fosfatasa ácida total | Día 6 de ciclo | | | | |
| Fosfatasa alcalina total | Día 6 de ciclo | | | | |
| Rodanasa | Día 6 de ciclo | | | | |
| Deshidrogenasa | Día 6 de ciclo | | | | |
| Ariulfatasa | Día 6 de ciclo | | | | |
| Microscopía electrónica | Día 1 y 10 de ciclo | | | | |
| Biodiversidad | Día 26 y 40 | Día 90 y 121 | Días 50, 51 y 112 | Días 39 y 41 | Día 48 |
| P A R Á M E T R O S D E C O N T R O L | | | | | |
| Aireación | Semanal | Semanal | Semanal | Semanal | Semanal |
| Caudal | Semanal | Semanal | Semanal | Semanal | Semanal |

En la **Tabla 18** se muestra la duración de las experiencias con los cinco biofiltros estudiados, los ciclos que estuvieron en funcionamiento cada uno de ellos (un ciclo equivale a diez días), así como el momento, dentro del ciclo, en el que se realizaron las diferentes determinaciones. Se puede observar, por ejemplo, cómo el peso de volátiles, de cada uno de los biofiltros con diferentes influentes, se determinó en el quinto día de funcionamiento. De cada una de las determinaciones se realizaron tres repeticiones.

La concentración de metal (en los biofiltros con influente contaminado), tanto a la salida como en los diferentes puntos de muestreo se realizó diariamente.

Los parámetros de control, tales como el caudal de aire y el caudal de influente, se le realizó un seguimiento semanal para comprobar que no había variaciones con los valores establecidos inicialmente.



RESULTADOS



1.- Determinaciones preliminares

En primer lugar se realizó la caracterización del material arcilloso empleado como soporte en los biofiltros con objeto de tener un perfil de composición del mismo a tiempo cero. De igual forma, se realizó una caracterización químico-microbiológica del agua de pozo empleada como influente.

1.1.- Caracterización del relleno

El relleno utilizado en nuestros estudios es de origen arcilloso, presentando un diámetro medio de poro de 0,8 mm. En las **Figuras 40, 41 y 42** se muestran las características de dicho relleno desde el punto de vista tanto morfológico como analítico.

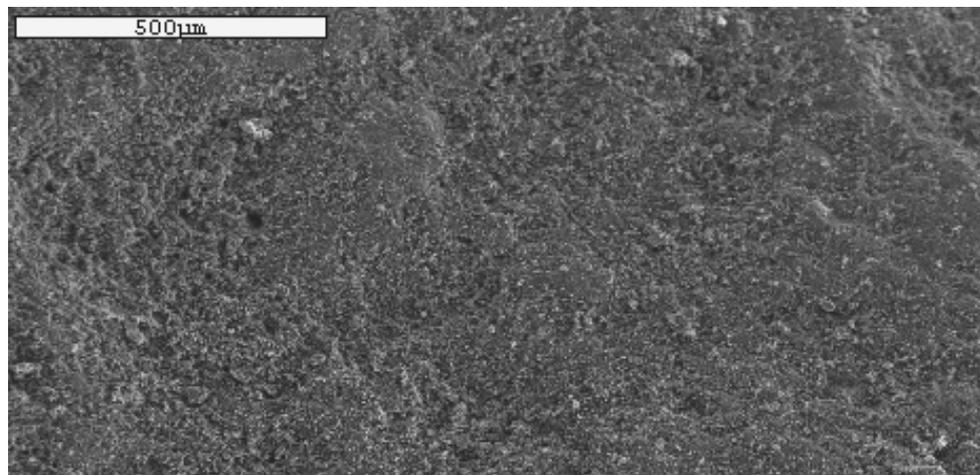


Figura 40: Microfotografía del relleno

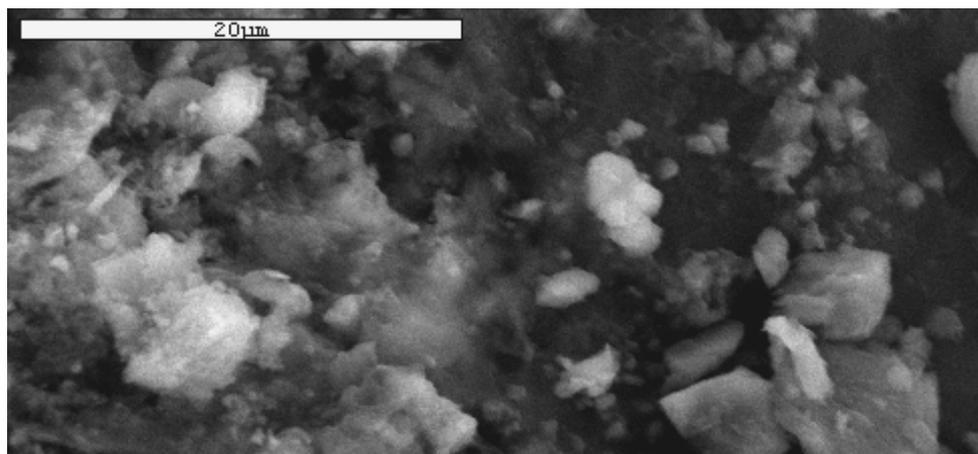


Figura 41: Microfotografía del relleno a mayor aumento

En la **Figura 41** se puede observar la superficie irregular del soporte, con abundantes oquedades y sitios de fijación para los microorganismos, lo que convierte a este material en idóneo para la formación de biopelículas.

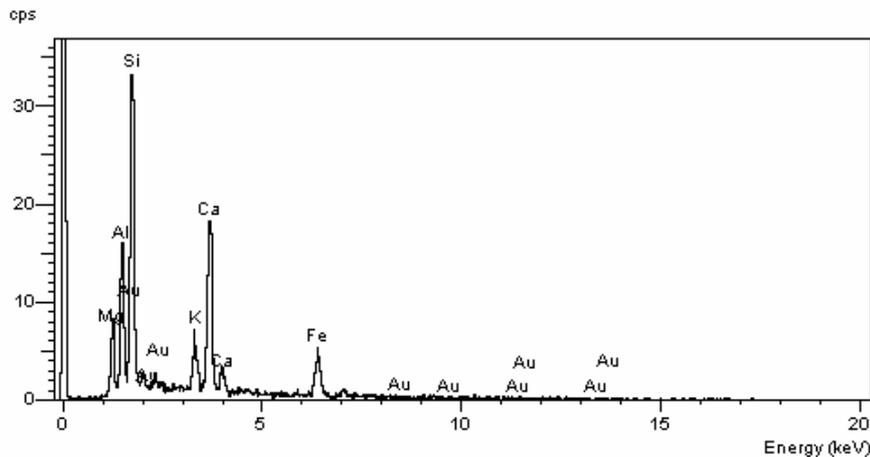


Figura 42: Análisis de difracción de rayos X del relleno

El análisis cualitativo de rayos X (**Figura 42**) demuestra la naturaleza arcillosa del relleno, compuesto mayoritariamente por hierro, calcio, silicio, aluminio y potasio. La presencia de oro se debe al protocolo de preparación de la muestra para su posterior análisis.

La presencia de fosfatos se determinó cuantitativamente mediante espectrofotometría y, debido a que las arcillas son heterogéneas en su composición, se llevaron a cabo seis repeticiones de esta medida (con sus respectivas réplicas). Para el análisis se tomaron muestras de diversa procedencia, con el objetivo de tener una idea lo más precisa posible de la cantidad de fosfatos presente en este tipo de materiales. Se obtuvo una composición de fosfatos por g de relleno de $0,3 \pm 0,2 \sigma \text{ g PO}_4^{3-}/\text{g}$ de relleno. La gran dispersión del resultado obtenido (67 %) confirma la composición poco definida de las arcillas.

1.2.- Caracterización del influente

La caracterización de dicho influente, adicionado de 250 mg/L de sacarosa como fuente de carbono, incluyó un amplio estudio de características físico-químicas y microbiológicas, el cual se describe en la **Tabla 19**.

Los altos valores obtenidos para la demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda biológica de oxígeno (DBO₅) se deben a la cantidad de sacarosa adicionada.

Las demás medidas realizadas están dentro de los rangos normales para un agua subterránea. Obsérvese, que el agua está exenta de metales pesados, por lo que un biofiltro que tenga este influente se puede emplear como control negativo en un estudio comparativo entre biofiltros contaminados con diferentes metales pesados.

Tabla 19: Características físico-químicas y microbiológicas del agua subterránea empleada en el estudio

| | DETERMINACIÓN | |
|--|--------------------------------|-------------------|
| | MICROBIOLÓGICA (log UFC/mL) | QUÍMICA (mg/L) |
| DQO | | 180 ± 10 |
| DBO ₅ | | 145,2 ± 0,8 |
| Microorganismos mesófilos a 20 °C (24 h) | 56 ± 10 | |
| Microorganismos mesófilos a 20 °C (48 h) | 104 ± 25 | |
| Microorganismos mesófilos a 30 °C (24 h) | 60 ± 12 | |
| Microorganismos mesófilos a 30 °C (48 h) | 146 ± 35 | |
| Enterococos | NO DETECTADOS | |
| <i>E. coli</i> | NO DETECTADOS | |
| FOSFATOS | | < 0,5 |
| NITRATOS | | 121,3 ± 0,8 |
| NITRITOS | | NO DETECTADOS |
| AMONIO | | 2,2 ± 0,5 |
| SULFATOS | | 178,90 ± 0,07 |
| CLORUROS | | 50,70 ± 0,08 |
| SODIO | | 250,0 ± 0,6 |
| POTASIO | | 7,50 ± 0,05 |
| METALES PESADOS | | TRAZAS (< 0,0001) |

*El recuento de microbiota mesófila se estandarizó a las 48 h debido a que pasado ese tiempo las colonias se han diferenciado morfológicamente por completo

2.- Establecimiento de los parámetros de control

Una vez realizadas las determinaciones tanto al soporte como al influente, se procedió a estandarizar una serie de factores que podrían influir en los resultados obtenidos posteriormente, tales como los caudales de influente y de aire, el aporte de sacarosa, las condiciones empleadas para la formación de la biopelículas en los distintos biofiltros y por último los ciclos de funcionamiento continuo de los mismos.

El objetivo de estandarizar estos parámetros fue el mantener constante una serie de variables que en principio podrían influir en el estudio comparativo de los distintos biofiltros, por lo que se mantuvieron constantes, a lo largo de todo el estudio, estos parámetros y sólo se introdujo la variable “presencia de metal pesado” en los biofiltros. De

esta forma se pudo llevar a cabo un estudio sobre la influencia de esta variable en las biopelículas formadas en cada uno de los biofiltros objeto de estudio.

2.1.- Caudal de influente

Inicialmente el caudal del agua subterránea empleado fue de 1,4 L/h, observándose en estas circunstancias como la fuente de carbono (sacarosa) se agotaba en los primeros 10 a 20 cm de planta (recorrido de influente a lo largo del biofiltro), por lo que se aumentó a 2,3 L/h, valor que determinaba una salida de 2,0 a 3,5 mg/L de sacarosa, concentración que se consideró no significativa en el funcionamiento de la planta desde el punto de vista económico.

2.2.- Caudal de aire

Para mantener un ambiente aerobio en los biofiltros era necesario un aporte exógeno de oxígeno en forma de aire, de modo que se realizaron ensayos con 0,5, 1, 5, 10 y 20 L de aire/min. Como resultado se obtuvo que el caudal óptimo para mantener una concentración alta de oxígeno en el influente y no producir perturbaciones en las biopelículas de los biofiltros fuera de 1 L/min.

2.3.- Fuente de carbono

La fuente de carbono empleada para los estudios realizados fue la sacarosa a una concentración de 250 mg/L a la entrada, valor éste utilizado en estudios realizados previamente en nuestro grupo de investigación (Gómez-Nieto, 1998). No obstante, en los estudios con cobre (II) la concentración de fuente de carbono se redujo a valores de 150 mg/L al objeto de disminuir los niveles de sacarosa a la salida del biofiltro.

2.4.- Formación de la biopelícula

La formación de la biopelícula en los biofiltros se realizó haciendo recircular un licor mezcla, procedente de la EDAR "Los Vados", a un caudal de 100 mL/h, durante un periodo de 24 h. Al licor mezcla se le añadió sacarosa hasta conseguir una concentración de 5 g/L (Gómez-Nieto, 1998).

2.5.- Funcionamiento de la planta

El funcionamiento continuo de los biofiltros se interrumpía cada diez días para realizar un lavado a contracorriente empleando la misma agua de salida y un caudal adicional de

aire. Para realizar este proceso se utilizaron 25 L de agua de salida como agua de lavado a contracorriente auxiliada con una entrada masiva de aire.

Dicha periodicidad en el lavado fue elegida al considerarse óptima para el sistema, considerando tanto el rendimiento óptimo en la eliminación del agente contaminante como la posibilidad de atascos en el sistema que hubieran tenido lugar si se hubiesen aumentado los días de funcionamiento continuo previos al proceso de lavado.

3.- Capacidad de eliminación de metales pesados por los biofiltros

Uno de los objetivos propuestos fue evaluar la capacidad de estos sistemas para la depuración de aguas subterráneas contaminadas con metales pesados. Para ello se analizó diariamente la concentración de metal pesado tanto en la entrada, salida como en las distintas tomas de muestreo situadas a lo largo de la planta e indicadas previamente en las **Figuras 29 y 30**.

Debido al comportamiento del biofiltro con influente contaminado con ión plomo (II), fue necesaria la cuantificación de este ión en la biopelícula a lo largo del recorrido del influente y a lo largo del ciclo de funcionamiento del mismo, además de las anteriormente mencionadas.

3.1.- Comportamiento del biofiltro en presencia de ión cúprico

El biofiltro con influente contaminado con ión cobre (II) se mantuvo en funcionamiento 7 meses, lo que equivale a 21 ciclos de diez días cada uno tal y como se puede apreciar en la **Tabla 19**. La diferencia de tiempo de funcionamiento de este biofiltro con los otros biofiltros (contaminados con plomo (II), cromo (III) y As (III)) se debe a que hubo que optimizar una serie de determinaciones, puesto que la presencia de este catión interfería en los análisis realizados.

En este periodo de funcionamiento se estudiaron, entre otras determinaciones, la concentración de este ión a la entrada, salida y en los distintos puntos de muestreo.

Tal y como se puede apreciar en la **Figura 43** los sistemas de lechos sumergidos presentan una alta eficacia en la eliminación de iones cúprico. El sistema necesita de un periodo de iniciación o adaptación, de 10 días, pasado el cual, el biofiltro es capaz de eliminar más de un 90 % de ión cúprico. Al estudiar con detalle el proceso de eliminación de este catión en el biofiltro, se puede comprobar cómo la retención del mismo se produce de forma mayoritaria en los primeros 10 cm de recorrido del agua subterránea en la

columna (Figura 44). No obstante, en función del tiempo se puede apreciar una cierta saturación, que comienza a ser visible a partir de los 30 días, que determina pérdidas de rendimiento del sistema. Así, tras 200 días de funcionamiento, los rendimientos del sistema descienden hasta un 73 %, valor éste aun bastante significativo en cuanto a la capacidad de eliminación del contaminante. Estos resultados son importantes al objeto de establecer los ciclos de lavado y caudales en el posible escalado posterior de este tipo de filtros sumergidos.

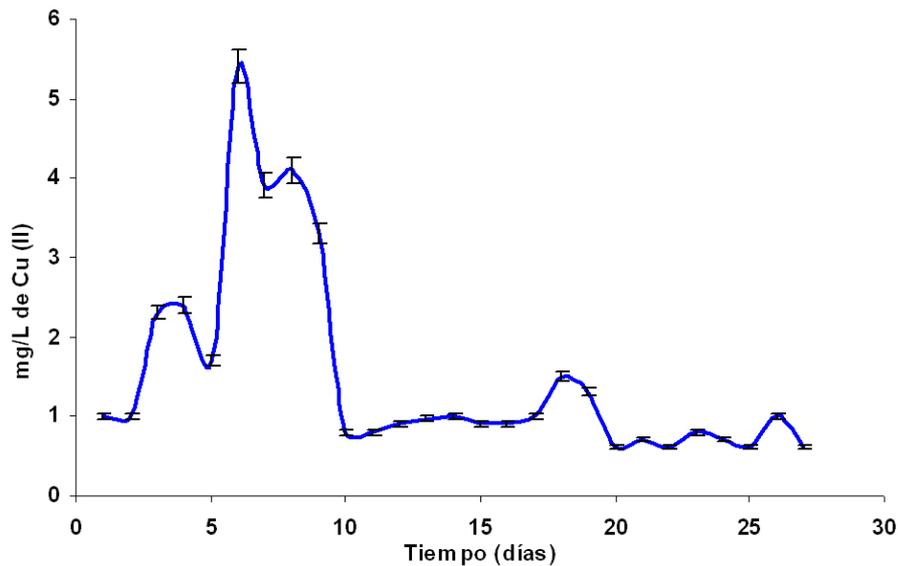


Figura 43: Concentración de cobre (II) a la salida del biofiltro en función del tiempo. Las barras verticales muestran la desviación estándar de cada serie de tres réplicas realizadas a cada medida.

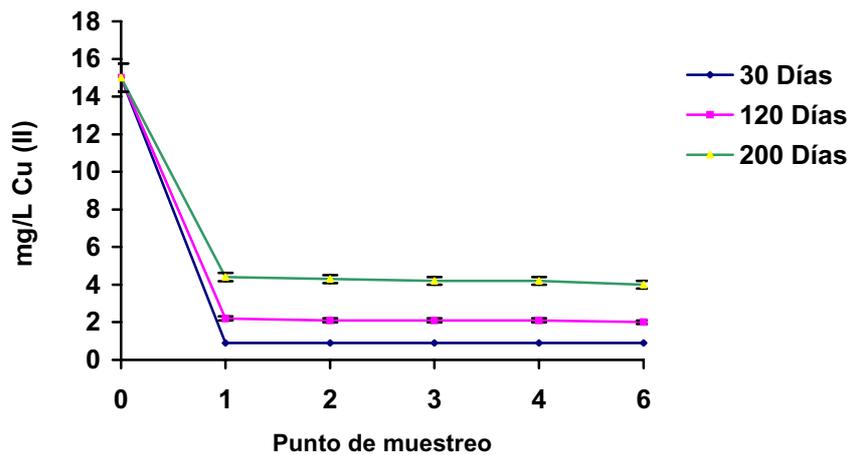


Figura 44: Variación de la concentración de Cu (II) en función del recorrido del influente. El punto 0 representa la entrada, el punto 6 la salida y los puntos 1 a 4, los distintos puntos de muestreo dispuestos en el biofiltro (Figura 29 y 30). La concentración a la entrada de este metal pesado fue constante a lo largo de todo el estudio e igual a 15 mg/L. Las barras verticales muestran la desviación estándar de cada serie de tres réplicas realizadas a cada medida.

3.2.- Comportamiento del biofiltro en presencia de ión plumboso

El tiempo de estudio de este biofiltro fue de 4 meses, con 13 ciclos completos de funcionamiento.

Al contrario que lo observado en el caso de aguas subterráneas contaminadas con ión cúprico, el biofiltro con influente contaminado con ión plumboso no necesitó de una etapa de adaptación para su eficaz puesta en marcha. Así, el influente tratado nunca superó el rango de 50 $\mu\text{g/L}$ de ión plumboso ni a la salida del biofiltro ni en todos los puntos de muestreo (**Figura 45**), es por ello que se procedió a analizar el contenido de plomo (II) en las biopelículas (**Figura 46**). El perfil de eliminación de ión plumboso en el biofiltro no se vio influenciado por los días de funcionamiento del mismo, no presentando grado de saturación en cuanto a la eliminación de plomo (II).

El reactor biológico funciona como un auténtico y eficaz filtro físico, actuando los microorganismos de la biopelícula como núcleos de cristalización del ión plumboso. Así, tras el periodo cíclico de diez días de funcionamiento continuo del biofiltro, se puede apreciar una cierta saturación en la biopelícula en los primeros puntos del sistema (**Figura 46**), volviendo a estar la biopelícula totalmente recuperada tras el proceso de lavado por lo que el rendimiento de eliminación (a la salida del sistema) fue próximo al 100 %.

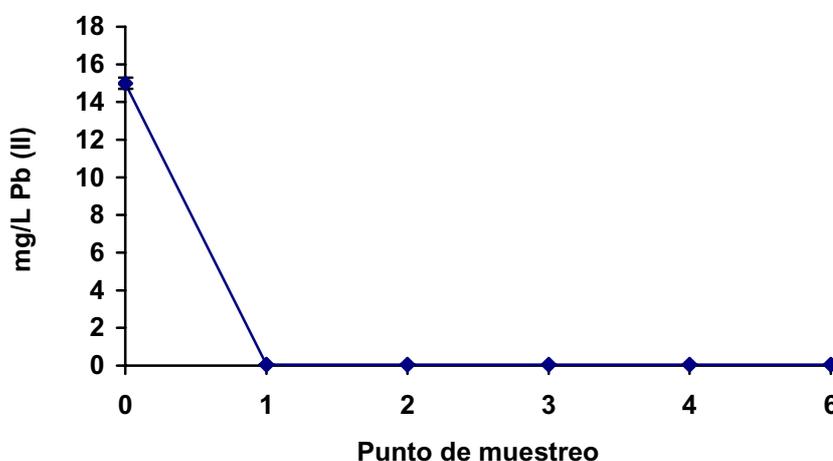


Figura 45: Eliminación de Pb (II) en los biofiltros en función del recorrido del influente. La concentración a la entrada de este catión fue constante a lo largo de todo el estudio realizado e igual a 15 mg/L. Las barras verticales muestran la desviación estándar de cada serie de tres réplicas realizadas a cada medida.

En la **Figura 46** se puede observar cómo la presencia de ión plomo (II) en la biopelícula se incrementa considerablemente a lo largo de los diez días de funcionamiento continuo del biofiltro, este valor llega a su máximo en el punto 1 de muestreo al décimo día

de funcionamiento del sistema, presentando un valor de 700 mg de ión plumboso por g de biopelícula seca. A medida que transcurren los diez días de funcionamiento continuo la biopelícula se va saturando de este ion, volviéndose a recuperar totalmente tras el proceso de lavado del sistema (día 0).

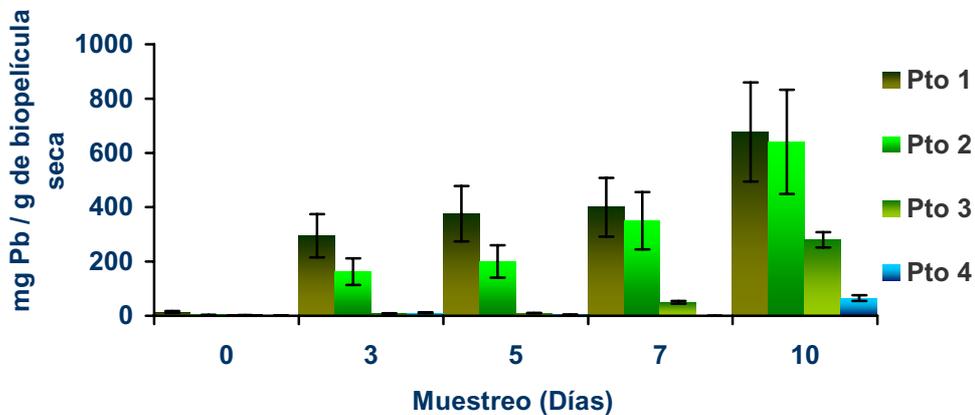


Figura 46: Concentración de plomo en las biopelículas desarrolladas en el biofiltro en función del recorrido del influente y del tiempo de funcionamiento de la planta. Las barras verticales muestran la desviación estándar de cada serie de tres réplicas realizadas a cada medida.

3.3.- Comportamiento del biofiltro en presencia de ión crómico

El tiempo de estudio de este biofiltro fue de 3 meses, equivalente a 6 ciclos completos. Al igual que en los cationes anteriores, la concentración de cromo (III) a la entrada del biofiltro fue de 15 mg/L. Al estudiar del biofiltro con influente contaminado, se observó que éste catión presenta una mayor movilidad con respecto al cobre (II), necesitándose más recorrido de columna por el agua subterránea para la eliminación de este catión. En la **Figura 47** se muestra una gráfica en la que se ha representado la concentración de cromo (III) en función de los puntos de muestreo y en tres tiempos de estudio diferentes. Se puede observar una retención de ión crómico del 95 % en los treinta primeros días de funcionamiento del biofiltro, la cual va disminuyendo hasta valores del 83 % en los treinta días siguientes, bajando a valores de 73 % en los últimos 20 días del estudio. En comparación con el ión cúprico, este ión necesita menos tiempo para conseguir los mismos niveles de saturación del biofiltro, puesto que la concentración a la salida a los 60 días de funcionamiento del biofiltro es similar a la obtenida con el ión cúprico a los 200 días de funcionamiento.

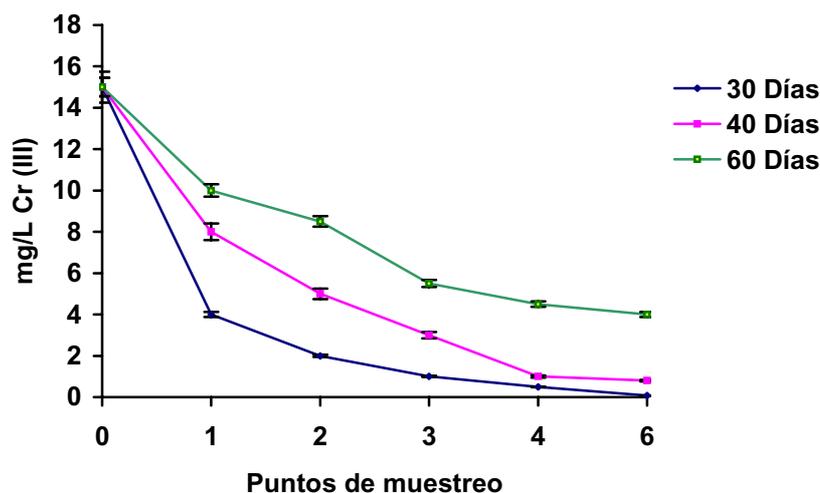


Figura 47: Concentración de cromo (III) a lo largo del recorrido del influente. La concentración de este catión a la entrada fue constante a lo largo de todo el estudio realizado en este biofiltro e igual a 15 mg/L. Las barras verticales muestran la desviación estándar de cada serie de tres réplicas realizadas a cada medida.

De igual forma, se puede observar una diferencia con respecto al ión cúprico en cuanto a la cinética de adsorción de este catión, debido a que se necesita más recorrido de influente, lo que equivale a un mayor tiempo de retención, para ser adsorbido.

3.4.- Comportamiento del biofiltro en presencia de ión *m*-arsenito

El biofiltro con influente contaminado con *m*-arsenito se estudió durante 70 días, equivalente a 7 ciclos completos. A lo largo de este periodo de tiempo se observó que esta especie química no era retenida por la biopelícula del biofiltro, presentando igual concentración en el agua a la entrada y a la salida. Una vez obtenido este resultado negativo, en cuanto a la adsorción de este ión, se incrementó su concentración hasta valores de 70 mg/L de As (III) para observar si este ión presentaba efectos tóxicos sobre los microorganismos presentes en la biopelícula y una vez alcanzados estos valores de concentración se realizaron las mismas determinaciones realizadas en los demás biofiltros (con influentes contaminados con cobre (II), cromo (III) y plomo (II)).

4.- Influencia de los metales pesados sobre las características químicas y microbiológicas de las biopelículas formadas en los biofiltros

Una vez formada la biopelícula, establecidos los ciclos de lavado y fijado variables como los caudales de influente, aire y concentración de la fuente de carbono en la entrada, se procedió a realizar un estudio comparativo entre las biopelículas formadas en los siguientes biofiltros:

- ∅ Biofiltro control con influente constituido por agua subterránea exenta de metales pesados.
- ∅ Biofiltro con influente contaminado con 15 mg/L de cobre (II).
- ∅ Biofiltro con influente contaminado con 15 mg/L de cromo (III).
- ∅ Biofiltro con influente contaminado con 15 mg/L de plomo (II).
- ∅ Biofiltro con influente contaminado con 70 mg/L de arsénico (III) -en forma de *m*-arsenito-.

Los parámetros estudiados durante el seguimiento de los biofiltros fueron los siguientes:

- ∅ Peso de volátiles y grado de hidratación en las biopelículas expresado en mg de volátiles/g de relleno seco y g de biopelícula hidratada/g de volátiles respectivamente.
- ∅ Sustancias poliméricas extracelulares (EPS), analizando los componentes volátiles, contenido en glúcidos, proteínas, ácidos urónicos y restos acetilos, expresados todos ellos en g de componente analizado/100 g de EPS.
- ∅ Niveles de adenosintrifosfato (ATP), expresados en σ g ATP/10⁸ células y σ g ATP/peso de volátiles.
- ∅ Concentración de sacarosa a lo largo de los biofiltros, expresada en mg de sacarosa/L.
- ∅ Microorganismos mesófilos, expresados en log UFC/peso húmedo de biopelícula y log UFC/peso de volátiles.
- ∅ Actividad fosfatasa alcalina total expresada en mg *p*-nitrofenol/peso húmedo de biopelícula/hora y mg *p*-nitrofenol/peso de volátiles/hora.
- ∅ Estudio de microscopía electrónica de barrido y transmisión acopladas a análisis cualitativo por rayos X.

- ∉ Estudio de la biodiversidad de las diferentes biopelículas formadas en los biofiltros mediante Electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE).

4.1.- Peso de volátiles en las biopelículas

El contenido en volátiles en una biopelícula indica la relación entre componentes inorgánicos y orgánicos presentes en la misma, es decir, indica el grado de mineralización de una biopelícula, puesto que con la metodología propuesta en el **apartado 5.1.1** del capítulo de **Material y Métodos** se consigue oxidar completamente la materia orgánica quedando únicamente el contenido inorgánico.

En la **Figura 48** se ha representado el contenido en volátiles de los cinco biofiltros estudiados (expresado en mg de volátiles por g de relleno seco) en función de los puntos de muestreo. Se puede observar cómo en el biofiltro control este contenido permanece constante en los dos primeros puntos de muestreo presentando a partir de este punto una tendencia descendente. La presencia de cobre (II) en el influente aumenta de forma considerable el contenido en componentes orgánicos de la biopelícula, observándose dos máximos en los puntos 1 y 2. El biofiltro con influente contaminado con cromo (III) presenta un perfil, en cuanto al contenido de volátiles, similar al del biofiltro control mientras que la presencia de plomo (II) y arsénico (III) - en la forma de *m*-arsenito - disminuyen de forma drástica el contenido orgánico de las biopelículas.

Desde un punto de vista global se puede observar que los valores medios en contenido de volátiles (expresado en mg de volátiles por g de relleno seco) en cada uno de los biofiltros son los siguientes: 35 para el biofiltro control y 63, 25, 37 y 20 para los biofiltros contaminados con cobre (II), plomo (II), cromo (III) y arsénico (III) respectivamente.

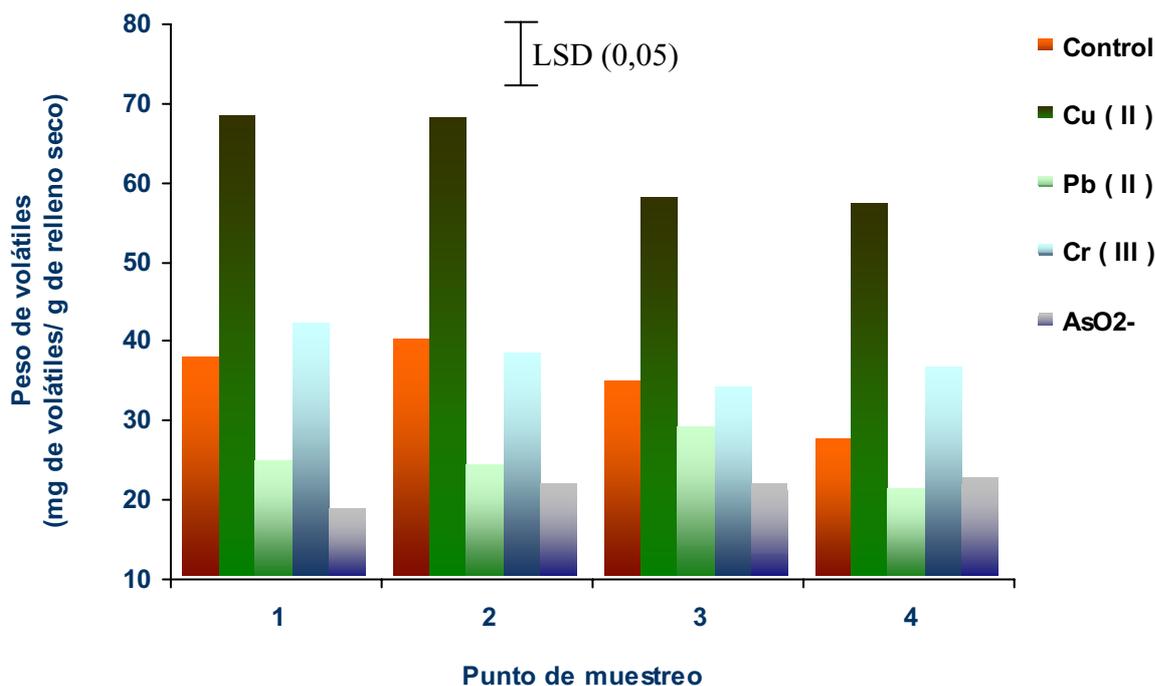


Figura 48: Contenido en volátiles de las biopelículas formadas en los biofiltros estudiados en función de los puntos de muestreo.

Del análisis de varianza realizado (Tabla 20), considerando como fuentes de variación el punto de muestreo y el catión ensayado, se deduce que ambos factores, influyen en el peso de volátiles presentes en las biopelículas, tanto por separado como su interacción (nivel de significación inferior a 0,05).

Tabla 20: Influencia del punto de muestreo y del catión ensayado en el peso de volátiles de las biopelículas

| Análisis de varianza para el peso de volátiles de la biopelícula -Tipo III Suma de Cuadrados- | | | | | |
|---|-----------------------|------|----------------|-------------|------------------------|
| Fuente de variación | Suma de los cuadrados | g.l. | Cuadrado medio | F-calculada | Nivel de significación |
| Efectos considerados | | | | | |
| A: Punto de muestreo | 372,214 | 3 | 124,071 | 17,40 | 0,0000 |
| B: Catión | 12003,3 | 4 | 3000,82 | 420,87 | 0,0000 |
| Interacción AB | 561,923 | 12 | 46,8269 | 6,57 | 0,0000 |
| Residual | 285,204 | 40 | 7,13009 | | |
| Total corregido | 13222,6 | 59 | | | |

El test de rango múltiple para el peso de volátiles considerando el efecto del catión (Tabla 21) muestra que los cinco biofiltros ensayados pertenecen a grupos homogéneos diferentes, por lo que el catión influye de forma estadísticamente significativa en la presencia de volátiles en las biopelículas. Destaca el incremento del peso de volátiles en la biopelícula del biofiltro contaminado con cobre (II), con respecto al control. La presencia de este ión

incrementa en aproximadamente el doble la cantidad de sustancias volátiles con respecto al control. La presencia de plomo (II) y arsénico (III) disminuyen de forma estadísticamente significativa el contenido en volátiles en las biopelículas con respecto al control y la presencia de cromo (III) la incrementa de forma poco acusada aunque estadísticamente significativa.

Tabla 21: Efecto del catión en la cantidad de sustancias volátiles de las biopelículas

| Test de Rango Múltiple para el peso de volátiles de la biopelícula considerando el efecto del catión (LSD 0,05) | | | | |
|---|-------------------|-------------|--------------------------|-------------------|
| Catión | Número de medidas | Media (LS) | Desviación estándar (LS) | Grupos homogéneos |
| Control | 12 | 35,25 | 0,77083 | A |
| Cobre | 12 | 61,6417 | 0,77083 | B |
| Plomo | 12 | 24,595 | 0,77083 | C |
| Cromo | 12 | 37,7075 | 0,77083 | D |
| Arsénico | 12 | 21,5317 | 0,77083 | E |
| Comparativa | | Diferencias | ∂ Límites | |
| Arsénico-Cobre | | * | -40,11 | 2,2032 |
| Arsénico-Control | | * | -13,7183 | 2,2032 |
| Arsénico-Cromo | | * | -16,1758 | 2,2032 |
| Arsénico-Plomo | | * | -3,0633 | 2,2032 |
| Cobre-Control | | * | 26,3917 | 2,2032 |
| Cobre-Cromo | | * | 23,9342 | 2,2032 |
| Cobre-Plomo | | * | 37,0467 | 2,2032 |
| Control-Cromo | | * | -2,4575 | 2,2032 |
| Control-Plomo | | * | 10,655 | 2,2032 |
| Cromo-Plomo | | * | 13,1125 | 2,2032 |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

Tabla 22: Efecto del punto de muestreo en la cantidad de sustancias volátiles de las biopelículas

| Test de Rango Múltiple para el peso de volátiles de la biopelícula considerando el punto de muestreo (LSD 0,05) | | | | |
|---|-------------------|-------------|--------------------------|-------------------|
| Nivel | Número de medidas | Media (LS) | Desviación estándar (LS) | Grupos homogéneos |
| 1 | 15 | 38,4767 | 0,6894 | A |
| 2 | 15 | 38,3813 | 0,6894 | A |
| 3 | 15 | 35,266 | 0,6894 | B |
| 4 | 15 | 32,4567 | 0,6894 | C |
| Comparativa | | Diferencias | ∂ Límites | |
| 1 - 2 | | | 0,0953 | 1,9706 |
| 1 - 3 | | * | 3,211 | 1,9706 |
| 1 - 4 | | * | 6,02 | 1,9706 |
| 2 - 3 | | * | 3,115 | 1,9706 |
| 2 - 4 | | * | 5,925 | 1,9706 |
| 3 - 4 | | * | 2,809 | 1,9706 |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

Si se realiza el test de rango múltiple considerando únicamente el punto de muestro (Tabla 22), se observa cómo los puntos de muestreo 1 y 2, próximos entre sí, pertenecen al mismo grupo homogéneo, y los puntos 3 y 4 son diferentes entre sí y diferentes a los dos

primeros. A lo largo del recorrido del influente se observa que en los dos primeros puntos de muestreo la cantidad de sustancias volátiles es constante, mientras que a partir del punto 2 se produce una tendencia descendente poco acusada aunque estadísticamente significativa.

Un parámetro que podría verse afectado en las biopelículas por la presencia de metal pesado es su grado de hidratación. Así, en la **Figura 49** se muestra el contenido en agua de las biopelículas formadas expresado en g de biopelícula húmeda por g de biopelícula seca.

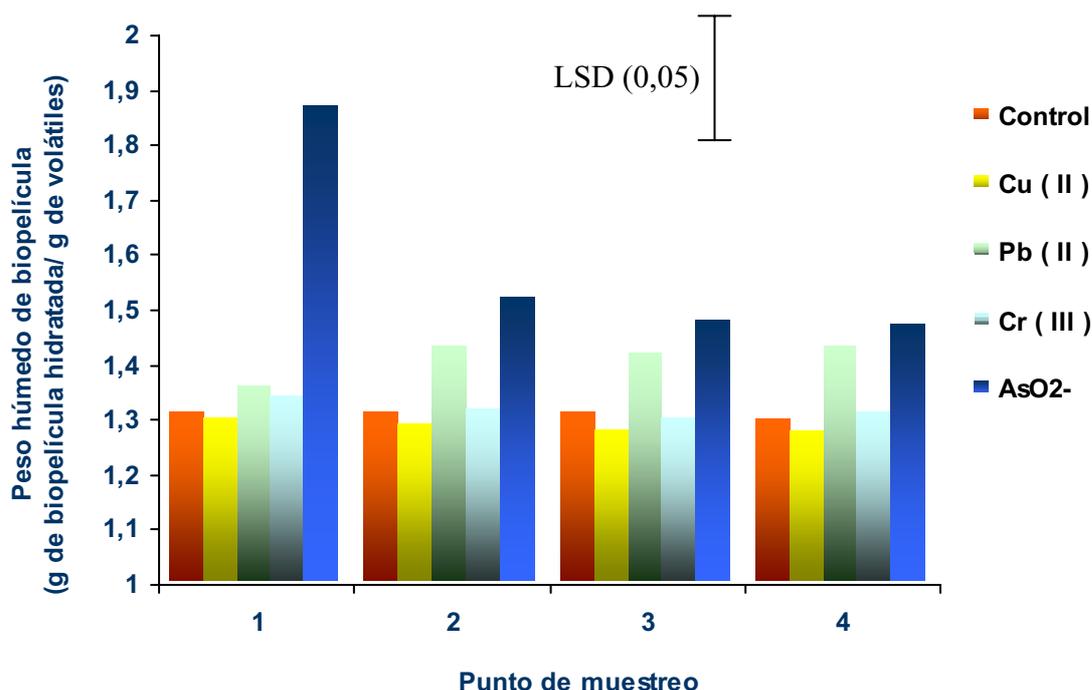


Figura 49: Grado de hidratación de las biopelículas formadas en biofiltros con influentes control y adicionados de cationes en función de los distintos puntos de muestreo.

De la **Figura 49** se deduce que la presencia de cobre (II) y cromo (III) no afecta al grado de hidratación de las biopelículas, en relación con el biofiltro control, manteniéndose constante en todo el biofiltro, mientras que la presencia de plomo (II) produce un ligero incremento en el contenido en agua de la biopelícula. La presencia de *m*-arsenito induce una fuerte hidratación en la biopelícula en el punto 1 de muestreo, presentando valores de hidratación muy superiores a todos los anteriores biofiltros. Las tendencias a lo largo del recorrido del influente son similares para los biofiltros control, cobre (II) y cromo (III), mientras que el biofiltro plomo (II) presenta una tendencia ascendente a lo largo del recorrido del influente, aunque no significativa estadísticamente, por el contrario, en el biofiltro arsénico (III) se observa una tendencia descendente muy acusada en los dos primeros puntos de muestreo.

El análisis de varianza (**Tabla 23**) realizado considerando como factores el punto de muestreo y el catión, indica que ambos influyen ($LSD < 0,05$), tanto por separado como su interacción, observándose diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes biofiltros.

Tabla 23: Influencia del punto de muestreo y del catión en el grado de hidratación de la biopelícula
Análisis de varianza para grado de hidratación de la biopelícula -Tipo III Suma de Cuadrados-

| Fuente de variación | Suma de los cuadrados | g.l. | Cuadrado medio | F-calculada | Nivel de significación |
|-----------------------------|-----------------------|------|----------------|-------------|------------------------|
| Efectos considerados | | | | | |
| A: Punto de muestreo | 0,0935 | 3 | 0,03116 | 3,54 | 0,0229 |
| B: Cation | 0,8724 | 4 | 0,218 | 24,79 | 0,0000 |
| Interacción AB | 0,4066 | 12 | 0,03388 | 3,85 | 0,0006 |
| Residual | 0,352 | 40 | 0,008797 | | |
| Total corregido | 1,724 | 59 | | | |

El test de rango múltiple realizado para el grado de hidratación considerando el efecto del catión (**Tabla 24**) muestra cómo los biofiltros control, cobre y cromo pertenecen al mismo grupo homogéneo, presentando el mismo grado de hidratación en las biopelículas, mientras que los biofiltros con plomo (II) y con arsénico (III) presentan un grado de hidratación superior con respecto al control siendo el último el que presenta una biopelícula con un mayor contenido en agua.

Tabla 24: Efecto del catión en el grado de hidratación de la biopelícula

| Test de Rango Múltiple para grado de hidratación de la biopelícula considerando el efecto del catión (LSD 0,05) | | | | |
|---|-------------------|--------------------|--------------------------|-------------------|
| Catión | Número de medidas | Media (LS) | Desviación estándar (LS) | Grupos homogéneos |
| Control | 12 | 1,295 | 0,0271 | A |
| Cobre | 12 | 1,2775 | 0,0271 | A |
| Plomo | 12 | 1,4075 | 0,0271 | B |
| Cromo | 12 | 1,3142 | 0,0271 | A |
| Arsénico | 12 | 1,6033 | 0,0271 | C |
| Comparativa | | Diferencias | ∂ Límites | |
| | Arsénico-Cobre | * | 0,3258 | 0,0774 |
| | Arsénico-Control | * | 0,3083 | 0,0774 |
| | Arsénico-Cromo | * | 0,2892 | 0,0774 |
| | Arsénico-Plomo | * | 0,1958 | 0,0774 |
| | Cobre-Control | | -0,0175 | 0,0774 |
| | Cobre-Cromo | | -0,03667 | 0,0774 |
| | Cobre-Plomo | * | -0,13 | 0,0774 |
| | Control-Cromo | | -0,01917 | 0,0774 |
| | Control-Plomo | * | -0,1125 | 0,0774 |
| | Cromo-Plomo | * | -0,09333 | 0,0774 |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

En la **Tabla 25** se muestra el test de rango múltiple para el grado de hidratación considerando el punto de muestreo pudiéndose observar cómo, independientemente del catión, el punto 1 de muestreo (donde la concentración de metal pesado es la mayor), pertenece a un grupo, mientras que los puntos 2, 3 y 4, pertenecen a otro grupo diferente, presentando grado de hidratación similar.

Tabla 25: Efecto del punto de muestreo en el grado de hidratación de la biopelícula

| Test de Rango Múltiple para grado de hidratación de la biopelícula considerando el punto de muestreo (LSD 0,05) | | | | |
|---|-------------------|-------------|--------------------------|-------------------|
| Nivel | Número de medidas | Media (LS) | Desviación estándar (LS) | Grupos homogéneos |
| 1 | 15 | 1,447 | 0,02422 | A |
| 2 | 15 | 1,3647 | 0,02422 | B |
| 3 | 15 | 1,3513 | 0,02422 | B |
| 4 | 15 | 1,3547 | 0,02422 | B |
| Comparativa | | Diferencias | ∂ Límites | |
| 1 - 2 | | * | 0,083 | 0,06922 |
| 1 - 3 | | * | 0,096 | 0,06922 |
| 1 - 4 | | * | 0,093 | 0,06922 |
| 2 - 3 | | | 0,013 | 0,06922 |
| 2 - 4 | | | 0,01 | 0,06922 |
| 3 - 4 | | | -0,0033 | 0,06922 |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

4.2.- Sustancias poliméricas extracelulares en las biopelículas

Se realizó un estudio del exopolímero extraído de las aguas de lavado de los distintos biofiltros con el fin de verificar el posible efecto que los metales pesados pueden ejercer sobre su composición relativa. Se cuantificó la fracción volátil del exopolímero (empleando una metodología similar a la descrita en el apartado 5.1.1 del capítulo de **Material y Métodos** tomando el EPS en lugar del soporte) y la cantidad de glúcidos totales, proteínas totales, ácidos urónicos y restos acetilos presentes en dicha fracción, según metodología descrita en el apartado 5.1.2 y sub-apartados correspondientes.

En las **Figuras 50 a 54** se muestra la caracterización química del exopolímero “cohesivo” presente en las biopelículas de los biofiltros estudiados. El EPS “no cohesivo” presentó una composición orgánica minoritaria, contenido en volátiles inferior al 3 %, y un contenido en glúcidos, proteínas, ácidos urónicos y restos acetilos que nunca llegó a superar los 0,1 g de componente analizado por 100 g de EPS, por lo que los datos resultantes de su determinación no se consideraron relevantes en el estudio comparativo entre los distintos biofiltros.

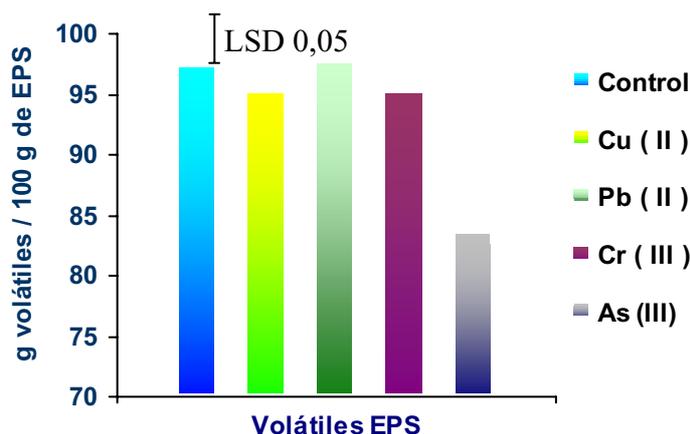


Figura 50: Gramos de componentes volátiles por 100 gramos de EPS “cohesivo” en biofiltros con influentes controles y adicionados de cationes contaminantes.

Tabla 26: Análisis de la varianza para el contenido de volátiles del EPS

| Análisis de varianza para el contenido en volátiles en el EPS en función del catión -Tipo III Suma de Cuadrados- | | | | | |
|---|-----------------------|------|----------------|-------------|------------------------|
| Fuente de variación | Suma de los cuadrados | g.l. | Cuadrado medio | F-calculada | Nivel de significación |
| Efectos considerados | | | | | |
| Entre grupos | 457,545 | 4 | 114,386 | 25,46 | 0,0000 |
| Por biofiltro | 44,9313 | 10 | 4,49313 | | |
| Total corregido | 502,476 | 14 | | | |

Tabla 27: Test de rango múltiple para el contenido en volátiles de los EPS en los distintos biofiltros

| Test de Rango Múltiple para el contenido de volátiles en los EPS de los biofiltros considerando el efecto del catión (LSD 0,05) | | | |
|---|-------------------|-------------|-------------------|
| Catión | Número de medidas | Media (LS) | Grupos homogéneos |
| Control | 3 | 97,0 | A |
| Cobre | 3 | 95,0 | A |
| Plomo | 3 | 97,79 | A |
| Cromo | 3 | 95,0 | A |
| Arsénico | 3 | 82,667 | B |
| Comparativa | | Diferencias | ∂ Límites |
| Arsénico-Cobre | | * -12,333 | 3,8563 |
| Arsénico-Control | | * -14,333 | 3,8563 |
| Arsénico-Cromo | | * -12,333 | 3,8563 |
| Arsénico-Plomo | | * -15,123 | 3,8563 |
| Cobre-Control | | 2,0 | 3,8563 |
| Cobre-Cromo | | 0,0 | 3,8563 |
| Cobre-Plomo | | -2,79 | 3,8563 |
| Control-Cromo | | 2,0 | 3,8563 |
| Control-Plomo | | -0,79 | 3,8563 |
| Cromo-Plomo | | -2,79 | 3,8563 |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

En la **Figura 50**, se puede observar el contenido en componentes volátiles de los exopolímeros “cohesivos”, presentando el EPS de los biofiltros control, cobre, plomo y cromo contenido en componentes orgánicos superior al 92 %. La presencia de arsénico (III) disminuye el contenido en volátiles hasta un valor de 82 g de volátiles/ 100 g de EPS.

El análisis de la varianza mostrado en la **Tabla 26**, muestra que la presencia de metal pesado influye de forma estadísticamente significativa en el contenido de volátiles en el EPS.

El test de rango múltiple (**Tabla 27**) indica que los biofiltros control, cobre, plomo y cromo pertenecen al mismo grupo homogéneo, no presentando diferencias significativas en cuanto al contenido de volátiles, mientras que el biofiltro con arsénico pertenece a un grupo diferente a los otros biofiltros estudiados (**Figura 50**).

Analizando los resultados de las **Figuras 51, 52, 53 y 54** se puede observar que los componentes estudiados en el exopolímero (glúcidos, proteínas, ácidos urónicos y restos acetilo) son similares en todos los biofiltros, siendo mayoritarios los glúcidos y minoritarios los restos acetilo en todos los exopolímeros estudiados.

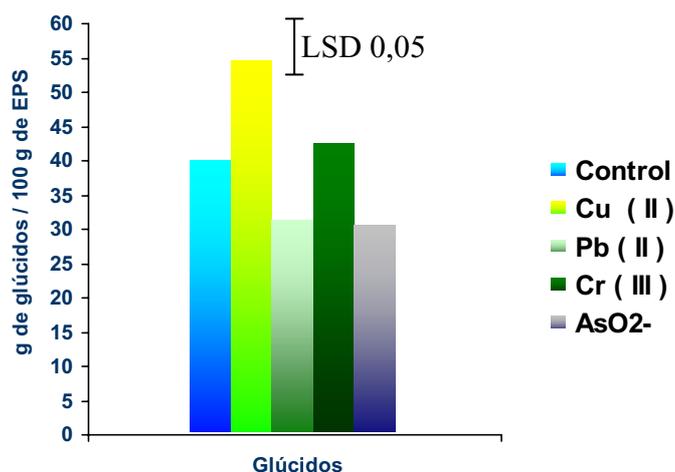


Figura 51: Contenido en glúcidos de los exopolímeros de las biopelículas formadas en los distintos biofiltros.

Tabla 28: Análisis de la varianza para la composición de glúcidos en el EPS en función del catión

| Análisis de varianza para los glúcidos en el EPS en función del catión -Tipo III Suma de Cuadrados- | | | | | |
|---|-----------------------|------|----------------|-------------|------------------------|
| Fuente de variación | Suma de los cuadrados | g.l. | Cuadrado medio | F-calculada | Nivel de significación |
| Efectos considerados | | | | | |
| Entre grupos | 1188,14 | 4 | 297,036 | 13,55 | 0,0005 |
| Por biofiltro | 219,243 | 10 | 21,9243 | | |
| Total corregido | 1407,39 | 14 | | | |

Tabla 29: Test de rango múltiple para los glúcidos en el EPS

| Test de Rango Múltiple para los glúcidos en el EPS considerando el efecto del catión (LSD 0,05) | | | | |
|---|-------------------|-------------|-------------------|---------|
| Catión | Número de medidas | Media (LS) | Grupos homogéneos | |
| Control | 3 | 40,2267 | A | |
| Cobre | 3 | 54,4333 | C | |
| Plomo | 3 | 30,7867 | B | |
| Cromo | 3 | 42,52 | A | |
| Arsénico | 3 | 30,1433 | B | |
| Comparativa | | Diferencias | ∂ Límites | |
| Arsénico-Cobre | | * | -24,29 | 8,51844 |
| Arsénico-Control | | * | -10,0833 | 8,51844 |
| Arsénico-Cromo | | * | -12,3767 | 8,51844 |
| Arsénico-Plomo | | | -0,64333 | 8,51844 |
| Cobre-Control | | * | 14,2067 | 8,51844 |
| Cobre-Cromo | | * | 11,9133 | 8,51844 |
| Cobre-Plomo | | * | 23,6467 | 8,51844 |
| Control-Cromo | | | -2,2933 | 8,51844 |
| Control-Plomo | | * | 9,44 | 8,51844 |
| Cromo-Plomo | | * | 11,7333 | 8,51844 |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

Como se puede observar en la **Figura 51** y en las **Tablas 28** y **29**, el exopolímero formado en la biopelícula del biofiltro contaminado con ión cúprico incrementa su cantidad en glúcidos totales, el formado en el biofiltro contaminado con ión plumboso y el formado con ión *m*-arsenito la disminuye, de forma estadísticamente significativa, en relación al control. La presencia de ión crómico no parece afectar la composición en cuanto a glúcidos del EPS de la biopelícula en relación al control. El análisis de varianza (**Tabla 28**) indica que la presencia del catión produce cambios estadísticamente significativos en el contenido de glúcidos de las biopelículas.

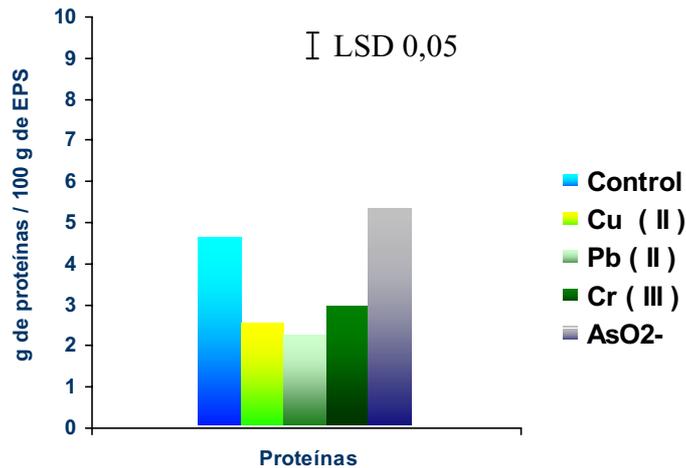


Figura 52: Contenido proteico de los exopolímeros de las biopelículas formadas en los distintos biofiltros.

Tabla 30: Análisis de la varianza para la composición de proteínas del EPS en función del catión

| Análisis de varianza para las proteínas en el EPS en función del catión -Tipo III Suma de Cuadrados- | | | | | |
|--|-----------------------|-----------|----------------|-------------|------------------------|
| Fuente de variación | Suma de los cuadrados | g.l. | Cuadrado medio | F-calculada | Nivel de significación |
| Efectos considerados | | | | | |
| Entre grupos | 22,6183 | 4 | 5,6546 | 45,55 | 0,0000 |
| Por biofiltro | 1,2413 | 10 | 0,1241 | | |
| Total corregido | 23,8596 | 14 | | | |

Tabla 31: Test de Rango Múltiple para las proteínas presentes en el EPS

| Test de Rango Múltiple para las proteínas presentes en el EPS considerando el efecto del catión (LSD 0,05) | | | |
|--|-------------------|--------------------|-------------------|
| Catión | Número de medidas | Media (LS) | Grupos homogéneos |
| Control | 3 | 4,65667 | A |
| Cobre | 3 | 2,51667 | B |
| Plomo | 3 | 2,37667 | B |
| Cromo | 3 | 2,71667 | B |
| Arsénico | 3 | 5,33333 | C |
| Comparativa | | Diferencias | ∂ Límites |
| Arsénico-Cobre | | * 2,81667 | 0,641 |
| Arsénico-Control | | * 0,67667 | 0,641 |
| Arsénico-Cromo | | * 2,61667 | 0,641 |
| Arsénico-Plomo | | * 2,95667 | 0,641 |
| Cobre-Control | | * -2,14 | 0,641 |
| Cobre-Cromo | | 0,2 | 0,641 |
| Cobre-Plomo | | 0,14 | 0,641 |
| Control-Cromo | | * 1,94 | 0,641 |
| Control-Plomo | | * 2,28 | 0,641 |
| Cromo-Plomo | | 0,34 | 0,641 |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

La composición de los exopolímeros en cuanto a los componentes proteínicos (Figura 52) cambia en relación al control en todos los biofiltros estudiados. El análisis de la varianza para la composición de proteínas en el EPS (Tabla 30) indica que la presencia de metal pesado influye significativamente en la composición proteica del exopolímero generado en los biofiltros. El test de rango múltiple indica diferencias significativas de todos los biofiltros con respecto al control (Tabla 31). Así, el biofiltro control forma un grupo homogéneo aparte del resto, mientras que los biofiltros cobre, plomo y cromo constituyen otro, debido a que disminuyen de forma significativa el contenido proteico del EPS con respecto al control, y por último, el biofiltro arsénico tiene una composición de proteínas significativamente mayor que la del resto de los biofiltros, por lo que pertenece a un grupo homogéneo distinto al resto de los biofiltros estudiados.

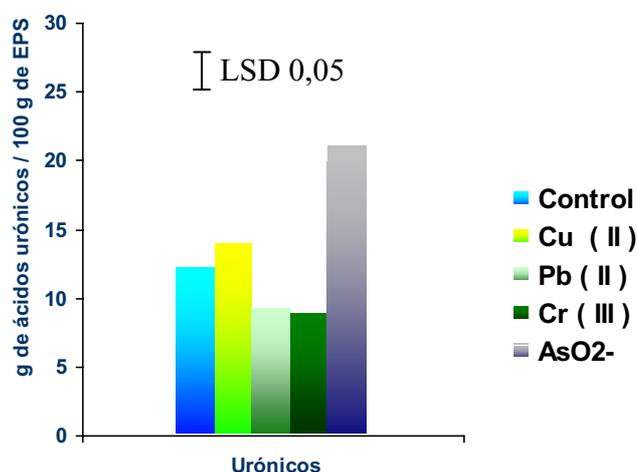


Figura 53: Contenido en ácidos urónicos de los exopolímeros de las biopelículas formadas en los distintos biofiltros.

Tabla 32: Análisis de varianza para los ácidos urónicos en el EPS en función del catión

| Análisis de varianza para los ácidos urónicos en el EPS en función del catión -Tipo III Suma de Cuadrados- | | | | | |
|--|-----------------------|------|----------------|-------------|------------------------|
| Fuente de variación | Suma de los cuadrados | g.l. | Cuadrado medio | F-calculada | Nivel de significación |
| Efectos considerados | | | | | |
| Entre grupos | 255,043 | 4 | 63,7607 | 41,47 | 0,0000 |
| Por biofiltro | 15,3754 | 10 | 1,5375 | | |
| Total corregido | 270,418 | 14 | | | |

Tabla 33: Test de Rango Múltiple para los ácidos urónicos presentes en el EPS

| Test de Rango Múltiple para los ácidos urónicos presentes en el EPS considerando el efecto del catión (LSD 0,05) | | | |
|--|-------------------|-------------|-------------------|
| Catión | Número de medidas | Media (LS) | Grupos homogéneos |
| Control | 3 | 12,48 | A |
| Cobre | 3 | 13,6433 | A |
| Plomo | 3 | 8,83667 | B |
| Cromo | 3 | 8,71667 | B |
| Arsénico | 3 | 20,0 | C |
| Comparativa | | Diferencias | \bar{d} Límites |
| Arsénico-Cobre | | * | 6,35667 |
| Arsénico-Control | | * | 7,52 |
| Arsénico-Cromo | | * | 11,2833 |
| Arsénico-Plomo | | * | 11,1633 |
| Cobre-Control | | | 1,16333 |
| Cobre-Cromo | | * | 4,92667 |
| Cobre-Plomo | | * | 4,80667 |
| Control-Cromo | | * | 3,76333 |
| Control-Plomo | | * | 3,64333 |
| Cromo-Plomo | | | -0,12 |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

La composición del EPS, en cuanto a ácidos urónicos, (Figura 53) se ve afectada significativamente por la presencia de los distintos iones estudiados, según se muestra en el análisis de varianza (Tabla 32). El test de rango múltiple (Tabla 33) muestra que los biofiltros control y cobre pertenecen a los mismos grupos homogéneos, presentando un contenido en ácidos urónicos similar, cuyas diferencias no son estadísticamente significativas, mientras que los controles plomo y cromo pertenecen a otro grupo distinto, con una disminución en el contenido de ácidos urónicos presentes en el EPS. Cabe destacar el incremento estadísticamente significativo que produce la presencia de ión *m*-arsenito en el contenido de ácidos urónicos del EPS.

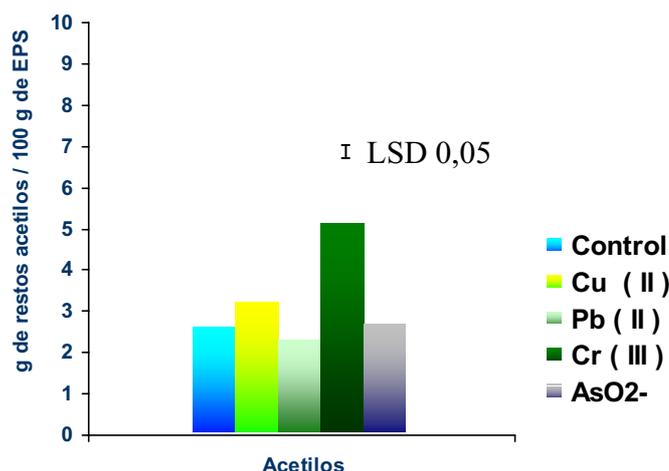


Figura 54: Contenido en restos acetilos de los exopolímeros de las biopelículas formadas en los distintos biofiltros.

Tabla 34: Análisis de varianza para los restos acetilos en el EPS en función del catión

| Análisis de varianza para los restos acetilos en el EPS en función del catión -Tipo III Suma de Cuadrados- | | | | | |
|--|-----------------------|------|----------------|-------------|------------------------|
| Fuente de variación | Suma de los cuadrados | g.l. | Cuadrado medio | F-calculada | Nivel de significación |
| Efectos considerados | | | | | |
| Entre grupos | 14,9655 | 4 | 3,74138 | 13,55 | 0,0000 |
| Por biofiltro | 0,2179 | 10 | 0,02179 | | |
| Total corregido | 15,1834 | 14 | | | |

Tabla 35: Test de Rango Múltiple para los restos acetilos presentes en el EPS

| Test de Rango Múltiple para los restos acetilos presentes en el EPS considerando el efecto del catión (LSD 0,05) | | | |
|--|-------------------|-------------|-------------------|
| Catión | Número de medidas | Media (LS) | Grupos homogéneos |
| Control | 3 | 2,54667 | AB |
| Cobre | 3 | 3,18667 | C |
| Plomo | 3 | 2,31 | A |
| Cromo | 3 | 5,06333 | D |
| Arsénico | 3 | 2,64333 | B |
| Comparativa | | Diferencias | ∂ Límites |
| Arsénico-Cobre | * | -0,5433 | 0,26853 |
| Arsénico-Control | | 0,09667 | 0,26853 |
| Arsénico-Cromo | * | -2,42 | 0,26853 |
| Arsénico-Plomo | * | 0,3333 | 0,26853 |
| Cobre-Control | * | 0,64 | 0,26853 |
| Cobre-Cromo | * | -1,8767 | 0,26853 |
| Cobre-Plomo | * | 0,87667 | 0,26853 |
| Control-Cromo | * | -2,5167 | 0,26853 |
| Control-Plomo | | 0,23667 | 0,26853 |
| Cromo-Plomo | * | 2,7533 | 0,26853 |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

Con respecto al contenido en restos acetilos en el EPS (**Figura 54**), cabe destacar un incremento significativo en el biofiltro contaminado con cromo (**III**). El análisis de varianza (**Tabla 34**) muestra, al igual que ocurría con los demás componentes analizados, que el catión influye de forma significativa en la composición del EPS. El test de rango múltiple (**Tabla 35**), considerando el efecto del catión, indica que los biofiltros control y arsénico presentan una composición de restos acetilos similar, no siendo las diferencias entre los dos biofiltros estadísticamente significativas, al igual que con los biofiltros control y plomo, mientras que entre los biofiltros plomo y arsénico sí existen diferencias significativas en la composición de restos acetilos. Los biofiltros cobre y cromo pertenecen cada uno a un grupo homogéneo diferente, lo que indica diferente composición de restos acetilos entre ellos y entre los otros tres.

4.3.- Niveles de Adenosintrifosfato (ATP) en los microorganismos presentes en las biopelículas

El contenido en ATP, tanto de las células procariontas como eucariotas, es un claro indicador de su actividad celular. En este sentido, el contenido en ATP de la biopelícula debe de considerarse como una determinación de gran importancia ya que cualquier efecto tóxico ambiental puede reflejarse inmediatamente en los niveles intracelulares de esta molécula.

En la **Tabla 36** se puede observar el efecto que los distintos metales pesados ejercen sobre el contenido en ATP presente en las células que forman parte de las biopelículas. Resulta evidente que los iones plomo (**II**), cromo (**III**) y *m*-arsenito determinan una disminución del contenido intracelular de ATP (expresado como μg de ATP por 10^8 células cultivables). Sin embargo, los resultados obtenidos para el caso del ión cúprico son ciertamente contrarios, siendo evidente un aumento de la actividad celular.

Tabla 36: Contenido en ATP expresado en μg de ATP por 10^8 células (bacterias cultivables), en las biopelículas formadas en los biofiltros en función de los distintos puntos de muestreo. LSD (0,05)

| Biofiltro | μg de ATP por 10^8 células | | | |
|-------------------------|---|---------|--------|-------|
| | Punto de muestreo | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Control | 0,5 | 0,18 | 0,14 | 0,06 |
| Cobre (II) | 0,8 | 1,7 | 1,6 | 1,0 |
| Plomo (II) | 0,048 | 0,018 | 0,028 | 0,024 |
| Cromo(III) | 0,0009 | 0,00077 | 0,0007 | 0,001 |
| Arsénico (III) | 0,002 | 0,003 | 0,003 | 0,003 |
| LSD (0,05) = 0,2 | | | | |

El análisis de varianza (Tabla 37) realizado para el contenido en ATP expresado por 10^8 células, indica que tanto el punto de muestreo como el catión estudiado, tanto de forma individual como su interacción, influyen, de forma significativa, en los niveles intracelulares de ATP.

Tabla 37: Influencia del punto de muestreo y del catión en la cantidad de ATP intracelular (expresada por 10^8 células)

| Análisis de varianza para ATP/ 10^8 células -Tipo III Suma de Cuadrados- | | | | | |
|--|-----------------------|------|----------------|-------------|------------------------|
| Fuente de variación | Suma de los cuadrados | g.l. | Cuadrado medio | F-calculada | Nivel de significación |
| Efectos considerados | | | | | |
| A: Punto de muestreo | 0,215 | 3 | 0,0716 | 9,11 | 0,0001 |
| B: Cation | 14,692 | 4 | 3,673 | 467,01 | 0,0000 |
| Interacción AB | 1,813 | 12 | 0,151 | 19,21 | 0,0000 |
| Residual | 0,3146 | 40 | 0,00786 | | |
| Total corregido | 17,034 | 59 | | | |

Tabla 38: Efecto del catión en la cantidad de ATP intracelular (expresada por 10^8 células)

| Test de Rango Múltiple para ATP/ 10^8 células considerando el efecto del catión (LSD 0,05) | | | | |
|--|-------------------|--------------------|--------------------------|-------------------|
| Catión | Número de medidas | Media (LS) | Desviación estándar (LS) | Grupos homogéneos |
| Control | 12 | 0,1729 | 0,0256 | A |
| Cobre | 12 | 1,278 | 0,0256 | B |
| Plomo | 12 | 0,0294 | 0,0256 | C |
| Cromo | 12 | 0,0008 | 0,0256 | C |
| Arsénico | 12 | 0,00275 | 0,0256 | C |
| Comparativa | | Diferencias | | ∂ Límites |
| Arsénico-Cobre | | * -1,2756 | | 0,07317 |
| Arsénico-Control | | * -0,1702 | | 0,07317 |
| Arsénico-Cromo | | 0,0019 | | 0,07317 |
| Arsénico-Plomo | | -0,0267 | | 0,07317 |
| Cobre-Control | | * 1,105 | | 0,07317 |
| Cobre-Cromo | | * 1,278 | | 0,07317 |
| Cobre-Plomo | | * 1,249 | | 0,07317 |
| Control-Cromo | | * 0,172 | | 0,07317 |
| Control-Plomo | | * 0,144 | | 0,07317 |
| Cromo-Plomo | | -0,0286 | | 0,07317 |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

El test de rango múltiple (Tabla 38) realizado con la presencia del catión como único factor de variación, muestra que el biofiltro control pertenece a un grupo homogéneo significativamente diferente a los otros biofiltros considerados, al igual que ocurre con el biofiltro cobre, en el que se observa un incremento significativo diez veces superior al contenido en ATP del biofiltro control. Los biofiltros plomo, cromo y arsénico, pertenecen a un tercer grupo homogéneo distinto de los dos anteriores. La presencia de estos iones

induce una disminución significativa, con respecto al control, del contenido en ATP expresado por 10^8 células cultivables.

La **Tabla 39** muestra el test de rango múltiple para los niveles de ATP, considerando el punto de muestreo como único factor de variación, observándose que los puntos de muestreo 1 y 4 pertenecen al mismo grupo homogéneo, mientras que los puntos de muestreo 2 y 3 pertenecen a otro diferente del anterior.

Tabla 39: Efecto del punto de muestreo en la cantidad de ATP intracelular (expresada por 10^8 células)

| Test de Rango Múltiple para ATP/ 10^8 células considerando el punto de muestreo (LSD 0,05) | | | | |
|--|-------------------|-------------|--------------------------|-------------------|
| Nivel | Número de medidas | Media (LS) | Desviación estándar (LS) | Grupos homogéneos |
| 1 | 15 | 0,2636 | 0,0229 | A |
| 2 | 15 | 0,3655 | 0,0229 | B |
| 3 | 15 | 0,3419 | 0,0229 | B |
| 4 | 15 | 0,2163 | 0,0229 | A |
| Comparativa | | Diferencias | | ∂ Límites |
| 1 - 2 | | * | -0,102 | 0,0654 |
| 1 - 3 | | * | -0,078 | 0,0654 |
| 1 - 4 | | | 0,0473 | 0,0654 |
| 2 - 3 | | | 0,0235 | 0,0654 |
| 2 - 4 | | * | 0,149 | 0,0654 |
| 3 - 4 | | * | -0,126 | 0,0654 |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

Los microorganismos que se desarrollan en las biopelículas de los biofiltros estudiados pueden ser tanto eucariotas como procariotas, y dentro de los procariotas puede haber bacterias no cultivables, por lo que el contenido de ATP se ha expresado, en función del peso de volátiles de la biopelícula (representado en la **Figura 55**), parámetro éste independiente del número de bacterias cultivables. De esta forma, la interpretación de los resultados se ve ciertamente modificada, observándose niveles bajos de ATP en los biofiltros con los iones cobre (II) y cromo (III) con respecto al biofiltro control, mientras que los biofiltros con el ión plomo (II) y *m*-arsenito muestran niveles intracelulares de ATP muy superiores al control. A lo largo del recorrido del influente se observa que los niveles de ATP disminuyen, siendo esta disminución estadísticamente significativa solamente entre los puntos de muestreo 1 y 2 del biofiltro plomo (II) y los puntos 1 y 3 del biofiltro arsénico. Los biofiltros control y cobre (II) presentan una disminución muy poco acusada y no significativa estadísticamente, mientras que el biofiltro cromo (III) presenta niveles de ATP estables a lo largo del recorrido del influente. El análisis de varianza para el contenido de ATP referido al peso de volátiles (**Tabla 40**) indica que tanto el punto de muestreo como la

presencia de catión, tanto desde un punto de vista individual como su interacción, influyen en los niveles de ATP presente en los microorganismos de las biopelículas. El test de rango múltiple (Tabla 41), realizado teniendo en cuenta la presencia de metal pesado como único factor de variación, muestra que los biofiltros control y cobre (II) presentan niveles de ATP similares, cuyas diferencias no son estadísticamente significativas, mientras que los demás biofiltros estudiados sí difieren significativamente, con respecto al control. Destaca el incremento estadísticamente significativo producido por la presencia de plomo (II) y de arsénico (III) en el influente. La Tabla 42, muestra el test de rango múltiple realizado considerando únicamente el punto de muestreo como única fuente de variación, observándose que el punto 1 de muestreo pertenece a un grupo homogéneo diferente a los demás, presentando unos niveles de ATP significativamente superiores al resto de los puntos de muestreo, mientras que los puntos de muestreo 2, 3 y 4, no presentan diferencias significativas entre ellos, perteneciendo por tanto al mismo grupo homogéneo.

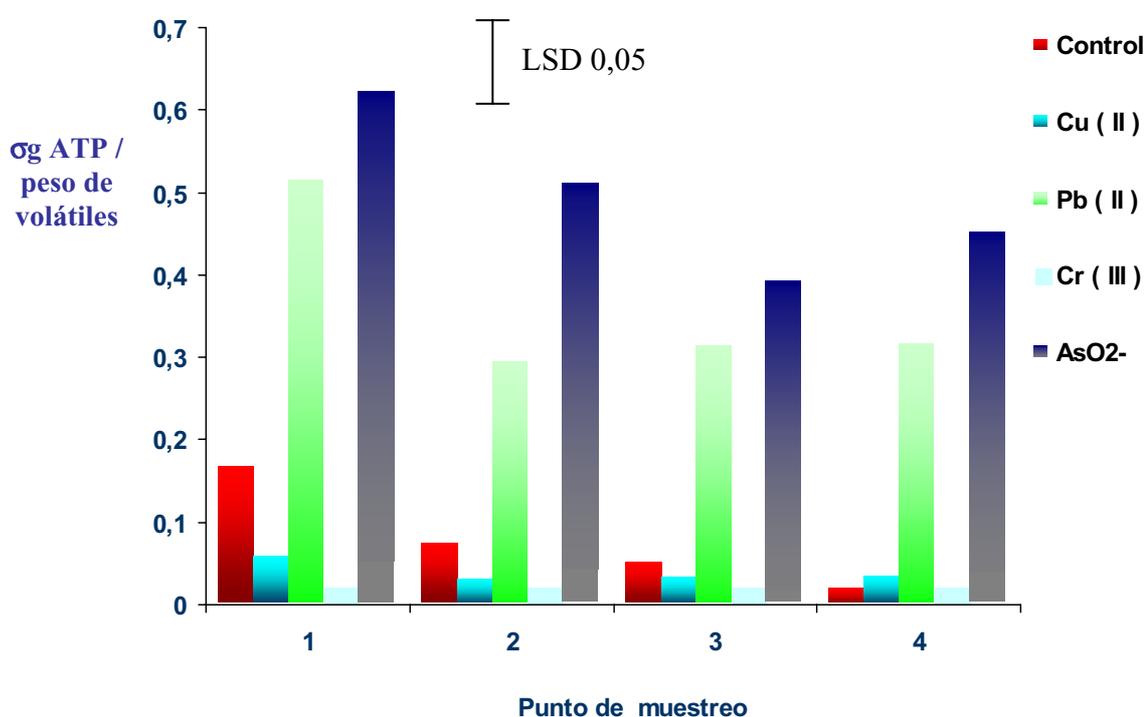


Figura 55: Contenido en ATP en las biopelículas formadas en los diferentes biofiltros expresado en μg de ATP por peso de volátiles en función de los puntos de muestreo.

Tabla 40: Influencia del punto de muestreo y del catión en la cantidad de ATP intracelular (expresado por peso de volátiles)

| Análisis de varianza para ATP/peso de volátiles -Tipo III Suma de Cuadrados- | | | | | |
|--|-----------------------|------|----------------|-------------|------------------------|
| Fuente de variación | Suma de los cuadrados | g.l. | Cuadrado medio | F-calculada | Nivel de significación |
| Efectos considerados | | | | | |
| A: Punto de muestreo | 0,1199 | 3 | 0,0400 | 18,84 | 0,0000 |
| B: Cation | 2,2749 | 4 | 0,5687 | 268,14 | 0,0000 |
| Interacción AB | 0,093 | 12 | 0,0078 | 3,66 | 0,0010 |
| Residual | 0,0848 | 40 | 0,00212 | | |
| Total corregido | 2,5727 | 59 | | | |

Tabla 41: Efecto del catión en la cantidad de ATP intracelular (expresado por peso de volátiles)

| Test de Rango Múltiple para ATP/peso de volátiles considerando el efecto del catión (LSD 0,05) | | | | |
|--|-------------------|-------------|--------------------------|-------------------|
| Catión | Número de medidas | Media (LS) | Desviación estándar (LS) | Grupos homogéneos |
| Control | 12 | 0,069 | 0,0133 | B |
| Cobre | 12 | 0,039 | 0,0133 | AB |
| Plomo | 12 | 0,363 | 0,0133 | C |
| Cromo | 12 | 0,0196 | 0,0133 | A |
| Arsénico | 12 | 0,4956 | 0,0133 | D |
| Comparativa | | Diferencias | | ∂ Límites |
| | Arsénico-Cobre | * | 0,4566 | 0,038 |
| | Arsénico-Control | * | 0,4264 | 0,038 |
| | Arsénico-Cromo | * | 0,476 | 0,038 |
| | Arsénico-Plomo | * | 0,132 | 0,038 |
| | Cobre-Control | | -0,030 | 0,038 |
| | Cobre-Cromo | | 0,019 | 0,038 |
| | Cobre-Plomo | * | -0,32 | 0,038 |
| | Control-Cromo | * | 0,050 | 0,038 |
| | Control-Plomo | * | -0,294 | 0,038 |
| | Cromo-Plomo | * | -0,344 | 0,038 |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

Tabla 42: Efecto del punto de muestreo en la cantidad de ATP intracelular (expresado por peso de volátiles)

| Test de Rango Múltiple para ATP/g de volátiles considerando el punto de muestreo (LSD 0,05) | | | | |
|---|-------------------|-------------|--------------------------|-------------------|
| Nivel | Número de medidas | Media (LS) | Desviación estándar (LS) | Grupos homogéneos |
| 1 | 15 | 0,2733 | 0,015 | A |
| 2 | 15 | 0,1849 | 0,015 | B |
| 3 | 15 | 0,1610 | 0,015 | B |
| 4 | 15 | 0,17 | 0,015 | B |
| Comparativa | | Diferencias | | ∂ Límites |
| | 1 - 2 | * | 0,0885 | 0,0429 |
| | 1 - 3 | * | 0,1123 | 0,0429 |
| | 1 - 4 | * | 0,1033 | 0,0429 |
| | 2 - 3 | | 0,0238 | 0,0429 |
| | 2 - 4 | | 0,0149 | 0,0429 |
| | 3 - 4 | | -0,0089 | 0,0429 |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

4.4.- Concentración de sacarosa en los biofiltros

La adición de una fuente de carbono exógena para el desarrollo y mantenimiento de las comunidades microbianas en las biopelículas responsables de la biodepuración en los reactores de lechos sumergidos, es un factor de considerable importancia. Por ello, es especialmente significativo conocer el consumo de dicha fuente orgánica al objeto de poder evaluar no solo la actividad biológica del reactor sino al mismo tiempo establecer los posibles costes de funcionamiento.

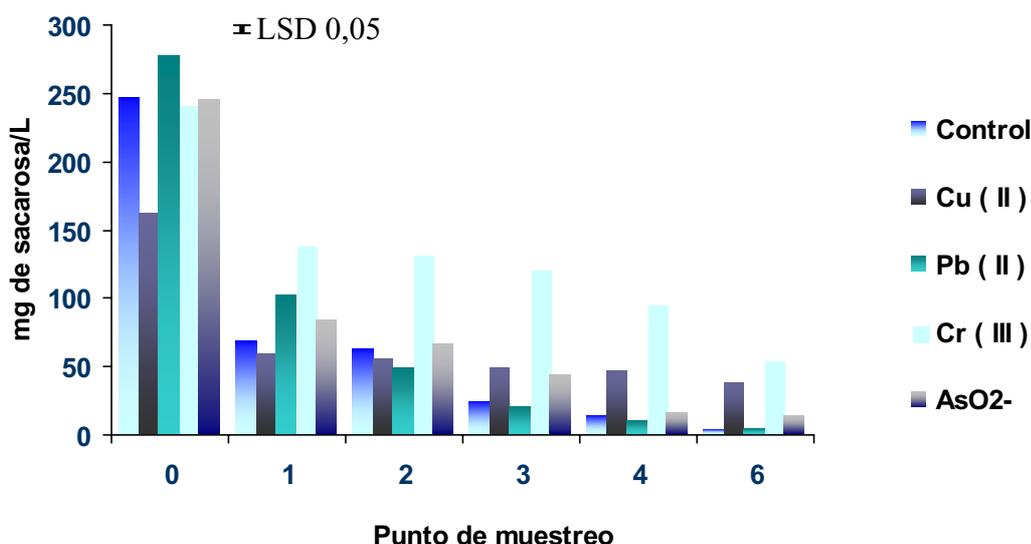


Figura 56: Consumo de sacarosa en los biofiltros expresado en mg de sacarosa por litro en función de los distintos puntos de muestreo. El punto 0 representa la entrada a los biofiltros y el punto 6 la salida. Los puntos 1 a 4 representan los diferentes puntos de muestreo situados en la planta (Figura 29 capítulo de Material y Métodos)

En la **Figura 56** se puede apreciar el consumo de sacarosa en función de los puntos de muestreo del biofiltro. Del análisis de los resultados obtenidos podemos establecer que la mayor parte de la fuente de carbono, en todos los biofiltros estudiados, es consumida en los primeros diez centímetros de la columna.

En el biofiltro control, al igual que en el biofiltro plomo (II), el consumo de sacarosa se produce con cinética similar, produciéndose una disminución del 70 % de sacarosa en los diez primeros centímetros de planta. En el caso de los biofiltros cobre (II), arsénico (III) y cromo (III) este consumo se ralentiza de forma considerable, llegándose en el caso del último a reducir en un 50 % la cinética de asimilación de sacarosa por parte de la microbiota presente en la biopelícula. Podemos sugerir por tanto, una cierta inhibición del consumo de sacarosa por la microbiota como consecuencia de la presencia en el influente de algunos

metales pesados como es el caso de los iones cúprico, crómico y *m*-arsenito, lo cual determinaría un posible efecto inhibitorio de estos iones sobre el metabolismo carbonado dentro de la compleja fisioecología de las biopelículas.

El análisis de la varianza (Tabla 43) realizado para la variación de la concentración de sacarosa a lo largo de los biofiltros indica que tanto el punto de muestreo como la presencia de catión, tanto individualmente como su interacción, influyen en esta variable.

Tabla 43: Influencia del punto de muestreo y del catión en la concentración de sacarosa a lo largo del biofiltro

| Análisis de varianza para la concentración de sacarosa a lo largo del biofiltro -Tipo III Suma de Cuadrados- | | | | | |
|--|-----------------------|------|----------------|-------------|------------------------|
| Fuente de variación | Suma de los cuadrados | g.l. | Cuadrado medio | F-calculada | Nivel de significación |
| Efectos considerados | | | | | |
| A: Punto de muestreo | 31008,9 | 3 | 10336,3 | 1972,09 | 0,0000 |
| B: Cation | 53792,1 | 4 | 13448,0 | 2565,78 | 0,0000 |
| Interacción AB | 10083,5 | 12 | 840,292 | 160,32 | 0,0000 |
| Residual | 209,652 | 40 | 5,241 | | |
| Total corregido | 95094,1 | 59 | | | |

Tabla 44: Efecto del catión en la concentración de sacarosa a lo largo del biofiltro

| Test de Rango Múltiple para la concentración de sacarosa a lo largo del biofiltro considerando el efecto del catión (LSD 0,05) | | | | |
|--|-------------------|-------------|--------------------------|-------------------|
| Catión | Número de medidas | Media (LS) | Desviación estándar (LS) | Grupos homogéneos |
| Control | 12 | 37,3833 | 0,6609 | A |
| Cobre | 12 | 51,2917 | 0,6609 | B |
| Plomo | 12 | 44,775 | 0,6609 | C |
| Cromo | 12 | 120,0 | 0,6609 | D |
| Arsénico | 12 | 51,703 | 0,6609 | B |
| Comparativa | | Diferencias | | ∂ Límites |
| Arsénico-Cobre | | 0,411 | | 1,88898 |
| Arsénico-Control | | * 14,32 | | 1,88898 |
| Arsénico-Cromo | | * -68,297 | | 1,88898 |
| Arsénico-Plomo | | * 6,93 | | 1,88898 |
| Cobre-Control | | * 13,908 | | 1,88898 |
| Cobre-Cromo | | * -68,7083 | | 1,88898 |
| Cobre-Plomo | | * 6,51667 | | 1,88898 |
| Control-Cromo | | * -82,6167 | | 1,88898 |
| Control-Plomo | | * -7,3917 | | 1,88898 |
| Cromo-Plomo | | * 75,225 | | 1,88898 |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

La Tabla 44 muestra el test de rango múltiple para la concentración de sacarosa considerando únicamente la presencia del catión, pudiéndose observar cómo los biofiltros control, plomo y cromo pertenecen a grupos homogéneos diferentes entre sí, mientras que los biofiltros cobre y arsénico presentan no presentan diferencias significativas entre ellos,

por lo que ambos iones inducen una inhibición similar en la captación de la sacarosa. La **Tabla 45** muestra el mismo estudio estadístico anterior, pero realizado teniendo en cuenta el punto de muestreo como única fuente de variación, pudiéndose observar que los cuatro puntos de muestreo pertenecen a grupos homogéneos diferentes entre sí.

Tabla 45: Efecto del punto de muestreo en la concentración de sacarosa a lo largo del biofiltro

| Test de Rango Múltiple para la concentración de sacarosa a lo largo del biofiltro considerando el punto de muestreo (LSD 0,05) | | | | |
|--|-------------------|-------------|--------------------------|-------------------|
| Nivel | Número de medidas | Media (LS) | Desviación estándar (LS) | Grupos homogéneos |
| 1 | 15 | 91,8827 | 0,591 | A |
| 2 | 15 | 72,12 | 0,591 | B |
| 3 | 15 | 47,5733 | 0,591 | C |
| 4 | 15 | 32,5467 | 0,591 | D |
| Comparativa | | Diferencias | ∂ Límites | |
| 1 - 2 | | * 19,7627 | 1,6896 | |
| 1 - 3 | | * 44,3093 | 1,6896 | |
| 1 - 4 | | * 59,336 | 1,6896 | |
| 2 - 3 | | * 24,5467 | 1,6896 | |
| 2 - 4 | | * 39,5733 | 1,6896 | |
| 3 - 4 | | * 15,0267 | 1,6896 | |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

4.5.- Mesófilos

Los recuentos de microbiota mesófila se realizaron según metodología descrita en los apartados 5.2.1 y 5.2.2 del capítulo de **Material y Métodos**.

Al comparar la microbiota mesófila presente en las biopelículas originadas en los biofiltros controles y problemas (influentes contaminados con metal pesado), se pudo comprobar un claro efecto de los iones metálicos sobre estas poblaciones microbianas. En las **Figuras 57** y **58** se puede apreciar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) detectado en cada caso y los efectos originados en la microbiota por los distintos metales pesados ensayados.

De los resultados obtenidos en la **Figura 57**, en donde se representa el log UFC/peso húmedo de biopelícula en función de los puntos de muestreo, podemos detectar una cierta homogeneidad en los recuentos bacterianos a lo largo del reactor biológico para cada uno de los influentes ensayados (control sin adición de metal y problemas adicionados de iones cúpricos, plumboso (II), cromo (III) o *m*-arsenito).

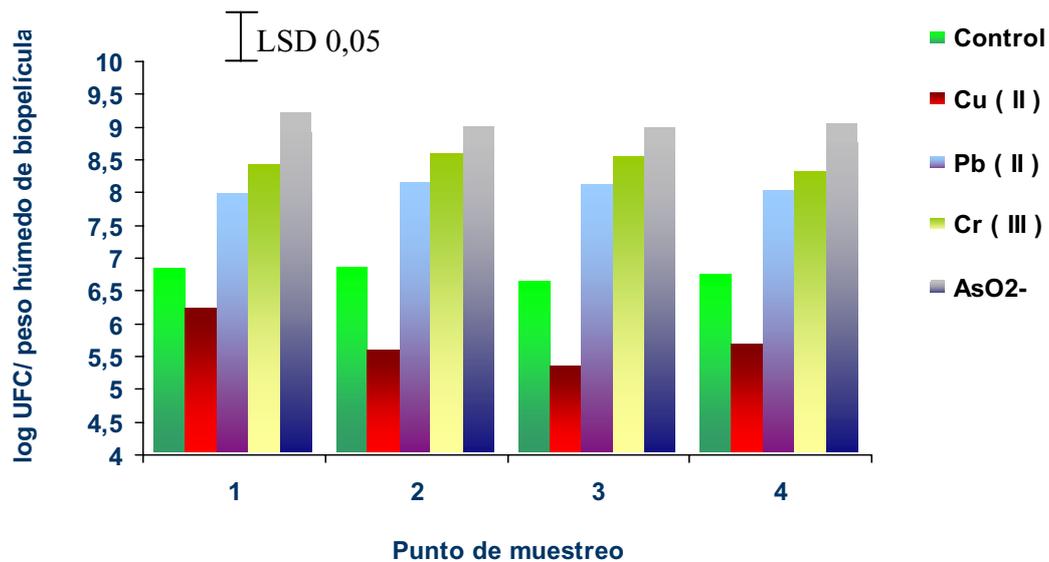


Figura 57: Microbiota mesófila en las biopelículas formadas en biofiltros con influentes control y adicionados de cationes contaminantes en distintos puntos de muestreo.

En cuanto al resultado absoluto de la determinación realizada, cabe resaltar que la presencia de cobre (II) disminuye en 1 logaritmo la presencia de microbiota mesófila cultivable en la biopelícula de este biofiltro con respecto al control, mientras que la presencia del resto de las especies ensayadas la aumenta con respecto al biofiltro control (Tabla 47). Por lo tanto, al comparar los efectos producidos por la presencia de iones metálicos en relación a controles, sobre la microbiota mesófila, es evidente que estas especies químicas afectan significativamente al contenido cuantitativo de las biopelículas.

Es por tanto evidente que la presencia de metales pesados en un influente modifica las características bacterianas de las biopelículas, pudiendo esto afectar a su capacidad depuradora.

El análisis de la varianza (Tabla 46) realizado para la cantidad de microbiota mesófila presente en la biopelícula (expresada por peso húmedo de biopelícula), indica que el punto de muestreo considerado no influye significativamente en esta variable (test de rango múltiple considerando el efecto del punto de muestreo mostrado en la Tabla 48), mientras que la presencia de catión sí lo hace (test de rango múltiple considerando el efecto del catión mostrado en la Tabla 49). El estudio realizado considerando ambos efectos muestra que la interacción conjunta, punto de muestreo y presencia de metal tampoco es significativa (Tabla 46).

Tabla 46: Influencia del punto de muestreo y del catión en la cantidad de microbiota mesófila presente en la biopelícula (expresada por peso húmedo de biopelícula)

| Análisis de varianza para log UFC/ peso húmedo de biopelícula -Tipo III Suma de Cuadrados- | | | | | |
|--|-----------------------|------|----------------|-------------|------------------------|
| Fuente de variación | Suma de los cuadrados | g.l. | Cuadrado medio | F-calculada | Nivel de significación |
| Efectos considerados | | | | | |
| A: Punto de muestreo | 0,3495 | 3 | 0,1165 | 0,91 | 0,4428 |
| B: Cation | 87,836 | 4 | 21,959 | 172,29 | 0,0000 |
| Interacción AB | 1,3363 | 12 | 0,1114 | 0,87 | 0,5789 |
| Residual | 5,0982 | 40 | 0,127 | | |
| Total corregido | 94,62 | 59 | | | |

Tabla 47: Efecto del catión en la microbiota mesófila presente en la biopelícula

| Test de Rango Múltiple para log UFC/ peso húmedo de biopelícula considerando el efecto del catión (LSD 0,05) | | | | |
|--|-------------------|-------------|--------------------------|-------------------|
| Catión | Número de medidas | Media (LS) | Desviación estándar (LS) | Grupos homogéneos |
| Control | 12 | 6,68333 | 0,1031 | A |
| Cobre | 12 | 5,7325 | 0,1031 | B |
| Plomo | 12 | 8,0508 | 0,1031 | C |
| Cromo | 12 | 8,4458 | 0,1031 | D |
| Arsénico | 12 | 9,04 | 0,1031 | E |
| Comparativa | | Diferencias | | ∂ Límites |
| | Arsénico-Cobre | * | 3,3075 | 0,2946 |
| | Arsénico-Control | * | 2,35667 | 0,2946 |
| | Arsénico-Cromo | * | 0,5942 | 0,2946 |
| | Arsénico-Plomo | * | 0,9892 | 0,2946 |
| | Cobre-Control | * | -0,9508 | 0,2946 |
| | Cobre-Cromo | * | -2,7133 | 0,2946 |
| | Cobre-Plomo | * | -2,3183 | 0,2946 |
| | Control-Cromo | * | -1,7625 | 0,2946 |
| | Control-Plomo | * | -1,3675 | 0,2946 |
| | Cromo-Plomo | * | 0,395 | 0,2946 |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

Tabla 48: Efecto del punto de muestreo en la microbiota mesófila presente en la biopelícula

| Test de Rango Múltiple para log UFC/ peso húmedo de biopelícula considerando el punto de muestreo (LSD 0,05) | | | | |
|--|-------------------|-------------|--------------------------|-------------------|
| Nivel | Número de medidas | Media (LS) | Desviación estándar (LS) | Grupos homogéneos |
| 1 | 15 | 7,718 | 0,0922 | A |
| 2 | 15 | 7,5807 | 0,0922 | A |
| 3 | 15 | 7,528 | 0,0922 | A |
| 4 | 15 | 7,5353 | 0,0922 | A |
| Comparativa | | Diferencias | | ∂ Límites |
| | 1 - 2 | | 0,1373 | 0,2635 |
| | 1 - 3 | | 0,19 | 0,2635 |
| | 1 - 4 | | 0,1827 | 0,2635 |
| | 2 - 3 | | 0,0527 | 0,2635 |
| | 2 - 4 | | 0,0453 | 0,2635 |
| | 3 - 4 | | -0,0073 | 0,2635 |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

Resultados análogos a los anteriormente descritos se pueden observar cuando se expresan el número de microorganismos mesófilos presentes en la biopelícula como log (UFC/peso de volátiles) en función de los puntos de muestreo. En la **Figura 58** se muestra la distribución de microorganismos mesófilos cultivables atendiendo a esta variable y se puede observar, que, al eliminar la variable “hidratación de la biopelícula” se reproduce la constancia en cuanto a las UFC a lo largo de todos los biofiltros.

Los estudios estadísticos realizados para la microbiota mesófila expresada por peso de volátiles son análogos a los obtenidos a los anteriormente mencionados, tal y como muestran las **Tablas 49, 50 y 51**.

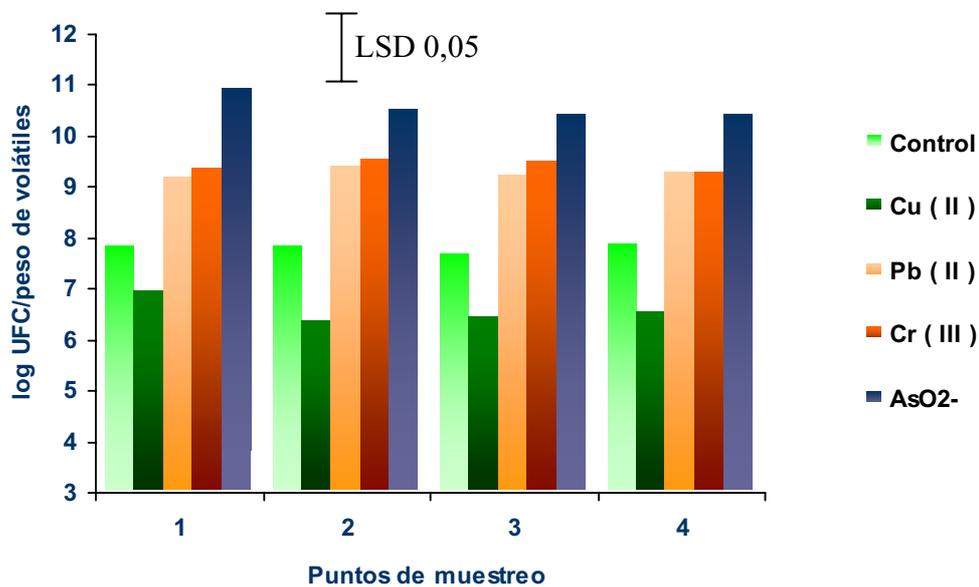


Figura 58: Microbiota mesófila en las biopelículas secas formadas en los diferentes biofiltros en función de los distintos puntos de muestreo.

Tabla 49: Influencia del punto de muestreo y del catión en la cantidad de microbiota mesófila presente en la biopelícula (expresada por peso de volátiles)

| Análisis de varianza para log UFC/peso de volátiles -Tipo III Suma de Cuadrados- | | | | | |
|--|-----------------------|------|----------------|-------------|------------------------|
| Fuente de variación | Suma de los cuadrados | g.l. | Cuadrado medio | F-calculada | Nivel de significación |
| Efectos considerados | | | | | |
| A: Punto de muestreo | 0,5863 | 3 | 0,1954 | 0,67 | 0,5731 |
| B: Catión | 113,186 | 4 | 28,2965 | 97,58 | 0,0000 |
| Interacción AB | 1,64876 | 12 | 0,1374 | 0,47 | 0,9183 |
| Residual | 11,5996 | 40 | 0,28999 | | |
| Total corregido | 127,021 | 59 | | | |

Tabla 50: Efecto del catión en la microbiota mesófila presente en la biopelícula

| Test de Rango Múltiple para log UFC/peso de volátiles considerando el efecto del catión (LSD 0,05) | | | | |
|--|-------------------|-------------|--------------------------|-------------------|
| Catión | Número de medidas | Media (LS) | Desviación estándar (LS) | Grupos homogéneos |
| Control | 12 | 7,76 | 0,1554 | A |
| Cobre | 12 | 6,5342 | 0,1554 | B |
| Plomo | 12 | 9,2292 | 0,1554 | C |
| Cromo | 12 | 9,3992 | 0,1554 | C |
| Arsénico | 12 | 10,4583 | 0,1554 | D |
| Comparativa | | Diferencias | | ∂ Límites |
| Arsénico-Cobre | | * | 3,9242 | 0,4443 |
| Arsénico-Control | | * | 2,6983 | 0,4443 |
| Arsénico-Cromo | | * | 1,0592 | 0,4443 |
| Arsénico-Plomo | | * | 1,2292 | 0,4443 |
| Cobre-Control | | * | -1,2258 | 0,4443 |
| Cobre-Cromo | | * | -2,865 | 0,4443 |
| Cobre-Plomo | | * | -2,695 | 0,4443 |
| Control-Cromo | | * | -1,6392 | 0,4443 |
| Control-Plomo | | * | -1,4692 | 0,4443 |
| Cromo-Plomo | | | 0,17 | 0,4443 |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

Tabla 51: Efecto del punto de muestreo en la microbiota mesófila presente en la biopelícula

| Test de Rango Múltiple para log UFC/peso de volátiles considerando el punto de muestreo (LSD 0,05) | | | | |
|--|-------------------|-------------|--------------------------|-------------------|
| Nivel | Número de medidas | Media (LS) | Desviación estándar (LS) | Grupos homogéneos |
| 1 | 15 | 8,846 | 0,1390 | A |
| 2 | 15 | 8,6027 | 0,1390 | A |
| 3 | 15 | 8,618 | 0,1390 | A |
| 4 | 15 | 8,638 | 0,1390 | A |
| Comparativa | | Diferencias | | ∂ Límites |
| 1 - 2 | | | 0,24333 | 0,3974 |
| 1 - 3 | | | 0,228 | 0,3974 |
| 1 - 4 | | | 0,208 | 0,3974 |
| 2 - 3 | | | -0,015 | 0,3974 |
| 2 - 4 | | | -0,035 | 0,3974 |
| 3 - 4 | | | -0,02 | 0,3974 |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

De las gráficas mostradas en las Figuras 57 y 58 se deduce que en todos los biofiltros la microbiota mesófila se distribuye a lo largo del recorrido del influente de igual forma, dentro de cada biofiltro estudiado, mientras que la presencia de metal pesado influye de forma significativa en la cantidad de los microorganismos mesófilos de las biopelículas.

4.6.- Actividades enzimáticas

Como parámetro orientativo del metabolismo de la biopelícula existente en los biofiltros se seleccionaron actividades enzimáticas involucradas en distintos ciclos

metabólicos (carbono, azufre, nitrógeno y fósforo). Así, la actividad fosfatasa se seleccionó por su relación con el ciclo del fósforo, la rodanasa por su relación con el ciclo del nitrógeno, la arilsulfatasa por su relación con el ciclo del azufre y la deshidrogenasa por su relación con el ciclo del carbono.

La biopelícula adherida en los biofiltros presentó una importante actividad fosfatasa alcalina total, mientras que, en las condiciones estudiadas, no se obtuvieron valores para el resto de las actividades enzimáticas. En la **Figura 59** y en la **Tabla 55** se puede observar las variaciones de la actividad fosfatasa alcalina total en las biopelículas estudiadas expresada como mg *p*-nitrofenol por peso húmedo de biopelícula y por hora, y como mg *p*-nitrofenol por peso de volátiles y por hora.

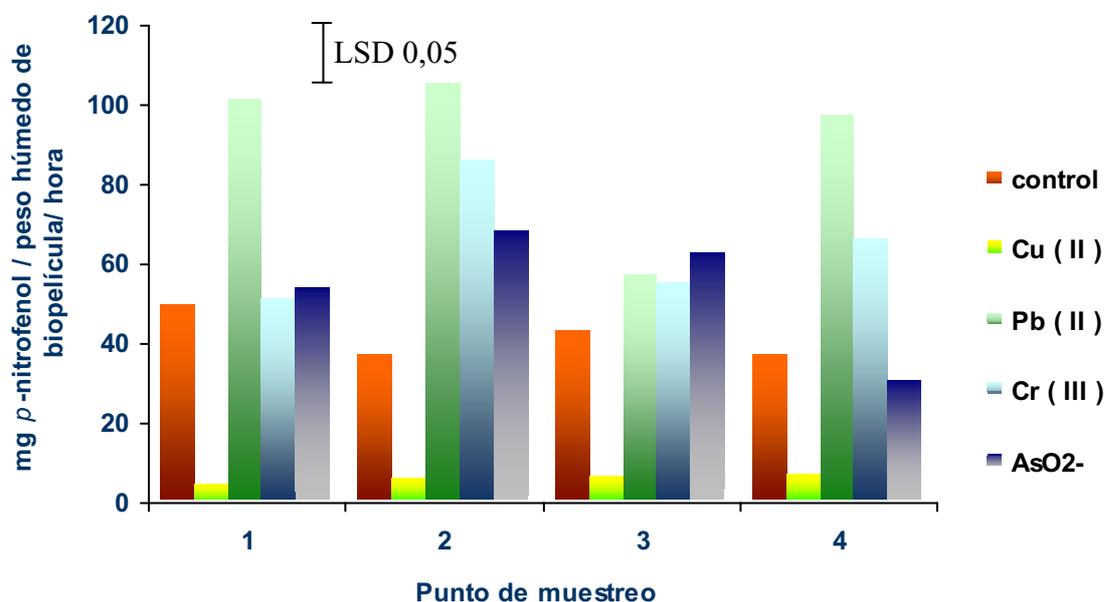


Figura 59: Actividad fosfatasa alcalina total en mg de *p*-nitrofenol/peso húmedo de biopelícula/h formadas en los distintos biofiltros en función de los puntos de muestreo.

La **Figura 59** muestra la actividad fosfatasa alcalina total en los biofiltros controles y en los biofiltros contaminados. La **Tabla 52** muestra el análisis de la varianza para la actividad fosfatasa expresada por peso húmedo de biopelícula considerando como fuentes de variación el punto de muestreo y la presencia del catión, e incluyendo en el estudio los efectos por separado y su interacción. Se puede observar cómo ambas fuentes de variación influyen de forma significativa en la actividad fosfatasa alcalina. La interacción de ambas fuentes de variación también induce diferencias significativas.

Tabla 52: Influencia del punto de muestreo y del catión en la actividad fosfatasa alcalina (expresada por peso húmedo de biopelícula)

| Análisis de varianza para fosfatasa alcalina/peso húmedo de biopelícula -Tipo III Suma de Cuadrados- | | | | | |
|--|-----------------------|------|----------------|-------------|------------------------|
| Fuente de variación | Suma de los cuadrados | g.l. | Cuadrado medio | F-calculada | Nivel de significación |
| Efectos considerados | | | | | |
| A: Punto de muestreo | 2027,32 | 3 | 675,775 | 15,56 | 0,0000 |
| B: Cation | 46659,1 | 4 | 11664,8 | 268,61 | 0,0000 |
| Interacción AB | 7910,99 | 12 | 659,249 | 15,18 | 0,0000 |
| Residual | 1737,04 | 40 | 43,426 | | |
| Total corregido | 58334,5 | 59 | | | |

Tabla 53: Efecto del catión en la actividad fosfatasa alcalina

| Test de Rango Múltiple para fosfatasa alcalina/peso húmedo de biopelícula considerando el efecto del catión (LSD 0,05) | | | | |
|--|-------------------|-------------|--------------------------|-------------------|
| Catión | Número de medidas | Media (LS) | Desviación estándar (LS) | Grupos homogéneos |
| Control | 12 | 41,4167 | 1,902 | A |
| Cobre | 12 | 5,8258 | 1,902 | B |
| Plomo | 12 | 90,5 | 1,902 | C |
| Cromo | 12 | 64,75 | 1,902 | D |
| Arsénico | 12 | 53,575 | 1,902 | E |
| Comparativa | | Diferencias | | ∂ Límites |
| | Arsénico-Cobre | * | 47,7492 | 5,437 |
| | Arsénico-Control | * | 12,1583 | 5,437 |
| | Arsénico-Cromo | * | -11,175 | 5,437 |
| | Arsénico-Plomo | * | -36,925 | 5,437 |
| | Cobre-Control | * | -35,591 | 5,437 |
| | Cobre-Cromo | * | -58,924 | 5,437 |
| | Cobre-Plomo | * | -84,674 | 5,437 |
| | Control-Cromo | * | -23,333 | 5,437 |
| | Control-Plomo | * | -49,083 | 5,437 |
| | Cromo-Plomo | * | -25,75 | 5,437 |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

El test de rango múltiple (Tabla 53), considerando solamente el efecto del catión, muestra que todos los biofiltros estudiados pertenecen a grupos homogéneos distintos, presentando diferencias significativas todos los biofiltros entre ellos y con respecto al control. Si comparamos la actividad enzimática fosfatasa alcalina detectada en los biofiltros adicionados de influentes contaminados con metales pesados con el biofiltro control, es evidente que los distintos iones metálicos afectan de forma diversa a las biopelículas microbianas. Así, el ión cúprico, produce una importante inhibición estadísticamente significativa, de la actividad fosfatasa alcalina, mientras que los iones plomo (II), cromo (III) y *m*-arsenito estimulan significativamente esta actividad enzimática.

El test de rango múltiple realizado considerando los puntos de muestreo como fuente de variación (Tabla 54), muestra que los puntos de muestreo 1 y 2 pertenecen a grupos

homogéneos diferentes, mientras que los puntos 3 y 4 pertenecen a otro distinto, no presentando diferencias significativas entre ellos. Obsérvese la tendencia descendente, estadísticamente significativa en los puntos de muestreo 1 y 2 y el punto 3, de la actividad fosfatasa alcalina a lo largo del recorrido del influente.

Tabla 54: Efecto del punto de muestreo en la actividad fosfatasa alcalina

Test de Rango Múltiple para fosfatasa alcalina/peso húmedo de biopelícula considerando el punto de muestreo (LSD 0,05)

| Nivel | Número de medidas | Media (LS) | Desviación estándar (LS) | Grupos homogéneos |
|-------------|-------------------|-------------|--------------------------|-------------------|
| 1 | 15 | 52,249 | 1,7015 | A |
| 2 | 15 | 60,217 | 1,7015 | B |
| 3 | 15 | 45,049 | 1,7015 | C |
| 4 | 15 | 47,339 | 1,7015 | C |
| Comparativa | | Diferencias | ∂ Límites | |
| 1 - 2 | | * -7,969 | 4,8633 | |
| 1 - 3 | | * 7,2 | 4,8633 | |
| 1 - 4 | | * 4,909 | 4,8633 | |
| 2 - 3 | | * 15,169 | 4,8633 | |
| 2 - 4 | | * 12,878 | 4,8633 | |
| 3 - 4 | | -2,291 | 4,8633 | |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

Estos mismos resultados se verifican, en mayor grado, cuando se expresa esta actividad en función del peso de volátiles (Tabla 55), lo cual demuestra claramente la sensibilidad positiva o negativa de la microbiota integrante de la biopelícula a los distintos metales pesados que pueden contaminar un influente determinado, afectando este hecho a otros parámetros esenciales de las biopelículas como puede ser la capacidad depuradora.

Tabla 55: Actividad fosfatasa alcalina total en mg de *p*-nitrofenol/peso de volátiles/h formadas en los biofiltros objeto de estudio en función de los puntos de muestreo. LSD (0,05)

| Biofiltro | mg de <i>p</i> -nitrofenol/peso de volátiles/h | | | |
|--------------------|--|------|------|------|
| | Punto de muestreo | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Control | 350 | 170 | 320 | 500 |
| Cobre | 24 | 31 | 37 | 40 |
| Plomo | 1570 | 1950 | 1440 | 2060 |
| Cromo | 460 | 820 | 560 | 620 |
| Arsénico | 2531 | 1709 | 1499 | 670 |
| LSD (0,05) = 390,5 | | | | |

El análisis de varianza (Tabla 56) muestra que tanto el punto de muestreo como el catión, por separado y su interacción, influyen en la actividad fosfatasa alcalina, tal y como ocurría anteriormente.

Tabla 56: Influencia del punto de muestreo y del catión en la actividad fosfatasa alcalina (expresada por g de volátiles)

| Análisis de varianza para fosfatasa alcalina/peso de volátiles -Tipo III Suma de Cuadrados- | | | | | |
|---|-----------------------|------|-----------------|-------------|------------------------|
| Fuente de variación | Suma de los cuadrados | g.l. | Cuadrado medio | F-calculada | Nivel de significación |
| Efectos considerados | | | | | |
| A: Punto de muestreo | 455478,0 | 3 | 151826,0 | 5,42 | 0,0032 |
| B: Cation | $2,8024 * 10^7$ | 4 | $7,0059 * 10^6$ | 250,23 | 0,0000 |
| Interacción AB | $6,1221 * 10^6$ | 12 | 510178,0 | 18,22 | 0,0000 |
| Residual | $1,11992 * 10^6$ | 40 | 27998,1 | | |
| Total corregido | $3,57212 * 10^7$ | 59 | | | |

Tabla 57: Efecto del catión en la actividad fosfatasa alcalina

| Test de Rango Múltiple para fosfatasa alcalina/ peso de volátiles considerando el efecto del catión (LSD 0,05) | | | | |
|--|-------------------|-------------|--------------------------|-------------------|
| Catión | Número de medidas | Media (LS) | Desviación estándar (LS) | Grupos homogéneos |
| Control | 12 | 312,5 | 48,303 | A |
| Cobre | 12 | 33,1667 | 48,303 | B |
| Plomo | 12 | 1757,5 | 48,303 | C |
| Cromo | 12 | 617,25 | 48,303 | D |
| Arsénico | 12 | 1558,25 | 48,303 | E |
| Comparativa | | Diferencias | | ∂ Límites |
| Arsénico-Cobre | | * | 1525,08 | 138,061 |
| Arsénico-Control | | * | 1245,75 | 138,061 |
| Arsénico-Cromo | | * | 941,0 | 138,061 |
| Arsénico-Plomo | | * | -199,25 | 138,061 |
| Cobre-Control | | * | -279,333 | 138,061 |
| Cobre-Cromo | | * | -584,083 | 138,061 |
| Cobre-Plomo | | * | -1724,33 | 138,061 |
| Control-Cromo | | * | -304,75 | 138,061 |
| Control-Plomo | | * | -1445,0 | 138,061 |
| Cromo-Plomo | | * | -1140,25 | 138,061 |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

La Tabla 57 muestra el test de rango múltiple realizado considerando el efecto del catión en la actividad fosfatasa alcalina, obteniéndose resultados análogos a los obtenidos anteriormente, mientras que el mismo estudio realizado considerando el punto de muestreo (Tabla 58), muestra como los puntos de muestreo 1 y 2 presentan similitud, al igual que los puntos 3 y 4, observándose también similitud entre los puntos 2 y 4.

Tabla 58: Efecto del punto de muestreo en la actividad fosfatasa alcalina

| Test de Rango Múltiple para fosfatasa alcalina/ peso de volátiles considerando el punto de muestreo (LSD 0,05) | | | | |
|--|-------------------|-------------|--------------------------|-------------------|
| Nivel | Número de medidas | Media (LS) | Desviación estándar (LS) | Grupos homogéneos |
| 1 | 15 | 978,733 | 43,2035 | A |
| 2 | 15 | 897,133 | 43,2035 | AB |
| 3 | 15 | 771,467 | 43,2035 | C |
| 4 | 15 | 775,6 | 43,2035 | BC |
| Comparativa | | Diferencias | ∂ Límites | |
| 1 - 2 | | 81,6 | 123,486 | |
| 1 - 3 | | * 207,267 | 123,486 | |
| 1 - 4 | | * 203,133 | 123,486 | |
| 2 - 3 | | * 125,667 | 123,486 | |
| 2 - 4 | | 121,533 | 123,486 | |
| 3 - 4 | | -4,1333 | 123,486 | |

* Denota diferencia estadísticamente significativa

4.7.- Análisis de correlación múltiple entre las variables estudiadas en los biofiltros

En cada uno de los biofiltros se ha realizado un estudio estadístico de correlación lineal para observar posibles relaciones de proporcionalidad (tanto directas como inversas) entre las siguientes variables:

- ∉ Contenido en ATP.
- ∉ Actividad fosfatasa alcalina.
- ∉ Grado de hidratación de la biopelícula.
- ∉ Peso de volátiles.
- ∉ Concentración de sacarosa a lo largo del biofiltro.
- ∉ Microbiota mesófila.

4.7.1.- Biofiltro control

La **Tabla 59** muestra la matriz de coeficientes de correlación entre las variables determinadas en el biofiltro control, indicándose en negrilla aquellas variables que guardan entre sí una proporcionalidad lineal significativa. Se puede observar que existe proporcionalidad directa entre los niveles de ATP y los de fosfatasa alcalina, entre los niveles de ATP y la concentración de sacarosa y entre la concentración de sacarosa y el peso de volátiles, lo que indica que un aumento en una de las dos variables produce un incremento en la otra variable considerada, mientras que entre el peso de volátiles y la fosfatasa alcalina (expresada por peso de volátiles) esta relación es inversamente proporcional.

Tabla 59: Matriz de coeficientes de correlación lineal entre las variables determinadas en el biofiltro control (* P< 0,05)

| | | | | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| A | | | | | | | | |
| B | 0,951* | | | | | | | |
| C | 0,697* | 0,596* | | | | | | |
| D | -0,0705 | -0,1863 | 0,08 | | | | | |
| E | -0,3026 | -0,2109 | 0,1977 | 0,2558 | | | | |
| F | 0,4593 | 0,5065 | 0,2154 | -0,717* | -0,4743 | | | |
| G | 0,743* | 0,894* | 0,2632 | -0,5651 | -0,4591 | 0,735* | | |
| H | 0,3239 | 0,3221 | -0,2098 | 0,2646 | -0,2858 | -0,2107 | 0,1730 | |
| I | 0,1221 | -0,0093 | 0,1388 | 0,0018 | -0,2718 | 0,2514 | 0,0584 | -0,4656 |
| | A | B | C | D | E | F | G | H |

A: ATP por 10⁸ célula; **B:** ATP por peso de volátiles; **C:** Fosfatasa alcalina/peso húmedo de biopelícula; **D:** Fosfatasa alcalina/peso de volátiles; **E:** Hidratación de la biopelícula; **F:** Peso de volátiles; **G:** Concentración de sacarosa; **H:** log UFC/peso húmedo de biopelícula; **I:** log UFC/peso de volátiles

4.7.2.- Biofiltro contaminado con cobre (II)

La matriz de coeficientes de correlación lineal (Tabla 60) para las variables determinadas en el biofiltro con cobre (II) muestra que existe una relación directamente proporcional entre los niveles de ATP (por peso de volátiles) y las variables microbiota mesófila y concentración de sacarosa, estando esta última relacionada, también de forma directamente proporcional, con el peso de volátiles y con la microbiota mesófila.

Tabla 60: Matriz de coeficientes de correlación lineal entre las variables determinadas en el biofiltro contaminado con cobre (II) (* P< 0,05, n = 12)

| | | | | | | | | |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| A | | | | | | | | |
| B | -0,441 | | | | | | | |
| C | 0,496 | -0,549 | | | | | | |
| D | 0,397 | -0,5486 | 0,9709* | | | | | |
| E | -0,520 | 0,3504 | -0,7543* | -0,7986* | | | | |
| F | 0,049 | 0,4016 | -0,6777* | -0,6977* | 0,5673 | | | |
| G | -0,124 | 0,6314* | -0,8244* | -0,8595* | 0,6117 | 0,9114* | | |
| H | -0,706* | 0,7094* | -0,7993* | -0,7352* | 0,6955* | 0,5523 | 0,6861* | |
| I | -0,564 | 0,7523* | -0,4865 | -0,3912 | 0,3528 | 0,4556 | 0,5634 | 0,7452* |
| | A | B | C | D | E | F | G | H |

A: ATP por 10⁸ célula; **B:** ATP por peso de volátiles; **C:** Fosfatasa alcalina/peso húmedo de biopelícula; **D:** Fosfatasa alcalina/peso de volátiles; **E:** Hidratación de la biopelícula; **F:** Peso de volátiles; **G:** Concentración de sacarosa; **H:** log UFC/peso húmedo de biopelícula; **I:** log UFC/peso de volátiles

La actividad fosfatasa alcalina se encuentra relacionada de forma inversamente proporcional con la microbiota mesófila, la concentración de sacarosa y el peso de volátiles.

4.7.3.- Biofiltro contaminado con plomo (II)

La matriz de coeficientes de correlación lineal (Tabla 61) entre las variables estudiadas en el biofiltro contaminado con plomo (II) muestra relación inversamente proporcional entre la fosfatasa alcalina y el peso de volátiles y relación directamente proporcional entre los niveles de ATP y la concentración de sacarosa, mientras que la relación entre los niveles de ATP y la microbiota mesófila es indirectamente proporcional.

El grado de hidratación de la biopelícula está directamente relacionado con la microbiota mesófila, mientras que la relación con la concentración de sacarosa es inversamente proporcional.

Tabla 61: Matriz de coeficientes de correlación lineal entre las variables determinadas en el biofiltro contaminado con plomo (II) (* P< 0,05, n = 12)

| | | | | | | | | |
|----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------|----------|----------|
| A | | | | | | | | |
| B | 0,8929* | | | | | | | |
| C | 0,1377 | 0,3132 | | | | | | |
| D | -0,4989 | -0,2110 | 0,3993 | | | | | |
| E | -0,6487* | -0,5633 | 0,0787 | 0,3126 | | | | |
| F | 0,1539 | 0,1406 | -0,6374* | -0,6120* | -0,1429 | | | |
| G | 0,7535* | 0,7763* | 0,4469 | -0,2843 | -0,7038* | 0,0819 | | |
| H | -0,3856 | -0,6706* | -0,2636 | -0,1724 | -0,0965 | -0,0523 | -0,1892 | |
| I | -0,0195 | 0,0367 | 0,4206 | 0,0473 | 0,7237* | -0,1135 | -0,0794 | -0,3818 |
| | A | B | C | D | E | F | G | H |

A: ATP por 10⁸ célula; B: ATP por peso de volátiles; C: Fosfatasa alcalina/peso húmedo de biopelícula; D: Fosfatasa alcalina/peso de volátiles; E: Hidratación de la biopelícula; F: Peso de volátiles; G: Concentración de sacarosa; H: log UFC/peso húmedo de biopelícula; I: log UFC/peso de volátiles

4.7.4.- Biofiltro contaminado con cromo (III)

En el biofiltro cromo (III) se obtienen correlaciones directas tanto entre el ATP y la microbiota mesófila como entre el grado de hidratación de la biopelícula y el peso de volátiles, no encontrándose relaciones significativas entre el resto de las variables determinadas.

Tabla 62: Matriz de coeficientes de correlación lineal entre las variables determinadas en el biofiltro contaminado con cromo (III) (* P< 0,05, n = 12)

| | | | | | | | | |
|----------|----------|----------------|----------------|----------|----------------|----------|----------|----------------|
| A | | | | | | | | |
| B | -0,4052 | | | | | | | |
| C | -0,0464 | 0,0951 | | | | | | |
| D | -0,2996 | -0,1600 | 0,7126* | | | | | |
| E | 0,3013 | -0,0977 | -0,3310 | -0,3062 | | | | |
| F | 0,1378 | 0,2154 | -0,1183 | -0,2008 | 0,6164* | | | |
| G | -0,5668 | 0,5313 | -0,0829 | -0,0698 | 0,5029 | 0,4370 | | |
| H | -0,2855 | 0,6440* | 0,2244 | -0,1933 | -0,1749 | -0,2524 | 0,4289 | |
| I | -0,0377 | 0,4629 | 0,1009 | -0,3892 | -0,1489 | -0,2746 | 0,2297 | 0,9366* |
| | A | B | C | D | E | F | G | H |

A: ATP por 10⁸ célula; **B:** ATP por peso de volátiles; **C:** Fosfatasa alcalina/peso húmedo de biopelícula; **D:** Fosfatasa alcalina/peso de volátiles; **E:** Hidratación de la biopelícula; **F:** Peso de volátiles; **G:** Concentración de sacarosa; **H:** log UFC/peso húmedo de biopelícula; **I:** log UFC/peso de volátiles

4.7.5.- Biofiltro contaminado con arsénico (III) - en forma de *m*-arsenito -

Tabla 63: Matriz de coeficientes de correlación lineal entre las variables determinadas en el biofiltro contaminado con arsénico (III) (* P< 0,05, n = 12)

| | | | | | | | | |
|----------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|----------|----------------|
| A | | | | | | | | |
| B | -0,6180* | | | | | | | |
| C | -0,0250 | 0,1143 | | | | | | |
| D | -0,2992 | 0,5012 | 0,5017 | | | | | |
| E | -0,4668 | 0,7634* | -0,0295 | 0,5320 | | | | |
| F | 0,5232 | -0,8306* | -0,0174 | -0,3221 | -0,7518* | | | |
| G | -0,3607 | 0,6087* | 0,6436* | 0,8964* | 0,5949* | -0,3458 | | |
| H | -0,5077 | 0,7230* | 0,0922 | 0,0296 | 0,4671 | -0,8799* | 0,1156 | |
| I | -0,5073 | 0,7442* | 0,0424 | 0,1131 | 0,6418* | -0,9544* | 0,1941 | 0,9594* |
| | A | B | C | D | E | F | G | H |

A: ATP por 10⁸ célula; **B:** ATP por peso de volátiles; **C:** Fosfatasa alcalina/peso húmedo de biopelícula; **D:** Fosfatasa alcalina/peso de volátiles; **E:** Hidratación de la biopelícula; **F:** Peso de volátiles; **G:** Concentración de sacarosa; **H:** log UFC/peso húmedo de biopelícula; **I:** log UFC/peso de volátiles

En el biofiltro contaminado con arsénico (III) se obtienen correlaciones directas con los niveles de ATP y las variables, microbiota mesófila, concentración de sacarosa e hidratación de la biopelícula, mientras que los niveles de ATP y el peso de volátiles mantienen una relación inversamente proporcional. La actividad fosfatasa alcalina presenta

una relación directamente proporcional con la concentración de sacarosa y el peso de volátiles está inversamente proporcional a la microbiota mesófila de la biopelícula. El grado de hidratación de la biopelícula se encuentra directamente relacionado con la microbiota mesófila y con la concentración de sacarosa mientras que con el peso de volátiles la proporcionalidad es inversa.

4.8.- Estudio microscópico de la estructura de las biopelículas

Con objeto de poder realizar un seguimiento de los cambios morfológicos de las biopelículas inducidos por los metales pesados ensayados, se realizó un estudio de microscopía electrónica de barrido. La presencia de iones metálicos induce profundos cambios en la morfología de las biopelículas, observándose cómo la respuesta de los microorganismos es diferente en función de las condiciones ambientales que los rodean, observándose, de igual forma, dismorfismos celulares causados por las condiciones ambientales adversas.

Paralelamente, se ha realizado un estudio de microscopía electrónica de transmisión, acoplado a un equipo de análisis de rayos X mediante EDRX (energía dispersiva de rayos X) para determinar las zonas, tanto en la biopelícula como en los microorganismos, donde tiene lugar una mayor acumulación de los metales pesados ensayados.

4.8.1.- Características estructurales de las biopelículas formadas en el biofiltro con influente sin contaminación (biofiltro control)

En las siguientes **Figuras (60, 61 y 62)** se puede observar la morfología de la biopelícula formada en el biofiltro control por el que fluye un caudal exento de carga contaminante.

Como se puede observar en la **Figura 57** en los biofiltros controles se originan biopelículas complejas formadas por comunidades heterogéneas de microorganismos. Así mismo, es evidente la existencia de canales de agua que permiten el tránsito de nutrientes orgánicos e inorgánicos y en consecuencia hacen posible el comportamiento depurativo de los sistemas de biopelícula fija (lechos sumergidos). En la **Figura 61** se muestra la biopelícula que se genera en el punto 2 de muestreo, observándose gran cantidad de microorganismos por unidad de superficie inmersos en la matriz polimérica extracelular, la cual sirve de soporte tanto a microorganismos filamentosos como a otros con morfología cocoide y bacilar, siendo por tanto una biopelícula de naturaleza heterogénea. La matriz exopolimérica se dispone sobre el soporte de forma que tanto los nutrientes como toda aquella sustancia disuelta pueda difundir a través de la estructura de la biopelícula (**Detalle 1 de la Figura 61**).

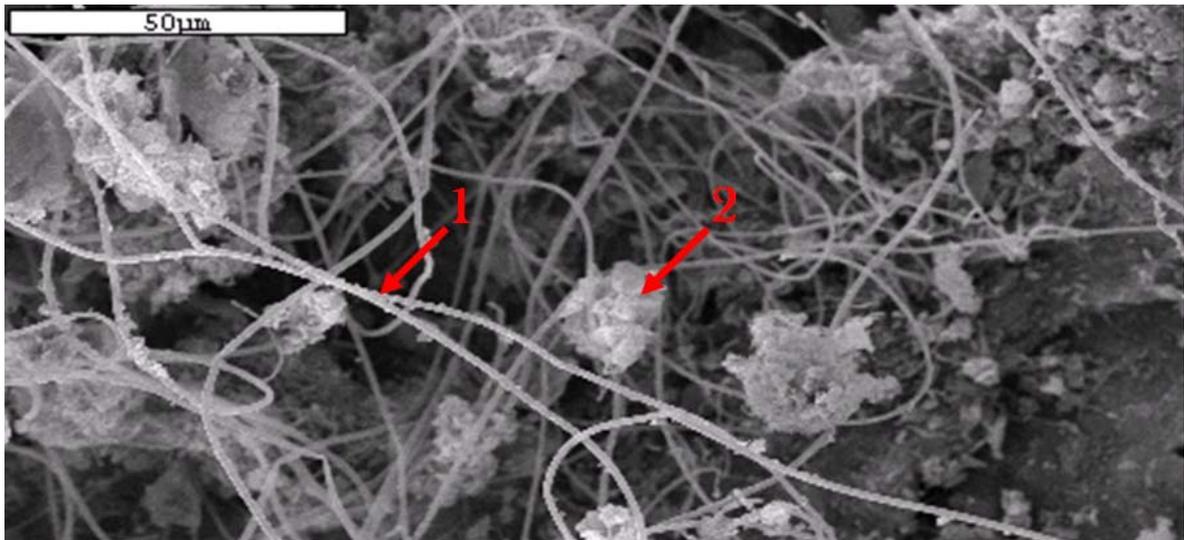


Figura 60: Estructura de la biopelícula formada en el biofiltro control, en el punto 4 de muestreo. Detalle 1: Presencia de abundantes hifas de hongos a lo largo de toda la superficie del soporte. Detalle 2: cúmulos de microorganismos con abundantes sustancias poliméricas extracelulares. La escala muestra una longitud de 50 μm .

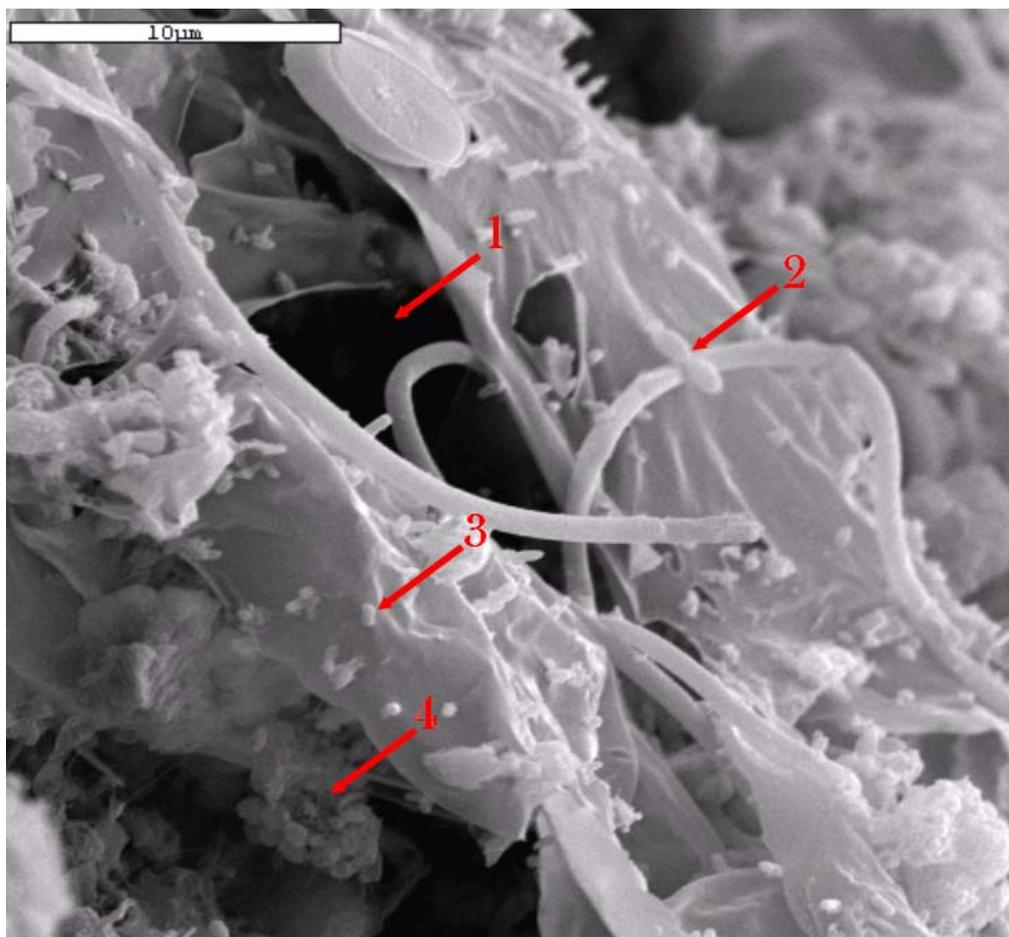


Figura 61: Estructura heterogénea de la biopelícula formada en el punto 2 de muestreo del biofiltro control. El guión muestra la escala de 10 μm . Detalle 1: Canales de agua en las biopelículas para la difusión de sustancias disueltas. Detalle 2: Microorganismos filamentosos en fase de reproducción. Detalle 3: Microorganismos cocoides y bacilares inmersos en la matriz exopolimérica. Detalle 4: Agregados de microorganismos unidos entre sí por sustancias poliméricas extracelulares.

La **Figura 62** muestra otra región de la biopelícula, fotografiada a menor aumento, localizada en el punto 1 de muestreo, donde se puede observar la disposición del exopolímero sobre el soporte (**Detalle 1**). Cabe destacar que la biopelícula cubre gran parte de la superficie del soporte y que por tanto la colonización por parte de los diferentes microorganismos integrantes de estas biopelículas es elevada.

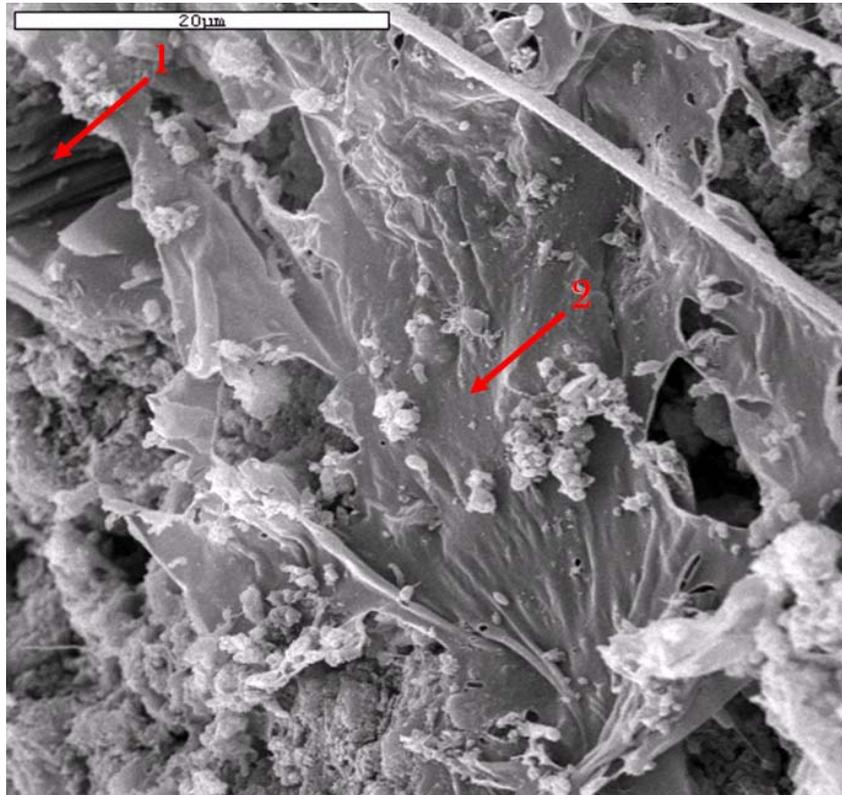


Figura 62: Polímero extracelular en las biopelículas generadas en el biofiltro control (punto 1 de muestreo), el guión muestra la escala de 20 µm. **Detalle 1:** Superficie del soporte. **Detalle 2:** Sustancias poliméricas extracelulares generadas por los microorganismos presentes en la biopelícula.

4.8.2.- Características estructurales de las biopelículas formadas en el biofiltro con influente contaminado con cobre (II)

La presencia de cobre en el influente originó cambios morfológicos en la biopelícula desarrollada sobre el soporte. En este biofiltro se estudiaron mediante microscopía electrónica de barrido las biopelículas antes y después del proceso de lavado del biofiltro para visualizar los posibles cambios en la estructura de las mismas debido a un paso de gran cantidad de agua a contracorriente junto con un aporte masivo de aire. Las **Figuras 63, 64 y 65** muestran el aspecto de la biopelícula antes del proceso de lavado a lo largo del recorrido del influente, mientras que las **Figuras 66, 67 y 68** lo hacen después de dicho proceso.

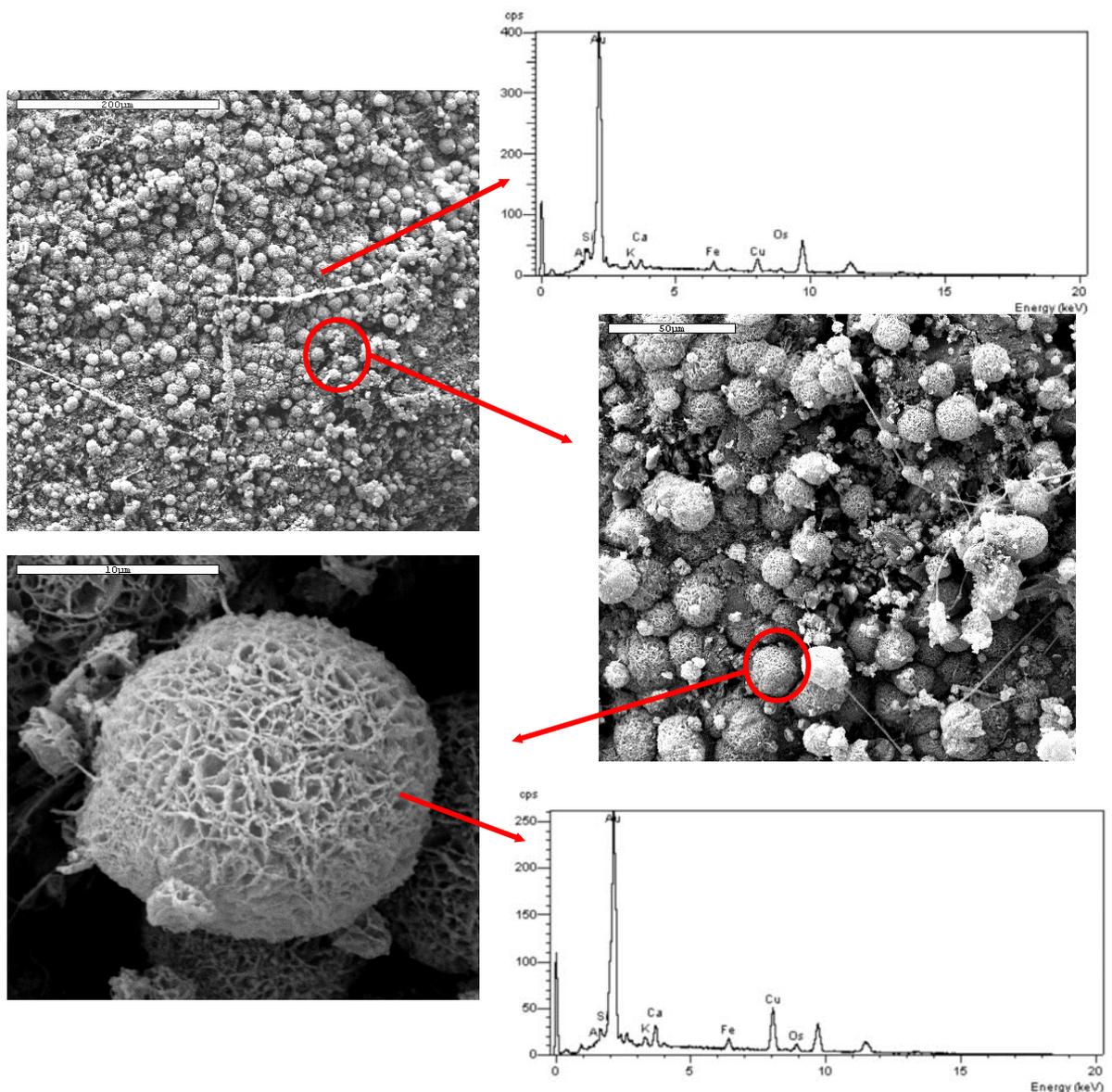


Figura 63: Cascada de ampliaciones de la estructura de la biopelícula en el punto 1 de muestreo previa al proceso de lavado en los biofiltros adicionados con cobre (II). En la fotografía inferior izquierda se muestra las estructuras encargadas de la adsorción de cobre (II). El guión muestra la escala de 200 μm en la fotografía superior izquierda, 50 μm en la foto central derecha y 10 μm en la fotografía inferior izquierda. Los espectros de rayos X muestran la presencia de cobre en la biopelícula formada. La presencia de oro y osmio en las muestras se debe al protocolo seguido en el proceso de contraste de las muestras.

En la **Figura 63**, que representa el aspecto de la biopelícula en el punto 1 de muestreo (donde la concentración de ión cúprico es la mayor, con respecto al resto de los puntos de muestreo) antes del proceso de lavado, se puede observar como la casi totalidad de la superficie del soporte presenta una serie de estructuras esféricas (fotografía superior izquierda de la **Figura 63**), las cuales, ampliadas, tienen una morfología esponjosa y muy porosa (fotografía central derecha e inferior izquierda). El análisis mediante EDRX muestra

gran concentración de cobre en estas estructuras, observándose la transición K_{ζ} del cobre a 8 KeV con una intensidad de 50 cuentas por segundo (cps). Obsérvese el cambio tan drástico inducido por el ión cúprico en la morfología de las biopelículas con respecto al control. La presencia de ión cúprico induce una mayor complejidad estructural a las biopelículas formadas sobre el soporte, siendo esto específicamente evidente en el punto 1 de muestreo.

En el punto 3 de muestreo, donde la concentración de ión cúprico es considerablemente menor, con respecto al punto 1 (**Figura 44**) se siguen observando estructuras esféricas, similares a las encontradas en el punto 1, si bien es cierto que en muy menor número (**Figura 64**). En este punto, al igual que en el punto 2, comienzan a observarse proliferación de microorganismos filamentosos, ausentes en el punto 1. Obsérvese que la colonización por parte de los microorganismos en este punto de muestreo es muy inferior en comparación con el punto 1.

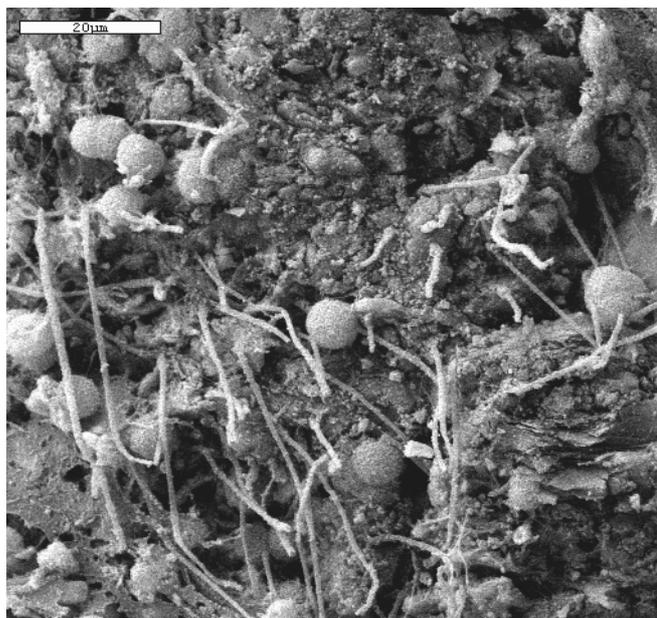


Figura 64: Estructura de la biopelícula en el punto 3 previa al proceso de lavado. El guión muestra la escala de 20 μm . En este punto de muestreo la superficie del soporte está menos colonizada por los microorganismos, pudiéndose ver la superficie del soporte exento de biopelícula.

En el punto 4, la superficie del soporte vuelve a estar completamente colonizada, observándose grandes conglomerados de microorganismos y sustancias poliméricas extracelulares (**Figura 65**), si bien es cierto que en ningún caso se observó similitud de esta biopelícula con la presente en el biofiltro control, por lo que parece indicar que la presencia de cobre (II), aun en pequeñas concentraciones, induce cambios en la morfología de las

biopelículas. En la **Figura 65** se puede observar el aspecto de la biopelícula presente en el punto 4, así como su análisis mediante rayos X, el cual muestra la escasa presencia de cobre en las sustancias poliméricas extracelulares.

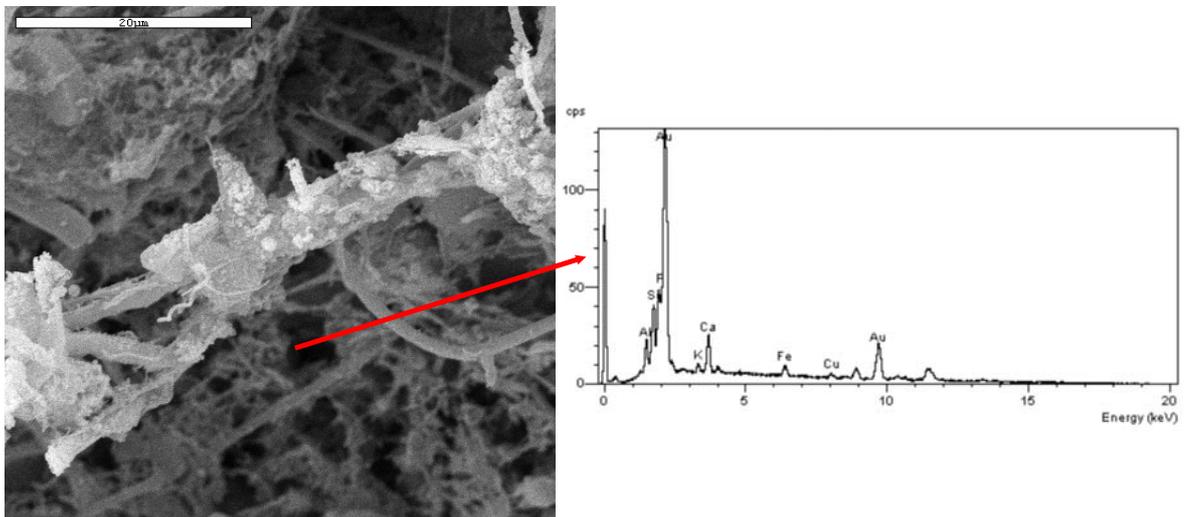


Figura 65: Estructura de la biopelícula en el punto 4 previa al proceso de lavado. El guión muestra la escala de 20 μm . El espectro que se muestra a la izquierda de la figura muestra la baja presencia de cobre en la biopelícula.

El proceso de lavado a contracorriente, tiene como finalidad eliminar la biopelícula de los estratos superiores, la cual, debido al inevitable crecimiento celular y a la acumulación de sustancias tóxicas, produce una disminución del rendimiento del biofiltro a lo largo de los días de funcionamiento del mismo. Las siguientes ilustraciones muestran el aspecto de las biopelículas en el biofiltro contaminado con cobre (II), en los distintos puntos de muestreo, un día después del proceso de lavado. Se puede observar, cómo las estructuras esféricas, presentes antes del lavado, vuelven a formarse a lo largo de todo el biofiltro, tal y como ocurría anteriormente.

En la **Figura 66** se muestra el aspecto de la biopelícula en el punto 1 cuya morfología es similar a la que presentaba antes del proceso de lavado, observándose gran número de estructuras esféricas con gran contenido en cobre. Sin embargo, en el punto 3 hay diferencias con respecto a la biopelícula previa al proceso de lavado. En la **Figura 67** se puede observar la presencia de estas mismas estructuras, presentando una menor saturación de cobre en su superficie (fotografía inferior derecha). En la cascada de ampliaciones presentada en la **Figura 67** se puede observar cómo la superficie del soporte está totalmente colonizada por los microorganismos, los cuales se desarrollan plenamente con abundante producción de sustancias poliméricas extracelulares (fotografía superior izquierda). La ampliación de esta zona de la biopelícula revela la presencia de microorganismos

filamentosos (fotografía inferior izquierda) así como de abundantes estructuras porosas capaces de adsorber cobre (II) sobre su superficie (fotografías superior e inferior derecha). El análisis mediante rayos X muestra que la presencia de cobre en estas estructuras, presentes en el punto 3, es baja en comparación con el punto 1 de muestreo previo al proceso de lavado, observándose la transición $K\zeta$ de este metal a 8 KeV con una intensidad de 15 cps.

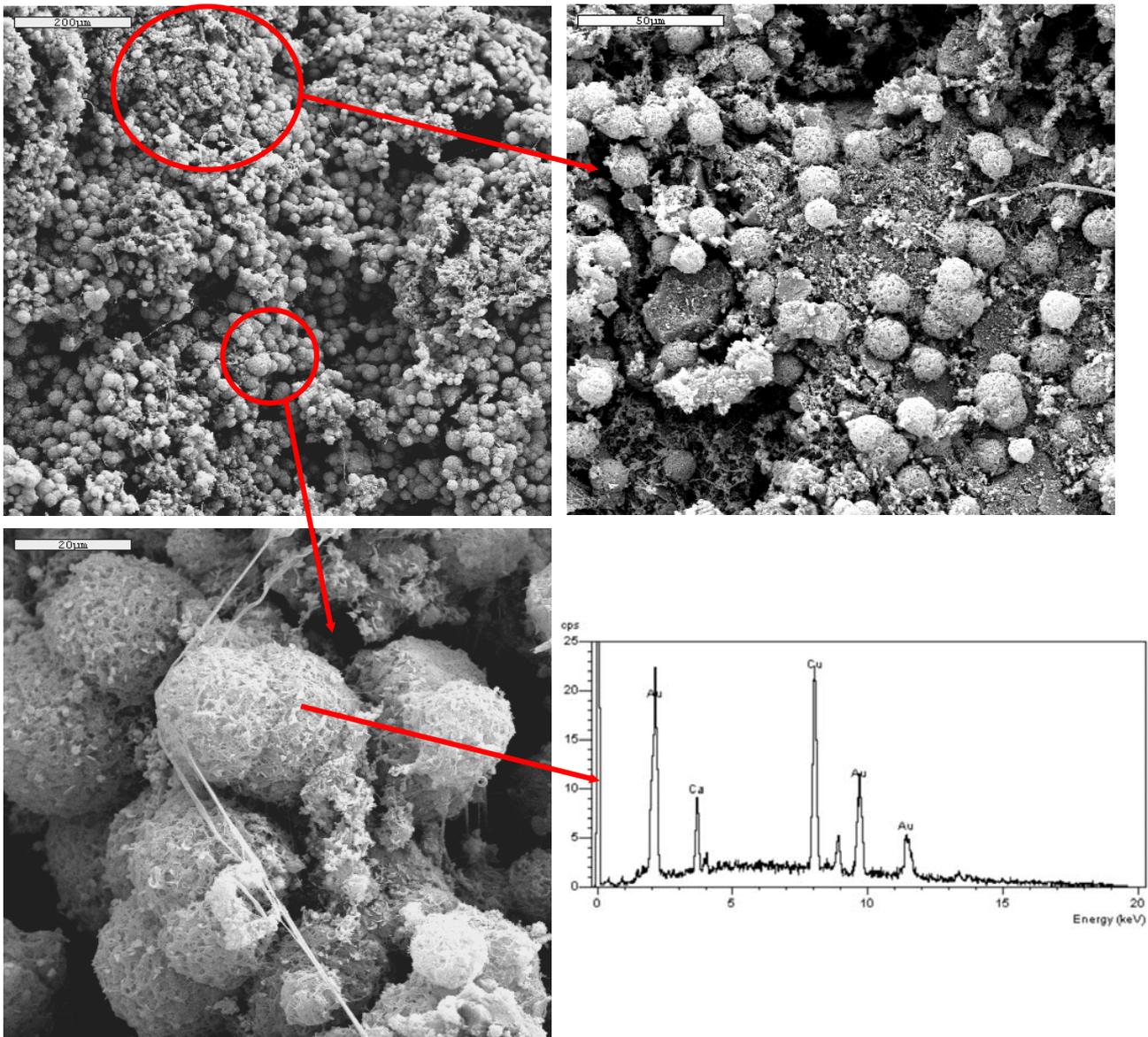


Figura 66: Cascada de ampliaciones de la estructura de la biopelícula en el punto 1 un día después de proceso de lavado. La fotografía superior izquierda (Escala 200 μm) muestra la superficie del soporte totalmente colonizada por microorganismos inmersos en la biopelícula con la morfología inducida por el ión cobre (II). Las fotografías superior derecha e inferior izquierda (escala 50 μm) muestran la presencia de estructuras porosas capaces de adsorber este ión, tal y como indica el espectro de rayos X (inferior derecha), en el que se observa la transición $K\zeta$ del cobre a 8 KeV con una intensidad de 25 cps. La presencia de oro se debe al metalizado de las muestras.

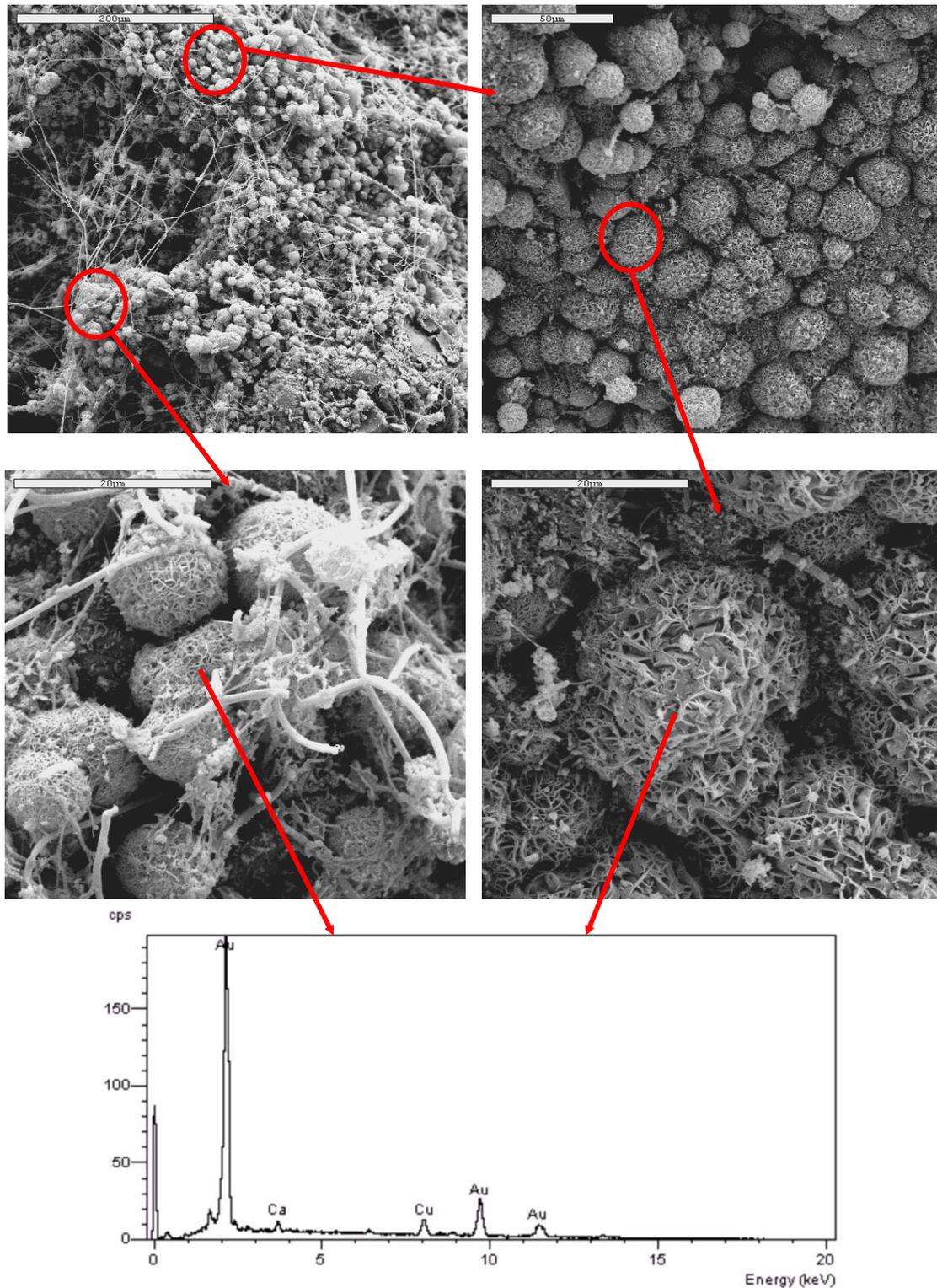


Figura 67: Aspecto de la biopelícula en el punto 3 un día después del proceso de lavado. La imagen superior izquierda (escala 200 μm) muestra la presencia de abundantes sustancias poliméricas extracelulares cuya ampliación indica una baja saturación de ión cúprico en su superficie (fotografía inferior derecha, escala 20 μm), al contrario de lo que ocurría en el punto 1 de lavado (imagen inferior izquierda de la Figura 65). La fotografía inferior izquierda (escala 20 μm) muestra la presencia de microorganismos filamentosos desarrollándose sobre las estructuras anteriormente mencionadas. El espectro de rayos X indica la baja presencia de cobre en este punto de muestreo. La presencia de oro en el espectro se debe a que el protocolo de contraste de la muestra emplea este metal.

En el punto 4, al día siguiente del proceso de lavado, la biopelícula presenta el aspecto que se muestra en la **Figura 68**. Se puede observar gran cantidad de microorganismos filamentosos sobre la superficie del soporte así como la ausencia de las estructuras esféricas presentes en los demás puntos de muestreo. El espectro de rayos X realizado en esta zona del biofiltro no muestra presencia de cobre en la biopelícula.

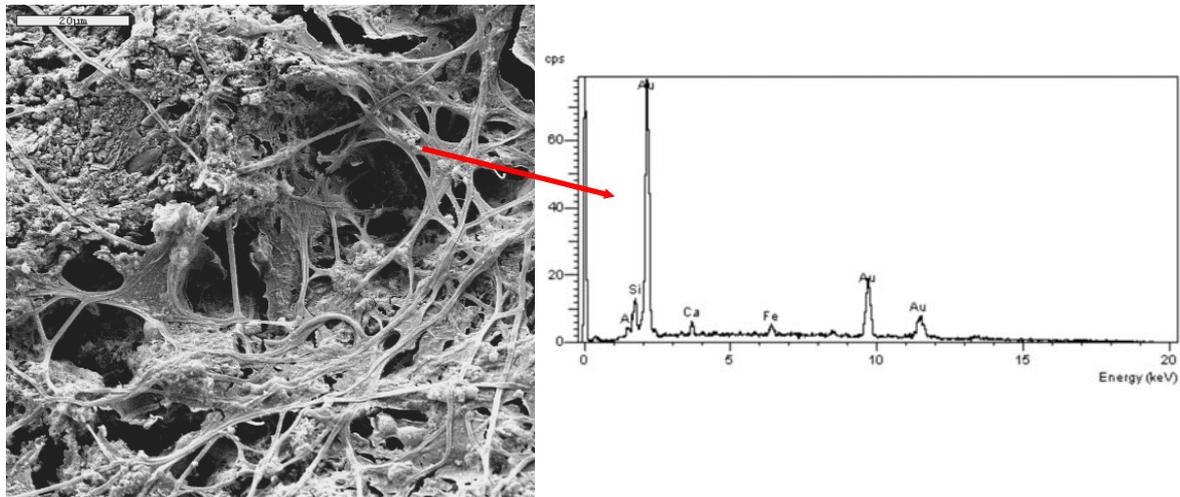


Figura 68: Aspecto de la biopelícula en el punto 4, un día después del proceso de lavado. La imagen derecha (escala 20 μm) muestra abundante presencia de microorganismos filamentosos sobre la superficie del soporte. El espectro de rayos X muestra ausencia de cobre en la biopelícula en este punto del biofiltro.

Resulta por tanto evidente que el ión cúprico a concentraciones de 15 mg/L da origen a un cambio en la estructura de la biopelícula responsable del proceso depurativo, induciendo un conjunto de asociaciones de microorganismos embebidos en la matriz exopolimérica, especializadas en la adsorción de este metal, observándose estas estructuras con distinto grado de saturación a lo largo del biofiltro.

Al estudiar con detalle las estructuras esféricas capaces de adsorber los iones cobre (II) presentes en el agua subterránea, pudimos comprobar que estaban constituidos fundamentalmente por bacterias y exopolímeros de naturaleza fibrosa (**Figura 69**). Las bacterias observadas fueron mayoritariamente bacilos embebidos en una matriz polimérica muy densa. Además de este hecho puramente estructural pudimos comprobar cómo dicha matriz es la responsable de la adsorción del ión cúprico (**Figura 69 y 70**) verificándose el alto contenido de fósforo y silicio en los exopolímeros, lo que determina la presencia de polifosfatos y silicatos de cobre responsables de la inmovilización del ión metálico.

En la **Figura 69** se muestran fotografías de microscopía electrónica de transmisión junto con espectros de rayos X de distintas zonas, tanto de la biopelícula como de los microorganismos presentes en ellas. En la fotografía superior izquierda (en la que el guión representa una escala de 1 μm) se observa un bacilo inmerso en la estructura polimérica de la biopelícula. El análisis mediante rayos X de estos bacilos reveló ausencia de cobre en su interior, mientras que en el exopolímero, en el que estos microorganismos están inmersos, los espectros realizados mostraron presencia de cobre junto con fósforo o silicio dependiendo de las zonas analizadas. Así, el espectro mostrado en la imagen superior derecha, muestra la presencia de cobre (transición K_{ζ} a 8,04 KeV y K_{η} a 8,89 KeV) junto con fósforo (transición K_{ζ} a 2,013 KeV) en el exopolímero mostrado como **detalle 1** en la fotografía superior izquierda, mientras que el análisis de la región mostrada en la fotografía central derecha (espectro inferior derecha), muestra la presencia de cobre junto con silicio (transición K_{ζ} a 1,739 KeV).

Un resultado relevante de este estudio de microscopía electrónica es el hecho de no haber encontrado presencia de metal pesado en el interior de los microorganismos procariotas presentes en la biopelícula, mientras que no ha ocurrido así con los resultados obtenidos al analizar el interior de los organismos eucariotas presentes en la misma. La fotografía central izquierda muestra un organismo eucariota, pudiéndose visualizar la región nuclear (aunque mal conservada debido a que ha sufrido contracción en el proceso de tinción y contraste) y numerosas mitocondrias (**detalle 2**). El análisis de las zonas más óptimamente densas, presentes en el interior de este tipo de microorganismos revela la presencia de cobre junto con fósforo (espectro inferior izquierda).

La presencia de níquel en los espectros de rayos X se debe a que la rejilla empleada para llevar a cabo este tipo de técnica microscópica está compuesta de níquel y la presencia de plomo y uranio en los mismos, a que el contraste se ha realizado con una mezcla compuesta por citrato de plomo (II) y acetato de uranilo, con objeto de contrastar la muestra y aumentar la densidad electrónica de la misma.

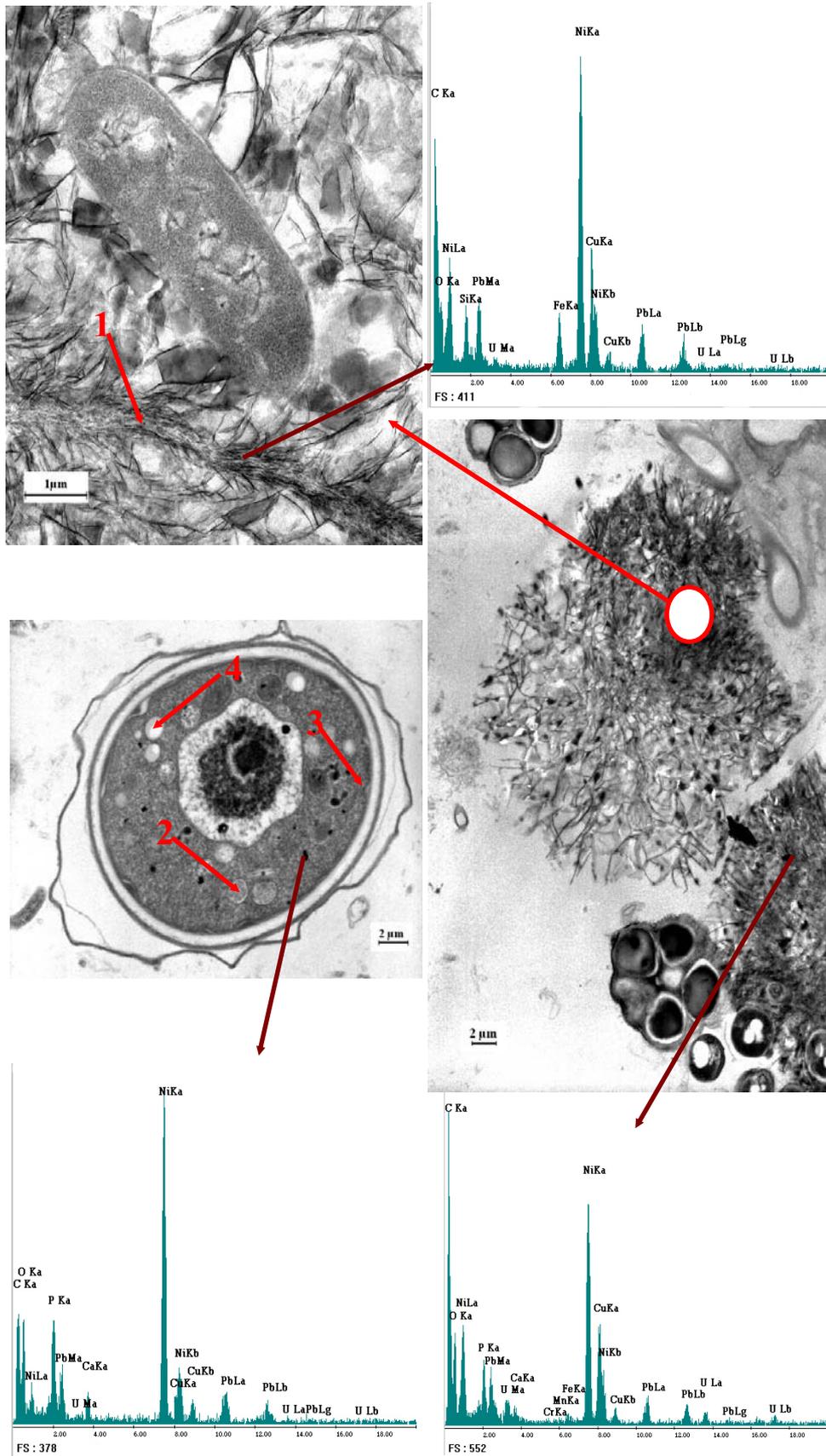


Figura 69: Imágenes de transmisión equivalentes a campo claro de la biopelícula (punto 1 de muestreo) en el biofiltro con influente contaminado con ión cúprico. Detalle 1: estructuras fibrosas presentes en la biopelícula. Detalle 2: Mitochondrias observadas en organismos eucariotas inmersos en la biopelícula. Detalle 3: Complejo de Golgi. Detalle 4: Gotas lipídicas.

En la **Figura 70** se muestra una ampliación de uno de los espectros de rayos X, observándose, de izquierda a derecha, las transiciones K_{ζ} del P a 2,013 KeV, M_{ζ} del Pb a 2,35 KeV (tinción), M_{ζ} del U a 3,17 KeV (tinción), K_{ζ} del Ni a 7,47 KeV (rejilla), K_{ζ} del Cu a 8,04 KeV (metal ensayado) produciéndose un solapamiento con la transición K_{η} del Ni a la misma energía, K_{η} del Cu a 8,89 KeV (metal ensayado), L_{ζ} y L_{η} del Pb a 10,53 y 12,60 KeV respectivamente, L_{ζ} del U (tinción) a 13,600 KeV, y por último y muy poco intensas, las transiciones L_{ν} del Pb a 14,77 KeV y L_{η} del U a 17,22 KeV.

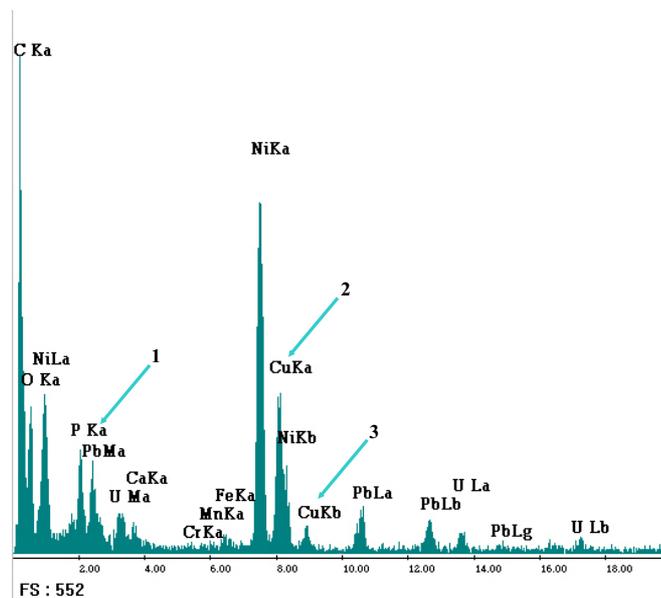


Figura 70: Ampliación del espectro de rayos X de las estructuras fibrosas mostrada en el detalle 1 de la **Figura 68**. 1. Transición K_{α} del fósforo. 2. Transición K_{α} del cobre. 3. Transición K_{β} del cobre.

4.8.3.- Características estructurales de las biopelículas formadas en los biofiltros con influente contaminado con ión plomo (II)

La microscopía electrónica en este biofiltro se realizó el día previo al proceso de lavado, tal y como se indica en la **Tabla 18** del apartado de **Material y Métodos**.

La adición de ión plumboso al agua subterránea en una concentración de 15 mg/L no parece modificar de forma significativa la estructura de la biopelícula en relación con los controles examinados (**Figuras 71, 74 y 75**). La biopelícula madura en los biofiltros utilizados para el tratamiento de influentes contaminados con este metal muestra una elevada complejidad con abundantes canales de agua y comunidades microbianas constituidas por formas cocoides y filamentosas. Estos resultados son observados en todos los puntos de muestreo. Pese a estos hechos, resulta evidente la eficacia de estos biofiltros en la

eliminación de iones plomo (II) del influente (**Figuras 72 y 73**), siendo especialmente significativo el papel desempeñado por las formas cocoides en la eliminación de este contaminante. Así, aunque las formas filamentosas presentes en la biopelícula son capaces de retener iones plomo (II) (**Figura 72**), las formas cocoides desarrollan esta función de una forma más importante (**Figura 73**).

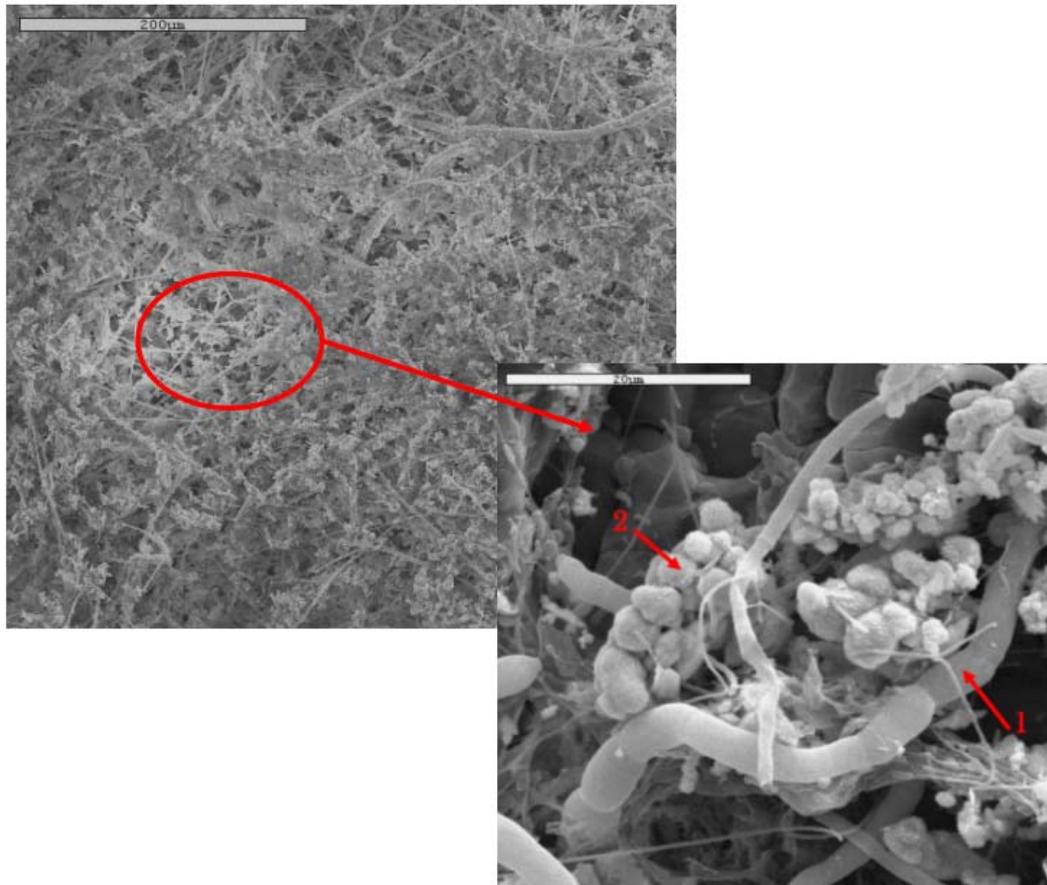


Figura 71: Aspecto de la biopelícula (punto 1) generada en el biofiltro adicionado con plomo (II). El guión en la fotografía superior muestra la escala de 200μm, y en su ampliación el guión muestra la escala de 20 σm. Detalle 1: Estructuras filamentosas. Detalle 2: Estructuras cocoides.

En el punto 1 del biofiltro se observa una biopelícula muy densa desarrollándose sobre la superficie del soporte con abundantes estructuras cocoides dispuestas como racimos coexistiendo junto con microorganismos filamentosos y sustancias poliméricas extracelulares. La presencia de plomo es evidente en todas y cada una de las zonas de la biopelícula analizadas, siendo mayoritaria la presencia de este metal en las estructuras cocoides, tal y como se puede observar en las **Figuras 72 y 73**. Así, En la **Figura 72**, correspondiente al análisis del **detalle 1** de la **Figura 71**, se puede observar que la intensidad de la transición M_{ζ} del Pb presenta una intensidad de 9 cps, mientras que esta misma

transición en la **Figura 73**, correspondiente al análisis del detalle 2 de la misma figura, presenta una intensidad cuatro veces superior.

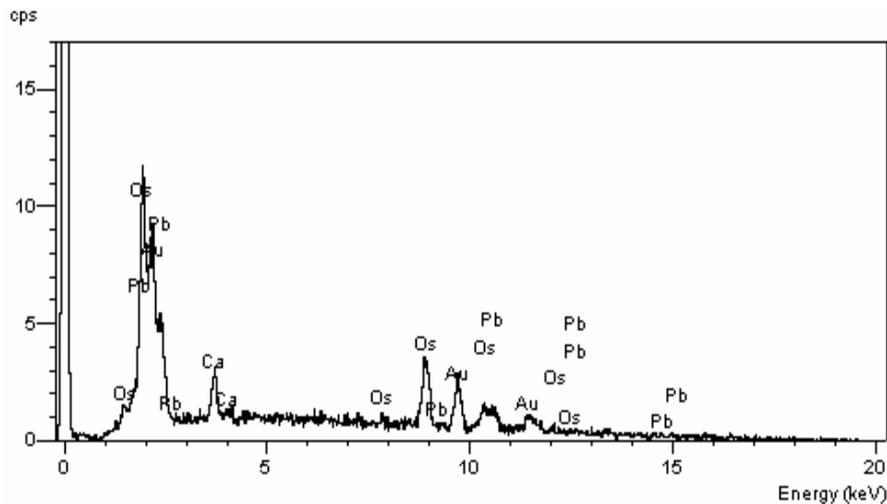


Figura 72: Análisis de difracción de rayos X de las estructuras filamentosas mostradas en el detalle 1 de la Figura 72. Se observan las transiciones pertenecientes al plomo $M\zeta$ a 2,35 KeV con una intensidad de 9 cps, $L\zeta$ a 10,53 KeV con una intensidad de 1,2 cps. Las transiciones $L\eta$ (a 12,60 KeV) y $L\nu$ (a 14,77 KeV), debido a la intensidad de la irradiación, son imperceptibles. La presencia de osmio en el espectro se debe al empleo de tetróxido de osmio en el proceso de tinción, necesario para el contraste de las muestras.

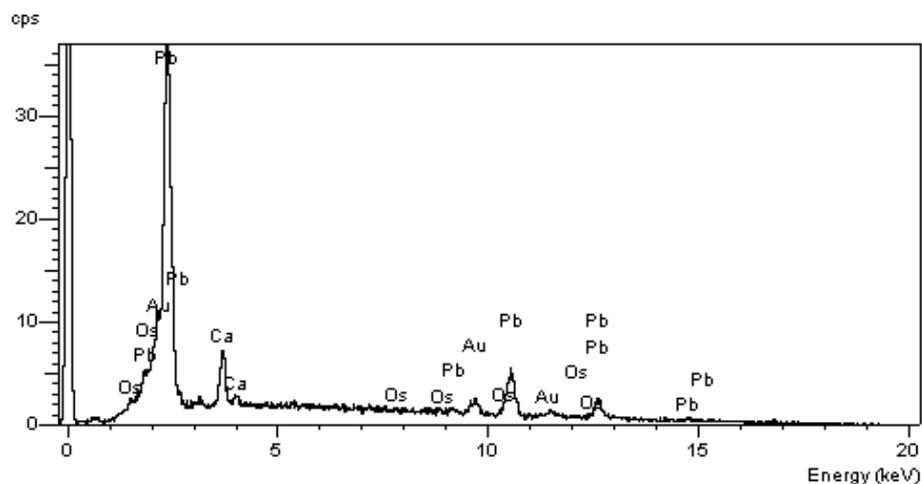


Figura 73: Espectro de rayos X de las formas cocoides mostradas en el detalle 2 de la Figura 72. Se observan las transiciones pertenecientes al plomo $M\zeta$ a 2,35 KeV con una intensidad de 37 cps, $L\zeta$ a 10,53 KeV con una intensidad de 5 cps. Obsérvese que la intensidad de las señales es, aproximadamente, cuatro veces superior en estas zonas de la biopelícula con respecto a las analizadas en la Figura 69.

En el punto 3 de muestreo la biopelícula adherida al soporte presentó el aspecto que se muestra en la **Figura 74**, pudiéndose observar una biopelícula muy densa y heterogénea desarrollándose sobre el soporte, en la que están presentes microorganismos con dismorfismo celular (detalle 1 **Figura 74**), probablemente debido a las condiciones

ambientales adversas, como puede ser la presencia de plomo (II) (**Figura 46**) y una baja concentración de sacarosa (**Figura 56**). No obstante, se observan microorganismos en fase de división (detalle 2 **Figura 74**), por lo que el efecto tóxico del plomo no parece afectar al desarrollo de los microorganismos presentes en la biopelícula.

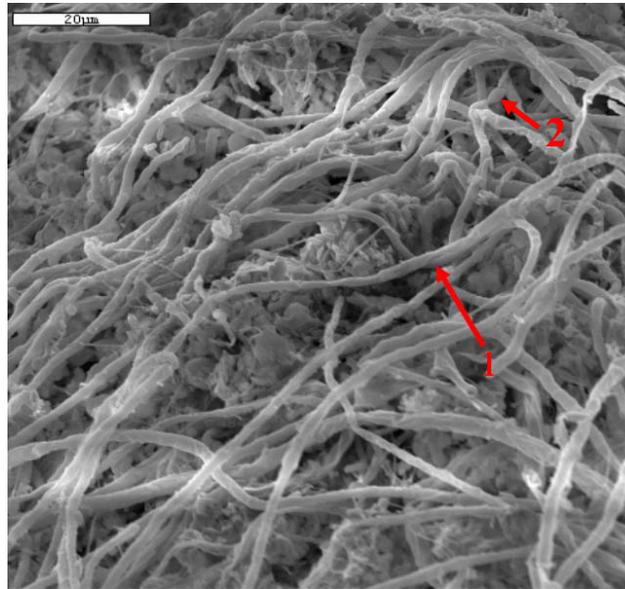


Figura 74: Estructura de la biopelícula (punto 3) del biofiltro con influente contaminado con plomo (II). Detalle 1: Dismorfismos celulares causados por condiciones ambientales adversas. Detalle 2: Microorganismos en fase de división. El guión muestra la escala de 20 μm .

En el punto 4 de muestreo la biopelícula presenta una estructura más extrema incluso a la que presentaba en el punto 3, pudiéndose observar abundante presencia de microorganismos filamentosos con marcados dismorfismos celulares (**detalle 1**), exentos de material extracelular a su alrededor, (**Figuras 75 y 76 izquierda**). En la **Figura 75** cabe resaltar la presencia de núcleos de cristalización (**detalle 2**) sobre los microorganismos presentes en la biopelícula, sobre los cuales el plomo (II) se deposita y se va eliminando paulatinamente, a medida que éste fluye a través del biofiltro.

En la **Figura 76** se muestra la misma zona de la biopelícula, con los mismos aumentos, pero empleando dos técnicas de fotografiado diferentes. En la imagen de la izquierda se ha empleado la técnica SE (electrones secundarios) mientras que en la imagen de la derecha se ha empleado la técnica BSE (electrones retrodispersados). La primera técnica se emplea debido a que da imágenes en tridimensionales, por lo que indica la morfología de la biopelícula, mientras que la segunda técnica da una imagen química, presentando más claridad aquellas zonas con metales electrónicamente densos, por lo que se emplea para

observar el quimismo de la biopelícula. Se puede observar cómo son los microorganismos, depositados sobre el soporte, y no éste, el causante de la eliminación de este ión.

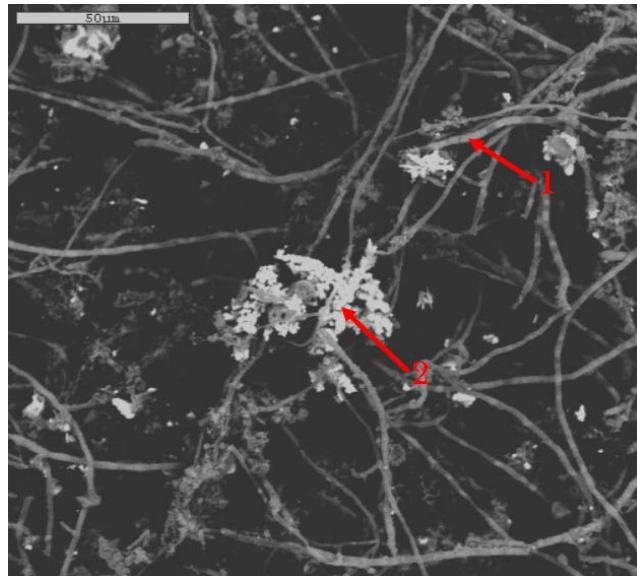


Figura 75: Estructura de la biopelícula (detalle 1) en el punto 4 en el biofiltro con influente contaminado con ión plumboso, mostrando cúmulos de plomo (II) (detalle 2). El guión muestra la escala de 50 μm.

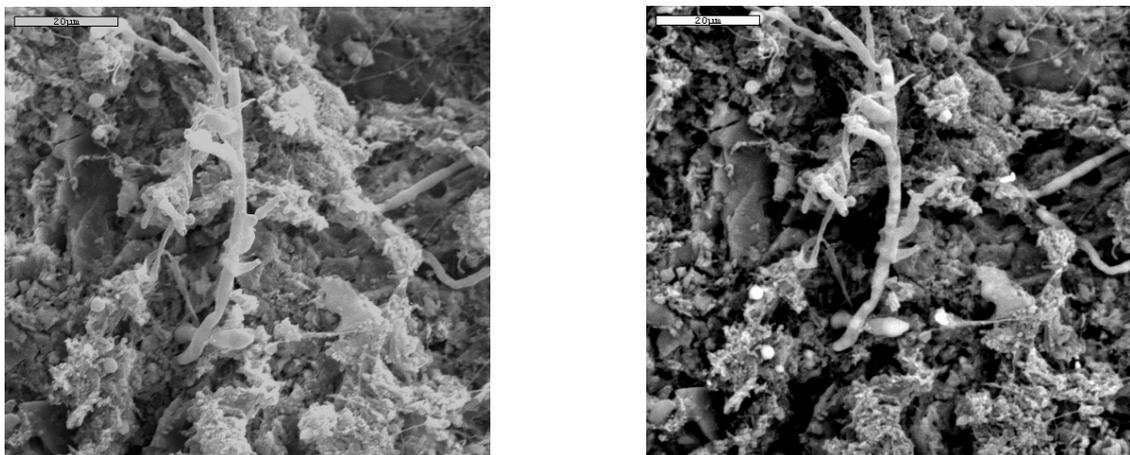


Figura 76: Fotografías de microscopía electrónica de barrido en el punto 4 de muestreo (la escala muestra 20 μm). La imagen de la izquierda se ha fotografiado en modo SE mientras que la de la derecha lo ha sido en modo BSE. Se puede observar, en la foto de la derecha, cómo, la mayor densidad electrónica está en la superficie de los microorganismos, mientras que el relleno presenta un contraste típico de materiales exentos de metal pesado (electrónicamente densos).

Para poder comprobar el mecanismo de eliminación del ión plumboso por parte de la microbiota presente en la biopelícula, se realizaron diversos estudios de microscopía electrónica de transmisión. La presencia de este metal se detectó mayoritariamente en la pared celular de los microorganismos presentes en la biopelícula y en algunos casos en el citoplasma de algunos de ellos. Este hecho comienza a ser detectado en los puntos más próximos a la entrada del influente y en función de un proceso de saturación de la biopelícula, se va observando en el resto del biofiltro a lo largo del ciclo de funcionamiento del mismo.

Si bien es cierto, que la estructura celular se ha conservado mal al final del proceso de tinción y contraste, debido a que la presencia de exopolímeros celulares y metal pesado, hacen que los procesos de tinción y contraste sean difíciles de llevar a cabo de forma adecuada, y que por lo tanto tengan lugar fenómenos de apoptosis y apoptosis celular debido a la manipulación de las muestras, sí se puede discernir entre la parte interna y externa de los microorganismos fotografiados, puesto que la membrana celular se distingue con claridad en todas las fotografías realizadas.

En la **Figura 77** se muestra un conjunto de microorganismos representativos de la microbiota que se desarrolla en el biofiltro contaminado con ión plomo (II). En las fotografías superiores, se ha detectado la presencia de plomo en la pared celular de los microorganismos, mientras que en la fotografía inferior, esta presencia se ha hecho evidente en el citoplasma bacteriano. Resaltar que la presencia de plomo (II) en los microorganismos, ya sea en el citoplasma o en la pared celular, va acompañada de silicio ($K_{\zeta} = 1,739 \text{ KeV}$), fósforo ($K_{\zeta} = 2,013 \text{ KeV}$) y cloro ($K_{\zeta} = 2,623 \text{ KeV}$), tal y como muestra el espectro de rayos X situado en la parte central de la **Figura 77**.

La acumulación de plomo (II) no es general en todos los microorganismos presentes en la biopelícula, tal y como se muestra en la **Figura 78**, en la que no se ha detectado en ningún punto la presencia de plomo (II) en ninguna zona del microorganismo.

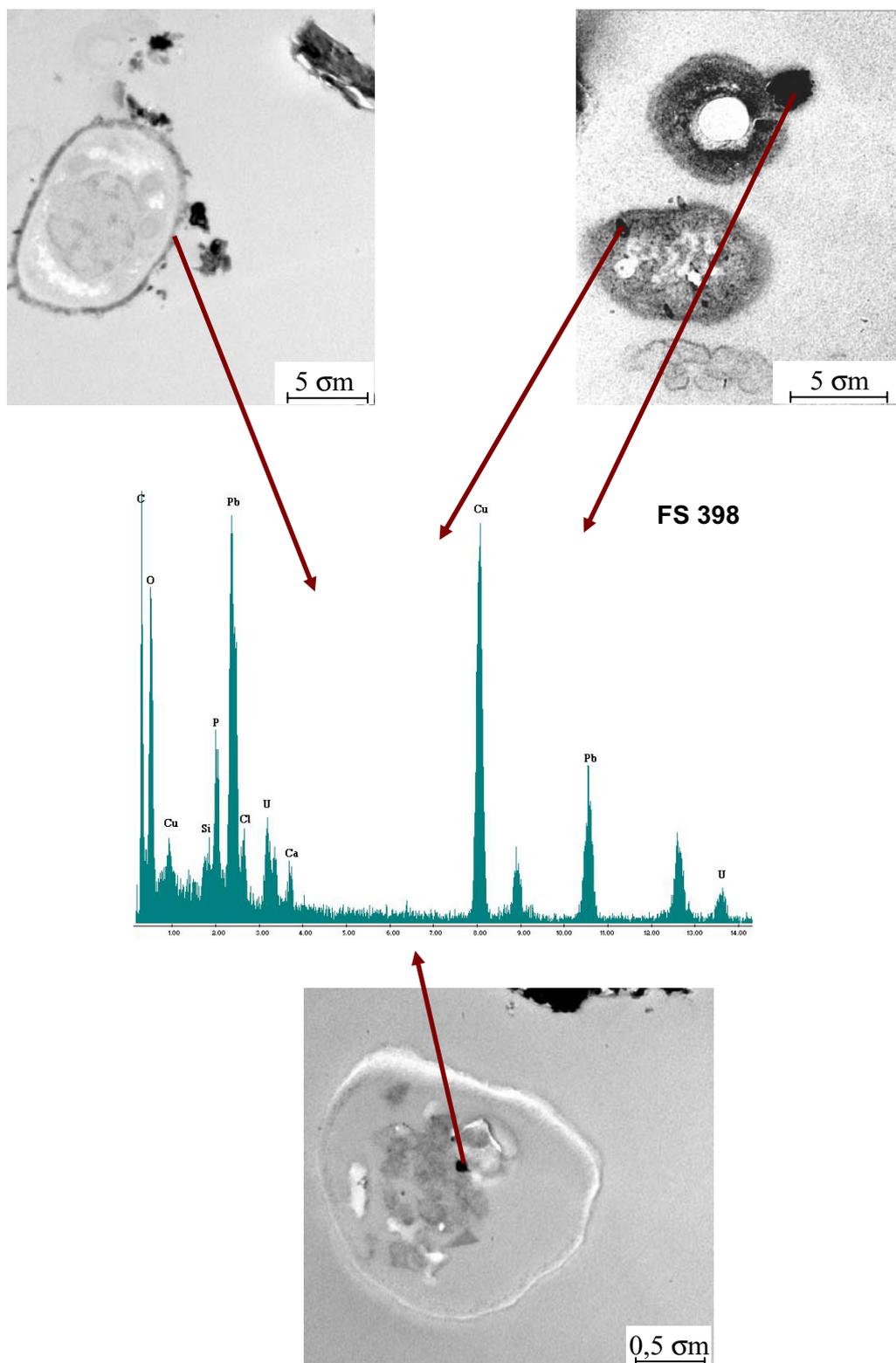


Figura 77: Microfotografía de transmisión de microorganismos presentes en la biopelícula del biofiltro con influente contaminado con ión plumboso, mostrando las zonas en donde se ha detectado la presencia de este metal. Para la tinción se ha empleado acetato de uranilo, razón por la cual se detecta este elemento en los espectros de rayos X. La rejilla empleada como soporte de las muestras fue de cobre y para la tinción de las muestras se empleó acetato de uranilo.

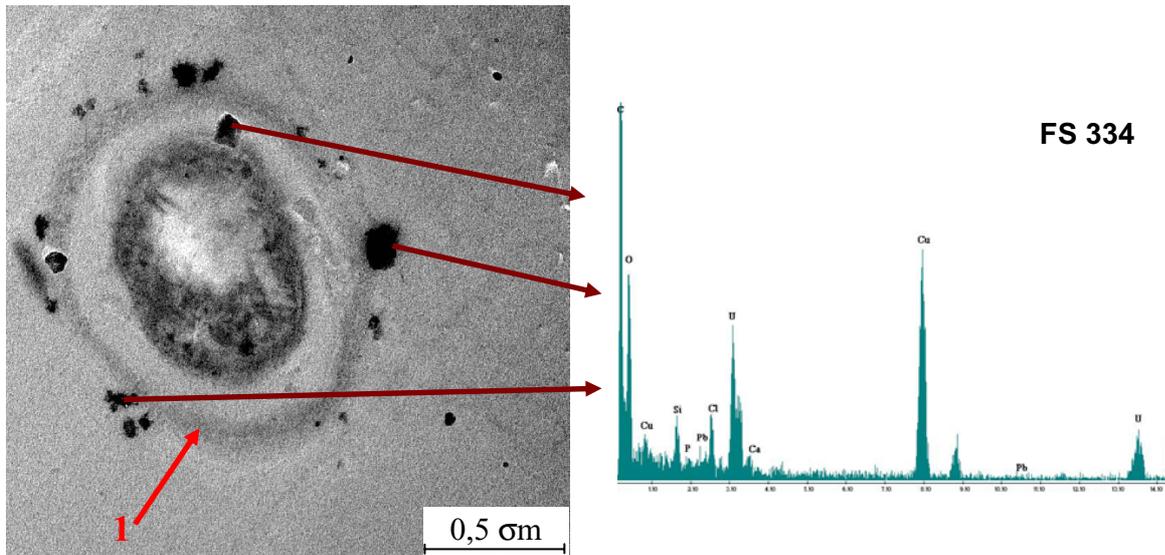


Figura 78: Imagen de transmisión de campo claro de un microorganismo presente en la biopelícula del biofiltro con influente contaminado con plomo (II). Aunque la estructura está mal conservada, si se aprecia la estructura de la membrana citoplasmática (detalle 1), observándose que tanto en el interior como en la parte externa de la membrana no hay presencia de plomo, tal y como se indica en el espectro de rayos X mostrado a la izquierda de la figura.

4.8.4.- Características estructurales de las biopelículas formadas en los biofiltros con influente contaminado con ión crómico

Al igual que acontece con el ión plumboso la presencia de cromo (III) en el agua subterránea tratada no determina cambios drásticos en la estructura de la biopelícula microbiana, en relación a los biofiltros controles. En las **Figura 79** se muestra el aspecto de dichas biopelículas en los puntos de entrada y salida del sistema.

De los resultados obtenidos en nuestro estudio también pudimos comprobar la alta movilidad del metal pesado (ión crómico) a lo largo del biofiltro, pudiéndose observar su presencia en todos los puntos de muestreo (**Figura 80**). Finalmente indicar que el ión crómico quedó adherido a las paredes celulares bacterianas y a las sustancias poliméricas extracelulares que forman parte de la estructura de la biopelícula.

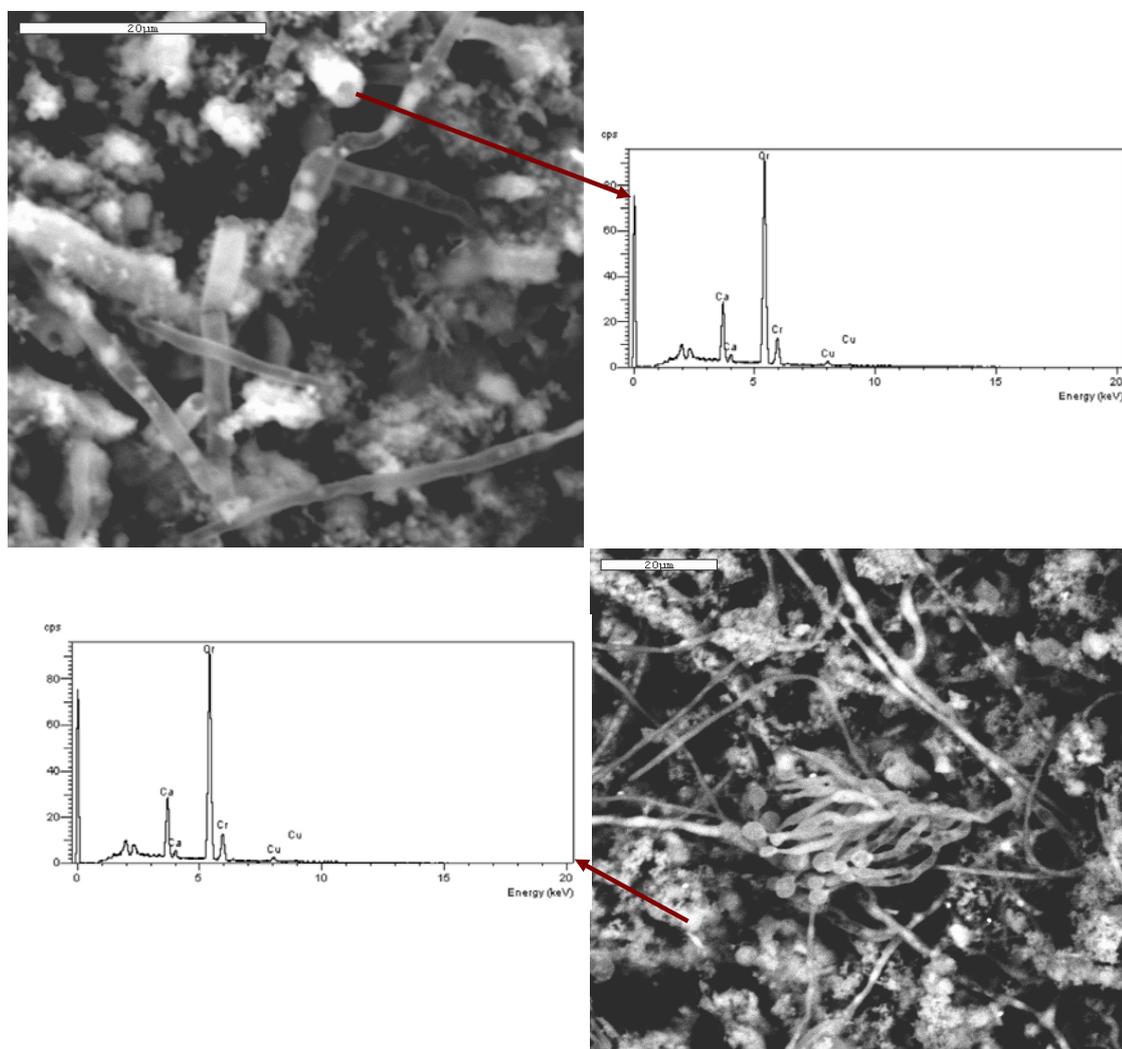


Figura 79: Aspecto de la biopelícula en el punto 1 (fotografía superior) en el biofiltro contaminado con ión crómico (escala 20 μm). Aspecto de la biopelícula en el punto 3 (fotografía inferior, escala 20 μm).

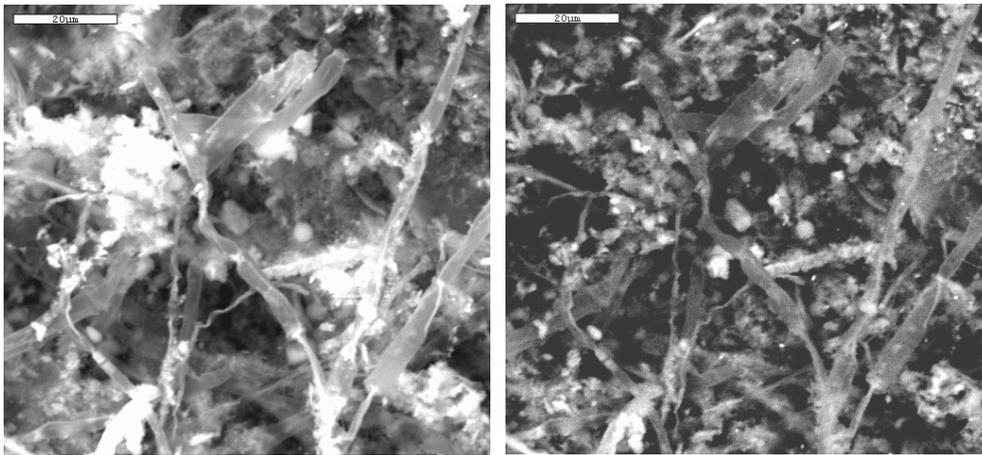


Figura 80: Microfotografías de barrido electrónico en donde se muestra la presencia de cromo en todos los puntos de la biopelícula a lo largo de todo el biofiltro. La figura muestra dos fotografías de la misma zona de la biopelícula mediante diferentes técnicas fotográficas: la imagen de la izquierda realizada mediante SE, en la que se puede observar la gran acumulación de metal pesado, electrónicamente denso, mientras que la imagen de la derecha, mediante BSE, pone en relevancia las zonas de la biopelícula donde la presencia de metal pesado es predominante (zonas más iluminadas de la fotografía).

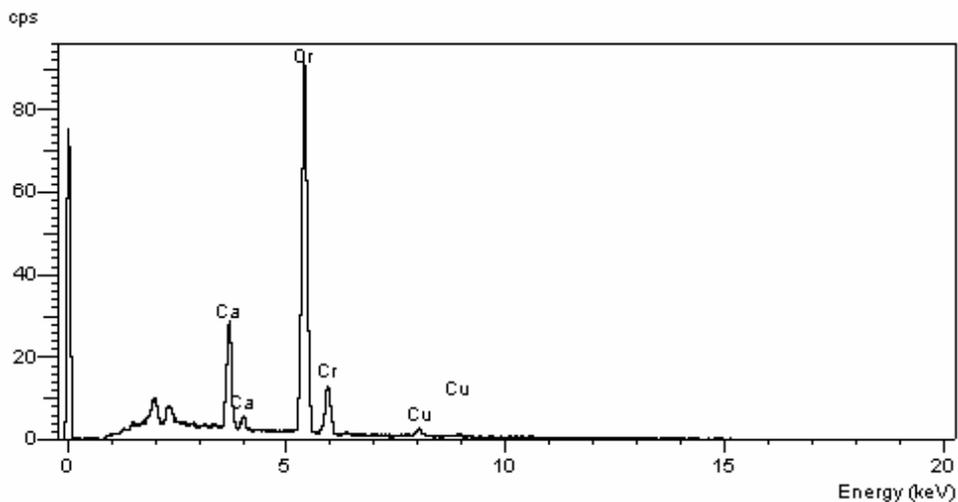


Figura 81: Ampliación del espectro de rayos X en el que se muestra la alta cantidad de cromo presente en todos los puntos analizados de la biopelícula (se puede observar la transición K_{ζ} del cromo a 5,4 KeV y la K_{η} a 5,98 KeV). La movilidad de este catión fue considerablemente mayor en comparación con los demás cationes ensayados que fueron retenidos en la biopelícula.

Para detectar el lugar de depósito del ión crómico en los microorganismos integrantes de la biopelícula, se realizó un estudio de microscopía electrónica de transmisión de la microbiota presente en el biofiltro con influente contaminado con este ión. Hemos podido demostrar cómo este catión, se deposita en la pared celular bacteriana y en el material exopolimérico producido por estos microorganismos (Figura 82).

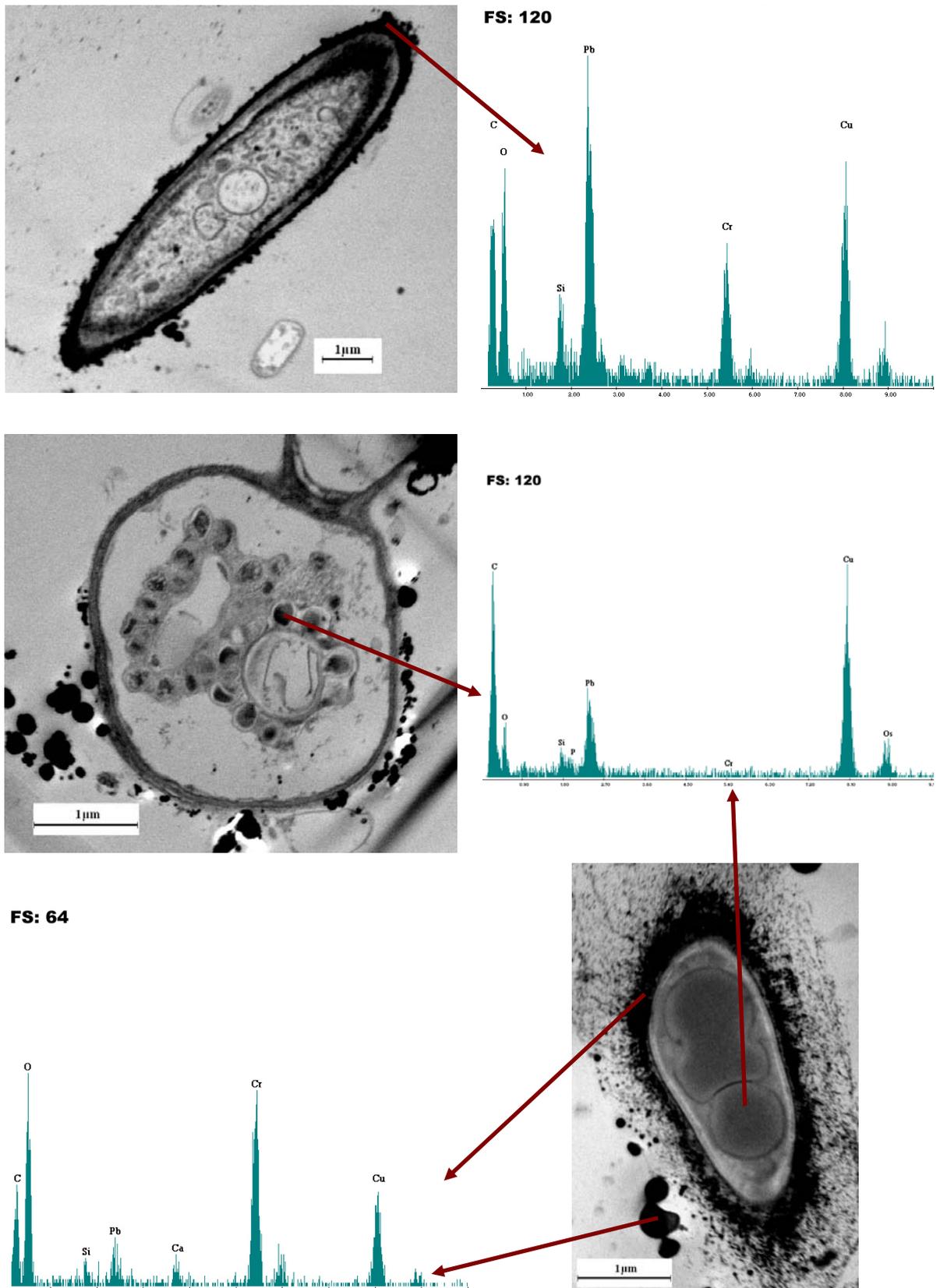


Figura 82: Microfotografía de transmisión de microorganismos presentes en la biopelícula del biofiltro con influente contaminado con ión crómico. En todas las fotografías la escala muestra 1 μm . La presencia de plomo en los espectros de rayos X es debida al empleo de citrato de plomo para el contraste de las muestras mientras que la presencia de cobre se debe a que la rejilla que sirve de soporte para las muestras está compuesta por este elemento.

Mediante el análisis de difracción de rayos X (espectros superior derecha e inferior izquierda de la **Figura 82**), se confirma la presencia de cromo en las estructuras celulares y exopolímeros hallados en la biopelícula. En ningún caso se pudo detectar la presencia de iones crómicos en el interior de las células bacterianas (**Figura 82**), siendo por tanto evidente que este ión metálico es eliminado del influente por su interacción con estructuras celulares bacterianas externas.

En las fotografías central izquierda e inferior derecha de la **Figura 82** se puede observar ausencia de cromo en el interior de los microorganismos encontrados en la biopelícula.

4.8.5.- Características estructurales de las biopelículas formadas en los biofiltros con influente contaminado con ión *m*-arsenito

Si bien es cierto que el ión *m*-arsenito no es eliminado del influente cuando éste pasa a través del biofiltro, se ha observado que esta especie química no presenta ningún efecto tóxico para la microbiota que se desarrolla en la biopelícula, pudiéndose observar en la **Figura 83** el aspecto de ésta en todos los puntos de muestreo a lo largo del biofiltro. En todas las imágenes mostradas se puede observar gran cantidad de sustancias poliméricas extracelulares así como una gran variedad de microorganismos inmersos en este EPS. El análisis de las zonas de la biopelícula pone de manifiesto la ausencia de arsénico en estas estructuras observadas, puesto que la transición $K\zeta$ del arsénico (que ocurre a 10,52 KeV) no se observa en el espectro de rayos X mostrado en la parte central de la **Figura 83**. La identificación de este metaloide no se puede llevar a cabo mediante la transición $L\zeta$ puesto que solapa con la del magnesio, por lo que hay que irradiar la muestra con una energía suficiente (1,6 veces superior a la teórica de la transición que se desea conseguir) para observar la transición $K\zeta$; con estas condiciones experimentales, no se observó presencia de arsénico en las muestras analizadas.

El estudio de transmisión electrónica de la biopelícula generada con influente contaminado con arsénico (III) se muestra en la **Figura 84**, en la que se puede observar microorganismos en fase de división (imágenes superior izquierda e inferior derecha) y microorganismos con abundantes gránulos de polihidroxibutirato (PHB) en el interior celular (imágenes superior derecha e inferior izquierda). El análisis de rayos X (imagen central de la **Figura 84**) muestra que en ninguna estructura celular tiene lugar la acumulación de arsénico, habiéndose analizado las inclusiones de PHB, las paredes celulares y las

partículas electrónicamente densas halladas en el interior de algunos microorganismos (imagen superior izquierda de la **Figura 84**).

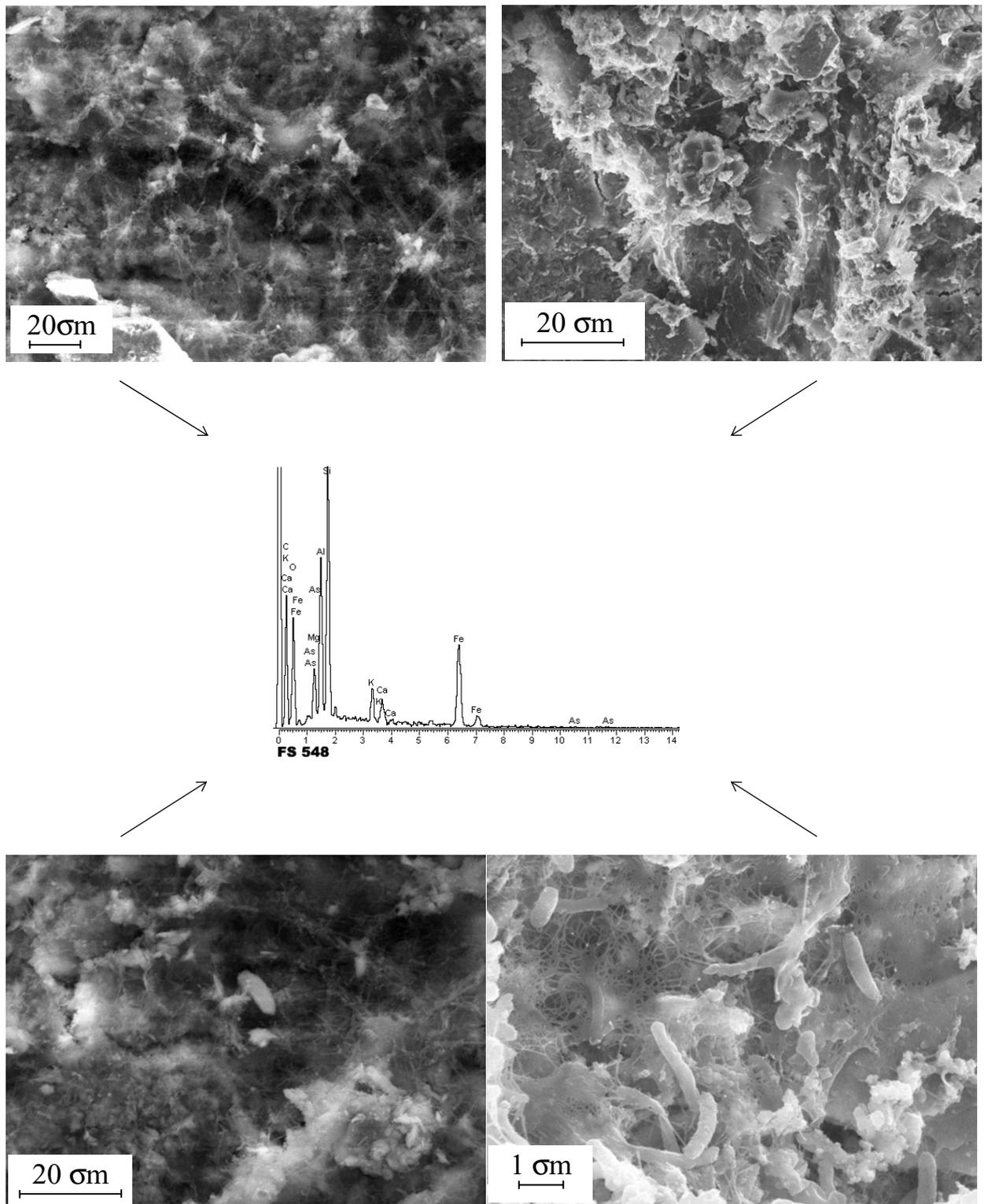


Figura 83: Fotografías de microscopía electrónica de barrido de la biopelícula formada en el biofiltro con influente contaminado con arsénico (III). En todos los puntos de la biopelícula en los que realizó el análisis de rayos X, sustancias poliméricas extracelulares y microorganismos, no se halló presencia de arsénico, tal y como muestra el espectro de rayos X mostrado en la parte central de la figura.

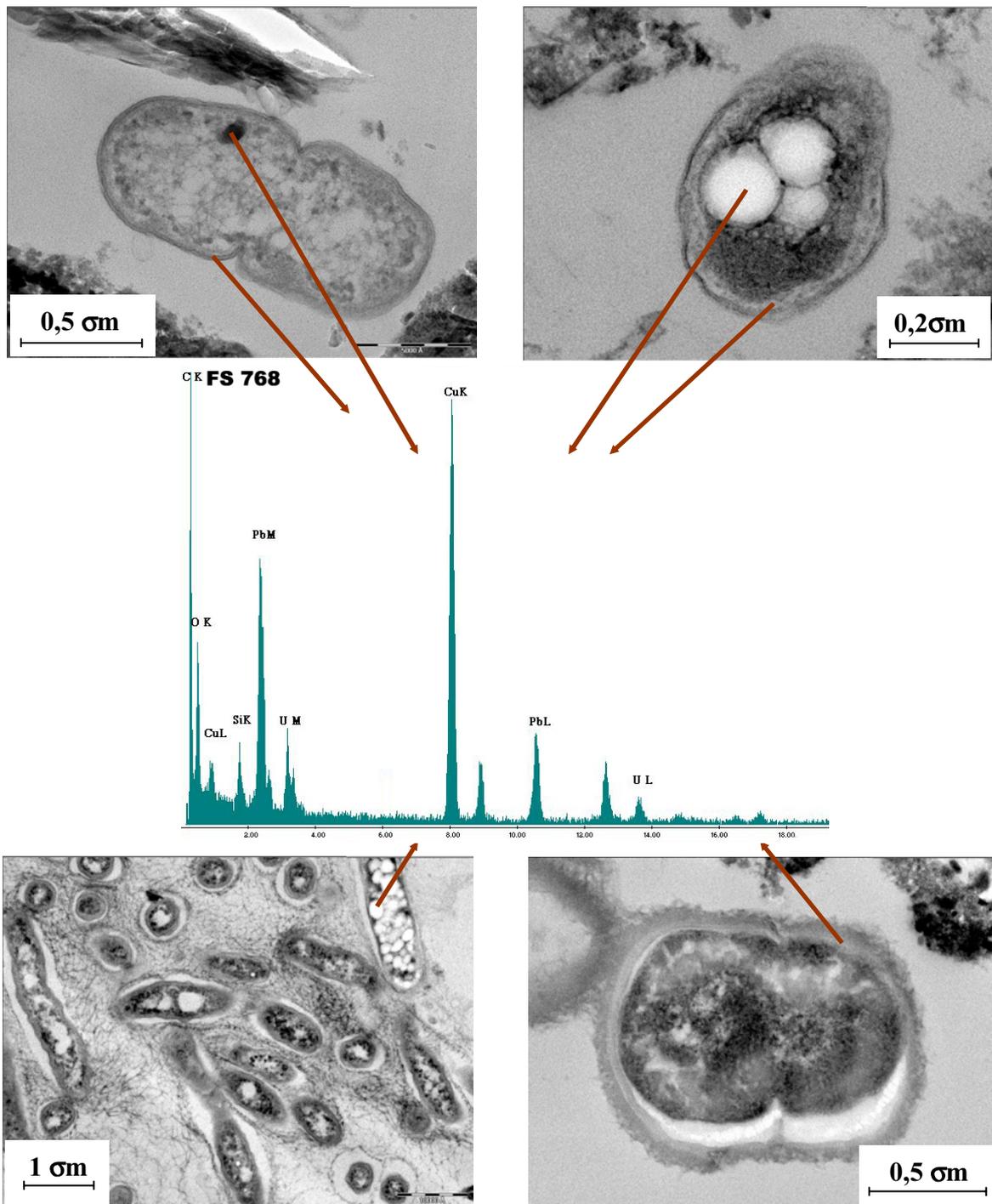


Figura 84: Imágenes de transmisión de los microorganismos que se desarrollan en la biopelícula formada con presencia de arsénico (III). Obsérvese la ausencia de arsénico, en el espectro de rayos X, en todos los puntos analizados (mostrados con flechas). La presencia de plomo y uranio se debe al empleo de citrato de plomo y acetato de uranilo en el proceso de contraste de las muestras y la de cobre a la composición de la rejilla empleada como soporte de las mismas.

4.9.- Estudios de biodiversidad

De cada uno de los filtros estudiados (control, cobre, plomo, cromo y arsénico) se realizaron estudios de biodiversidad atendiendo al tiempo de toma de muestras y en función de los puntos de muestreo, con objeto de realizar un seguimiento temporal y espacial de la microbiota presente en las biopelículas de los biofiltros.

4.9.1.-Amplificación y separación de fragmentos del gen codificante del ARN ribosómico 16S mediante PCR y TGGE

Dado que el gen codificante del ARN ribosómico 16S (ADNr 16S) cumple con los requisitos para actuar como buena sonda evolutiva, se procedió a la amplificación de la región hipervariable V3 de dicho gen a partir del ADN total de la comunidad procariota presente en las biopelículas de cada uno de los biofiltros objeto de estudio. Los fragmentos resultantes de la amplificación se sometieron a una TGGE para obtener los perfiles de poblaciones de cada biofiltro y posteriormente reamplificar y secuenciar las distintas bandas obtenidas para poder así determinar la afiliación taxonómica de cada individuo.

En todos los biofiltros se realizó un muestreo en los cuatro puntos situados a diferentes alturas del biofiltro, para estudiar la variación espacial de la microbiota en los biofiltros. Además, en los biofiltros con influentes contaminados con cobre (II) y plomo (II) se llevaron a cabo dos muestreos con treinta y sesenta y un días, respectivamente, de diferencia para observar la variación temporal de la diversidad de la comunidad microbiana de las biopelículas.

4.9.1.1.- Biofiltro control

En la **Figura 85** se muestran los perfiles de poblaciones obtenidos mediante TGGE en el biofiltro control en los cuatro puntos de muestreo. Cabe destacar la similitud de los perfiles de población a lo largo del recorrido del influente, puesto que casi la totalidad de las bandas están presentes en todos los puntos de muestreo, sin embargo, se observa la aparición o desaparición de algunas bandas a lo largo del recorrido del influente, tal y como se muestra en los detalles de la **Figura 85** marcados con asterisco.

Se procedió a la reamplificación de un total de veintidós bandas procedentes de tres geles diferentes, de las cuales sólo tres se pudieron identificar, por comparación con las secuencias de ADNr 16S depositadas en la base de datos EMBL (**Tabla 64**), ya que el resto, tras varios intentos, o bien no se pudieron reamplificar o bien, de ellas se obtuvieron

secuencias con un alto número de indeterminaciones, quizás debido a fenómenos de solapamiento de bandas.

Las tres bandas identificadas pertenecen a tres clases taxonómicas diferentes, como se indica en la **Tabla 64**, la secuencia de la banda **B10** tiene un 99 % de similitud con *Dechloromonas* sp. y *Ferribacterium limneticum*, pertenecientes a las Beta-proteobacterias, la secuencia de la banda **B4-13** con un 100 % de similitud a *Sphingomonas* sp., perteneciente a las Alfa-proteobacterias, y la secuencia de la banda **B3a-15** que presenta una similitud del 95 % con una bacteria no identificada encuadrada en las Acido-bacterias.

Tabla 64: Identificación de las bandas secuenciadas del gen mostrado en la **Figura 82**, presentes en la biopelícula formada en el biofiltro control.

| Banda | Afiliación taxonómica más probable (Clase) | Microorganismo más similar | Longitud de solapamiento | Número de acceso | %Identidad/ %Similitud |
|---------------|--|---|--------------------------|------------------|---------------------------|
| B10 | Beta-proteobacteria | <i>Dechloromonas</i> sp. | 160 | AY032610 | 96 / 99 |
| | | <i>Ferribacterium limneticum</i> | 160 | UBPR16S | 96 / 99 |
| | | Bacteria perclorato-reductora | 160 | AY265866 | 96 / 99 |
| B4-13 | Alfa-proteobacteria | Alfa-proteobacteria TH-S43 | 135 | AJ86002 | 97 / 100 |
| | | <i>Sphingomonas</i> sp HS352 | 135 | AY116884 | 97 / 100 |
| B3a-15 | Acido-bacterias | Bacteria no identificada clon Qui2P1-34 | 160 | UBA518479 | 95 / 95 |
| | | Bacteria no identificada clon Neu2P2-97 | 161 | UBA518345 | 93 / 97 |
| | | Clon acido-bacteria FTLM5 | 160 | AF529125 | 93 / 93 |

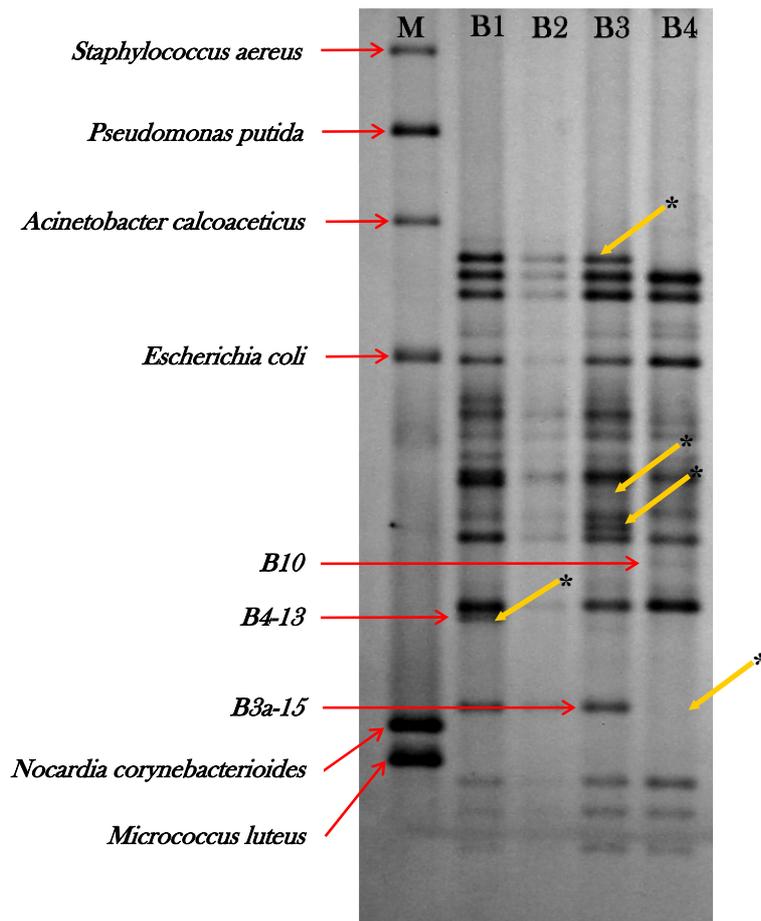


Figura 85: TGGE de fragmentos del gen ADNr 16S (región V3), amplificado por PCR a partir de muestras de ADN extraídas de biopelícula aislada del biofiltro control. En el carril izquierdo (denominado M) del gel se muestran las cepas que se han empleado como marcadores, las cuales presentan diferente porcentaje de G + C. Los cuatro carriles restantes se han nombrado de B1 a B4, haciendo referencia a los cuatro puntos de muestreo del biofiltro control. Los asteriscos muestran bandas que aparecen o desaparecen a lo largo del recorrido del influente.

4.9.1.2.- Biofiltro con influente contaminado con cobre (II)

En la **Figura 86** se puede observar los perfiles de poblaciones en el biofiltro contaminado con cobre (II) a los 90 días de funcionamiento (Cu I) y a los 121 días de funcionamiento (Cu II). Este biofiltro presentó estabilidad temporal en cuanto al perfil de bandas presente en el gel, si bien es cierto, que destaca cómo la influencia temporal afecta en especial a la banda denominada Cu 9, la cual está presente sólo en el segundo muestreo.

Se observan diferentes intensidades en algunas de las bandas presentes en el biofiltro en función del tiempo, lo que indica aumento o disminución relativos, de la abundancia de los microorganismos que componen la comunidad procariota presente en la biopelícula.

En lo que se refiere a la variación espacial, se puede apreciar cómo este biofiltro presenta una población constante a lo largo del recorrido del influente, presentando las mismas bandas en los cuatro puntos de muestreo. Las intensidades de las bandas en todos los puntos son similares en la mayoría de los casos, lo que indica que la abundancia relativa de los miembros que componen la comunidad procariota es constante a lo largo del recorrido del influente.

Se trató de reamplificar un total de veinte bandas, de las que se secuenciaron un total de catorce, las cuales se han nombrado tal y como se muestra en la **Figura 86**, e identificado por comparación con las secuencias de ADNr 16S depositadas en la base de datos EMBL (**Tabla 65**).

Tabla 65: Identificación de las bandas secuenciadas del gen mostrado en la Figura 83, presentes en la biopelícula formada en el biofiltro cobre.

| Banda | Afiliación taxonómica más probable | Microorganismo más similar | Longitud de solapamiento | Número de acceso | %Identidad/ %Similitud |
|---------|------------------------------------|---|--------------------------|------------------|---------------------------|
| CuI-1-1 | Alfa-proteobacteria | <i>Erythrobacter</i> sp. | 135 | AY664125 | 97 / 100 |
| | | <i>Sphingomonas</i> sp. | 135 | AJ812013 | 97 / 100 |
| | | <i>Blastomonas natatoria</i> | 135 | BNA250434 | 97 / 100 |
| CuI-1-2 | Alfa-proteobacteria | <i>Sphingomonas xenophaga</i> | 135 | AB099631 | 100 / 100 |
| | | <i>Porphyrobacter tepidarius</i> | 135 | AY568499 | 99 / 99 |
| CuI-1-6 | Alfa-proteobacteria | <i>Sphingobium yanoikuyae</i> | 135 | AY619556 | 97 / 100 |
| | | <i>Sphingomonas oligophenolica</i> | 135 | AB018439 | 97 / 99 |
| Cu6 | Alfa-proteobacteria | Bacteria no cultivada | 135 | AY475200 | 97 / 100 |
| | | <i>Sphingomonas</i> sp. | 135 | SSP313029 | 97 / 99 |
| CuI-2-7 | Alfa-proteobacteria | Alfa-proteoBacteria TH-S43 | 135 | AJ786002 | 96 / 100 |
| | | <i>Sphingomonas</i> sp. | 135 | SSP313029 | 95 / 99 |
| CuI-1-8 | Alfa-proteobacteria | <i>Sphingomonas</i> sp. no cultivada | 135 | AY635879 | 99 / 100 |
| | | <i>Paralactobacillus</i> sp. no cultivado | 135 | AY129797 | 98 / 99 |

Tabla 65 cont.: Identificación de las bandas secuenciadas del gen mostrado en la Figura 86, presentes en la biopelícula formada en el biofiltro cobre.

| Banda | Afiliación taxonómica más probable | Microorganismo más similar | Longitud de solapamiento | Número de acceso | %Identidad/ %Similitud |
|----------|------------------------------------|--|--------------------------|------------------|---------------------------|
| CuI-1-10 | Alfa-proteobacteria | <i>Sphingomonas</i> sp. <i>HS352</i> | 135 | AY116884 | 100 / 100 |
| | | <i>Paralactobacillus</i> sp. <i>no cultivado</i> | 135 | AY129797 | 99 / 99 |
| CuI-1-11 | Eubacteria | Eubacteria no cultivada | 151 | AF445657 | 98 / 98 |
| | | Bacteria no cultivada | 152 | AY544212 | 95 / 95 |
| | | <i>Propionibacterium acidipropionici</i> | 155 | AJ704569 | 80/80 |
| CuI-2-5 | Alfa-proteobacteria | <i>Bacteria no cultivada</i> | 135 | AY268346 | 100 / 100 |
| | | <i>Sphingomonas</i> sp. | 135 | AJ617690 | 100 / 100 |
| CuII-1-4 | Alfa-proteobacteria | <i>Sphingomonas</i> sp. | 135 | D84518 | 100 / 100 |
| | | Bacteria no cultivada | 135 | AY268256 | 100 / 100 |
| CuII-4-5 | Alfa-proteobacteria | Bacteria no cultivada | 135 | AY268256 | 100 / 100 |
| | | <i>Brevundimonas vesicularis</i> | 135 | AB193264 | 92 / 100 |
| | | <i>Asticcacaulis</i> sp. | 135 | AY136075 | 92 / 100 |
| Cu7 | Alfa-proteobacteria | Bacteria no cultivada | 135 | AY268346 | 99 / 100 |
| | | <i>Sphingomonas</i> sp. | 135 | AJ313029 | 98 / 99 |
| Cu8 | Alfa-proteobacteria | <i>Rhodobacter gluconicum</i> | 135 | AB077986 | 94 / 97 |
| | | Bacteria no cultivada | 135 | AY102903 | 95 / 100 |
| Cu9 | Alfa-proteobacteria | <i>Sphingomonas sibiricus</i> | 135 | SSY10678 | 98 / 98 |
| | | Bacteria no cultivada | 135 | AF353286 | 100 / 100 |

De las catorce bandas secuenciadas, trece pertenecen a la clase taxonómica de las Alfa-proteobacterias, todas ellas con más de un 99 % de similitud con las existentes en la base de datos, destacando *Sphingomonas* como género predominante en la comunidad de la biopelícula desarrollada en presencia de cobre (II) (Tabla 65). La banda denominada como *CuI-1-11* presenta un 98 % de identidad con la secuencia AF445657, perteneciente a una eubacteria no cultivada y un 80 % de identidad con la secuencia AJ704569, perteneciente a una cepa bacteriana del Orden de las Actinomicetales y Familia *Propionibacteriaceae*.

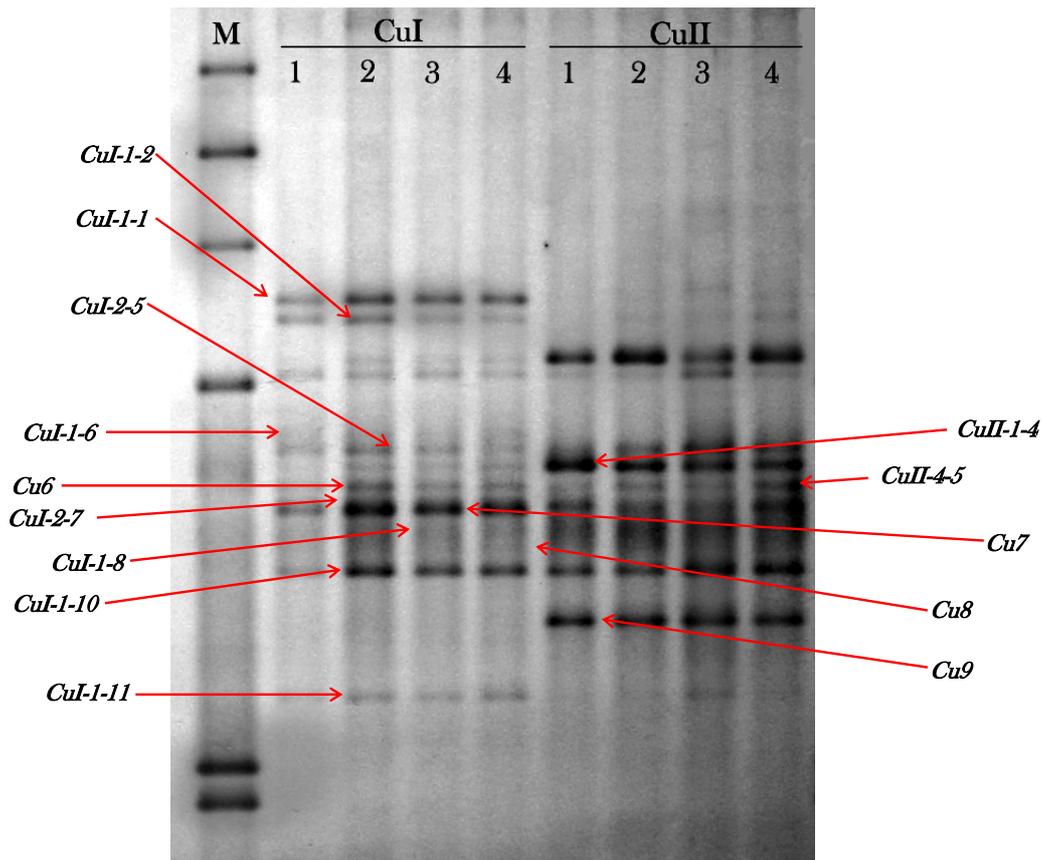


Figura 86: TGGE del ADNr 16S (región V3) de la comunidad bacteriana presente en el biofiltro con influente contaminado con cobre (II). Los cuatro carriles nombrados como Cu I se tomaron en los puntos de muestreo 1 a 4 del día 90 de funcionamiento continuo del biofiltro, mientras que los cuatro siguientes, nombrados como Cu II, se tomaron en dichos puntos de muestreo el día 121. Como marcadores (carril M) se emplearon las mismas secuencias de ADNr 16S que en el biofiltro control.

4.9.1.3.- Biofiltro con influente contaminado con plomo (II)

En el biofiltro con influente contaminado con plomo (II) se realizaron tres muestreos, a los 50, a los 51 y a los 112 días de funcionamiento, para observar variación temporal y espacial, al igual que en el caso del biofiltro con cobre (II).

En la **Figura 87** se pueden observar los perfiles de poblaciones bacterianas en la biopelícula tanto en función del tiempo como del recorrido del influente a lo largo del biofiltro. Tras 61 días de funcionamiento los perfiles son prácticamente idénticos, por lo que en este biofiltro, al igual que en el caso del biofiltro con cobre (II), la composición de la comunidad microbiana permanece constante. En cuanto a la variación espacial, se puede observar cómo el perfil de poblaciones también permanece prácticamente constante a lo largo del recorrido del influente. En el muestreo realizado el día 112 de funcionamiento, se

observa la banda *Pb112-2-13* con mayor intensidad que en los otros muestreos realizados, lo que indica un incremento relativo con respecto al resto de la comunidad procariota presente en la biopelícula. Así, se observa que en el muestreo realizado el día 51, la banda *Pb50-3-5* presenta la misma intensidad que la anteriormente mencionada, mientras que en el día 112, la intensidad de ésta última es muy superior a la primera.

De todas las bandas presentes en el gel, se reamplificaron un total de veinticuatro y se consiguieron secuenciar e identificar solamente nueve, debido a problemas tanto de amplificación como de solapamiento de bandas, lo que originó secuencias con un alto número de indeterminaciones.

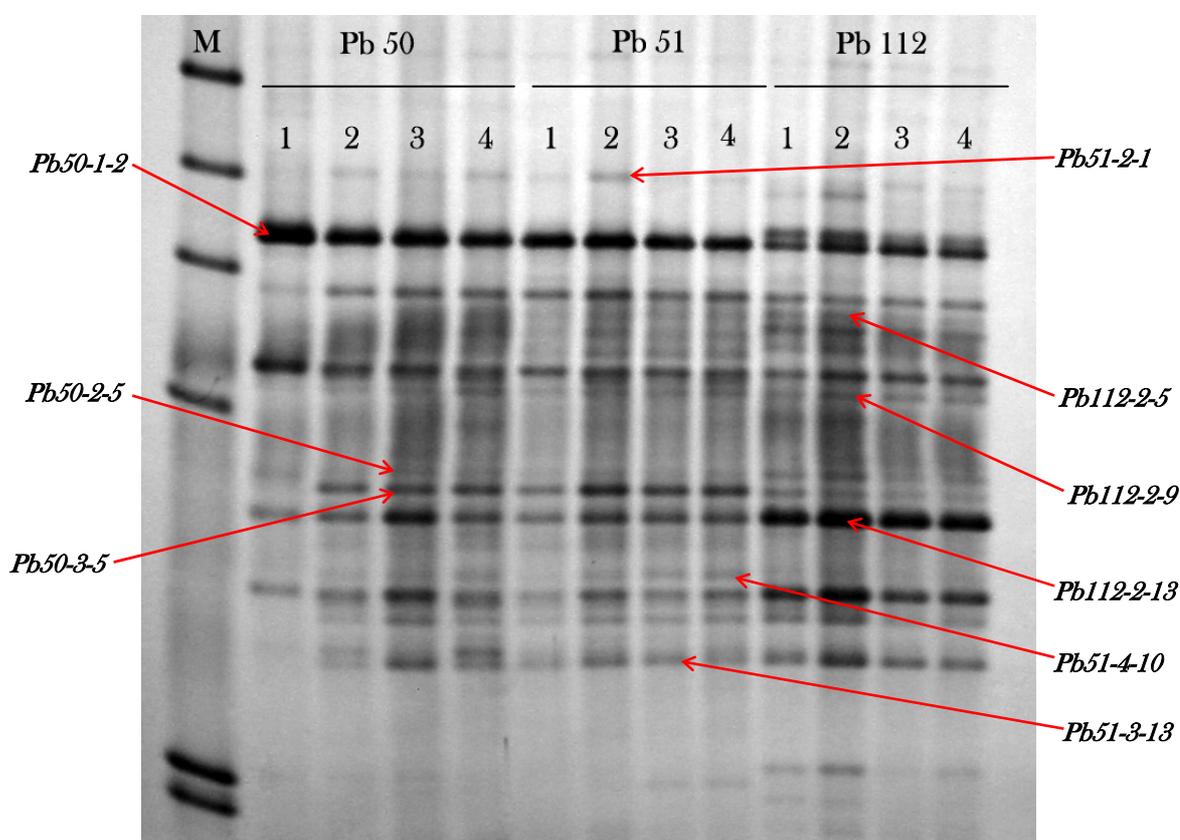


Figura 87: TGGE del ADNr 16S (región V3) de la comunidad bacteriana presente en el biofiltro con influente contaminado con plomo (II). Los cuatro carriles nombrados como Pb 50 pertenecen al muestreo realizado en el día 50 de funcionamiento continuo del biofiltro en los cuatro puntos de muestreo. Los otros muestreos se realizaron los días 51 y 112.

De las nueve bandas extraídas y secuenciadas dos de ellas se afiliaron a Beta-proteobacterias y el resto a Alfa-proteobacterias (Tabla 66). Destacan los microorganismos similares a *Rhodobacter* en la biopelícula de este biofiltro.

Tabla 66: Identificación de las bandas secuenciadas del gen mostrado en la Figura 87, presentes en la biopelícula formada en el biofiltro plomo.

| Banda | Afiliación taxonómica más probable (Clase) | Microorganismo más similar | Longitud de solapamiento | Número de acceso | %Identidad/ %Similitud |
|----------------------|--|-------------------------------|--------------------------|------------------|---------------------------|
| Pb50-1-2 | Beta-proteobacteria | Bacteria acuática RUB_R2A_15 | 160 | AF148973 | 98 / 98 |
| | | Beta-proteobacteria | 160 | AF236006 | 95 / 95 |
| | | Eubacteria no cultivada | 160 | AF175619 | 95 / 95 |
| Pb50-2-5 Pb50-3-5 | Alfa-proteobacteria | Bacteria no cultivada | 135 | AY212706 | 100 / 100 |
| | | <i>Rhodobacter gluconicum</i> | 135 | AB077986 | 97 / 97 |
| Pb51-2-1 | Beta-proteobacteria | <i>Pseudomonas</i> sp. | 160 | AJ617689 | 91 / 96 |
| | | <i>Acidovorax</i> sp. | 160 | AY635986 | 90 / 95 |
| Pb112-2-5 | Alfa-proteobacteria | Bacteria no identificada | 135 | UBA518619 | 94 / 97 |
| | | <i>Methylopila</i> sp. | 135 | AY466434 | 92 / 95 |
| Pb112-2-9 | Alfa-proteobacteria | Bacteria no cultivada | 135 | AY102903 | 97 / 99 |
| | | <i>Rhodobacter gluconicum</i> | 136 | AB077986 | 96 / 97 |
| Pb112-2-13 | Alfa-proteobacteria | <i>Rhodovulum</i> sp. | 135 | AB214344 | 94 / 97 |
| | | Bacteria no cultivada | 135 | AY102903 | 95 / 98 |
| Pb51-4-10 | Alfa-proteobacteria | Bacteria no cultivada | 135 | AY102903 | 97 / 100 |
| | | <i>Rhodobacter gluconicum</i> | 135 | AB077986 | 94 / 97 |
| Pb51-3-13 | Alfa-proteobacteria | Bacteria no cultivada | 135 | AY102903 | 99 / 99 |
| | | <i>Rhodobacter gluconicum</i> | 135 | AB077986 | 98 / 98 |

4.9.1.4.- Biofiltro con influente contaminado con cromo (III)

En el biofiltro con influente contaminado con cromo (III) se realizaron dos muestreos, los días 39 y 41 de funcionamiento continuo del biofiltro. En la Figura 88 se puede observar el perfil de poblaciones presentes en la biopelícula de este biofiltro. Al igual que ocurría en los biofiltros anteriores, a lo largo del recorrido del influente los perfiles de población son muy similares.

De las veintiocho bandas extraídas se secuenciaron con éxito un total de dieciséis, mostradas en la Figura 88.

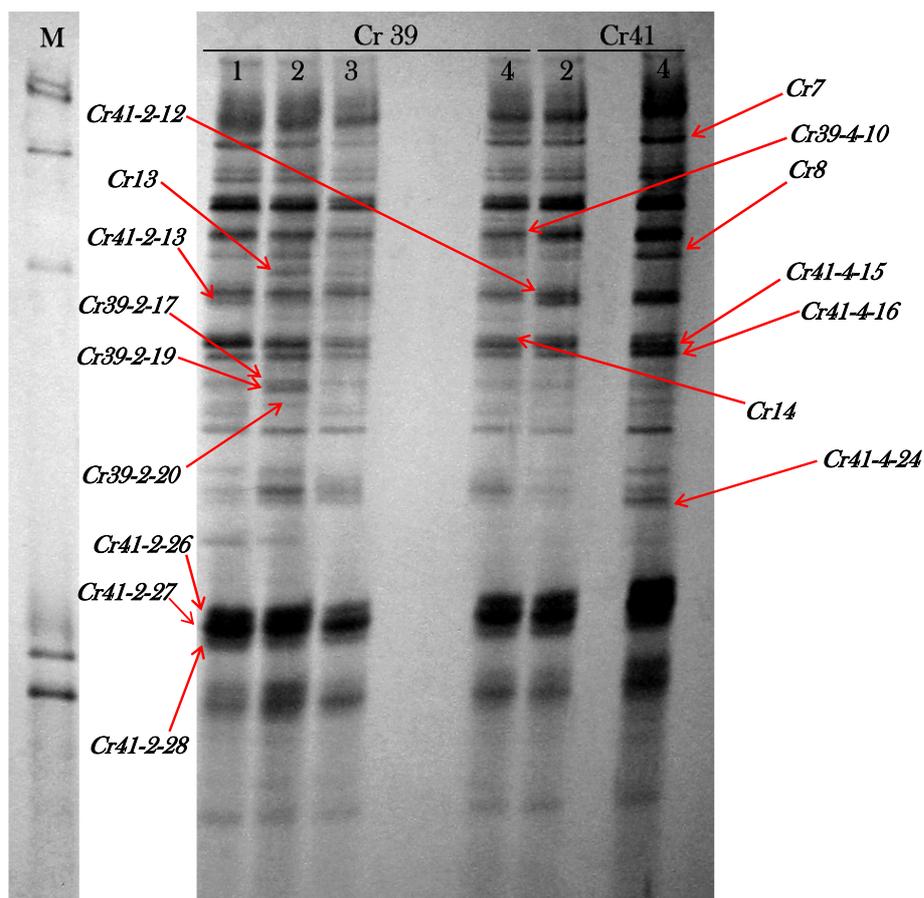


Figura 88: TGGE del ADNr 16S (región V3) de la comunidad bacteriana presente en las biopelículas del biofiltro con influente contaminado con cromo (III). Del ADN extraído en los puntos de muestreo Cr41-1 y Cr41-3 no se obtuvo amplificación alguna.

En la **Tabla 67** se detalla la identificación de las bandas reamplificadas y secuenciadas con éxito. De las dieciséis bandas secuenciadas, nueve tienen similitud con Beta-proteobacterias, mientras que las otras siete lo tienen con Alfa-proteobacterias. Destacan, dentro del primer grupo, microorganismos similares a *Comamonas*, *Aquaspirillum*, y *Variovorax*, mientras que del segundo destacan los similares a *Methylopila* y *Bradyrhizobium*.

Tabla 67: Identificación de las bandas secuenciadas del gel mostrado en la Figura 88, presentes en la biopelícula formada en el biofiltro cromo.

| Banda | Afiliación taxonómica más probable (Clase) | Microorganismo más similar | Longitud de solapamiento | Número de acceso | %Identidad/ %Similitud |
|-----------|--|---|--------------------------|------------------|---------------------------|
| Cr41-2-12 | Beta-proteobacteria | Bacteria desnitrificante oxidadota de hierro | 160 | DFU51105 | 98 / 99 |
| | | <i>Acidovorax delafieldii</i> | 160 | AJ420323 | 98 / 99 |
| | | <i>Comamonas</i> sp. | 160 | AB008429 | 96 / 97 |
| | | <i>Aquaspirillum metamorphum</i> | 160 | AF078757 | 96 / 98 |
| | | <i>Hidrogenophaga palleronii</i> | 160 | AF078769 | 95 / 96 |
| Cr13 | Beta-proteobacteria | <i>Rhodoferrax</i> sp. | 160 | AY788965 | 94 / 96 |
| | | Bacteria no cultivada | 160 | AJ575699 | 94 / 96 |
| Cr41-2-13 | Beta-proteobacteria | <i>Aquaspirillum delicatum</i> | 160 | AF078756 | 96 / 98 |
| | | <i>Acidovorax avenae</i> | 160 | AY512827 | 95 / 96 |
| Cr39-2-17 | Alfa-proteobacteria | Bacteria no cultivada | 135 | AB126358 | 97 / 99 |
| | | Bacteria no cultivada aislada en minas de oro | 135 | AF337870 | 97 / 99 |
| | | <i>Sphingomonas</i> sp. | 135 | AJ313029 | 97 / 99 |
| Cr39-2-19 | Alfa-proteobacteria | <i>Reichenowia pictae</i> | 135 | AY316685 | 94 / 96 |
| | | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 135 | AY306224 | 94 / 96 |
| | | <i>Rhizobium</i> sp. | 135 | AY306217 | 94 / 96 |
| Cr39-2-20 | Alfa-proteobacteria | Bacteria no cultivada | 108 | AF546914 | 97 / 100 |
| | | <i>Methylopila</i> sp. | 108 | AY466434 | 96 / 99 |
| Cr41-2-26 | Beta-proteobacteria | <i>Aquaspirillum delicatum</i> | 160 | AF078756 | 97 / 98 |
| | | <i>Comamonas</i> sp. | 160 | AY566581 | 96 / 97 |
| Cr41-2-27 | Beta-proteobacteria | <i>Variovorax</i> sp. | 160 | AY238498 | 96 / 98 |
| | | Bacteria no cultivada | 160 | AY160868 | 96 / 98 |
| Cr41-2-28 | Beta-proteobacteria | <i>Acidovorax</i> sp. | 143 | AJ277707 | 95 / 97 |
| | | <i>Aquaspirillum delicatum</i> | 143 | AF078756 | 95 / 97 |
| Cr7 | Beta-proteobacteria | <i>Massilia cf. timonae</i> | 160 | AY157762 | 96 / 96 |
| | | <i>Zoogloea</i> sp. | 160 | AY437629 | 95 / 95 |

Tabla 67 (cont.): Identificación de las bandas secuenciadas del gel mostrado en la Figura 88, presentes en la biopelícula formada en el biofiltro cromo.

| Banda | Afiliación taxonómica más probable (Clase) | Microorganismo más similar | Longitud de solapamiento | Número de acceso | %Identidad/ %Similitud |
|-----------|--|-----------------------------------|--------------------------|------------------|---------------------------|
| Cr41-4-15 | Alfa-proteobacteria | Bacteria aislada en un glacial | 135 | AF479379 | 100 / 100 |
| | | <i>Bosea thiooxidans</i> | 135 | AF508803 | 100 / 100 |
| | | Bacteria metanotrófica | 135 | AF068118 | 100 / 100 |
| Cr41-4-16 | Alfa-proteobacteria | <i>Bosea</i> sp. | 135 | BSP313022 | 92 / 100 |
| | | <i>Bosea minatitlanensis</i> | 135 | AF273081 | 92 / 100 |
| Cr14 | Alfa-proteobacteria | Bacteria no cultivada | 109 | AB094938 | 95 / 100 |
| | | <i>Bradyrhizobium</i> sp. | 109 | AF352563 | 94 / 99 |
| Cr41-4-24 | Alfa-proteobacteria | <i>Agrobacterium</i> sp. | 135 | AY225504 | 94 / 99 |
| | | <i>Rhizobium</i> sp. | 135 | AY306217 | 94 / 99 |
| Cr39-4-10 | Beta-proteobacteria | Bacteria no cultivada | 160 | AF422672 | 99 / 99 |
| | | <i>Variovorax paradoxus</i> | 160 | AF508103 | 98 / 98 |
| Cr8 | Beta-proteobacteria | Bacteria no cultivada | 160 | AY212632 | 95 / 100 |
| | | <i>Aquaspirillum sychrophilum</i> | 160 | AF078755 | 93 / 98 |

4.9.1.5.- Biofiltro con influente contaminado con arsénico (III) (en la forma de *m*-arsenito)

En el biofiltro con arsénico (III) se tomaron muestras de los cuatro puntos de muestreo a los 48 días de funcionamiento continuo. En la **Figura 89** se muestra el perfil de población del biofiltro contaminado con arsénico, en el que se puede observar la similitud del perfil de bandas a lo largo del recorrido del influente.

Se intentó la reamplificación de catorce bandas del gel, de las que se secuenciaron con éxito un total de siete (**Figura 89**). La identificación de estas siete bandas (**Tabla 68**) mostró la abundancia en la biopelícula de Alfa-proteobacterias (seis de siete bandas secuenciadas) de las que destacan bacterias similares a *Agrobacterium*, *Kaistina*, *Methylopila*, *Caulobacter* y *Brucella*. La única banda secuenciada afiliada a las Beta-proteobacterias es similar a *Rhodocyclus*.

Tabla 68: Identificación de las bandas secuenciadas del gen mostrado en la Figura 89, presentes en la biopelícula formada en el biofiltro arsénico.

| Banda | Afiliación taxonómica más probable (Clase) | Microorganismo más similar | Longitud de solapamiento | Número de acceso | %Identidad/ %Similitud |
|---------|--|----------------------------------|--------------------------|------------------|---------------------------|
| As-1-1 | Alfa-proteobacteria | <i>Brevundimonas</i> sp. | 135 | AY439267 | 100 / 100 |
| | | <i>Caulobacter</i> sp. | 135 | CSY14151 | 97 / 97 |
| | | <i>Asticcacaulis</i> sp. | 135 | AB093140 | 98 / 98 |
| As-2-8 | Alfa-proteobacteria | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 135 | AY306224 | 100 / 100 |
| | | <i>Rhizobium tropici</i> | 135 | AY117618 | 100 / 100 |
| | | <i>Reichenowia ornatae</i> | 135 | AY316684 | 100 / 100 |
| As2 | Beta-proteobacteria | <i>Rhodocyclus</i> sp. | 160 | AF431239 | 98 / 98 |
| | | Beta-proteobacteria no cultivada | 160 | AF431239 | 98 / 98 |
| As3 | Alfa-proteobacteria | <i>Methylophila capsulata</i> | 135 | AF004844 | 97 / 97 |
| | | <i>Kaistina koreensis</i> | 135 | AB127972 | 97 / 97 |
| | | <i>Allorhizobium undicola</i> | 135 | AUY17047 | 97 / 97 |
| As-2-11 | Alfa-proteobacteria | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 135 | AF508095 | 98 / 99 |
| | | <i>Brucella</i> sp. | 135 | AF027600 | 97 / 98 |
| | | <i>Ochrobactrum</i> sp. | 135 | AY306219 | 97 / 98 |
| | | <i>Ensifer</i> sp. | 135 | AF384182 | 98 / 99 |
| As-4-11 | Alfa-proteobacteria | Bacteria no cultivada | 135 | AJ744905 | 100 / 100 |
| | | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 135 | AF508095 | 98 / 98 |
| As-3-13 | Alfa-proteobacteria | Bacteria no cultivada | 135 | AF546914 | 98 / 100 |
| | | <i>Agrobacterium</i> sp. | 135 | AY225504 | 97 / 99 |

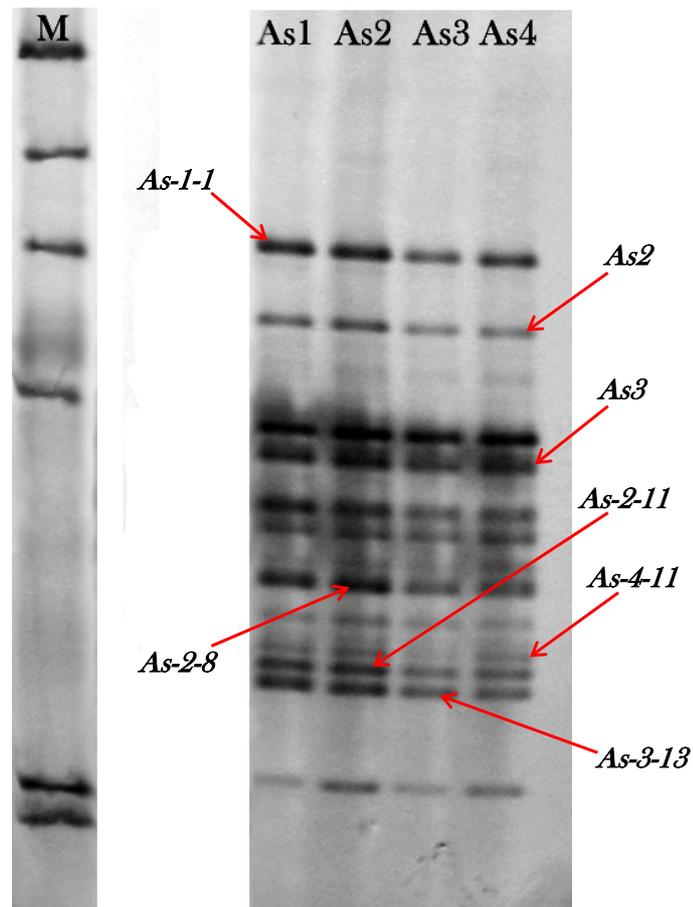


Figura 89: TGGE del ADNr 16S (región V3) de la comunidad bacteriana presente en las biopelículas del biofiltro con influente contaminado con Arsénico (III).

4.9.2.- Alineamientos de las secuencias parciales del ADNr 16S y árboles filogenéticos de las poblaciones microbianas desarrolladas en las biopelículas de los biofiltros estudiados

Con el conjunto de secuencias parciales del ADNr 16S (tres del biofiltro control, catorce del biofiltro cobre, nueve del biofiltro plomo, dieciséis del biofiltro cromo y siete del biofiltro arsénico) se realizó un alineamiento, incluyendo como referencia secuencias de la misma región V3 del gen ADNr 16S de los microorganismos más similares existentes en la base de datos, cuyos números de acceso se muestran en la **Tabla 69**.

La **Figura 90** muestra el alineamiento de todas las secuencias, y se puede observar cómo se dividen en tres grupos, correspondiendo con tres clases taxonómicas diferentes. El primer grupo, con una longitud de 160 pb, lo constituyen las secuencias pertenecientes a la clase Beta-proteobacteria, en el que están mayoritariamente representados aquellos microorganismos que se desarrollan en el biofiltro con cromo (III). El segundo grupo, más numeroso, está formado por fragmentos de aproximadamente 135 pb y lo constituyen Alfa-proteobacterias, clase a la que se afilian mayoritariamente los microorganismos que se

desarrollan en las biopelículas de todos los biofiltros estudiados. Un último grupo, está formado por dos microorganismos afiliados a la clase de las Acido-bacterias, en el que se encuentran un microorganismo presente en el biofiltro control y otro en el contaminado con cobre (II).

Tabla 69: Microorganismos recogidos en la base de datos, empleados para realizar el árbol filogenético mostrado en la Figura 90.

| Microorganismo | Número de Acceso | Microorganismo | Número de Acceso | Microorganismo | Número de Acceso |
|----------------------------------|------------------|----------------------------------|------------------|---|------------------|
| <i>Acidovorax delafieldii</i> | AJ420323 | <i>Comamonadaceae bacterium</i> | CPS 505858 | <i>Sphingomonas</i> sp. | AY116884 |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | AF508095 | <i>Dechloromonas</i> sp. | AY032610 | <i>Variovorax</i> sp. | AY599729 |
| <i>Aquaspirillum delicatum</i> | AF078756 | <i>Erythrobacter</i> sp. | AY726907 | Alfa-proteobacteria | AJ786002 |
| <i>Aquaspirillum</i> sp. | AF384190 | <i>Ferribacterium limneticum</i> | UBPR16S | Alfa-proteobacteria | AF288309 |
| <i>Asticcacaulis</i> sp. | AY157762 | <i>Kaistina korensis</i> | AB127972 | Alfa-proteobacteria | AF288309 |
| Bacilus aeróbico | AEBRRD L22759.1 | <i>Massilia cf. Timonae</i> | AY157762 | Bacteria desnitrificante | DFU51105 |
| <i>Blastomonas</i> sp. | AY704922 | <i>Methylopila capsulata</i> | AF004844 | Bacteria acuática RUB_R2A_15 | AF148973 |
| <i>Bosea minatitlanensis</i> | AF273081 | <i>Novosphingobium</i> sp. | AB164692 | Bacteria metanotrófica | AF068118 |
| <i>Bosea thiooxidans</i> | AF508803 | <i>Porphirobacter tepidarius</i> | AY568495 | Bacteria no cultivada | AY102903 |
| <i>Bosea</i> sp. | AJ313022 | <i>Reichenowia pícate</i> | AY316685 | Bacteria no cultivada | AF546914 |
| <i>Blastomonas natatoria</i> | BNA250434 | <i>Rhizobium</i> sp. | AY306217 | Bacteria no cultivada | AF337870 |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. | AF352563 | <i>Rhodocyclus</i> sp. | AF431239 | Bacteria aislada en profundidades árticas | MAR557867 |
| <i>Brevundimonas aurantiaca</i> | AY136072 | <i>Sphingomonas xenophaga</i> | AB099631 | Bacteria no cultivada | AY268346 |
| <i>Brevundimonas vesicularis</i> | AB193264 | <i>Sphingobium yanoikuyae</i> | AY619556 | Bacteria no identificada | UBA518345 |
| <i>Brevundimonas</i> sp. | AY439267 | <i>Sphingomonas</i> sp. | AJ812013 | Bacteria glacial | AF479379 |
| <i>Caulobacter</i> sp. | CSY14151 | <i>Sphingomonas</i> sp. | SSP313029 | Bacteria del suelo | AY039384 |

La matriz de distancias global, perteneciente al alineamiento mostrado en la Figura 90 se muestra en el Anexo I. En el estudio filogenético realizado en este apartado se ha llevado a cabo una división, en función de las diferencias en pares de bases mostradas en la Figura 90, el cual separa las Alfa-proteobacterias de las Beta y Acido-bacterias.

Los alineamientos de las secuencias pertenecientes a la clase Alfa-proteobacteria se trataron informáticamente y se obtuvo el árbol filogenético mostrado en la **Figura 91**, el cual se ha subdividido en tres *clusters* en función de las distancias evolutivas de las distintas cepas descritas en bibliografía. El *cluster* 1 lo constituyen bacterias afiliadas a la Familia *Caulobacteraceae* en el que se encuentran los géneros *Brevundimonas*, *Asticcacaulis* y *Caulobacter*, junto con las secuencias de ADNr 16S (región V3) pertenecientes a las bandas *CuII-4-5* y *As-1-1*, aisladas en los biofiltros contaminados con cobre (II) y arsénico (III) respectivamente. El *cluster* 2 lo forman bacterias afiliadas a la Familia *Rhizobiaceae* incluyendo los géneros *Kaistina*, *Methylopila*, *Reichenowia*, *Agrobacterium* y *Rhizobium*, junto con cinco secuencias de ADNr 16S (región V3) aisladas del biofiltro arsénico y una presente en el biofiltro contaminado con cromo (III). El *cluster* 3 engloba bacterias afiliadas a las Familias *Sphingomonadaceae* y *Bradyrhizobiaceae* así como a un conjunto de secuencias de ADNr 16S (región V3) que no tiene similitud con ningún género descrito en bibliografía. El sub-*cluster* G incluye a los géneros *Blastomonas*, *Sphingomonas*, *Novosphingobium* y *Erythrobater*, pertenecientes todos ellos a la Familia *Sphingomonadaceae*, junto con once secuencias de ADNr 16S (región V3) de microorganismos presentes en el biofiltro contaminado con ión cúprico, una secuencia de ADNr de un microorganismo presente en el biofiltro contaminado con ión crómico y una perteneciente a un microorganismo desarrollado en el biofiltro control. El sub-*cluster* F incluye a los géneros *Bosea* y *Bradyrhizobium* pertenecientes a la Familia *Bradyrhizobiaceae*, junto con tres secuencias de ADNr 16S (región V3) de microorganismos aislados en el biofiltro contaminado con ión crómico. El sub-*cluster* E lo forman dos secuencias de ADNr de dos microorganismos, uno presente en el biofiltro con plomo (II) y el otro presente en el biofiltro con cromo (III). La secuencia *Cr39-2-19* (D) forma una rama del árbol separada del resto y no se ha encontrado ninguna similitud alta con ningún género descrito en bibliografía. El sub-*cluster* C incluye al género *Rhodobacteraceae* junto con seis secuencias de ADNr 16S (región V3) pertenecientes a cinco microorganismos presentes en el biofiltro contaminado con plomo (II) y a uno presente en el biofiltro con cobre (II), además de la secuencia AY102903 perteneciente a una bacteria no cultivada.

RESULTADOS

| | * | 20 | * | 40 | * | 60 | * | 80 |
|---|---|--|---|-----------------|---|----|---|----|
| Acidovorax delafieldii | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| DFU51105 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Cr41-2-13 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Cr41-2-28 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Cr41-2-12 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Cr41-2-26 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Cr41-2-27 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Aquaspirillum delicatum | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Aquaspirillum sp. | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Cr39-4-10 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Comamonadaceae bacterium | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Cr13 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Cr8 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Variovorax sp. | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| AF148973 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Pb50-1-2 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Pb51-2-1 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| As2 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Rhodocyclus sp. | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Dechloromonas sp. | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Ferribacterium limmeticum | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| B10 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Cr7 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Massilia cf. timonae | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| CuI-1-10 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Cu7 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| AY268346 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| CuI-1-8 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Sphingomonas sp. AY116884 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| CuI-2-5 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| AJ786002 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| AF337870 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Cu9 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Sphingobium yanoikuyae | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Sphingomonas sp. SSP313029 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| MAR57858 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Blastomonas natatoria | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Sphingomonas sp. AJ812013 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Novosphingobium sp. | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Blastomonas sp. | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Erythrobacter sp. | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| CuI 1-1 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| CuI-1-6 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| AEBRRD L22759.1 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Porphyrobacter tepidarius | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Sphingomonas xenophaga | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| CuI-1-2 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| AY268274 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| CuII-1-4 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| B4-13 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Cr39-2-17 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Cu6 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| CuI-2-7 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Pb112-2-5 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| AF068118 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Cr41-4-15 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| AF288309 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| AF479379 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| AY039384 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Bosea sp. | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Bosea thiooxidans | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Cr41-4-16 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Methylobila capsulata | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Kaistinia koreensis | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| As3 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Cr39-2-20 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Bosea minatitlanensis | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Bradrythobium sp. | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Cr14 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| AY102903 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Pb112-2-9 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Pb51-4-10 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Pb112-2-13 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Pb50-3-5 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Pb-50-2-5/Pb-50-3-5 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Pb51-3-13 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Rhodobacter gluconicum | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Cu8 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| AF546914 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| As-4-11 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Agrobacterium tumefaciens | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Rhizobium sp. | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| As-2-8 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| As-2-11 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Cr41-4-24 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Reichenowia pictae | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| As-3-13 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Cr39-2-19 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Asticcacaulis sp. | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Caulobacter sp. | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| As-1-1 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Brevundimonas sp. | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Brevundimonas aurantiaca | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| Brevundimonas vesicularis | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| CuII-4-5 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| B3a15 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| UBA518345 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| CuI-1-11 | : | TGGGAATTTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGG | : | GTGTGAAAAGCTGCT | : | 80 | | |
| TggGGAAT TTggaCAATGgGcG AAgcCTGAtccAGC AtGCCGCGTgA GATGAAGGcctT gG gTgTAAA ctCT | | | | | | | | |

Figura 90: Alineamiento de la región V3 del ADNr 16S de todas las secuencias pertenecientes a los microorganismos que se desarrollan en las biopelículas de los biofiltros estudiados. Se han incluido además secuencias descritas en la base de datos con el fin de establecer similitudes entre las poblaciones bacterianas desarrolladas en los distintos biofiltros y los microorganismos descritos en bibliografía.

| | * | 100 | * | 120 | * | 140 | * | 160 | |
|-------------------------------------|---|-----------------------|---|------------------------|-----------------------|------------------|-----|-----|--|
| <i>Acidovorax delafieldii</i> | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| DFU51105 | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| Cr41-2-13 | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| Cr41-2-28 | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| Cr41-2-12 | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| Cr41-2-26 | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| Cr41-2-27 | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| <i>Aquaspirillum delicatum</i> | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| <i>Aquaspirillum</i> sp. | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| Cr39-4-10 | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| Comamonadaceae bacterium | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| Cr13 | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| Cr8 | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| <i>Variovorax</i> sp. | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 161 | |
| AF148973 | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| Pb50-1-2 | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| Pb51-2-1 | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| As2 | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| <i>Dechloromonas</i> sp. | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| <i>Rhodocyclomus</i> sp. | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| <i>Rechloromonas</i> sp. | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| <i>Ferritribacterium limmeticum</i> | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| B10 | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| Cr7 | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| <i>Massilia cf. timonae</i> | : | TTGTACGGAACGAAAGACT | - | CTGGTTAATACCTGGGTCCATG | AGGTACCGTAAGAAATAGC | ACCGGCTAACTAAGT | : | 160 | |
| CuI-1-10 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| Cu7 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| AY268346 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| CuI-1-8 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Sphingomonas</i> sp. AY116884 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| CuI-2-5 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| AJ786002 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| AF337870 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| Cu9 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Sphingobium yanoikuyae</i> | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Sphingomonas</i> sp. SSP313029 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| MAR557858 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Blastomonas natarioria</i> | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Sphingomonas</i> sp. AJ812013 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Novosphingobium</i> sp. | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Blastomonas</i> sp. | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Erythrobacter</i> sp. | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| CuI 1-1 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| CuI-1-6 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| AEBRRD L22759.1 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Porphyrobacter tepidarius</i> | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Sphingomonas xenophaga</i> | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| CuI-1-2 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| AY268274 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| CuII-1-4 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| B4-13 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| Cr39-2-17 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| Cu6 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| CuI-2-7 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| Pb112-2-5 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| AF068118 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| Cr41-4-15 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| AF288309 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| AF479379 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| AY039384 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Bosea</i> sp. | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Bosea thiooxidans</i> | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| Cr41-4-16 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Methylophila capsulata</i> | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Kaistina korensis</i> | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| As3 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 134 | | |
| Cr39-2-20 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 108 | | |
| <i>Bosea minatitlanensis</i> | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 109 | | |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 109 | | |
| Cr14 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 109 | | |
| AY102903 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| Pb112-2-9 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| Pb51-4-10 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| Pb112-2-13 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| Pb50-3-5 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| Pb-50-2-5/Pb-50-3-5 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| Pb51-3-13 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Rhodobacter gluconicum</i> | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| Cu8 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| AF546914 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| As-4-11 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Rhizobium</i> sp. | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| As-2-8 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| As-2-11 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| Cr41-4-24 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Reichenowia pictae</i> | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| As-3-13 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| Cr39-2-19 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Asticcacaulis</i> sp. | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Caulobacter</i> sp. | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| As-1-1 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Brevundimonas</i> sp. | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Brevundimonas aurantiaca</i> | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| <i>Brevundimonas vesicularis</i> | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| CuII-4-5 | : | TTTACCCGGGATGATA | - | ATGACAGTACCGGAGAAATAGC | TCCGGCTAACTCGTG | : | 135 | | |
| B3a15 | : | GTCTGTGAGGACGAAAGTGGG | - | GGCGTTAATAGCGCTCTCTG | TGAGGTAATCCGAGAGAAAGC | CCCGGCTAACTCTGT | : | 160 | |
| UBA518345 | : | GTCTGTGAGGACGAAAGTGGG | - | GGCGTTAATAGCGCTCTCTG | TGAGGTAATCCGAGAGAAAGC | CCCGGCTAACTCTGT | : | 161 | |
| CuI-1-11 | : | GTAGCGTGGGGCAAAAGCAC | - | -----CCTCGGGTGTAGATG | TGTAACCAAGAAAGTAAAG | ATCCGGCTAACTAAGT | : | 152 | |
| tT | : | ggga gA a | : | atGac GTAcc | agaa aagc | cgggtaact cgtg | : | | |

Figura 90 (cont.): Obsérvese la diferencia en cuanto al número de bases de las secuencias mostradas. El grupo de secuencias en la parte superior de las figuras, con 160 pb, pertenecen al grupo de las Beta-proteobacterias, la parte central lo constituyen las Alfa-proteobacterias, mientras que las tres últimas secuencias guardan similitud con las Acido-bacterias.

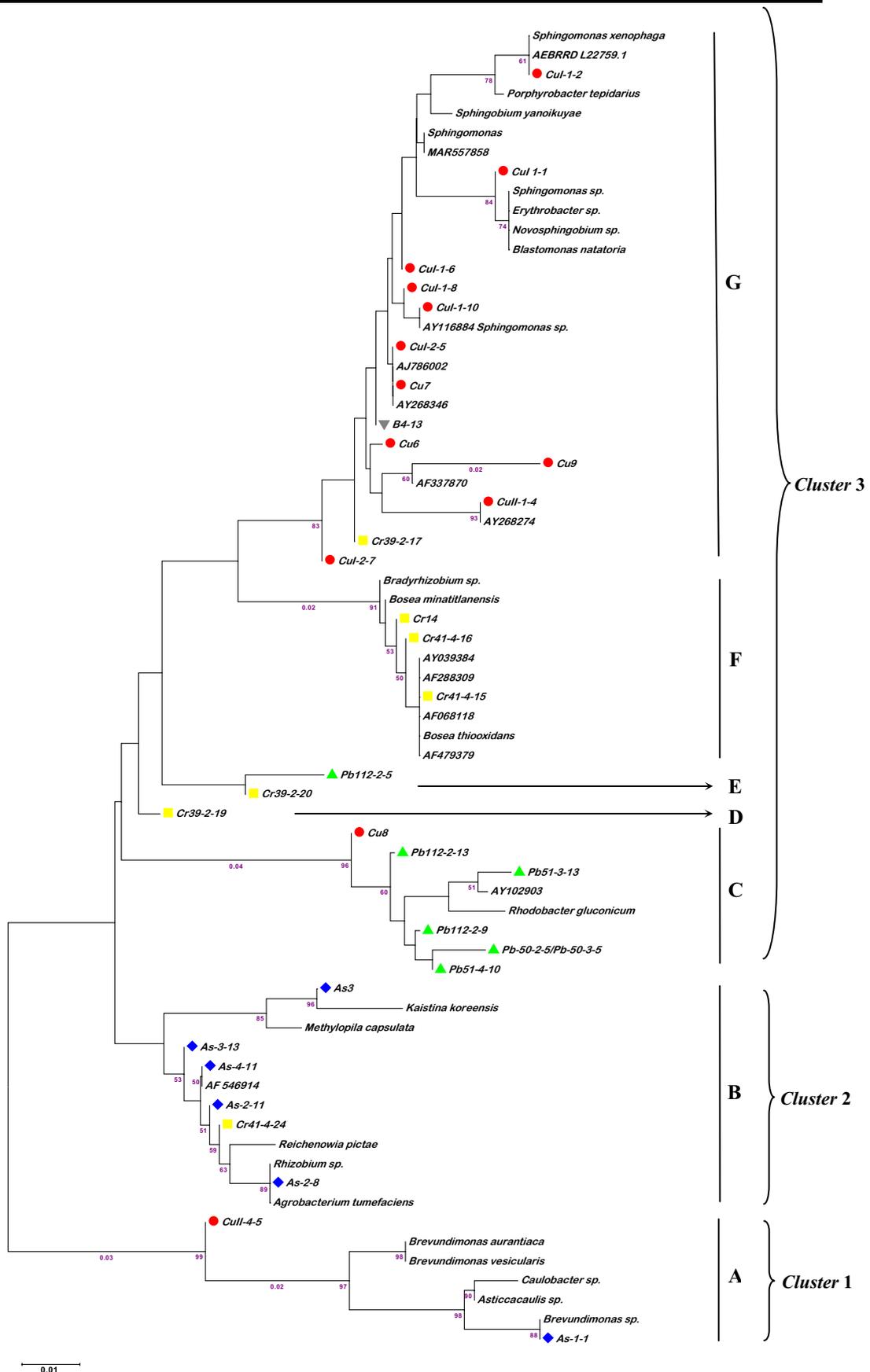


Figura 91: Árbol filogenético Neighbour-Joining basado en la secuencia de la región V3 del ADNr 16S, mostrando las posiciones de las secuencias de las treinta y tres bandas de TGGE afiliadas a Alfa-proteobacterias y otras descritas en bibliografía. La barra indica un 1 % de divergencia estimada. Los números junto a las ramas indican el valor de *bootstrap* cuando éste es superior al 50 %.

Se puede observar de todo lo comentado anteriormente que en función del catión la biodiversidad procariota se ve influenciada. Así, en el biofiltro con cobre (II) son los microorganismos pertenecientes a la Familia *Sphingomonadaceae* los más abundantes, en el biofiltro contaminado con cromo (III) se desarrollan microorganismos pertenecientes a la Familia *Bradyrhizobiaceae*, en el biofiltro con arsénico (III) lo hacen los microorganismos de la Familia *Rhizobiaceae* mientras que en el biofiltro contaminado con Plomo (II) se desarrollan microorganismos afiliados a la Familia *Rhodobacteraceae*.

En la **Tabla 70** se muestra la matriz de distancias por pares de las secuencias de las bandas de TGGE mostradas en el sub-*cluster* 1A, en la que se han incluido las secuencias de *Agrobacterium tumefaciens* y As-3-13 pertenecientes al sub-*cluster* más próximo (sub-*cluster* 2B). Entre los sub-*clusters* 1A y 2B hay una divergencia entre el 4,1 % y el 14,8 %, mientras que las bandas As-1-1 y CuII-4-5, incluidas en el sub-*cluster* 1A no presentan divergencia con el género *Brevundimonas*.

Tabla 70: Matriz de distancias por pares de las secuencias del sub-*cluster* 1A mostrado en la Figura 91.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| 1. As-3-13 | | | | | | | | |
| 2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 0.008 | | | | | | | |
| 3. <i>Caulobacter</i> sp. | 0.120 | 0.141 | | | | | | |
| 4. <i>Asticcacaulis</i> sp. | 0.113 | 0.133 | 0.007 | | | | | |
| 5. <i>Brevundimonas</i> sp. | 0.128 | 0.148 | 0.022 | 0.015 | | | | |
| 6. As-1-1 | 0.128 | 0.148 | 0.022 | 0.015 | 0.000 | | | |
| 7. <i>Brevundimonas vesicularis</i> | 0.090 | 0.104 | 0.037 | 0.030 | 0.044 | 0.044 | | |
| 8. Cull-4-5 | 0.041 | 0.056 | 0.040 | 0.032 | 0.048 | 0.048 | 0.000 | |

En la **Tabla 71** se muestra la matriz distancias por pares de las secuencias de las bandas de TGGE mostradas en el sub-*cluster* 2B, en la que se han incluido además las secuencias *Pb51-3-13* y AY102903 pertenecientes al sub-*cluster* 3C y la secuencia *Cr39-2-19* perteneciente a la rama 3D. El sub-*cluster* 2B presenta una divergencia filogenética de un 6-11 % con respecto al sub-*cluster* 3C y de un 1,5-6 % con respecto a la banda *Cr39-2-19*. Las bandas incluidas en este sub-*cluster* presentan una divergencia inferior al 1 % con la más cercana, a excepción de la banda As3 que presenta una divergencia de 1,5 % con *Kaistina koreensis*.

Tabla 71: Matriz de distancias por pares de las secuencias del sub-cluster 2B mostrado en la Figura 91

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| 1. Pb51-3-13 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. AY102903 | 0.007 | | | | | | | | | | | | | | |
| 3. As3 | 0.090 | 0.097 | | | | | | | | | | | | | |
| 4. Kaistina koreensis | 0.104 | 0.111 | 0.015 | | | | | | | | | | | | |
| 5. Methylophilus capsulata | 0.074 | 0.081 | 0.015 | 0.030 | | | | | | | | | | | |
| 6. As-4-11 | 0.081 | 0.074 | 0.037 | 0.052 | 0.022 | | | | | | | | | | |
| 7. AF 546914 | 0.081 | 0.074 | 0.037 | 0.052 | 0.022 | 0.000 | | | | | | | | | |
| 8. Rhizobium sp | 0.096 | 0.089 | 0.052 | 0.067 | 0.037 | 0.015 | 0.015 | | | | | | | | |
| 9. As-2-8 | 0.096 | 0.089 | 0.052 | 0.067 | 0.037 | 0.015 | 0.015 | 0.000 | | | | | | | |
| 10. Agrobacterium tumefaciens | 0.096 | 0.089 | 0.052 | 0.067 | 0.037 | 0.015 | 0.015 | 0.000 | 0.000 | | | | | | |
| 11. Reichenowia pictae | 0.096 | 0.089 | 0.052 | 0.067 | 0.037 | 0.015 | 0.015 | 0.015 | 0.015 | 0.015 | | | | | |
| 12. As-2-11 | 0.082 | 0.075 | 0.038 | 0.052 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.007 | 0.007 | 0.007 | 0.007 | | | | |
| 13. Cr41-4-24 | 0.078 | 0.070 | 0.039 | 0.054 | 0.023 | 0.000 | 0.000 | 0.008 | 0.008 | 0.008 | 0.008 | 0.000 | | | |
| 14. As-3-13 | 0.083 | 0.075 | 0.030 | 0.045 | 0.023 | 0.000 | 0.000 | 0.008 | 0.008 | 0.008 | 0.008 | 0.000 | 0.000 | | |
| 15. Cr39-2-19 | 0.069 | 0.061 | 0.046 | 0.061 | 0.038 | 0.015 | 0.015 | 0.031 | 0.031 | 0.031 | 0.031 | 0.015 | 0.016 | 0.016 | |

La **Tabla 72** muestra la matriz de distancias por pares del *cluster 3*, incluyendo las bandas *As-3* y *Kaistina Koreensis* pertenecientes al *cluster 2B*, con el que éste tiene una divergencia del 4,5-13 %. Las bandas incluidas en el sub-cluster 3G presentan una divergencia con la más cercana inferior al 1 %, mientras que las bandas incluidas en los sub-clusters 3E y 3D presentan una divergencia superior al 3 % con respecto a secuencias descritas en bibliografía. El sub-cluster 3C tiene una divergencia del 1,6-3,7 % con *Rhodobacter gluconicum*.

Las bandas de TGGE que una vez secuenciadas tuvieron una longitud de 160 pb se agruparon junto con otras descritas en bibliografía y tras el test de filogenia realizado se obtuvo el árbol filogenético mostrado en la **Figura 92**. El *cluster 4* incluye dos bandas pertenecientes a dos comunidades microbianas, presentes una de ellas en el biofiltro control y la otra en el biofiltro contaminado con cobre (II). La banda **B3a-15** ha sido afiliada tentativamente a la clase de las Acido-bacterias. El *cluster 5* incluye las Familias *Neisseriaceae* (sub-cluster 5N), *Comamonadaceae* (sub-cluster 5M), *Oxalobacteraceae* (sub-cluster 5J) y *Rhodocyclaceae* (sub-cluster 5I), además del sub-cluster 5K y una rama independiente (5L) formada por la banda de TGGE *Pb51-2-1* que no han podido ser afiliados con claridad a ningún género descrito en bibliografía.

Se puede observar cómo las poblaciones microbianas presentes en el biofiltro contaminado con cromo (III) pertenecientes a la clase de las Beta-proteobacterias se afilian mayoritariamente en las Familias *Neisseriaceae* y *Comamonadaceae*.

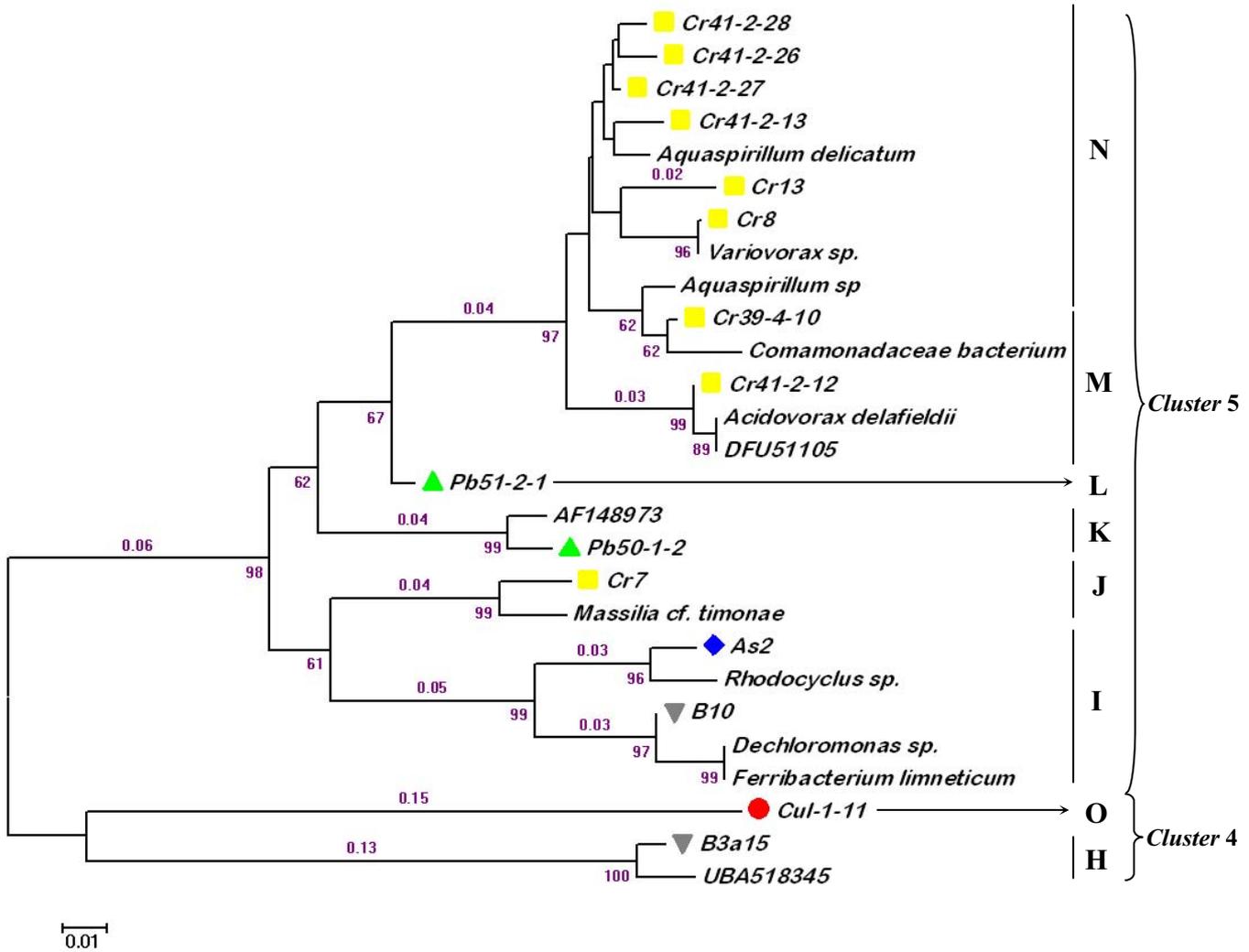


Figura 92: Árbol filogenético Neighbour-Joining basado en la secuencia de la región V3 del ADNr 16S, mostrando las posiciones de las secuencias de las quince bandas de TGGE afiliadas a Beta-proteobacterias y otras descritas en bibliografía. La barra indica un 1 % de divergencia estimada. Los números junto a las ramas indican el valor de *bootstrap* cuando éste es superior al 50 %.

Tabla 73: Matriz de distancias por pares de las secuencias del sub-cluster 4H mostrado en la Figura 92

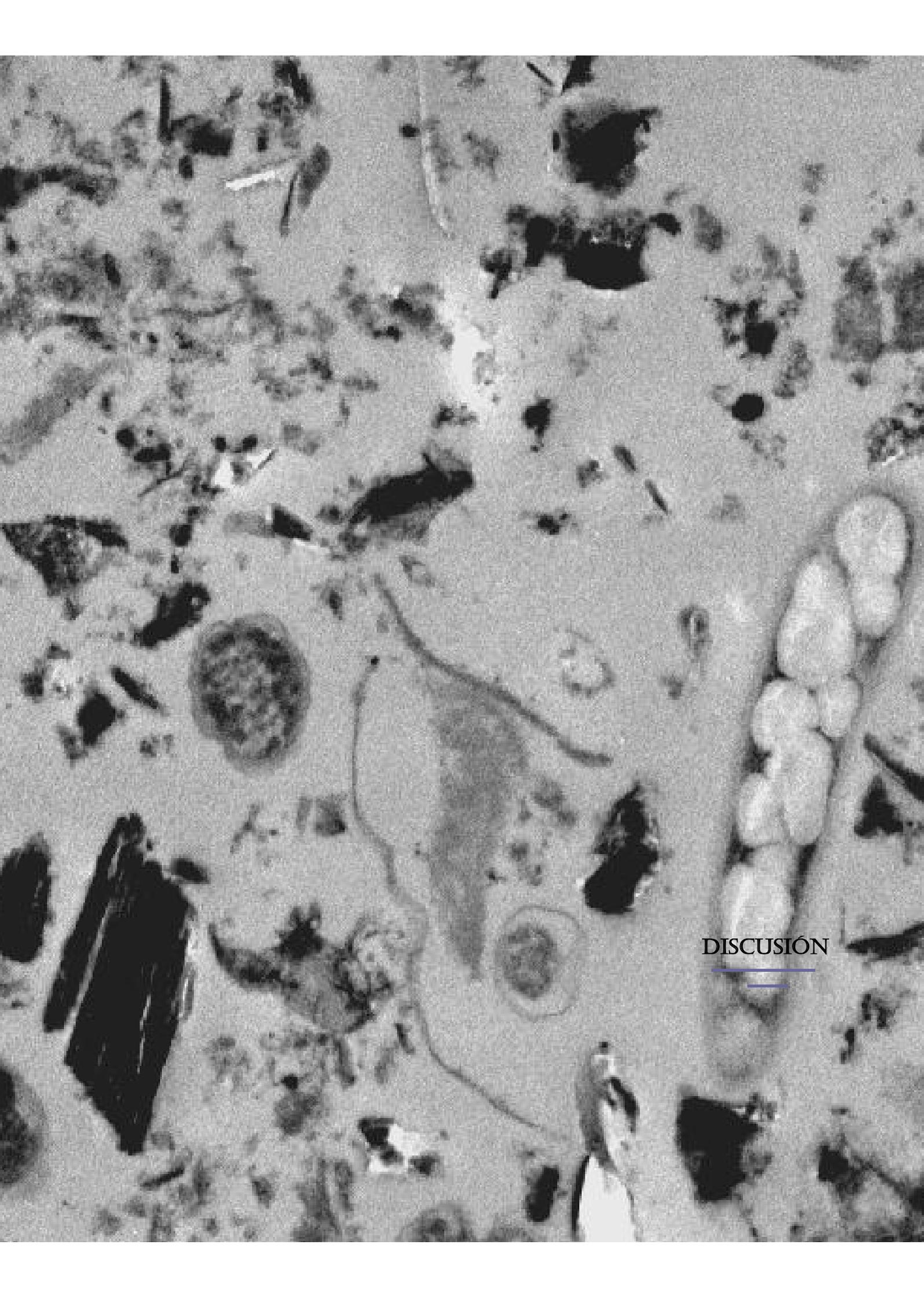
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|---|
| 1. <i>Ferribacterium limneticum</i> | | | | |
| 2. B3a15 | 0.281 | | | |
| 3. UBA518345 | 0.286 | 0.019 | | |
| 4. Cul-1-11 | 0.344 | 0.291 | 0.276 | |

En la **Tabla 73** se muestra la matriz de divergencia de las bandas de TGGE mostradas en la **Figura 92**, correspondientes al sub-*cluster* 4, junto con la secuencia UBA518345 descrita en bibliografía, afiliada al grupo de las Acido-bacterias. Se ha incluido la secuencia de la misma región V3 ADNr 16S perteneciente a *Ferribacterium limneticum* (*cluster* 5I), con la que hay una divergencia superior al 28 % con las secuencias del *cluster* 4H. Obsérvese que la banda secuenciada *B3a-15*, presente en el biofiltro control tiene un 1,9 % de divergencia con la secuencia UBA 518345, mientras que la banda CuI-1-11 tiene un porcentaje de divergencia superior al 27 % con el resto de las secuencias incluidas en el *cluster* 4, por lo que ella sola forma una rama independiente (4O).

En la **Tabla 74** se muestra la matriz de distancias por pares del *cluster* 5, mostrado en la **Figura 92**, en la que se ha incluido la secuencia de la banda CuI-1-11 perteneciente al sub-*cluster* 4O.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| 1. Dechloromonas sp. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. Ferribacterium limneticum | 0.000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3. B10 | 0.006 | 0.006 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4. Rhodocyclus sp. | 0.069 | 0.069 | 0.058 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5. As2 | 0.082 | 0.082 | 0.071 | 0.025 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6. Cr7 | 0.138 | 0.138 | 0.110 | 0.144 | 0.132 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7. Massilia cf. timonae | 0.150 | 0.150 | 0.123 | 0.150 | 0.138 | 0.031 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8. Pb50-1-2 | 0.200 | 0.200 | 0.174 | 0.169 | 0.170 | 0.119 | 0.106 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9. Cr41-2-13 | 0.215 | 0.215 | 0.188 | 0.215 | 0.210 | 0.152 | 0.165 | 0.127 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10. Cr41-2-28 | 0.216 | 0.216 | 0.185 | 0.216 | 0.210 | 0.180 | 0.180 | 0.144 | 0.022 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11. Aquaspirillum delicatum | 0.206 | 0.206 | 0.181 | 0.206 | 0.201 | 0.150 | 0.150 | 0.125 | 0.019 | 0.022 | | | | | | | | | | | | | | |
| 12. Cr41-2-26 | 0.195 | 0.195 | 0.169 | 0.195 | 0.190 | 0.164 | 0.164 | 0.132 | 0.025 | 0.014 | 0.019 | | | | | | | | | | | | | |
| 13. Cr41-2-27 | 0.185 | 0.185 | 0.158 | 0.185 | 0.179 | 0.146 | 0.146 | 0.121 | 0.019 | 0.007 | 0.013 | 0.013 | | | | | | | | | | | | |
| 14. Cr8 | 0.183 | 0.183 | 0.167 | 0.196 | 0.197 | 0.144 | 0.144 | 0.124 | 0.033 | 0.030 | 0.039 | 0.046 | 0.026 | | | | | | | | | | | |
| 15. Variovorax sp. | 0.212 | 0.212 | 0.187 | 0.219 | 0.214 | 0.163 | 0.163 | 0.131 | 0.032 | 0.029 | 0.038 | 0.044 | 0.025 | 0.000 | | | | | | | | | | |
| 16. Cr13 | 0.179 | 0.179 | 0.152 | 0.186 | 0.181 | 0.141 | 0.135 | 0.128 | 0.045 | 0.044 | 0.045 | 0.051 | 0.032 | 0.040 | 0.038 | | | | | | | | | |
| 17. Cr39-4-10 | 0.200 | 0.200 | 0.174 | 0.206 | 0.201 | 0.175 | 0.163 | 0.125 | 0.025 | 0.036 | 0.031 | 0.038 | 0.032 | 0.046 | 0.044 | 0.045 | | | | | | | | |
| 18. Comamonadaceae bacterium | 0.200 | 0.200 | 0.174 | 0.206 | 0.208 | 0.175 | 0.175 | 0.119 | 0.044 | 0.058 | 0.050 | 0.057 | 0.051 | 0.046 | 0.050 | 0.045 | 0.019 | | | | | | | |
| 19. Aquaspirillum sp. | 0.188 | 0.188 | 0.161 | 0.194 | 0.189 | 0.181 | 0.169 | 0.131 | 0.038 | 0.036 | 0.031 | 0.025 | 0.025 | 0.059 | 0.056 | 0.051 | 0.013 | 0.031 | | | | | | |
| 20. Acidovorax delafieldii | 0.175 | 0.175 | 0.148 | 0.175 | 0.164 | 0.156 | 0.163 | 0.169 | 0.063 | 0.036 | 0.056 | 0.050 | 0.045 | 0.078 | 0.075 | 0.064 | 0.069 | 0.087 | 0.056 | | | | | |
| 21. DFU51105 | 0.175 | 0.175 | 0.148 | 0.175 | 0.164 | 0.156 | 0.163 | 0.169 | 0.063 | 0.036 | 0.056 | 0.050 | 0.045 | 0.078 | 0.075 | 0.064 | 0.069 | 0.087 | 0.056 | 0.000 | | | | |
| 22. Cr41-2-12 | 0.166 | 0.166 | 0.138 | 0.166 | 0.154 | 0.146 | 0.153 | 0.159 | 0.052 | 0.029 | 0.045 | 0.038 | 0.032 | 0.067 | 0.064 | 0.052 | 0.057 | 0.076 | 0.045 | 0.000 | 0.000 | | | |
| 23. Pb51-2-1 | 0.166 | 0.166 | 0.136 | 0.146 | 0.140 | 0.126 | 0.119 | 0.060 | 0.067 | 0.061 | 0.060 | 0.053 | 0.054 | 0.076 | 0.073 | 0.088 | 0.073 | 0.093 | 0.060 | 0.073 | 0.073 | 0.074 | | |
| 24. CuI-1-11 | 0.318 | 0.318 | 0.301 | 0.305 | 0.313 | 0.311 | 0.311 | 0.278 | 0.275 | 0.282 | 0.265 | 0.273 | 0.270 | 0.292 | 0.285 | 0.255 | 0.272 | 0.272 | 0.265 | 0.265 | 0.265 | 0.255 | 0.246 | |

Tabla 74: Matriz de distancias por pares de las secuencias del sub-*cluster* 5 mostrado en la Figura 92



DISCUSIÓN



La presencia de metales pesados en un soporte acuoso aumenta considerablemente la toxicidad de estas especies químicas debido a que incrementa su movilidad y facilita el contacto con los seres vivos, por lo que es de suma importancia idear sistemas para transferirlos a un soporte sólido, más fácil de transportar y con menos impacto ambiental. Sistemas como la ósmosis inversa o la electrodiálisis, producen una concentración de estos contaminantes y los eliminan del influente de forma muy eficiente, si bien es cierto que su elevado coste y mantenimiento hacen inviables su uso generalizado (Kapoor, 1999).

Los sistemas de biofiltros sumergidos, ampliamente empleados para el tratamiento de aguas residuales urbanas e industriales, de bajo coste inicial y de mantenimiento, pueden emplearse de igual forma para la eliminación de estos contaminantes, por lo que en el presente trabajo de investigación se han estudiado a nivel biológico y químico una serie de biofiltros de biopelícula sumergida destinados a la descontaminación de metales pesados de aguas, y para ello se han elegido una serie de parámetros destinados a conocer los mecanismos a partir de los cuales la microbiota presente en dichos biofiltros es capaz de eliminarlos del influente. Para ello, se ha elegido un agua subterránea, debido a que presenta estabilidad temporal en cuanto a concentraciones de sales inorgánicas y parámetros biológicos.

La contaminación por metales pesados representa un importante problema medioambiental debido a los efectos tóxicos de estas especies químicas, y su acumulación en los seres vivos conlleva su entrada en la cadena trófica produciendo graves problemas ecológicos (Suzuki, 2002). La biotecnología aplicada en este campo ha resultado ser un útil instrumento para la eliminación de metales pesados de influentes contaminados y su empleo se ha extendido en los últimos años. Existen en la bibliografía abundantes ejemplos de procesos de bioadsorción, empleando biomasa muerta o viable, en los que se estudia el equilibrio y la cinética de este proceso (Richard et al., 1992; Luef et al., 1991; Banerjee et al., 2003). El empleo de adecuados consorcios bacterianos aumenta el rendimiento de eliminación de los metales pesados, mediante la combinación de procesos tales como la bioprecipitación, bioadsorción y diversas reacciones metabólicas posteriores a la adsorción física (Gadd, 2000; Malik, 2004).

Recientes estudios ponen de manifiesto que la biomasa microbiana de células vivas o inactivas es una eficaz matriz de adsorción para los metales pesados, obteniendo rendimientos de adsorción mayores incluso que los obtenidos con carbón activo. Este hecho se debe a la presencia de grupos químicos en la superficie celular y en el exopolímero que presentan afinidad química con los cationes (Ong et al., 2003). Por lo que el empleo de

microorganismos, bacterias, hongos o levaduras, tanto vivas como inactivas, es ampliamente utilizado en procesos de bioadsorción de este tipo de contaminantes.

Los resultados obtenidos en cuanto a la adsorción de los iones cobre (II), plomo (II) y cromo (III) coincide con los obtenidos por diversos autores en los últimos años, que han estudiado la adsorción de metales pesados en sistemas análogos a los empleados en el presente estudio, ya sea con células vivas o inactivas, células en cultivo puro o consorcio microbiano. Gadd (2000) observó una rápida adsorción de iones plumboso, cúprico y cadmio (II) por *Pseudomonas aeruginosa*. Ozdemir (2003) empleó células inactivas de *Ochrobactrum anthropi* para realizar un estudio de adsorción de ión cadmio (II) a 30 mg/L e ión cúprico a 125 mg/L, observando que la concentración de metal disminuía rápidamente en los primeros 5 minutos de contacto y permanecía constante a lo largo de las restantes 2 horas de experiencia.

La bioadsorción de cobre (II) mediante los lechos sumergidos del presente estudio presentó un rendimiento medio del 80 % observándose una paulatina saturación del biofiltro a lo largo de los 200 días que duró la experiencia. La concentración de cobre (II) en aguas potables, según legislación vigente (Real Decreto 1138/1990 B.O.E. 20 de Septiembre de 1990), no fija valor límite, si bien es cierto que se indica el valor guía de 0,1 mg/L y se hace la observación de que concentraciones mayores a 3 mg/L causan sabor amargo en el agua. Por lo tanto, estos sistemas son eficaces y acordes a legislación.

Costley et al. (2001), realizó un estudio de biorremediación de los metales pesados cobre (II), cinc (II) y cadmio (II), en un agua residual sintética mediante contactores biológicos rotativos, obteniendo rendimientos cercanos al 80 % de eliminación de cobre (concentración inicial 100 mg/L), en los 84 días que duró la experiencia, por lo que el empleo de lechos inundados para la eliminación de cobre (II) produce rendimientos superiores incluso a los 120 días de funcionamiento continuo en comparación con los sistemas de contactores biológicos.

En el sistema de filtros sumergidos empleado en este estudio la cinética de adsorción del ión cobre (II) (**Figura 44**) es similar a las descritas en bibliografía por autores como Chua et al (1999) y Nuhoglu et al (2002), los cuales han estudiado la adsorción del ión cúprico en fangos activos, obteniendo los perfiles mostrados en la **Apartado 3** del Capítulo **Introducción**, que coinciden con los obtenidos en los biofiltros sumergidos con influente contaminado con este ión.

La eliminación del ión plomo (II) presenta un rendimiento cercano al 100 % no presentando saturación a lo largo de los 4 meses que duró el estudio, por lo que la

eliminación de plomo (II) mediante estos sistemas se ajusta a la normativa vigente (concentración máxima permitida 0,05 mg/L según Real Decreto 1138/1990 B.O.E. 20 de Septiembre de 1990). La cinética de adsorción obtenida con este catión coincide con la descrita por Chua et al. (1999) si bien es cierto que los sistemas de biofiltros sumergidos presentan un rendimiento mayor de adsorción con respecto a los fangos activos (**Figuras 7 y 45**). Kapoor et al. (1999) estudió la adsorción del ión plomo (II) sobre la biomasa estéril de *Aspergillus niger*. El estudio lo realizó durante cinco ciclos continuos, regenerando la biomasa mediante lavado con agua desionizada y mediante intercambio iónico, obteniendo el doble de rendimiento de adsorción en el primer ciclo con respecto a los otros cuatro ciclos siguientes. Si bien es cierto que la cinética de adsorción observada por estos autores es similar a la de los lechos sumergidos, el empleo de células no viables produce una rápida saturación de la biomasa empleada, disminuyendo la capacidad de captación del ión plomo (II).

Con lo que respecta al ión crómico, el sistema no necesita estabilización y se obtienen concentraciones a la salida ajustadas a la normativa (concentración máxima permitida: 0,05 mg/L) en los primeros 30 días de funcionamiento del biofiltro, produciéndose posteriormente un paulatino incremento de la concentración de ión crómico que alcanza valores de 4 mg/L en los siguientes 30 días. Los sistemas de fangos activos (Chua et al., 1999) dan resultados diferentes a los obtenidos mediante el empleo de lechos sumergidos, puesto que en aquellos, la cinética de adsorción para el catión crómico es similar a la del plomo (II) y cobre (II), mientras que la cinética de adsorción en los biofiltros sumergidos para este catión muestra que es más lenta, necesitándose más recorrido de influente a través del biofiltro para obtener niveles de adsorción similares a las del ión cobre (II) (**Figura 47**). Chua et al. (1999) concluyen que la capacidad de adsorción de los iones cúprico, crómico, cinc y plumboso sobre fangos activos, es en el orden $\text{Cu}^{2+} > \text{Cr}^{3+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$, mientras que mediante los lechos inundados empleados en el presente estudio, el orden es de $\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cr}^{2+}$. Este resultado es acorde con los obtenidos por Akay et al., (2001), $\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$, empleando células inactivas de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros autores emplean células inactivas de *Mucor rouxii* para la bioadsorción y captación de iones como plomo (II), cadmio (II) níquel (II) y cinc (II) obteniendo resultados similares, en cuanto a la cinética, con un orden de adsorción $\text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$ (Viraraghavan et al., 2001),

Destaca el hecho de que los lechos inundados presentan una cinética similar de adsorción sobre los cationes plomo (II) y cobre (II) a la que tienen la resina sintética,

descrita por Denizli (2000) (**Figura 5**), resultante de la polimerización del monómero monoclorotriazinil (**Figura 3 y 4**).

Los estudios cinéticos realizados con otros cationes metálicos presentan el mismo perfil. Cotorás et al., (1992) observó una bioadsorción de uranilo del 95 % a los 5 min de contacto con biomasa liofilizada producida por *Rhizopus oligosporus* a pH 5 al igual que ocurre con el proceso de bioadsorción de níquel empleando fangos activos (Tetis et al., 2002).

La adsorción de *m*-arsenito por la biopelícula presente en el biofiltro dio resultados negativos bajo las condiciones de este estudio, lo que pone de manifiesto la falta de afinidad del exopolímero bacteriano por este anión, no produciéndose procesos de bioadsorción. De la misma manera, el grupo constituido por Ribera-Utrilla et al (2003), (**Figuras 1 y 2**) obtiene resultados negativos en cuanto a la adsorción del anión cromato. Según lo descrito en bibliografía esta falta de retención puede ser debida a la carga negativa presente en los aniones, provocando que no se adhiera esta especie química al EPS de la biopelícula, debido a una falta de afinidad de los grupos químicos presentes en el EPS y las especies químicas con carga negativa. Por el contrario, los resultados descritos por Ozdemir (2003) indican adsorción sobre células inactivas de *Ochrobactrum anthropi* del anión cromo (VI) a una concentración de 16 mg/L. Esta discrepancia puede ser debida a las condiciones en las que se ha realizado la experiencia, pH 2, en el que el carácter oxidante del anión cromato se ve potenciado con respecto a pH neutros.

Existen pocos ejemplos en bibliografía donde se describan procesos de adsorción del anión *m*-arsenito en condiciones aerobias. Matis et al., (2003) describe la bioadsorción de este anión mediante el empleo de células de *P. chrysogenum*, inactivas y modificadas químicamente, mediante tratamiento con un polielectrolito catiónico, mientras que Maruyama et al., (2005) consiguen la bioadsorción de esta especie química a pH 7 con biomasa fúngica metilada, mediante metanol en medio clorhídrico y posterior lavado. Sin embargo, en medios anaerobios o microaerobios, sí se encuentra bibliografía de procesos que describen la eliminación en efluentes, de metales y metaloides, entre ellos el arsénico, en las formas de arsenito y arseniatos (Lloyd, 2003; De Lorenzo, 2002; Barkay, T., 2001). El ión arsénico (V) en medios anaerobios se reduce por la participación microbiana a la forma de arsénico (III), con mayor movilidad y toxicidad, actuando como aceptor de electrones en la oxidación del carbono (Oremland et al., 2000). Microorganismos como *Sulfitomaculum auripigmentum* reducen el arsénico (V) en presencia de sulfatos hasta sulfuro arsenioso,

formando un compuesto insoluble y retirando por tanto este contaminante del medio (Newman et al., 1998).

Con el estudio morfológico realizado a las biopelículas mediante microscopía de barrido y transmisión, así como mediante las determinaciones químico-microbiológicas llevadas a cabo sobre las mismas, se pudo comprobar que la presencia de ciertos cationes metálicos contaminantes en el influente induce cambios drásticos en los microorganismos y en las sustancias poliméricas extracelulares que éstos producen. Del mismo modo, se muestra que las biopelículas formadas en los biofiltros, tanto control como los contaminados por los diferentes iones, tienen una estructura heterogénea y multicelular, en la que participan diferentes bacterias y hongos, siendo perceptible el papel que juegan las sustancias poliméricas extracelulares en la cimentación de las biopelículas.

Los componentes volátiles de la biopelícula representan la densidad de la misma en cuanto a materia orgánica, y ésta está directamente relacionada con el contenido de sustratos carbonados presentes en el influente, debido a que una abundancia de estos nutrientes produce un aumento en la producción de sustancias exopoliméricas de naturaleza orgánica y consecuentemente un mayor contenido en componentes volátiles en la biopelícula.

En el biofiltro control se puede observar (**Figura 48**), que dicha densidad de componentes volátiles permanece constante en los tres primeros puntos de muestreo, descendiendo levemente en el último punto. La concentración de sacarosa (**Figura 56**) a la entrada del biofiltro fue de 250 mg/L la cual disminuyó hasta valores de 20 mg/L en el punto 3 de muestreo. En el punto 4 la concentración de sacarosa fue de 10 mg/L y a esta concentración ya se observa cierta disminución de los componentes volátiles de la biopelícula. Por ello debemos deducir que para mantener una biopelícula homogénea a lo largo de todo el recorrido del influente no se debe bajar de una concentración de sacarosa de 20 mg/L ya que valores inferiores disminuyen el contenido en componentes volátiles de naturaleza orgánica de la biopelícula. Si se comparan las imágenes mostradas en las **Figuras 60 a 62**, se puede observar cómo a medida que disminuye la concentración de sacarosa la morfología de la biopelícula cambia. La **Figura 62** muestra la biopelícula en el punto 1 de muestreo, donde la concentración de sacarosa es de 70 mg/L, observándose abundancia de sustancias poliméricas extracelulares y de microorganismos, al igual que la **Figura 61**, del punto 3 de muestreo donde la concentración de este nutriente es de 20 mg/L, mientras que

en el punto 4 de muestreo (**Figura 60**) se puede observar una disminución considerable de EPS en comparación con las dos puntos anteriores.

La presencia de cobre (II) en el influente produce dos efectos, por un lado aumenta de forma drástica el contenido en componentes volátiles (orgánicos) de la biopelícula (**Figura 48**) y por otro ralentiza el consumo de sacarosa por la microbiota presente en la misma (**Figura 56**). Según Brynhildsen et al. (1988) la presencia de ión cúprico en concentraciones de 6 mg/L presenta efecto tóxico tanto en la respiración como en la asimilación de glucosa a bajas concentraciones (0,1 mg/L), si bien es cierto que este efecto disminuye si se aumenta la concentración de la misma. Este resultado coincide con el hecho de que en el biofiltro contaminado con cobre (II) se observó una disminución de la microbiota mesófila cultivable de 1 log (**Figura 58**).

Como consecuencia de esta disminución en el consumo de sacarosa provocada por la presencia de cobre (II), la concentración de este sustrato a lo largo de todo el recorrido del influente es siempre superior a 20 mg/L, por lo que en ningún momento la tasa de carbono llega a ser crítica para la formación de sustancias exopoliméricas. Los resultados mostrados en las **Figuras 63 a 68** hacen pensar que la microbiota presente en el biofiltro con influente contaminado incrementa el contenido en componentes orgánicos del EPS y cambia su estructura para retener el catión cúprico e impedir altas concentraciones del mismo en las inmediaciones de las células. Este hecho queda confirmado por los resultados obtenidos en cuanto al peso de volátiles (**Figura 48**) y en cuanto a la composición del EPS en relación al biofiltro control. La **Figura 51** muestra la composición en glúcidos de los EPS en cada uno de los biofiltros estudiados, observándose un incremento de éstos cuando en el influente hay presencia de cobre (II), al igual que ocurre con los restos acetilos, por lo que se puede suponer que en el mecanismo de bioadsorción del catión cobre (II) son los glúcidos, como tales y acetilados, los que juegan un papel relevante en la captación de este metal. Los ácidos urónicos, glúcidos con un grupo ácido normalmente en el carbono seis, no se ven incrementados en la biopelícula por la presencia de cobre (II), mientras que las proteínas disminuyen considerablemente en el EPS con respecto al control. Por todo lo anterior, se puede afirmar que las estructuras mostradas en las **Figuras 63, 66 y 67** tienen un componente glucídico superior a las biopelículas formadas en el control.

Por otro lado, se observa una disminución de las estructuras responsables de la adsorción de ión cúprico, a lo largo del recorrido del influente. Este hecho podría ser consecuencia de la disminución en la concentración de contaminante. Además, en la **Figura**

66, perteneciente al punto 1 de muestreo, se aprecia que el EPS está totalmente saturado de cobre (II) mientras que la misma estructura, mostrada en la **Figura 67** presenta un grado de saturación de esta sal mucho menor. Los altos contenidos en componentes volátiles obtenidos para los últimos puntos de muestreo son debidos muy posiblemente a la disminución en la concentración de cobre (II) en el influente (disminución del componente inorgánico en la biopelícula), y a la concentración de 50 mg/L de sacarosa por otro, facilitando, estos dos factores, la captación de la fuente de carbono y la producción de sustancias exopoliméricas (**Figuras 65 y 68**).

La forma de retención del ión cúprico en el EPS se lleva a cabo mediante la formación de polifosfatos, según muestra la **Figura 69**, acorde con lo descrito anteriormente en bibliografía para cationes como U (VI) o Ni (II), (Basnakova 1998, 1999).

Con el análisis realizado a la biopelícula mediante microscopía de transmisión acoplada a análisis de dispersión de rayos X se pudo comprobar que la biopelícula en el biofiltro contaminado con cobre (II) estaba constituida por microorganismos procariontes y eucariotes (**Figura 69**), no observándose presencia de metal pesado en el interior de los primeros. Estos resultados están de acuerdo con lo descrito en bibliografía por Costley et al., (2001), aunque la morfología que presentan las biopelículas desarrolladas por estos autores sea diferente (**Figura 9** del capítulo **Introducción**) en las que se puede observar las diferencias estructurales con las obtenidas en el presente estudio. Aun así, estos autores detectaron presencia de metales pesados en el exterior celular, adherido al EPS, no encontrando presencia de metal en el interior celular. Observando la **Figura 69** se puede apreciar la presencia de microorganismos eucariotes en la biopelícula, en los que sí se han detectado inclusiones de cobre junto con fósforo, aunque es cierto que la mayor cantidad de cobre se encuentra en la matriz exopolimérica, al igual que en el estudio de dichos autores.

La presencia de ión plumboso en el influente disminuye de forma notable los componentes volátiles de la biopelícula (**Figura 48**), debido a dos factores principalmente: la alta concentración de plomo (II) en el punto 1 (**Figura 46**) y la baja concentración de sacarosa en el punto 4 (**Figura 56**). En el punto 1 de muestreo el contenido en fuente de carbono es lo suficientemente elevado como para que los microorganismos no sufran carencia de nutrientes carbonados, sin embargo, en este punto se produce una mineralización de la biopelícula debido a que las sustancias exopoliméricas ejercen una función de núcleos de cristalización en donde tiene lugar la precipitación de diferentes sales insolubles de plomo, mayoritariamente oxocloruros, fosfatos y silicatos (**Figura 71 y 77**). A

medida que el influente va descendiendo por el biofiltro se observa un aumento en el contenido de volátiles, debido a que la concentración de sacarosa es lo suficientemente alta como para no considerarse crítica y la concentración de plomo (II) va disminuyendo drásticamente. Llegado al punto 4 de muestreo, de manera análoga al biofiltro control, se produce un descenso del contenido de volátiles, debido sin duda a que los niveles de sacarosa son críticos y no hay nutrientes para la formación de sustancias exopoliméricas, como muestra la **Figura 75** en la que se observa una biopelícula formada por microorganismos con poco material extracelular.

La composición del EPS en el biofiltro contaminado con plomo (II) muestra que esta especie química produce una disminución de glúcidos, proteínas y ácidos urónicos con respecto al control.

El estudio de microscopía electrónica de transmisión llevado a cabo en la biopelícula del biofiltro contaminado con plomo (II) muestra, al igual que en el caso del cobre, presencia de este metal en el interior de algunos microorganismos, aunque a diferencia con aquel, la mayor presencia de plomo (II) se encuentra en el exterior de la pared celular de todos los microorganismos encontrados, y no en el EPS. Este tipo de bioadsorción fue descrita por Mullen et al (1989) cuando estudió cuatro cepas bacterianas (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) en presencia de los cationes plata (I), cadmio (II), cobre (II) y lantano (III) y obtuvo resultados de bioadsorción en los que el metal pesado se depositaba en el exterior de la pared celular de estos microorganismos, siendo el orden de bioadsorción en los ensayos de competición $Ag^+ > La^{3+} > Cu^{2+} > Cd^{2+}$.

La presencia de ión crómico en el influente genera una biopelícula cuyo contenido en sustancias volátiles, de origen orgánico, es ligeramente superior, aunque estadísticamente significativo, a la de las biopelículas del biofiltro control (**Figura 48**). Se observa no obstante, una constancia de estos componentes a todo lo largo de la columna del biofiltro, debido sin duda, a que este catión inhibe parcialmente el consumo de sacarosa por la microbiota presente en la biopelícula (**Figura 56**), lo cual produce que la concentración de ésta sea superior, en todos los puntos de muestreo, a 20 mg/L y por tanto, la microbiota presente en el biofiltro no se encuentre con tasas bajas de nutrientes carbonados.

La presencia de cromo (III) en la biopelícula produce una disminución de proteínas y de ácidos urónicos del EPS con respecto al control (**Figuras 52 y 53**), y una composición de glúcidos similar a éste (**Figura 51**), mientras que los glúcidos con restos acetilos se ven incrementados considerablemente (**Figura 54**), por lo que se puede suponer que estos grupos

funcionales juegan un papel importante en el proceso de captación de este ión, debido quizás a la estructura del grupo acetilo y a las tres cargas positivas del ión crómico.

Las **Figuras 79, 80 y 82**, muestran una biopelícula en la que la adsorción de cromo (III) tiene lugar tanto en el exopolímero como en el exterior de la pared celular, no habiéndose detectado en ningún caso presencia de cromo en el interior celular.

La biopelícula del biofiltro en presencia de arsénico presentó el menor peso de volátiles de todos los biofiltros estudiados (**Figura 48**), al igual que la composición del EPS se vio disminuida en cuanto al peso de volátiles, presentando diferencias significativas con el resto de los biofiltros (**Figura 50**). En cuanto a la composición del EPS, la presencia de arsénico (III) en el influente disminuye la composición de glúcidos con respecto al control (**Figura 51**), teniendo un comportamiento similar al que produce la presencia de plomo (II), mientras que la composición de proteínas y ácidos urónicos se ve considerablemente incrementada (**Figuras 52 y 53**) al contrario de lo que ocurre cuando en el influente están presentes el resto de los iones estudiados. Este hecho puede deberse a la carga negativa de esta especie química aunque no hay bibliografía que apoye o contradiga esta afirmación. El hecho de que los ácidos urónicos presenten carga negativa en su molécula, debido al grupo carboxílico, al igual que las proteínas, puede consistir en un mecanismo de defensa frente a especies químicas cargadas negativamente, puesto que al estar rodeados los microorganismos de un exopolímero “aniónico” pueden llegar a impedir la difusión de aquellas sustancias con igual carga. La afirmación anterior se refuerza si además se tiene en cuenta el 15 % inorgánico del EPS obtenido (**Figura 50**) en el biofiltro con arsénico en comparación con el 2-3 % de inorgánicos en el resto de los biofiltros estudiados. Esto explicaría el aspecto que presentan algunas zonas de la biopelícula en este biofiltro, tal y como se muestra en la **Figura 83**, en la que se observan regiones con alto grado de mineralización con una composición inorgánica (espectro de energía dispersiva de rayos X de la **Figura 83**) en cuanto a magnesio, calcio, hierro y potasio superiores a las obtenidas en el resto de los biofiltros (ver espectros de rayos X en las **Figuras 63, 65, 66, 67, 68** del biofiltro cobre, **72, 73**, biofiltro plomo y **79** del biofiltro cromo).

En el presente estudio se ha comprobado que la presencia de arsénico (III) en concentraciones 70 mg/L no impide el desarrollo de microbiota en los biofiltros sumergidos, tal y como muestran las **Figuras 83 y 84**, pudiéndose observar microorganismos en fase de división.

Con el objetivo de estudiar la influencia del metal pesado en el metabolismo de la microbiota presente en los respectivos biofiltros, se cuantificaron los niveles de ATP y la actividad fosfatasa alcalina total (metaloenzima que cataliza la hidrólisis no específica de monoésteres fosfato) de las biopelículas formadas.

En el biofiltro control (**Tabla 59** y **Figuras 48, 55, 56** y **Tablas 36** y **55**) se observan correlaciones directas entre la concentración de sacarosa y la concentración de ATP, la concentración de ATP y la fosfatasa alcalina, y entre la concentración de sacarosa y el peso de volátiles. Los resultados obtenidos parecen indicar que un aumento de sacarosa induce un incremento del peso de volátiles así como de la concentración de ATP, mientras que un incremento en la concentración de ATP parece inducir un incremento de la actividad fosfatasa alcalina. Otro resultado relevante en este biofiltro es la correlación directa entre los niveles de ATP expresados por UFC o como peso de volátiles, puesto que parece lógico suponer que un aumento de la microbiota cultivable presente en la biopelícula induzca un incremento en el peso de volátiles.

En los biofiltros con presencia de metal, estas correlaciones se ven ciertamente modificadas. Así en el biofiltro con cobre (II), sólo se observa una relación directa entre la concentración de sacarosa y el peso de volátiles, mientras que la concentración de ATP se ve modificada en función de si se expresa en relación a la microbiota cultivable o al peso de volátiles (**Tabla 60**). La presencia de cobre (II) inhibe la actividad fosfatasa alcalina con respecto al control (**Figura 59**). El hecho de que el ión cúprico sea adsorbido por la biopelícula en forma de polifosfatos puede estar relacionado con este hecho. Según Blum et al. (1998) la presencia de ión cúprico a una concentración de 0,7 mg/L produce la inhibición de la actividad fosfatasa ácida, y estudios recientes (Renella, 2003) demuestran una influencia negativa en la actividad fosfatasa alcalina y en el contenido en ATP (por kg de suelo) presentes en suelos contaminados por cobre, cadmio y cinc. De igual forma, este autor demuestra la existencia de efectos aditivos del cobre y cinc sobre la toxicidad del cadmio en la actividad fosfatasa y contenido de ATP (por kg de suelo). Geiger y col (1997) estudiaron la influencia del ión cúprico sobre la actividad celulasa y β -glucosidasa, encontrando inhibición de ambas actividades enzimáticas, debida al ión cúprico a concentraciones de 0,2 mM.

Hai-Meng Zhou et al. (2000), observan que iones alcalinos monovalentes (Li^+ , Na^+ y K^+) no tienen efecto sobre la actividad de esta enzima, iones alcalino-térreos divalentes (Mg^{2+} , Ca^{2+} y Ba^{2+}) la activan, al igual que iones como Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} y Cd^{2+} , mientras que iones como Hg^{2+} , Ag^+ , Bi^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} la inhiben. El mecanismo de inhibición que presenta el ión Cu (II), descrito por estos autores es del tipo no competitiva.

Debido a la sensibilidad que presenta las enzimas fosfatasa ácida y básica, algunos autores han planteado el empleo de éstas como biosensores de contaminación de metales pesados, así como de pesticidas, ya que estas especies químicas son una de las mayores fuentes de polución ambientales (Shindo, H. 2000; Navas, A.N. et al., 2003). Doelman (1989) demostró, mediante el valor ED_{50} (la concentración de metal pesado que inhibe a la mitad la actividad enzimática), que la influencia de los metales pesados sobre la actividad fosfatasa ácida en suelos podría ser atribuida a la diferente composición de suelos en cuanto a materia orgánica, arcilla o limos.

La respuesta de ciertos hongos a los metales pesados es diferente (Tsekova, 2003). Así, los niveles de ambas actividades fosfatasa dependen de la concentración de cobre en el medio en el hongo *Rhizopus delemar*. La presencia de cobre (II) en el medio de cultivo produce un leve descenso de esta actividad y un incremento significativo de la cantidad de enzima secretada por gramo de células secas. Por otro lado, un incremento de la presencia de este ión produce un incremento considerable de los valores de actividad enzimática celular.

En el biofiltro con presencia de plomo (II) se observó una relación directa entre la actividad fosfatasa y el peso de volátiles así como entre los niveles de ATP y la sacarosa, tal y como ocurría en el biofiltro control (Tabla 61). Los niveles de ATP en presencia de plomo se ven ciertamente disminuidos con respecto al control (Tabla 36), si se expresan por UFC, mientras que la actividad fosfatasa incrementó su actividad (Figura 59). En este biofiltro no se ve inhibida la captación de la sacarosa, presentando un perfil de adquisición de este nutriente similar a cuando no hay ión contaminante (Figura 56).

La presencia de cromo (III) produce una fuerte inhibición de sacarosa a lo largo del recorrido del influente (Figura 56), observándose de igual modo niveles muy bajos de ATP y constantes a lo largo del biofiltro (Tabla 36) y una actividad fosfatasa alcalina potenciada con respecto al control (Figura 59). En este biofiltro, se obtienen resultados contradictorios en la concentración de ATP según se exprese, bien por peso de volátiles o bien por UFC.

En el biofiltro con *m*-arsenito, se encuentran relaciones directas entre la concentración de sacarosa y la actividad fosfatasa alcalina, entre la concentración de sacarosa y las UFC y entre el peso de volátiles y las UFC (Tabla 63). La actividad fosfatasa se potencia con respecto al control (Figura 59) mientras que el ATP, expresado por UFC, está en muy baja concentración, al igual que ocurría en los biofiltros plomo y cromo (Tabla 36).

Las demás actividades enzimáticas (fosfatasa ácida, rodanasa, deshidrogenasa y arilsulfatasa), dieron resultados negativos en todos los biofiltros estudiados. Koopman et al.

(1984), propone la actividad deshidrogenasa como bioindicador de sistemas biológicos debido a su fácil y económica determinación, indicando que se obtienen buenas correlaciones entre esta actividad y concentraciones de ATP, fracción biodegradable y recuento de viables en placa. En nuestros estudios hemos puesto en evidencia que la presencia de metales, tales como el cromo (III), plomo (II) y arsénico (III), disminuyen la concentración de ATP expresado por UFC, aunque en el caso del ión cobre (II) el contenido en ATP expresado por UFC se ve incrementado con respecto al control.

En los últimos años, la aplicación de las técnicas independientes de cultivo al estudio de la microbiología de los sistemas de tratamiento de aguas ha supuesto un gran avance en el conocimiento acerca de la ecología microbiana de los mismos. La existencia de nuevos géneros bacterianos con interés biotecnológico se ha puesto de manifiesto gracias a estas técnicas, al mismo tiempo que se ha podido demostrar que determinados géneros bacterianos, cuyo cultivo en condiciones de laboratorio es difícil o hasta la fecha imposible, juegan importantes papeles en procesos como el tratamiento de aguas residuales para la eliminación de nitrógeno. Debido a ello, en este estudio se consideró esencial el empleo de un método independiente de cultivo para profundizar en el conocimiento de la composición de las biopelículas obtenidas en este estudio para la eliminación de los metales pesados, y se escogió para ello la metodología TGGE, ampliamente empleada para dichos fines en numerosos trabajos recientes.

A pesar de que la presencia de metales pesados en las aguas residuales supone toxicidad para los microorganismos que forman parte de los fangos activos utilizados para el tratamiento de las mismas, dichos fangos activos son la fuente a partir de la cual se han aislado numerosas bacterias con capacidad para eliminar iones solubles de metales pesados, ya sea mediante transformación química o bioadsorción (Leu et al, 2001; Wong et al., 2001; Lo et al, 2003; Ozdemir et al, 2003). Los propios fangos activos o polisacáridos obtenidos a partir de ellos se han empleado en procesos biotecnológicos para la eliminación de metales como Cd (II), Cu (II), Zn (II), Cr (II), Cr (IV) y Pb (II) (Aksu et al, 2002; Guibaud et al., 2003; Sag et al., 2003; Wu et al., 2004; Gulnaz et al. 2005). Por esta razón, se consideró el empleo de fango activo como inoculante para la planta piloto utilizada en este estudio. Los fangos activos se han empleado anteriormente con éxito en nuestro grupo de investigación como fuente de bacterias útiles para procesos de eliminación de otros contaminantes (NO₃) de aguas subterráneas (Gómez et al., 2002; Moreno et al., 2005). Los microorganismos que forman parte de las biopelículas utilizadas en este estudio para la eliminación de metales

pesados de aguas subterráneas proceden por tanto del fango activo empleado para la inoculación de la planta piloto, o bien se trata de bacterias de la propia agua de pozo tratada mediante dicho sistema que han sido capaces de establecerse como parte de la biopelícula.

Los perfiles de diversidad obtenidos mediante TGGE muestran que existe una importante variación dependiendo del metal pesado que se encuentre presente en el agua subterránea. Sin embargo, en cada caso se produce escasa variación temporal o espacial en las comunidades de los biofiltros contaminados con un ión concreto, mostrando una gran estabilidad de dichas comunidades a lo largo del sistema y durante su ciclo de funcionamiento.

Aunque la técnica TGGE no es cuantitativa, diversos estudios han constatado que esta metodología sólo es capaz de detectar organismos que constituyan como mínimo un 1% de la comunidad total (Muyzer y Smalla, 1998). Este umbral de detección limita la detección de ADN amplificado a partir de células muertas o poblaciones poco numerosas, por lo cual se ha de considerar que las bandas presentes en los perfiles de TGGE son representantes de poblaciones mayoritarias en las biopelículas de las que proceden.

La secuenciación de las bandas aisladas de los geles ha permitido llevar a cabo la afiliación taxonómica de un total de 47 bacterias integrantes de las biopelículas, pertenecientes mayoritariamente a las clases Alfa y Beta de las Proteobacterias, como se muestra en los árboles filogenéticos correspondientes en el capítulo Resultados (Figs. 91 y 92). Las Proteobacterias se han descrito con frecuencia como el grupo que constituye la mayor proporción de la microbiota tanto de los fangos activos como de las aguas subterráneas y otros hábitats subsuperficiales (Ekendal et al., 1994; Balkwill et al., 1997; Crump et al., 1999; Detmers et al., 2004). Entre las Proteobacterias, los géneros *Comamonas*, *Sphingomonas* y *Variovorax* se encuentran entre los más frecuentemente aislados en los hábitat subsuperficiales (Balkwill et al., 1997). En el curso de este estudio, una elevada proporción de las secuencias identificadas se sitúa filogenéticamente próxima a alguno de estos 3 mencionados géneros.

En el biofiltro contaminado con Cu (II), la mayoría de las secuencias identificadas se encuadran dentro de la clase Alfa-Proteobacteria, con una gran mayoría de secuencias en la periferia del género *Sphingomonas* (Fig. 90). Las bacterias del género *Sphingomonas* y relacionados se han aislado con frecuencia en medio ambientes acuáticos, tanto en aguas marinas como dulces, en ambientes prístinos o en zonas con acusada contaminación (White et al., 1995; Balkwill et al., 2003). Es usual su aislamiento en zonas subsuperficiales, tanto

aguas subterráneas como sedimentos y otros materiales (Balkwill et al., 1997) así como aguas potables, aguas residuales y plantas de tratamiento de las mismas basadas en la tecnología de fangos activos (White et al., 1995). La presencia mayoritaria de bacterias relacionadas con *Sphingomonas* en el biofiltro contaminado con Cu (II) no es sorprendente, puesto que se trata de bacterias capaces de resistir altas concentraciones de este metal pesado. Determinadas cepas de *Sphingomonas* spp. son capaces de acumular Cu cuando forman colonias en agar adicionado de este metal, y frecuentemente se han aislado en biopelículas formadas en el interior de tuberías de cobre, donde la presencia de estas bacterias en asociación con otros géneros como *Acidovorax* y *Pseudomonas* se ha relacionado con la corrosión de las tuberías y la liberación de iones Cu al agua en altas concentraciones (Balkwill et al., 2003; Critchley et al., 2003, 2004). Se trata además de bacterias que se desarrollan fácilmente en medios pobres en nutrientes y que producen abundantes polisacáridos (Balkwill et al., 2003), características que les hacen idóneos para crecer en las biopelículas de la planta piloto empleada en este estudio. Es igualmente interesante destacar la capacidad de las bacterias de este género para degradar sustratos orgánicos recalcitrantes y contaminantes (Balkwill et al., 1997, 2003), por lo que constituyen un grupo de gran interés en el campo de la biorremediación. No obstante, a pesar de todo lo expuesto no existen referencias bibliográficas relativas al empleo de *Sphingomonas* y géneros relacionados en la bioadsorción de Cu u otros metales pesados en aguas, aunque los resultados del presente estudio señalan un importante potencial de estas bacterias en estos procesos.

En el biofiltro contaminado con Pb (II), la mayoría de las secuencias identificadas guardan gran similitud entre sí, formando un cluster dentro de la clase Alfa-Proteobacteria, con las secuencias agrupadas en la periferia del género *Rhodobacter*. Si bien las bacterias de la Familia *Rhodobacteraceae* son filogenéticamente distantes de la *Sphingomonadaceae*, ambas tienen en común la habilidad para desarrollarse en medios pobres en nutrientes. Las *Rhodobacteraceae* son bacterias del medio ambiente acuático por excelencia, muy versátiles metabólicamente, pudiendo realizar fotosíntesis en condiciones de anaerobiosis, y están comúnmente presentes en aguas subterráneas y aguas residuales (Imhoff, 2001). Aunque no existen referencias en la bibliografía acerca de la capacidad de estas bacterias para resistir los metales pesados, sí hay un estudio previo en el que se ha empleado con éxito biomasa de células muertas de *Rhodobacter sphaeroides* para la bioadsorción de Cd y Pb (Seki et al., 1998). Esta bioadsorción se produce por la unión de los metales a dos tipos de sitios ácidos de la superficie de las células bacterianas.

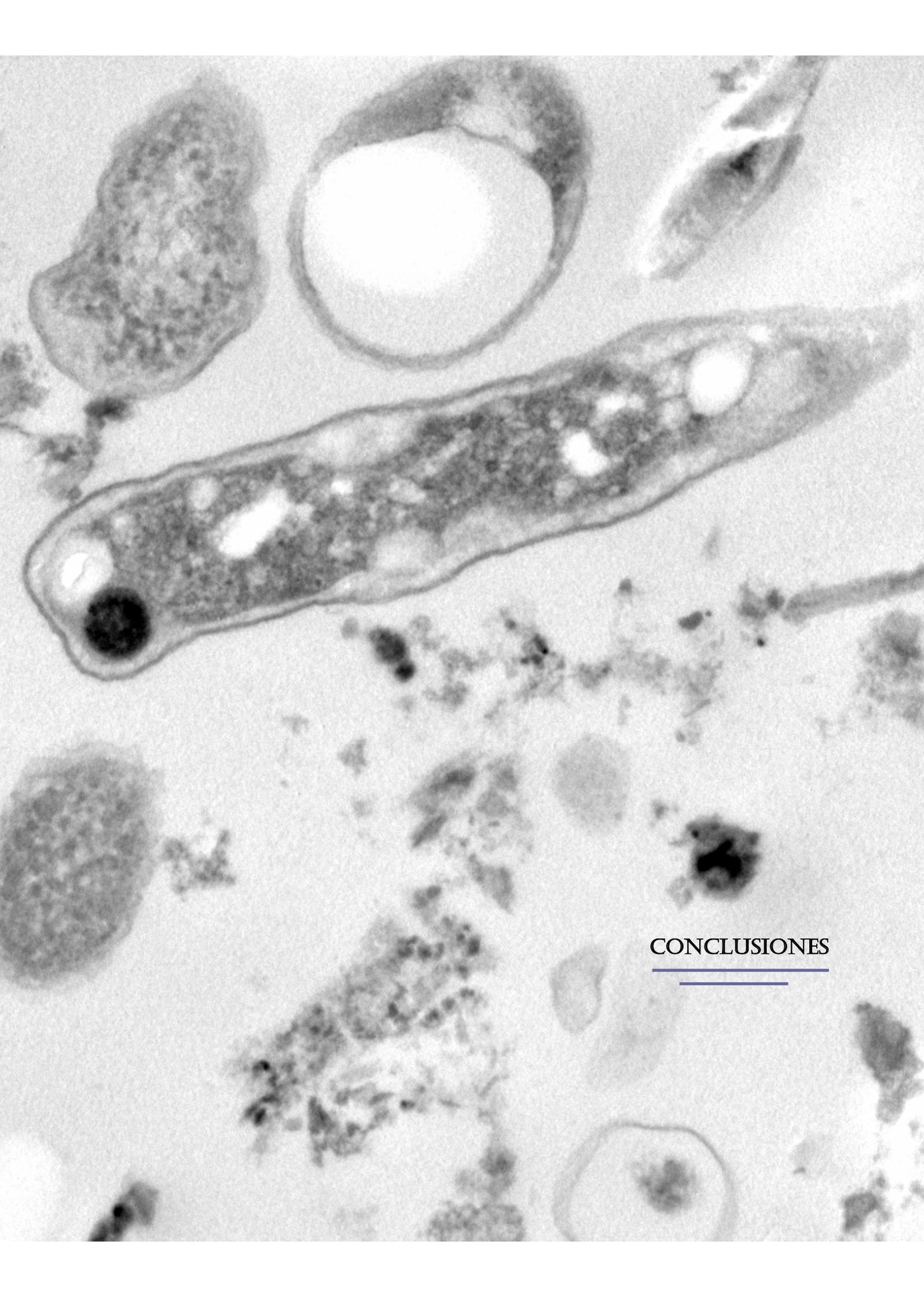
En el biofiltro contaminado con Cr (III) es donde se encuentra una mayor diversidad de secuencias identificadas, afiliadas tanto a las Alfa como Beta Proteobacterias. Entre las Beta-Proteobacterias identificadas en este biofiltro, destacan las afiliadas a la Familia *Comamonadaceae* (Fig. 91). Las bacterias de esta familia también son metabólicamente muy versátiles, muchas cepas degradan compuestos orgánicos complejos (Willem y De Vos, 2002) y las bacterias de los géneros *Acidovorax* y *Variovorax* son capaces de crecer quimiolitotróficamente (Kerstens et al., 2003). Las cepas de *Comamonas* spp. se han encontrado frecuentemente en entornos fuertemente contaminados con metales pesados como Ni y Cd (Stoppel y Schlegel, 1995, Kanazawa y Mori, 1996), y existen cepas capaces de reducir el cromato, acumulando grandes cantidades de Cr (III) en tuberías de conducción de aguas industriales (Cooke et al., 1995). En cuanto a las secuencias afiliadas a las Alfa-Proteobacterias, éstas se encuentran dispersas en varias Familias, aunque 3 de ellas se encuadran en la Familia *Bradyrhizobiaceae*, en particular en las proximidades del género *Bosea* (Fig. 90).

Por último, en el biofiltro contaminado con As (IV) se identificaron secuencias mayoritariamente afiliadas a las Alfa-Proteobacterias, particularmente aquellas encuadradas en la Familia *Rhizobiaceae*.

Por otra parte, tomando como base los alineamientos de la **Figura 80**, dos de las secuencias obtenidas se han encuadrado alejadas de las Proteobacterias (**Figura 91**). La secuencia B3a15, aislada en el biofiltro control, se encuadra dentro de la División Acidobacteria, aunque no muestra identidad alta con ninguna de las especies conocidas dentro de este taxón. En el caso de la secuencia CuI-1-11, que forma parte del biofiltro involucrado en la bioadsorción de Cu (II), destaca el hecho de que forma una rama filogenéticamente aislada, ya que sólo muestra similitud alta con secuencias ambientales de los bancos de datos, obtenidas de bacterias no cultivadas en estudios análogos al realizado aquí (**Tabla 64**), y muestra una divergencia muy acusada (identidad <80%) con las secuencias no ambientales más similares encontradas en el banco de datos. Por tanto, aunque en el árbol filogenético se muestra que la secuencia CuI-1-11 está más próxima a las Acidobacterias que a la Beta-Proteobacterias, su afiliación taxonómica basada únicamente en la secuencia del ARNr 16S es muy incierta.

Las Acidobacterias constituyen una División de los Procariotas, de identificación relativamente reciente, formada por miembros genética y metabólicamente muy diversos.

Aunque pocos microorganismos de esta División han logrado ser cultivados y en la actualidad solamente existen tres géneros validados (*Acidobacterium*, *Geothrix*, *Holophaga*), su distribución en hábitat naturales parece estar muy extendida, ya con alta frecuencia se recuperan secuencias de ADNr 16S encuadradas en este grupo a partir de muestras de suelo y otros ambientes naturales (Barns et al., 1999). En la actualidad, existe un número limitado de secuencias del ADNr 16S pertenecientes a las Acidobacterias en los bancos de datos y la posición taxonómica de la gran mayoría es aún incierta, por lo que el aporte de nuevas secuencias relacionadas con esta División es especialmente interesante.



CONCLUSIONES

Durante el periodo de estudio realizado se han alcanzado las siguientes conclusiones:

1.- El tiempo necesario para la formación de biopelícula en los biofiltros empleados en nuestro estudio es de 24 h y el tiempo de lavado para una planta con las características de la empleada en este estudio es de diez días, funcionando a un caudal de 2,3 L/h y una concentración de sacarosa de 250 mg de sacarosa/L.

2.- La respuesta de las biopelículas a cada metal pesado contaminante es diferente y los mecanismos empleados para la eliminación de cationes del influente varía según el catión estudiado. Así el ión cobre (II) necesita un ciclo de diez días para la estabilización del biofiltro, siendo rápidamente eliminado del influente a partir del segundo ciclo, en los diez primeros centímetros de lecho sumergido, observándose saturación a partir de 120 días de funcionamiento. El ión plomo (II) no requiere estabilización previa y se elimina del influente con un rendimiento cercano al 100 % no presentando saturación a lo largo de los ciclos. El ión Cr (III) no necesita estabilización previa y presenta mayor movilidad que los anteriores iones, requiriendo mayor recorrido del influente para su bioadsorción y presentando saturación a partir de los cuarenta días de funcionamiento. El ión m-arsenito da resultados negativos en cuanto a su eliminación del influente.

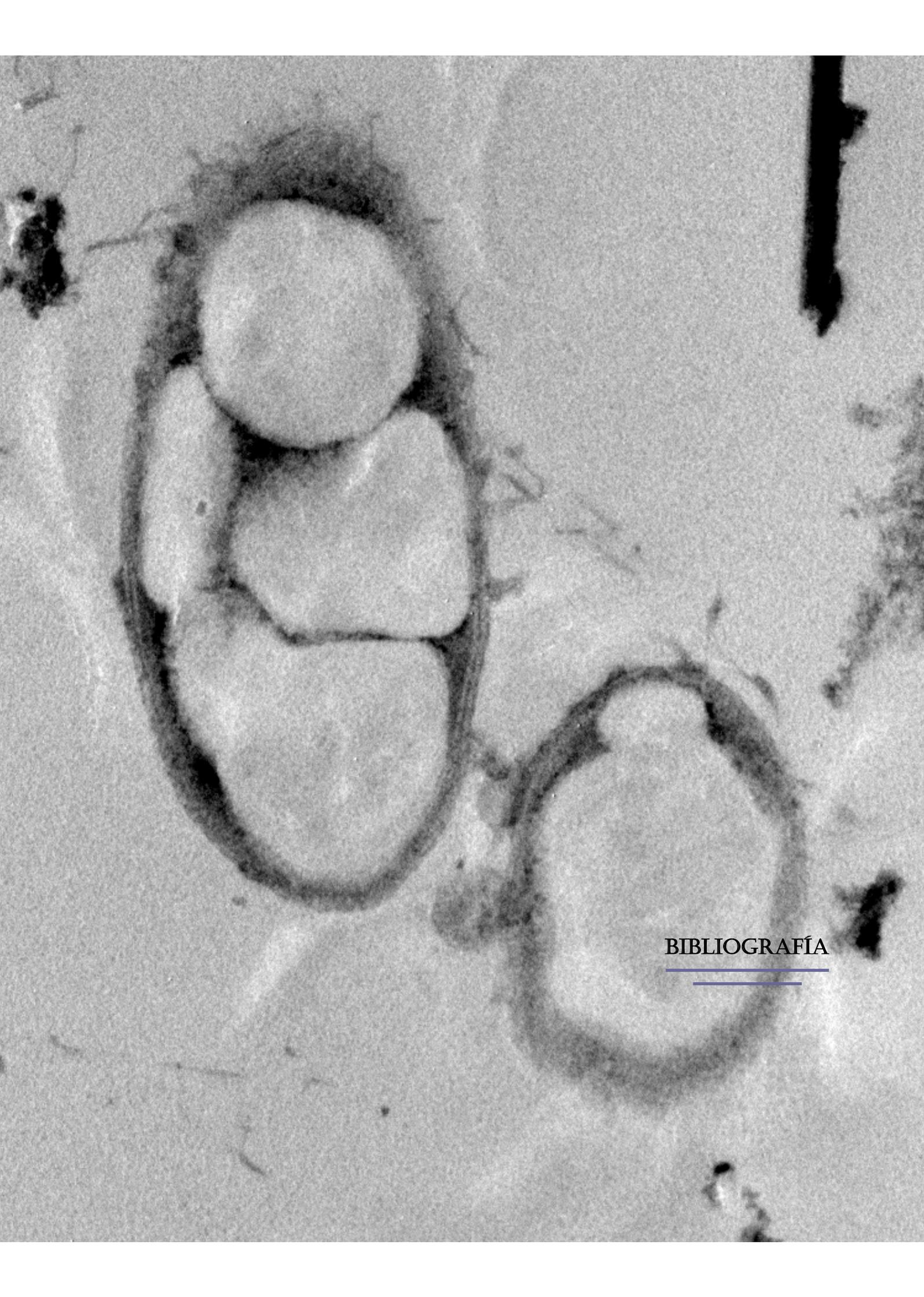
3.- El metabolismo de los microorganismos presentes en las biopelículas se ve influenciado por la presencia de metal pesado. Los iones Cu (II), Cr (III) y As (III) producen una ralentización en la captación de sacarosa mientras que el ión Pb (II) afecta a este proceso. La actividad enzimática fosfatasa alcalina se ve inhibida por la presencia de Cu (II), mientras que los iones Cr (III), Pb (II) y As (III) la activan. La presencia de Cu (II) y Cr (III) incrementan significativamente el contenido en volátiles de la biopelícula, mientras que el Pb (II) y el As (III) lo disminuyen. La concentración de ATP en relación con las UFC se ve incrementada con la presencia de Cu (II) mientras que la presencia del resto de los iones la disminuye significativamente.

4.- Las características químicas del EPS depende de la naturaleza de la carga contaminante en el influente. La presencia de Cu (II) incrementa los glúcidos, los ácidos urónicos y los restos acetilos del EPS, mientras que las proteínas disminuyen con respecto al biofiltro control. El ión Pb (II) disminuye todos los componentes analizados en el EPS con respecto al control. El ión Cr (III) disminuye las proteínas, ácidos urónicos y restos acetilos,

no influyendo en los glúcidos con respecto al control. El As (II) incrementa de forma significativa la presencia de proteínas y ácidos urónicos en el EPS con respecto al control.

5.- La morfología de las biopelículas se ve muy influenciada por la presencia de metal pesado. El ión cobre (II) induce la formación de estructuras poliméricas extracelulares capaces de su bioadsorción en forma de fosfatos. La biopelícula capaz de la bioadsorción del ión Pb (II) actúa como filtro físico en el que los microorganismos intervienen como núcleos de cristalización en donde precipitan sales insolubles de plomo (II). El Cr (III) se bioadsorbe sobre la materia orgánica de la biopelícula desarrollada en el biofiltro con influente contaminado con este catión. La presencia de As (III) en el influente produce la parcial mineralización del EPS debido al incremento de cationes alcalinos y alcalinotérreos principalmente.

6.- La biodiversidad procariota sufre profundos cambios en función del catión presente en el influente. El género predominante en el biofiltro con cobre (II) es *Sphingomonas*. La presencia de plomo (II) incrementa la comunidad de la Familia *Rhodobacteraceae*. En el biofiltro contaminado con el ión Cr (III) se obtienen comunidades procariotas pertenecientes tanto a Alfa-proteobacterias como a Beta-proteobacterias. La presencia de As (III) en el influente incrementa la Familia *Rhizobiaceae* en la biopelícula.



BIBLIOGRAFÍA

- Aksu, Z., Acikel, U., Kabasakal, E., Tezer, S. (2002) Equilibrium modelling of individual and simultaneous biosorption of chromium(VI) and nickel(II) onto dried activated sludge. *Water Research* 36:3063-73.
- Azeredo, J., Lazarova, V. and Oliveira, R. 1999. Methods to extract the exopolimeric matriz from biofilm: a comparative study. *Wat. Sci. Tech.* 39, n°7: 243-250
- Balkwill, D.L., Fredrickson, J.K., Romine, M.F. (2003) *Sphingomonas* and related genera. Dworkin, M. et al. (eds.) *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd Edition, release 3.14. 31/07/2003, Springer-Verlag, New York, <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125>
- Balkwill, D.L., Reeves, R., Drake, G., Reeves, J.Y., Crocker, F., King, M.B., Boone, D.R. (1997) Phylogenetic characterization of bacteria in the subsurface microbial culture collection. *FEMS Microbiology Reviews* 20:201-216.
- Barkay, T., Shaefer, J. 2001. Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Current Opinion in Microbiology* 4: 318-323
- Barns, S., Takala, S.L., Kuske, C. R. (1999) Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment. *Applied and Environmental Microbiology* 65:1731-1737.
- Basiric, D., Lulic, S. and Miletic, P. 1982 Radium and uranium in phosphate fertilisers and their impact on the radioactivity of waters. *Water Research*.26: 607-611
- Berman, T; 1970, Alkaline phosphatases and phosphorus availability in Lake Kinneret. *Limnol. Oceanogr.* 15; 663-674.
- Beijer, K. And Jernelöv, A. 1986 General aspect of specific data on ecological effects of metals. In *Handbook on the toxicology of metals* (Friberg, L.; Nordberg, G.F. and Vonk, V. Eds). Segunda Edición Pp 253-268. Elsevier Science Publishers.
- Ben Omar, N., Merroum, M.L. González Muñoz, M.T. and Arias J.M. 1996. Brewery yeast as biosorbent of uranium. *Journal of Applied Bacteriology.* 81: 284-287.
- Ben Omar, M.L. González-Muñoz and Arias J.M. 1997 Comparative heavy metal biosorption study of brewery yeast and *Myxococcus xanthus*. *Chemosphere.* 35: 2277:2283
- Blumenkratz, N and Asboe-Hansen, G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72:248-254.
- Brierley, J.A., Brierley, C.L. and Goyak, G.M. 1986 AMT-Bioclaim: A new wastewater treatment and metal recovery technology. In *fundamental and applied biohydrometallurgy*, ed Lawrence, R. W., Branion, R.M.R. and Ebner, H.G. pp 291-303. Elsevier, Amsterdam.

- Broda, E.** 1972 The uptake of heavy cations trace elements by microorganisms. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*. **22**: 93-108
- Casida, L.E., Jr.; Klein, D.A. and Santoro, T.;** 1964. Soil deshydrogenase activity. *Soil Sci*. **98**: 371-376.
- CEDEX**, 1998 Curso sobre tratamiento de aguas residuales y explotación de estaciones depuradoras. M.M.A. y M.F. Madrid.
- Cooke, V. M., M. N. Hughes, R. K. Poole.** (1995). Reduction of chromate by bacteria isolated from the cooling water of an electricity generating station *Journal of Industrial Microbiology* **14**:323-328.
- Costa, A.C.A. and Leite, S.G.F.** 1990. Cadmium and zinc bioadsorption by *Chorella homosphaera*. *Biotechnology letter*. **12**: 941-944.
- Critchley, M.M, Cromar, N.J., McClure, N.C., Fallowfield, HJ** (2003) The influence of the chemical composition of drinking water on cuprosolvency by biofilm bacteria. *Journal of Applied Microbiology* **94**:501-507.
- Critchley, M.M., Pasetto, R., O'Halloran, R.J.** (2004) Microbiological influences in "blue water" copper corrosion. *Journal of Applied Microbiology* **97**:590-597
- Crump, B., Virginia-Armbrust, V., Baross, J.** (1999) Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its stuary, and the adjacent coastal ocean. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:3192-3204.
- De Lorenzo, V., Valls, M.** 2002. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology Reviews* **26**: 327-338
- Detmers, J., Strauss, H., Schulte, U., Bergmann, A., Knittel, K., Kuever, J.** (2003) FISH shows that *Desulfotomaculum* spp. Are the dominating sulfate-reducing bacteria in a pristine aquifer. *Microbial Ecology* **47**:236-242.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. and Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**:350-356.
- Ekendal, S., Arlinger, J., Stahl, F., Pedersen, K.** (1994) Characterization of attached bacterial populations in deep granitic groundwater from the Stripa research mine by 16S-rRNA gene sequencing and scanning electron microscopy. *Microbiology* **140**:1575-1583.
- Erlinch, H.L.** 1997 Microbes and Metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **48** 687-692
- Gómez-Nieto, M.A.** 1998. Tesis Doctoral Universidad de Granada (España).
- Gómez, M.A., Hontoria, E, González-López, J.** (2002) Effect of dissolved oxygen concentration on nitrate removal from groundwater using a denitrifying submerged filter. *Journal of Hazardous Materials* **90**:267-278

- Gómez, M.; Zamorano, M.; Cardenete, J.M.; Menéndez, A.; González-López, J. y Hontoria, E. 1996 Desnitrificación biológica de aguas subterráneas: estudios a escala de planta piloto. IV Simposio sobre el agua en Andalucía. **2**: 331-340.
- González Muñoz, M.T., Merroum, M.L.; Ben Omar, N. and Arias J.M. 1997. Biosorption of uranium by *Myxococcus xanthus*. *International Biodegradation and Biodeterioration*. **40**: 107-114.
- González-López, J.; Gómez, M.A. and Hontoria, E. 1998 Influence of carbon source on nitrate remove of contaminated groundwater in denitrifying submerged filter. Contamination par des nitrates et des pesticides des eaux des pays Mediterraneens. Tetouan (Marruecos).
- Groenendijk, D; Zeinstra, L.W.M. and Postma, J.F. 1998. Fluctuating asymmetry and mentum gaps in populations of the midge *Chironomus riparius* (diptera: Chironomidae) from a metal contaminated river. *Environmental Toxicology and chemistry*. **17 (10)**: 1999-2005.
- Guibaud, G., Tixier, N., Bouju, A., Baudu, M. (2003) Relation between extracellular polymers' composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. *Chemosphere* 52:1701-1710
- Gulnaz, O., Saygideger, S., Kusvuran, E. (2005) Study of Cu(II) biosorption by dried activated sludge: effect of physico-chemical environment and kinetics study. *Journal of Hazardous Materials* 120:193-200.
- Hontoria, E.; Zamorano, M. y Gómez, M.A. 1998 Nuevos soportes para la depuración biológica en filtros inundados. *Tecno Ambiente*. **79**: 63-65.
- Hughes, M.N. and Poole, R.K. 1989 *Metals and Microorganisms*. Chapman and Hall, London-New York.
- Imhoff, J.F. (2001) The phototrophic Beta-proteobacteria. En: Dworkin, M. et al. (eds.) *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd Edition, release 3.6 22/06/2001. Springer-Verlag, New York <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125>
- Iñarra, I.A.L., Cncio, D. y Del Potro, R. 1989. Residuos radiactivos. Ministerio de Obras Públicas. Unidades Temáticas Ambientales/Dirección General de Medio Ambiente.
- Jansen, J.C.; Jepsen, S.E. and Laursen K.D. 1993 Carbon utilisation in denitrifying biofilter. *Second International Specialised Conference on Biofilm Reactors*. París 151-159.
- Kambe-Honjoh, H.; Sugawara, A.; Yoda, K.; Kitamoto, K. and Yamasaki, M. 1997 Isolation and Characterisation of nickel-accumulating yeast. *Applied Microbiology Biotechnology* **48**: 373-378.
- Kanazawa, S., Mori, M. (1996). Isolation of cadmium-resistant bacteria and their resistance mechanisms. Part I: Isolation of Cd-resistant bacteria from soils contaminated with heavy metals *Soil Science and Plant Nutrition* 42:725-730

- Kapoor, A. And Viraraghavan, T.** 1998 Removal of heavy metal from aqueous solutions using immobilised fungal biomass in continuous mode. *Water Research*. **32(6)**: 1968-1977.
- Karl, D.M.** 1980 Cellular nucleotide measurements and application in microbial ecology, *Microbiol. Rev.* **44**: 739.
- Kasan, H.C. and Stegmann, P.** 1987 Intracellular bioaccumulation of zinc by an *Enterobacter* species. *Microbios*. **51**: 89-96.
- Kerstens, K., De Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P., Stackebrandt, E.** (2003) Introduction to the Proteobacteria. En: Dworkin, M. et al. (eds.) The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community, 3rd Edition, release 3.12. 28/03/2003. Springer-Verlag, New York <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125>
- Leung, W.C., Chua, H., Lo, W.** (2001) Biosorption of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **93**:171-184
- Lloyd, J.R.** 2003 Microbial reduction of metals and radionuclides. *FEMS Microbiology Reviews* **27**:411-425
- Lo W, Ng LM, Chua H, Yu PH, Sin SN, Wong PK.** (2003) Biosorption and desorption of copper (II) ions by *Bacillus* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **108**:581-91.
- Marañón, E. y Sastre, H.** 1990 Eliminación y recuperación de metales pesados de efluentes industriales: Análisis de comparación de procesos de tratamiento. *Revista Técnica de Medio Ambiente*. Julio-Agosto 9-23.
- McComb, E.A. and McCready, R.M.** 1957. Determination of acetyl in pectin and acetylated carbohydrate polymers hidroxilamic acid reaction. *Analytical Chemistry* **29**:819-821.
- Merroum, M.L., Ben Omar, N., González Muñoz, M.T. and Arias J.M.** 1998 *Myxococcus xantus* biomass ass biosorbent for lead. *Journal of Applied Microbiology* **84**: 63-67.
- Moreno, B.,Gómez, M.A., González-López, J., Hontoria, E.** (2005) Inoculation of a submerged filter for biological denitrification of nitrate polluted groundwater: a comparative study. *Journal of Hazardous Materials* **117**:141-147.
- Newman, D.K., Kennedy, E.K., Coates, J.D., Ahmann, D., Ellis, D.J., Lovley, D.R. and Morel, F.M.M.** 1998 Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp. *Nov Arch. Microbiol.* **165**: 380-388
- Oremland, R. S., Dowlle, P.R., Hoefft, S., Sharp, J.O., Schaefer, J.K., Miller, L.G. Switzerblum, J., Smith, R.L., Bloom, N.S. and Wallschelaeger, D.** 2000 Bacterial dissimilatory reduction of arsenate and sulphate in meromictic Mono lake, California. *Geochim. Cosmochim. Acta* **64**: 3073-3084.
- Ozdemir, G., Ozturk, T., Ceyhan, N., Isler, R., Cosar, T.** (2003) Heavy metal biosorption by biomass of *Ochrobactrum anthropi* producing exopolysaccharide in activated sludge. *Bioresources Technology* **90**:71-74.

- Parker, D.L.; Rai, L.C.; Mallick, N.; Rai, P.K.; and Kumar, H.D. 1998 Effect of cellular metabolism and viability on metal ion accumulation by cultured biomass from a loom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Applied of Environmental Microbiology*. **64**: 1545-1547.
- Sag, Y., Tatar, B., Kutsal, T. (2003) Biosorption of Pb(II) and Cu(II) by activated sludge in batch and continuous-flow stirred reactors. *Bioresources Technology* 87:27-33.
- Scoot, J.A. and Karanjkar, A.M. 1998 Immobilised biofilm on granular activated carbon for removal and accumulation of heavy metals from contaminated streams. *Water Science Technology*.**38**: 197-204.
- Seki, H, Suzuki, A., Mitsueda, S.I.(1998). Biosorption of heavy metal ions on *Rhodobacter sphaeroides* and *Alcaligenes eutrophus* H16. *Colloid Interface Science* 15:185-190.
- Stoppel, R. D., Schlegel, H.G. (1995). Nickel-resistant bacteria from anthropogenically nickel-polluted and naturally nickel-percolated ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2276-2285
- Tanabai, M.A. and Singh B.B. 1970. Rhodanese activity of soils. *Soil Sci. Soc.Am.* **40**: 381-385.
- Tabatabai, M.A., Bremmer, J.M.; 1972. Assay of urease activity in soils. *Soil Biol. Biochem.***4**: 479-487
- Watanabe, K.; Yamamoto, S.; Hino, S. And Harayama, S.1998. Population dynamics of phenol-degrading bacteria in activated sludge determined by *gyrB*-targeted quantitative PCR. *Environ. Microbiol.***64**:1203-1209
- White, D.C., Sutton, S., Ringelberg, D. 1995. The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. *Current Opinion in Biotechnology* 7:301-306
- Willems, A., De Vos, P. 2002. *Comamonas*. En: Dworkin, M. et al. (eds.) *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd Edition, release 3.10. 27/09/2002. Springer-Verlag, New York <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125>
- Wong MF, Chua H, Lo W, Leung CK, Yu PH. (2001) Removal and recovery of copper (II) ions by bacterial biosorption. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 93:447-457
- Wu, H.S., Zhang, A.Q., Wang, L.S. (2004) Immobilization study of biosorption of heavy metal ions onto activated sludge. *Journal of Environmental Science* 16:640-645.
- Xiaoqi, Z.; Bishop, P.L. and Kinkle, B.K. 1999. Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms. *PII*: S0273-1223(99)00170-5
- Zoller, U. 1994 *Groundwater contamination and control*. Marcel Dekker, INC. New York.

ANEXO I

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Microscopía electrónica de barrido de la superficie de carbón activo. Ribera-Utrilla et al. (2003) | 9 |
| Figura 2 | Microscopía electrónica de barrido de la superficie de carbón activo con <i>E. coli</i> . Ribera-Utrilla et al. (2003) | 9 |
| Figura 3 | Estructura química de Cibacron Blue F3GA (Denizli et al., 2000) | 10 |
| Figura 4 | Fotografía de microscopía electrónica de barrido de la membrana de polivinilalcohol (Denizli et al., 2000) | 10 |
| Figura 5 | Cinética de adsorción de ión mercúrico (B) y de ión cúprico (A). Denizli (2000) | 11 |
| Figura 6 | Capacidad de eliminación de ión Cúprico por <i>U. zonata</i> (Nuhoglu et al., 2002) | 12 |
| Figura 7 | Adsorción de metales pesados por fangos activos (Chua et al., 1999) | 13 |
| Figura 8 | Porcentaje de metal retirado de un efluente sintético contaminado con Cd*, Cu* y Zn* por la biopelícula durante 87 días (primer ciclo Figura 8A y segundo ciclo Figura 8B). (Costley et al., 2001). | 13 |
| Figura 9 | Microbiota presente en los biodiscos antes y después del lavado. La escala de la Figura 9A representa 6µm y la de la Figura 9B 11µm. Se señalan bacterias (b), organismos filamentosos (f) y hongos (y). (Cosley et al., 2001) | 14 |
| Figura 10 | Microbiota presente en el segundo ciclo de adsorción (Cosley et al., 2001). | 15 |
| Figura 11 | Mecanismos de eliminación de metales pesados mediados por bacterias (Valls, 2002) | 19 |
| Figura 12 | Movilización de Fosfato inorgánico a partir de ATP (Keasling, 2000) | 21 |
| Figura 13 | Inmovilización del catión uranilo en la superficie exterior de la pared celular (Keasling, 2000) | 21 |
| Figura 14 | Microfotografía de transmisión de células de <i>P. aeruginosa</i> en presencia de nitrato de uranilo (Keasling, 2000) | 22 |
| Figura 15 | Diagrama de solubilidad del hierro en función del pH en presencia de iones fosfato, sulfuro y carbonato (Remoudaki et al., 2003) | 23 |
| Figura 16 | Diagrama de solubilidad para el ión cúprico en función del pH en presencia de iones carbonato (Remoudaki et al., 2003) | 23 |
| Figura 17 | Efecto del pH en la adsorción de cobre (II), cromo (III), plomo (II), níquel (II) y cinc (II) sobre biomasa de <i>Solanum elaeagnifolium</i> (Tiemann et al., 2002) | 24 |
| Figura 18 | Adsorción en función del pH sobre bacterias gram negativas (Ngwenya et al., 2003) | 24 |
| Figura 19 | Fase de formación de una biopelícula (Costerton, 2001) | 27 |
| Figura 20 | Construcción de una biopelícula. Bacterias planctónicas libres se unen a una superficie. Comunicación célula-célula previa a la formación de una biopelícula. | 29 |
| Figura 21 | Modelo del canal de agua | 30 |
| Figura 22 | Modelo del mosaico heterogéneo | 30 |
| Figura 23 | Modelo de película densa | 31 |
| Figura 24 | Modelo de la regulación para la formación de una biopelícula (Stanley et al., 2004) | 35 |
| Figura 25 | Estructura y componentes del ribosoma procariota. | 41 |
| Figura 26 | Mapa de variabilidad del ADN _r de <i>E. coli</i> . | 43 |
| Figura 27 | Esquema de la aplicación de la técnica de DGGE/TGGE a estudios de la biodiversidad microbiana de los ecosistemas. | 45 |
| Figura 28 | Regiones hipervariables presentes en el ARN 16S procariótico, denominadas V1 a V9 y resaltadas en rojo. Neefs et al (1990). | 47 |
| Figura 29 | Esquema del biofiltro | 53 |
| Figura 30 | Aspecto del biofiltro ubicado en las instalaciones del Instituto del Agua de la Universidad de Granada | 54 |
| Figura 31 | Aspecto del filtro sobre medio TSA a las 48 h de cultivo. | 55 |
| Figura 32 | Aspecto del agua de lavado | 66 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| Figura 33 | Aspecto del Pellet 4 | 66 |
| Figura 34 | Esquema para la obtención del EPS “no cohesivo” | 67 |
| Figura 35 | Esquema para la obtención del EPS “cohesivo” | 69 |
| Figura 36 | Extracción con dimetilsulfóxido del ATP | 75 |
| Figura 37 | Esquema de la reacción de PCR anidada, donde se realizaron dos reacciones consecutivas de amplificación, en la primera se amplificó una región correspondiente a casi la totalidad del gen y en la segunda una región interna de menor tamaño. | 85 |
| Figura 38 | Aspecto de un gel de TGGE | 89 |
| Figura 39 | Aspecto de un gel de TGGE tras la extracción de bandas | 90 |
| Figura 40 | Microfotografía del relleno | 95 |
| Figura 41 | Microfotografía del relleno a mayor aumento | 95 |
| Figura 42 | Análisis de difracción de rayos X del relleno | 96 |
| Figura 43 | Concentración de cobre (II) a la salida del biofiltro en función del tiempo. Las barras verticales muestran la desviación estándar de cada serie de tres réplicas realizadas a cada medida. | 100 |
| Figura 44 | Variación de la concentración de Cu (II) en función del recorrido del influente. El punto 0 representa la entrada, el punto 6 la salida y los puntos 1 a 4, los distintos puntos de muestreo dispuestos en el biofiltro (Figura 29 y 30). La concentración a la entrada de este metal pesado fue constante a lo largo de todo el estudio e igual a 15 mg/L. Las barras verticales muestran la desviación estándar de cada serie de tres réplicas realizadas a cada medida. | 100 |
| Figura 45 | Eliminación de Pb (II) en los biofiltros en función del recorrido del influente. La concentración a la entrada de este catión fue constante a lo largo de todo el estudio realizado e igual a 15 mg/L. Las barras verticales muestran la desviación estándar de cada serie de tres réplicas realizadas a cada medida. | 101 |
| Figura 46 | Concentración de plomo en las biopelículas desarrolladas en el biofiltro en función del recorrido del influente y del tiempo de funcionamiento de la planta. Las barras verticales muestran la desviación estándar de cada serie de tres réplicas realizadas a cada medida. | 102 |
| Figura 47 | Concentración de cromo (III) a lo largo del recorrido del influente. La concentración de este catión a la entrada fue constante a lo largo de todo el estudio realizado en este biofiltro e igual a 15 mg/L. Las barras verticales muestran la desviación estándar de cada serie de tres réplicas realizadas a cada medida. | 103 |
| Figura 48 | Contenido en volátiles de las biopelículas formadas en los biofiltros estudiados en función de los puntos de muestreo. | 106 |
| Figura 49 | Grado de hidratación de las biopelículas formadas en biofiltros con influentes control y adicionados de cationes en función de los distintos puntos de muestreo. | 108 |
| Figura 50 | Gramos de componentes volátiles por 100 gramos de EPS “cohesivo” en biofiltros con influentes controles y adicionados de cationes contaminantes. | 111 |
| Figura 51 | Contenido en glúcidos de los exopolímeros de las biopelículas formadas en los distintos biofiltros. | 112 |
| Figura 52 | Contenido proteico de los exopolímeros de las biopelículas formadas en los distintos biofiltros. | 114 |
| Figura 53 | Contenido en ácidos urónicos de los exopolímeros de las biopelículas formadas en los distintos biofiltros. | 115 |
| Figura 54 | Contenido en restos acetilos de los exopolímeros de las biopelículas formadas en los distintos biofiltros. | 117 |
| Figura 55 | Contenido en ATP en las biopelículas formadas en los diferentes biofiltros expresado en µg de ATP por peso de volátiles en función de los puntos de muestreo. | 121 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| Figura 56 | Consumo de sacarosa en los biofiltros expresado en mg de sacarosa por litro en función de los distintos puntos de muestreo. El punto 0 representa la entrada a los biofiltros y el punto 6 la salida. Los puntos 1 a 4 representan los diferentes puntos de muestreo situados en la planta (Figura 29 capítulo de Material y Métodos) | 123 |
| Figura 57 | Microbiota mesófila en las biopelículas formadas en biofiltros con influentes control y adicionados de cationes contaminantes en distintos puntos de muestreo. | 126 |
| Figura 58 | Microbiota mesófila en las biopelículas secas formadas en los diferentes biofiltros en función de los distintos puntos de muestreo. | 128 |
| Figura 59 | Actividad fosfatasa alcalina total en mg de <i>p</i> -nitrofenol/peso húmedo de biopelícula/h formadas en los distintos biofiltros en función de los puntos de muestreo. | 130 |
| Figura 60 | Estructura de la biopelícula formada en el biofiltro control, en el punto 4 de muestreo. Detalle 1: Presencia de abundantes hifas de hongos a lo largo de toda la superficie del soporte. Detalle 2: cúmulos de microorganismos con abundantes sustancias poliméricas extracelulares. La escala muestra una longitud de 50 μm . | 139 |
| Figura 61 | Estructura heterogénea de la biopelícula formada en el punto 2 de muestreo del biofiltro control. El guión muestra la escala de 10 μm . Detalle 1: Canales de agua en las biopelículas para la difusión de sustancias disueltas. Detalle 2: Microorganismos filamentosos en fase de reproducción. Detalle 3: Microorganismos cocoides y bacilares inmersos en la matriz exopolimérica. Detalle 4: Agregados de microorganismos unidos entre sí por sustancias poliméricas extracelulares. | 139 |
| Figura 62 | Polímero extracelular en las biopelículas generadas en el biofiltro control (punto 1 de muestreo), el guión muestra la escala de 20 μm . Detalle 1: Superficie del soporte. Detalle 2: Sustancias poliméricas extracelulares generadas por los microorganismos presentes en la biopelícula. | 140 |
| Figura 63 | Cascada de ampliaciones de la estructura de la biopelícula en el punto 1 de muestreo previa al proceso de lavado en los biofiltros adicionados con cobre (II). En la fotografía inferior izquierda se muestra las estructuras encargadas de la adsorción de cobre (II). El guión muestra la escala de 200 μm en la fotografía superior izquierda, 50 μm en la foto central derecha y 10 μm en la fotografía inferior izquierda. Los espectros de rayos X muestran la presencia de cobre en la biopelícula formada. La presencia de oro y osmio en las muestras se debe al protocolo seguido en el proceso de contraste de las muestras. | 141 |
| Figura 64 | Estructura de la biopelícula en el punto 3 previa al proceso de lavado. El guión muestra la escala de 20 μm . En este punto de muestreo la superficie del soporte está menos colonizada por los microorganismos, pudiéndose ver la superficie del soporte exento de biopelícula. | 142 |
| Figura 65 | Estructura de la biopelícula en el punto 4 previa al proceso de lavado. El guión muestra la escala de 20 μm . El espectro que se muestra a la izquierda de la figura muestra la baja presencia de cobre en la biopelícula. | 143 |
| Figura 66 | Cascada de ampliaciones de la estructura de la biopelícula en el punto 1 un día después de proceso de lavado. La fotografía superior izquierda (Escala 200 μm) muestra la superficie del soporte totalmente colonizada por microorganismos inmersos en la biopelícula con la morfología inducida por el ión cobre (II). Las fotografías superior derecha e inferior izquierda (escala 50 μm) muestran la presencia de estructuras porosas capaces de adsorber este ión, tal y como indica el espectro de rayos X (inferior derecha), en el que se observa la transición K_{α} del cobre a 8 KeV con una intensidad de 25 cps. La presencia de oro se debe al metalizado de las muestras. | 144 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| Figura 67 | Aspecto de la biopelícula en el punto 3 un día después del proceso de lavado. La imagen superior izquierda (escala 200 σ m) muestra la presencia de abundantes sustancias poliméricas extracelulares cuya ampliación indica una baja saturación de ión cúprico en su superficie (fotografía inferior derecha, escala 20 σ m), al contrario de lo que ocurría en el punto 1 de lavado (imagen inferior izquierda de la Figura 65). La fotografía inferior izquierda (escala 20 σ m) muestra la presencia de microorganismos filamentosos desarrollándose sobre las estructuras anteriormente mencionadas. El espectro de rayos X indica la baja presencia de cobre en este punto de muestreo. La presencia de oro en el espectro se debe a que el protocolo de contraste de las muestra emplea este metal. | 145 |
| Figura 68 | Aspecto de la biopelícula en el punto 4, un día después del proceso de lavado. La imagen derecha (escala 20 σ m) muestra abundante presencia de microorganismos filamentosos sobre la superficie del soporte. El espectro de rayos X muestra ausencia de cobre en la biopelícula en este punto del biofiltro. | 146 |
| Figura 69 | Imágenes de transmisión equivalentes a campo claro de la biopelícula (punto 1 de muestreo) en el biofiltro con influente contaminado con ión cúprico. Detalle 1: estructuras fibrosas presentes en la biopelícula. Detalle 2: Mitocondrias observadas en organismos eucariotas inmersos en la biopelícula. Detalle 3: Complejo de Golgi. Detalle 4: Gotas lipídicas. | 148 |
| Figura 70 | Ampliación del espectro de rayos X de las estructuras fibrosas mostrada en el detalle 1 de la Figura 68. 1. Transición K_{α} del fósforo. 2. Transición K_{α} del cobre. 3. Transición K_{β} del cobre. | 149 |
| Figura 71 | Aspecto de la biopelícula (punto 1) generada en el biofiltro adicionado con plomo (II). El guión en la fotografía superior muestra la escala de 200 μ m, y en su ampliación el guión muestra la escala de 20 σ m. Detalle 1: Estructuras filamentosas. Detalle 2: Estructuras cocoides. | 150 |
| Figura 72 | Análisis de difracción de rayos X de las estructuras filamentosas mostradas en el detalle 1 de la Figura 72. Se observan las transiciones pertenecientes al plomo M_{ζ} a 2,35 KeV con una intensidad de 9 cps, L_{ζ} a 10,53 KeV con una intensidad de 1,2 cps. Las transiciones L_{η} (a 12,60 KeV) y L_{ν} (a 14,77 KeV), debido a la intensidad de la irradiación, son imperceptibles. La presencia de osmio en el espectro se debe al empleo de tetróxido de osmio en el proceso de tinción, necesario para el contraste de las muestras. | 151 |
| Figura 73 | Espectro de rayos X de las formas cocoides mostradas en el detalle 2 de la Figura 72. Se observan las transiciones pertenecientes al plomo M_{ζ} a 2,35 KeV con una intensidad de 37 cps, L_{ζ} a 10,53 KeV con una intensidad de 5 cps. Obsérvese que la intensidad de las señales es, aproximadamente, cuatro veces superior en estas zonas de la biopelícula con respecto a las analizadas en la Figura 69. | 151 |
| Figura 74 | Estructura de la biopelícula (punto 3) del biofiltro con influente contaminado con plomo (II). Detalle 1: Dismorfismos celulares causados por condiciones ambientales adversas. Detalle 2: Microorganismos en fase de división. El guión muestra la escala de 20 μ m. | 152 |
| Figura 75 | Estructura de la biopelícula (detalle 1) en el punto 4 en el biofiltro con influente contaminado con ión plumboso, mostrando cúmulos de plomo (II) (detalle 2). El guión muestra la escala de 50 μ m. | 153 |
| Figura 76 | Fotografías de microscopía electrónica de barrido en el punto 4 de muestreo (la escala muestra 20 σ m). La imagen de la izquierda se ha fotografiado en modo SE mientras que la de la derecha lo ha sido en modo BSE. Se puede observar, en la foto de la derecha, cómo, la mayor densidad electrónica está en la superficie de los microorganismos, mientras que el relleno presenta un contraste típico de materiales exentos de metal pesado (electrónicamente densos). | 153 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| Figura 77 | Microfotografía de transmisión de microorganismos presentes en la biopelícula del biofiltro con influente contaminado con ión plumboso, mostrando las zonas en donde se ha detectado la presencia de este metal. Para la tinción se ha empleado acetato de uranilo, razón por la cual se detecta este elemento en los espectros de rayos X. La rejilla empleada como soporte de las muestras fue de cobre y para la tinción de las muestras se empleó acetato de uranilo. | 154 |
| Figura 78 | Imagen de transmisión de campo claro de un microorganismo presente en la biopelícula del biofiltro con influente contaminado con plomo (II). Aunque la estructura está mal conservada, si se aprecia la estructura de la membrana citoplasmática (detalle 1), observándose que tanto en el interior como en la parte externa de la membrana no hay presencia de plomo, tal y como se indica en el espectro de rayos X mostrado a la izquierda de la figura. | 156 |
| Figura 79 | Aspecto de la biopelícula en el punto 1 (fotografía superior) en el biofiltro contaminado con ión crómico (escala 20 σ m). Aspecto de la biopelícula en el punto 3 (fotografía inferior, escala 20 μ m). | 157 |
| Figura 80 | Microfotografías de barrido electrónico en donde se muestra la presencia de cromo en todos los puntos de la biopelícula a lo largo de todo el biofiltro. La figura muestra dos fotografías de la misma zona de la biopelícula mediante diferentes técnicas fotográficas: la imagen de la izquierda realizada mediante SE, en la que se puede observar la gran acumulación de metal pesado, electrónicamente denso, mientras que la imagen de la derecha, mediante BSE, pone en relevancia las zonas de la biopelícula donde la presencia de metal pesado es predominante (zonas más iluminadas de la fotografía). | 158 |
| Figura 81 | Ampliación del espectro de rayos X en el que se muestra la alta cantidad de cromo presente en todos los puntos analizados de la biopelícula (se puede observar la transición K_{ζ} del cromo a 5,4 KeV y la K_{η} a 5,93 KeV). La movilidad de este catión fue considerablemente mayor en comparación con los demás cationes ensayados que fueron retenidos en la biopelícula. | 158 |
| Figura 82 | Microfotografía de transmisión de microorganismos presentes en la biopelícula del biofiltro con influente contaminado con ión crómico. En todas las fotografías la escala muestra 1 σ m. La presencia de plomo en los espectros de rayos X es debida al empleo de citrato de plomo para el contraste de las muestras mientras que la presencia de cobre se debe a que la rejilla que sirve de soporte para las muestras está compuesta por este elemento. | 159 |
| Figura 83 | Fotografías de microscopía electrónica de barrido de la biopelícula formada en el biofiltro con influente contaminado con arsénico (III). En todos los puntos de la biopelícula en los que realizó el análisis de rayos X, sustancias poliméricas extracelulares y microorganismos, no se halló presencia de arsénico, tal y como muestra el espectro de rayos X mostrado en la parte central de la figura. | 161 |
| Figura 84 | Imágenes de transmisión de los microorganismos que se desarrollan en la biopelícula formada con presencia de arsénico (III). Obsérvese la ausencia de arsénico, en el espectro de rayos X, en todos los puntos analizados (mostrados con flechas). La presencia de plomo y uranio se debe al empleo de citrato de plomo y acetato de uranilo en el proceso de contraste de las muestras y la de cobre a la composición de la rejilla empleada como soporte de las mismas. | 162 |
| Figura 85 | TGGE de fragmentos del gen ADNr 16S (región V3), amplificado por PCR a partir de muestras de ADN extraídas de biopelícula aislada del biofiltro control. En el carril izquierdo (denominado M) del gel se muestran las cepas que se han empleado como marcadores, las cuales presentan diferente porcentaje de G + C. Los cuatro carriles restantes se han nombrado de B1 a B4, haciendo referencia a los cuatro puntos de muestreo del biofiltro control. Los asteriscos muestran bandas que aparecen o desaparecen a lo largo del recorrido del influente. | 165 |

| | | |
|----------------------|--|-----|
| Figura 86 | TGGE del ADNr 16S (región V3) de la comunidad bacteriana presente en el biofiltro con influente contaminado con cobre (II). Los cuatro carriles nombrados como Cu I se tomaron en los puntos de muestreo 1 a 4 del día 90 de funcionamiento continuo del biofiltro, mientras que los cuatro siguientes, nombrados como Cu II, se tomaron en dichos puntos de muestreo el día 121. Como marcadores (carril M) se emplearon las mismas secuencias de ADNr 16S que en el biofiltro control. | 168 |
| Figura 87 | TGGE del ADNr 16S (región V3) de la comunidad bacteriana presente en el biofiltro con influente contaminado con plomo (II). Los cuatro carriles nombrados como Pb 50 pertenecen al muestreo realizado en el día 50 de funcionamiento continuo del biofiltro en los cuatro puntos de muestreo. Los otros muestreos se realizaron los días 51 y 112. | 169 |
| Figura 88 | TGGE del ADNr 16S (región V3) de la comunidad bacteriana presente en las biopelículas del biofiltro con influente contaminado con cromo (III). Del ADN extraído en los puntos de muestreo Cr41-1 y Cr41-3 no se obtuvo amplificación alguna. | 171 |
| Figura 89 | TGGE del ADNr 16S (región V3) de la comunidad bacteriana presente en las biopelículas del biofiltro con influente contaminado con Arsénico (III). | 175 |
| Figura 90 | Alineamiento de la región V3 del ADNr 16S de todas las secuencias pertenecientes a los microorganismos que se desarrollan en las biopelículas de los biofiltros estudiados. Se han incluido además secuencias descritas en la base de datos con el fin de establecer similitudes entre las poblaciones bacterianas desarrolladas en los distintos biofiltros y los microorganismos descritos en bibliografía. | 178 |
| Figura 90 (cont.) | Obsérvese la diferencia en cuanto al número de bases de las secuencias mostradas. El grupo de secuencias en la parte superior de las figuras, con 160 pb, pertenecen al grupo de las Beta-proteobacterias, la parte central lo constituyen las Alfa-proteobacterias, mientras que las tres últimas secuencias guardan similitud con las Acido-bacterias. | 179 |
| Figura 91 | Árbol filogenético Neighbour-Joining basado en la secuencia de la región V3 del ADNr 16S, mostrando las posiciones de las secuencias de las treinta y tres bandas de TGGE afiliadas a Alfa-proteobacterias y otras descritas en bibliografía. La barra indica un 1 % de divergencia estimada. Los números junto a las ramas indican el valor de <i>bootstrap</i> cuando éste es superior al 50 %. | 180 |
| Figura 92 | Árbol filogenético Neighbour-Joining basado en la secuencia de la región V3 del ADNr 16S, mostrando las posiciones de las secuencias de las quince bandas de TGGE afiliadas a Beta-proteobacterias y otras descritas en bibliografía. La barra indica un 1 % de divergencia estimada. Los números junto a las ramas indican el valor de <i>bootstrap</i> cuando éste es superior al 50 %. | 184 |

| | | |
|----------|---|-----|
| Tabla 1 | Niveles guía y concentraciones máximas permitidas para los metales pesados | 5 |
| Tabla 2 | Características generales de las tecnologías empleadas en la descontaminación de metales pesados | 8 |
| Tabla 3 | Factores que influyen en la morfología de las biopelículas (Wimpenny et al., 2000) | 32 |
| Tabla 4 | Diversidad del mundo vivo (Pascual, 1997) | 41 |
| Tabla 5 | Recta de calibrado para la determinación de la concentración de sacarosa | 63 |
| Tabla 6 | Recta de calibrado utilizada para la determinación del contenido en glúcidos totales en el EPS | 70 |
| Tabla 7 | Recta de calibrado para la determinación del contenido proteico en el exopolímero | 71 |
| Tabla 8 | Recta de calibrado utilizada para la determinación del contenido en ácidos urónicos en el exopolímero | 72 |
| Tabla 9 | Análisis de ácidos urónicos en las SPE mediante adición de patrón interno | 73 |
| Tabla 10 | Recta de calibrado para la determinación de los grupos acetilos en el EPS | 74 |
| Tabla 11 | Recta de calibrado para la determinación de la actividad fosfatasa ácida | 77 |
| Tabla 12 | Recta de calibrado utilizada para la determinación de la actividad fosfatasa básica | 78 |
| Tabla 13 | Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR anidada | 84 |
| Tabla 14 | Reactivos empleados en la primera reacción de la PCR anidada, efectuada en un volumen final de 50 σ L. | 86 |
| Tabla 15 | Reactivos empleados en la segunda reacción de la PCR anidada, efectuada en un volumen final de 100 σ L | 86 |
| Tabla 16 | Composición del gel desnaturalizante de poliacrilamida empleado en la TGGE | 88 |
| Tabla 17 | Listado de las cepas de colección que se emplearon como marcadores en la TGGE | 89 |
| Tabla 18 | Periodicidad en las determinaciones realizadas | 92 |
| Tabla 19 | Características físico-químicas y microbiológicas del agua subterránea empleada en el estudio | 97 |
| Tabla 20 | Influencia del punto de muestreo y del catión ensayado en el peso de volátiles de las biopelículas | 106 |
| Tabla 21 | Efecto del catión en la cantidad de sustancias volátiles de las biopelículas | 107 |
| Tabla 22 | Efecto del punto de muestreo en la cantidad de sustancias volátiles de las biopelículas | 107 |
| Tabla 23 | Influencia del punto de muestreo y del catión en el grado de hidratación de la biopelícula | 109 |
| Tabla 24 | Efecto del catión en el grado de hidratación de la biopelícula | 109 |
| Tabla 25 | Efecto del punto de muestreo en el grado de hidratación de la biopelícula | 110 |
| Tabla 26 | Análisis de la varianza para el contenido de volátiles del EPS | 111 |
| Tabla 27 | Test de rango múltiple para el contenido en volátiles de los EPS en los distintos biofiltros | 111 |
| Tabla 28 | Análisis de la varianza para la composición de glúcidos en el EPS en función del catión | 112 |

| | | |
|----------|--|-----|
| Tabla 29 | Test de rango múltiple para los glúcidos en el EPS | 113 |
| Tabla 30 | Análisis de la varianza para la composición de proteínas del EPS en función del catión | 114 |
| Tabla 31 | Test de Rango Múltiple para las proteínas presentes en el EPS | 114 |
| Tabla 32 | Análisis de varianza para los ácidos urónicos en el EPS en función del catión | 115 |
| Tabla 33 | Test de Rango Múltiple para los ácidos urónicos presentes en el EPS | 116 |
| Tabla 34 | Análisis de varianza para los restos acetilos en el EPS en función del catión | 117 |
| Tabla 35 | Test de Rango Múltiple para los restos acetilos presentes en el EPS | 117 |
| Tabla 36 | Contenido en ATP expresado en μg de ATP por 10^8 células (bacterias cultivables), en las biopelículas formadas en los biofiltros en función de los distintos puntos de muestreo. LSD (0,05) | 118 |
| Tabla 37 | Influencia del punto de muestreo y del catión en la cantidad de ATP intracelular (expresada por 10^8 células) | 119 |
| Tabla 38 | Efecto del catión en la cantidad de ATP intracelular (expresada por 10^8 células) | 119 |
| Tabla 39 | Efecto del punto de muestreo en la cantidad de ATP intracelular (expresada por 10^8 células) | 120 |
| Tabla 40 | Influencia del punto de muestreo y del catión en la cantidad de ATP intracelular (expresado por peso de volátiles) | 122 |
| Tabla 41 | Efecto del catión en la cantidad de ATP intracelular (expresado por peso de volátiles) | 122 |
| Tabla 42 | Efecto del punto de muestreo en la cantidad de ATP intracelular (expresado por peso de volátiles) | 122 |
| Tabla 43 | Influencia del punto de muestreo y del catión en la concentración de sacarosa a lo largo del biofiltro | 124 |
| Tabla 44 | Efecto del catión en la concentración de sacarosa a lo largo del biofiltro | 124 |
| Tabla 45 | Efecto del punto de muestreo en la concentración de sacarosa a lo largo del biofiltro | 125 |
| Tabla 46 | Influencia del punto de muestreo y del catión en la cantidad de microbiota mesófila presente en la biopelícula (expresada por peso húmedo de biopelícula) | 127 |
| Tabla 47 | Efecto del catión en la microbiota mesófila presente en la biopelícula | 127 |
| Tabla 48 | Efecto del punto de muestreo en la microbiota mesófila presente en la biopelícula | 127 |
| Tabla 49 | Influencia del punto de muestreo y del catión en la cantidad de microbiota mesófila presente en la biopelícula (expresada por peso de volátiles) | 128 |
| Tabla 50 | Efecto del catión en la microbiota mesófila presente en la biopelícula | 129 |
| Tabla 51 | Efecto del punto de muestreo en la microbiota mesófila presente en la biopelícula | 129 |
| Tabla 52 | Influencia del punto de muestreo y del catión en la actividad fosfatasa alcalina (expresada por peso húmedo de biopelícula) | 131 |
| Tabla 53 | Efecto del catión en la actividad fosfatasa alcalina | 131 |
| Tabla 54 | Efecto del punto de muestreo en la actividad fosfatasa alcalina | 132 |
| Tabla 55 | Actividad fosfatasa alcalina total en mg de <i>p</i> -nitrofenol/peso de volátiles/h formadas en los biofiltros objeto de estudio en función de los puntos de muestreo. LSD (0,05) | 132 |
| Tabla 56 | Influencia del punto de muestreo y del catión en la actividad fosfatasa alcalina (expresada por g de volátiles) | 133 |
| Tabla 57 | Efecto del catión en la actividad fosfatasa alcalina | 133 |
| Tabla 58 | Efecto del punto de muestreo en la actividad fosfatasa alcalina | 134 |

| | | |
|---------------------|---|-----|
| Tabla 59 | Matriz de coeficientes de correlación lineal entre las variables determinadas en el biofiltro control (* P< 0,05) | 135 |
| Tabla 60 | Matriz de coeficientes de correlación lineal entre las variables determinadas en el biofiltro contaminado con cobre (II) (* P< 0,05) | 135 |
| Tabla 61 | Matriz de coeficientes de correlación lineal entre las variables determinadas en el biofiltro contaminado con plomo (II) (* P< 0,05) | 136 |
| Tabla 62 | Matriz de coeficientes de correlación lineal entre las variables determinadas en el biofiltro contaminado con cromo (III) (* P< 0,05) | 137 |
| Tabla 63 | Matriz de coeficientes de correlación lineal entre las variables determinadas en el biofiltro contaminado con arsénico (III) (* P< 0,05) | 137 |
| Tabla 64 | Identificación de las bandas secuenciadas del gen mostrado en la Figura 82, presentes en la biopelícula formada en el biofiltro control. | 164 |
| Tabla 65 | Identificación de las bandas secuenciadas del gen mostrado en la Figura 83, presentes en la biopelícula formada en el biofiltro cobre. | 166 |
| Tabla 65 (cont.) | Identificación de las bandas secuenciadas del gen mostrado en la Figura 86, presentes en la biopelícula formada en el biofiltro cobre. | 167 |
| Tabla 66 | Identificación de las bandas secuenciadas del gen mostrado en la Figura 87, presentes en la biopelícula formada en el biofiltro plomo. | 170 |
| Tabla 67 | Identificación de las bandas secuenciadas del gel mostrado en la Figura 88, presentes en la biopelícula formada en el biofiltro cromo. | 172 |
| Tabla 67 (cont.) | Identificación de las bandas secuenciadas del gel mostrado en la Figura 88, presentes en la biopelícula formada en el biofiltro cromo. | 173 |
| Tabla 68 | Identificación de las bandas secuenciadas del gen mostrado en la Figura 89, presentes en la biopelícula formada en el biofiltro arsénico. | 174 |
| Tabla 69 | Microorganismos recogidos en la base de datos, empleados para realizar el árbol filogenético mostrado en la Figura 90. | 176 |
| Tabla 70 | Matriz de distancias por pares de las secuencias del sub- <i>cluster</i> 1A mostrado en la Figura 91. | 181 |
| Tabla 71 | Matriz de distancias por pares de las secuencias del sub- <i>cluster</i> 2B mostrado en la Figura 91 | 182 |
| Tabla 72 | Matriz de distancias por pares de las secuencias del sub- <i>cluster</i> 3 mostrado en la Figura 91 | 183 |
| Tabla 73 | Matriz de distancias por pares de las secuencias del sub- <i>cluster</i> 4H mostrado en la Figura 92 | 184 |
| Tabla 74 | Matriz de distancias por pares de las secuencias del sub- <i>cluster</i> 5 mostrado en la Figura 92 | 185 |

