

**UNIVERSIDAD SAN PABLO-CEU
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**



**ESTUDIO Y DESARROLLO DE SISTEMAS
DE BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS DE
TALADRINAS PROCEDENTES DE
ACTIVIDADES INDUSTRIALES**

LUCÍA GRIJALBO FERNÁNDEZ

**TESIS DOCTORAL
Madrid, 2012**

**UNIVERSIDAD SAN PABLO-CEU
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**



**ESTUDIO Y DESARROLLO DE SISTEMAS DE
BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS DE TALADRINAS
PROCEDENTES DE ACTIVIDADES INDUSTRIALES**

Memoria presentada por
Lucía Grijalbo Fernández
para optar al grado de doctor

VºBº de los directores.

Director Dr. J. Antonio Lucas García

Director Dr. F. Javier Gutiérrez Mañero

Lucía Grijalbo Fernández

Madrid, 2012

A mi familia y a Carlos

“En la vida se puede tener todo, poder, riqueza y honores, pero todo se puede perder en un abrir y cerrar de ojos... y solamente nos queda el amor que hayamos podido sembrar”

(**Emperatriz Zita**, esposa del beato Carlos I de Austria)

AGRADECIMIENTOS

Primero de todo al Señor, que siempre guía mis pasos, que me ha dado la vida y los talentos. También gracias a María, ejemplo de entrega y de servicio a Dios.

A la Universidad San Pablo-CEU y a todos los que la constituyen, por la formación que me han dado, tanto a nivel intelectual como espiritual, y por permitirme realizar mi tesis doctoral.

A mi familia por darme su amor en cada momento. A mis padres, por su cariño incondicional, por apoyarme en todas mis decisiones. A mis abuelos y mis tíos, gracias porque, aun en la distancia, siempre sabéis estar a mi lado. A Carlos por ser mi roca, por acompañarme, escucharme y estar siempre a mi lado.

A mis queridos directores, el Dr. Fco. Javier Gutiérrez Mañero y el Dr. José Antonio Lucas García, por su cariño, su paciencia y su ayuda durante estos 6 años y, por supuesto, gracias por admitirme en su grupo de investigación.

A la empresa John Deere Ibérica S. A. por el convenio Universidad-Empresa que ha permitido la realización de mi tesis doctoral.

A D. Lázaro Martínez, por permitirme realizar este proyecto y por lo cariñoso que es y siempre ha sido conmigo. A Ángel porque siempre que necesito algo de información me la envía en el momento y a todos los compañeros del “palomar” de John Deere, especialmente a Guille, por los buenos ratos que me hicieron pasar cuando estuve con ellos y por todo lo que me enseñaron.

A mis compañeros de laboratorio, por su compañía. En especial a Alfonso Bonilla por ayudarme con las medidas del maíz y a la Dra. Beatriz Ramos que siempre me ha ayudado, corrigiéndome los “abstracts”, incluso cuando se lo pedía en el último momento. A Jorgito y a Dani, por hacer más ameno el laboratorio. También gracias a las doctoras Ana y Elena.

Un agradecimiento especial al Dr. D. Emilio Herrera, por los ratos del café y las cenas de laboratorio (no puedo olvidar las cenas de Navidad con su famoso villancico “el puente de la Macarena...”).

No quiero olvidarme del Dr. Jorge Barriuso, por su ayuda durante mis primeros años de investigación y por su alegría en las cenas de laboratorio.

Al Dr. Agustín Probanza porque siempre ha estado y está dispuesto a ayudarme en aquello que necesite. También por su simpatía y buen humor.

Al Dr. Benito Lacalle, por su cariño y por permitirme disponer de su laboratorio y atender mis dudas en cualquier momento.

Quiero agradecer a los doctores Nuno Henriques Gil y M^a José Pozuelo de Felipe las correcciones que me han hecho con todo su cariño.

Gracias a la gente de Parasitología, por su simpatía y porque siempre que he necesitado un producto me lo han dejado encantados.

A todos los profesores de la Universidad San Pablo-CEU, por todo lo que me han enseñado, no sólo a nivel académico sino, y sobretodo, a nivel humano, que para mí es el más importante.

A los capellanes del CEU. Especialmente al padre Cura, por su apoyo, porque siempre está cuando le necesito y por todo el cariño que siempre da. Y, por supuesto, al padre LuisFer por su cariño, por estar siempre pendiente de todos, por su alegría y ejemplo.

Gracias también a los profesores del grupo de Pastoral por acogerme en las reuniones y en las comidas.

Gracias al personal de secretaría por su amabilidad y por todos los certificados que me han impreso; al personal de mantenimiento (Alejandro y Montes) porque siempre reparan las cosas en el menor tiempo posible, incluso quitándose tiempo de descanso, y por sus bromas y simpatía cada vez que nos cruzábamos con ellos; al personal de informática (especialmente a JuanPa); a los bedeles, por abrirme las puertas de los laboratorios; a las señoras de la limpieza; a Guillermo por el suministro de los productos... a todos los que hacen posible que esta Universidad funcione día a día.

Y, los agradecimientos a la gente de otros centros... espero no dejarme a nadie...

Primeramente y de modo muy especial a la Dra. Mercedes Fernández-Pascual, por sus consejos, porque siempre ha estado abierta a que realice con ellos distintas técnicas de investigación, siempre dispuesta a acogerme en su grupo. Gracias por todo lo que me ha enseñado.

A los compañeros del departamento de Fisiología y Ecología Vegetal del Instituto de Ciencias Agrarias del C.S.I.C., en especial a César y a Susana que me ayudaron en las inclusiones y en los cortes con el microtomo. A todos ellos gracias por su cariño. Y, por supuesto, gracias también a Fernando por los agradables ratos en el microscopio.

Gracias a la Dra. Francisca Fernández Piñas, por acogerme en su laboratorio y permitirme realizar los ensayos de bioluminiscencia. También a Ismael, por enseñarme estos ensayos, por su paciencia. Y al resto de compañeros del departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid, por su acogida.

A toda la gente de Gaiker, especialmente a D. Javier Etxebarria, por acogerme con tanto cariño y por buscar que mi estancia fuese lo más fructífera posible, no sólo trabajando en Gaiker, sino también ayudándome para que hiciese los ensayos en Neiker y la UPV.

Por supuesto, también quiero decir "mileske" a Esti y a Deiene, por hacerme sentir una más en el grupo de trabajo, enseñarme todo lo que hacían y siempre con amabilidad.

Y, también al resto de la gente que me ayudó y me permitió estar en su laboratorio, especialmente a Patxi Vilches y a Zoraida. Y a todos los que me dejaron la tarjeta para acceder a los laboratorios de microbiología, en especial a Ana.

No me olvido de los compañeros de cafés, comidas y buenos ratos. Gracias a Nerea, Iker, Igor, Iván, Leire, Jone... os guardo en el corazón (y os tengo fichados en Facebook...).

Al Dr. Carlos Garbisu, por ponernos en contacto con D. Javier Etxebarria para que pudiese realizar mi estancia y permitirme disponer de su laboratorio para la realización de los experimentos de Biolog[®].

A los Drs. Lur Epelde e Iker Martín, por ayudarme con dichos ensayos y enviarme los datos cada vez que se los pedía.

Al Dr. Txema Becerril, por permitirme usar sus laboratorios y cámaras de cultivo para realizar los ensayos con plantas durante mi estancia y por todas las plantas acuáticas que seleccionó de su "estanque" para que realizase los ensayos.

Quiero agradecer especialmente a la Dra. Oihana Barrutia toda su ayuda, su compañía durante los muestreos, su simpatía y su amistad. Gracias por llevarme a la residencia cuando salíamos tarde de la Uni, aunque te supusiera desplazarte de camino, "mileske".

Y por supuesto, gracias a todos los compañeros del laboratorio que me ayudaron durante la estancia o que al menos me acogieron con mucha amabilidad.

Para toda esta gente de Bilbao... Besarkada bat.

Y a mis amigos, porque siempre estáis ahí. Gracias en especial a Carmen y a Roberto por su amistad incondicional.

Y por supuesto, a todas las personas que, de alguna manera, siempre están o han estado junto a mí.

Este trabajo ha sido financiado con beca para la Formación del Personal Universitario (FPU) del Ministerio de Ciencia e Innovación.

ÍNDICE

Índice de tablas	i
Índice de figuras	vii
Índice de abreviaturas	xxxix
Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción	5
1.1 El agua	7
1.2. Usos del agua	8
1.3. Normativa legal aplicable	9
1.4. La contaminación del agua	11
1.5. Causas de contaminación	11
1.6. Clasificación de la contaminación	13
1.6.1. Contaminación química	13
1.6.1.1. Contaminantes orgánicos	13
1.6.1.2. Contaminantes inorgánicos: Metales	15
1.6.2. Contaminación física	15
1.6.3. Contaminación radiactiva	15
1.6.4. Contaminación biológica	15
1.7. Parámetros generales indicadores de contaminación acuática	16
1.7.1. Parámetros de carácter químico	16
1.7.2. Parámetros de carácter físico	16
1.7.3. Parámetros de carácter radiactivo	17
1.7.4. Parámetros de carácter microbiológico	17
1.8. Efecto de los contaminantes sobre los seres vivos	17
1.9. Las taladrinas	18
1.10. Biorremediación	20
1.10.1. Factores que condicionan la biorremediación	21

1.10.2. Estrategias de biorremediación -----	26
1.10.2.1. Mineralización -----	26
1.10.2.2. Cometabolismo -----	27
1.10.3. Técnicas de biorremediación -----	28
1.10.3.1. Técnicas <i>Ex situ</i> o tratamientos por encima del suelo -----	28
1.10.3.2. Técnicas <i>In situ</i> -----	28
1.11. Técnicas de biorremediación <i>ex situ</i> : Reactores biológicos -----	29
1.11.1. Reactores biológicos de membrana (R. B. M.) -----	29
1.11.2. Tipos de Reactores Biológicos de Membrana -----	33
1.11.2.1. Biorreactores con membrana integrada o sumergida -----	33
1.11.2.2. Membranas externas o con recirculación al biorreactor -----	34
1.12. Técnicas de biorremediación <i>in situ</i> -----	34
1.12.1. Atenuación natural -----	35
1.12.2. Bioestimulación -----	36
1.12.3. Bioaumentación -----	36
1.12.3.1. Factores que determinan el bioaumentación -----	37
1.12.3.2. Selección de microorganismos para el bioaumentación -----	39
1.12.4. Fitorremediación -----	42
1.12.4.1. Contaminantes fitorremediados -----	43
1.12.4.2. Fases de la fitorremediación -----	45
1.12.4.3. Estrategias de la fitorremediación -----	46
1.12.4.3.a. Fitoextracción o fitoacumulación -----	47
1.12.4.3.b. Fitodegradación -----	47
1.12.4.3.c. Fitovolatilización -----	48
1.12.4.3.d. Fitoestabilización -----	48
1.12.4.3.e. Rizofiltración -----	49
1.12.5. Rizorremediación -----	50
1.12.5.1. La rizosfera -----	51
1.12.5.2. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) -----	54
1.13. Objetivos -----	55

2. Materiales y métodos: Puesta a punto de un sistema de cultivo optimizado para la fitorremediación de agua de taladrina -----	57
2.1. Residuo industrial objeto de la fitorremediación: Agua de taladrina -----	59
2.2. Análisis químicos de las muestras de agua de taladrina -----	60
2.2.1. Demanda biológica de Oxígeno (DBO ₅) -----	60
2.2.2 Demanda química de Oxígeno (DQO) -----	61
2.2.3 Medida de pH -----	62
2.2.4. Conductividad eléctrica y residuo seco -----	62
2.3. Análisis cualitativo y cuantitativo de los hidrocarburos (aromáticos y no aromáticos) en las muestras de agua de taladrinas -----	63
2.3.1. Análisis cualitativo de los hidrocarburos -----	63
2.3.1.1. Cromatografía de gases combinado con espectrometría de masas (GC/MS) cualitativo -----	63
2.3.1.2. Microextracción en fase sólida (SPME) -----	64
2.3.2. Cuantificación de hidrocarburos totales -----	64
2.4. Análisis cuantitativo y cualitativo de los elementos químicos de las muestras de agua de taladrina -----	65
2.5. Bacterias utilizadas en los experimentos -----	66
2.5.1. Bacterias procedentes de la colección de cepas del grupo de investigación de Biotecnología de la Rizosfera de la Universidad San Pablo-CEU: Cepas procedentes de la zona franca de Barcelona -----	66
2.5.2. Bacterias aisladas de agua de taladrinas -----	67
2.5.2.1. Método de filtración -----	67
2.5.2.2. Método de suspensiones-diluciones -----	67
2.6. Determinación de la capacidad de las bacterias para crecer en presencia de agua de taladrinas -----	68
2.7. Determinación de la capacidad de las bacterias para crecer en agua de taladrina como única fuente de nitrógeno y carbono -----	68
2.8. Clasificación taxonómica de las bacterias -----	69
2.9. Cinética de crecimiento de las cepas bacterianas en agua de taladrina -----	70
2.10. Especies vegetales utilizadas en los experimentos de fitorremediación -----	72
2.10.1. Especies de hábitat terrestre -----	72

2.10.2. Especies de hábitat acuático -----	76
2.11. Determinación de la capacidad de germinación en agar con agua de taladrina de las semillas de las especies de hábitat terrestre -----	79
2.12. Determinación de la capacidad de crecimiento en agua de taladrina -----	80
2.13. Determinación de la capacidad de desarrollo en agua de taladrina -----	81
2.13.1. Experimentos con <i>Lemna minor</i> -----	81
2.13.2. Experimentos con <i>Myriophyllum</i> y <i>Elodea</i> -----	84
2.13.3. Experimentos con <i>Cyperus</i> -----	85
2.14. Determinación de la capacidad de fitorremediación del maíz en un periodo de cinco días -----	85
2.15. Determinación de la capacidad de fitorremediación del maíz en un periodo de nueve días -----	89
2.16. Diseño de un sistema planta-microorganismo -----	92
2.17. Tratamiento estadístico: Análisis de la varianza (ANOVA) -----	93
3. Resultados: Puesta a punto de un sistema de cultivo optimizado para la fitorremediación de agua de taladrina -----	95
3.1. Análisis fisicoquímicos de las muestras de agua de taladrina -----	97
3.1.1. Conductividad -----	97
3.1.2. Residuo seco -----	97
3.1.3. pH -----	98
3.1.4. Demanda química de oxígeno (DQO) -----	99
3.1.5. Demanda biológica de oxígeno (DBO ₅) -----	99
3.2. Análisis cualitativo y cuantitativo de los hidrocarburos (aromáticos y no aromáticos) de las muestras de agua de taladrinas -----	99
3.3. Análisis elemental, cuantitativo y cualitativo, de muestras de agua de taladrina ----	102
3.4. Determinación de la capacidad de las bacterias procedentes de la zona franca de Barcelona y de las cepas aisladas de las taladrinas para crecer en medio sólido con agua de taladrina como única fuente de nutrientes -----	103
3.5. Clasificación taxonómica de las bacterias aisladas -----	103
3.6. Cinética crecimiento cepas bacterianas seleccionadas en agua de taladrina -----	104
3.7. Determinación de la capacidad de germinación en agar con agua de taladrina de las semillas de las especies de hábitat terrestre -----	106

3.7.1 Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) -----	106
3.7.2. Altramuz (<i>Lupinus sp.</i>) -----	106
3.7.3. Arroz (<i>Oryza sativa</i>) -----	107
3.7.4. Espadaña (<i>Typha angustifolia</i>) -----	108
3.7.5. Girasol (<i>Helianthus annuus</i>) -----	108
3.7.6. Maíz (<i>Zea mays</i>) -----	109
3.7.7. Mostaza parda (<i>Brassica juncea</i>) -----	110
3.8. Determinación de la capacidad de crecimiento en agua de taladrina -----	110
3.9. Determinación de la capacidad de desarrollo en agua de taladrina de las plantas de hábitat acuático -----	112
3.9.1. Experimentos con <i>Lemna minor</i> -----	112
3.9.1.1. Disminución de la DQO por la especie <i>Lemna minor</i> -----	112
3.9.1.2 Variación del peso fresco, eficiencia fotosintética y pigmentos fotosintéticos de <i>Lemna minor</i> creciendo en agua de taladrina y taladrina pretratada -----	112
3.9.1.2.a. Variación del peso fresco -----	112
3.9.1.2.b. Variación de la eficiencia fotosintética de las plantas en agua de taladrina -----	114
3.9.1.2.c. Variación de la eficiencia fotosintética de las plantas en taladrina pretratada -----	116
3.9.1.2.d. Variación de los pigmentos fotosintéticos de las plantas en agua de taladrina -----	117
3.9.1.2.e. Variación de los pigmentos fotosintéticos de las plantas en taladrina pretratada -----	119
3.9.2. Experimentos con <i>Cyperus alternifolius</i> , <i>Elodea canadensis</i> y <i>Myriophyllum</i> -----	121
3.10. Determinación de la capacidad de biorremediación del maíz en dos periodos de 5 días -----	122
3.10.1. Variaciones de la DQO bajo el efecto de plantas de maíz -----	122
3.10.2. Efecto del agua de taladrina sobre los parámetros biométricos de las plantas de maíz -----	122
3.10.3. Efecto del agua de taladrina sobre los parámetros fotosintéticos de las plantas de maíz -----	123

3.11. Determinación de la capacidad de biorremediación del maíz en un periodo de nueve días -----	125
3.11.1. Variación de la DQO bajo el efecto de las plantas de maíz -----	125
3.11.2. Efecto del agua de taladrina sobre los parámetros biométricos de las plantas de maíz -----	126
3.11.3. Efecto del agua de taladrina sobre los parámetros fotosintéticos de las plantas de maíz -----	127
3.12. Diseño de un sistema de rizorremediación planta-microorganismo -----	129
3.12.1. Análisis del agua de taladrina fitorremediada -----	129
3.12.2. Variación de los parámetros biométricos -----	133
3.12.3. Variación de los parámetros fotosintéticos -----	134
3.13. Aportaciones a congresos -----	135
4. Discusión: Puesta a punto de un sistema de cultivo optimizado para la fitorremediación de agua de taladrina -----	137
5. Materiales y métodos: Desarrollo y optimización de sistemas planta-microorganismo para fitorremediar agua de taladrina -----	157
5.1. Colonias bacterianas utilizadas en los sistemas optimizados de fitorremediación --	159
5.1.1. Colonias bacterianas procedentes del esparto -----	159
5.1.2. Cepas bacterianas procedentes de sistemas rizosféricos -----	160
5.2. Clasificación taxonómica de las bacterias aisladas del esparto -----	160
5.3. Optimización de los sistemas de fitorremediación mediante un sistema planta-microorganismo -----	161
5.4. Determinación de velocidad del flujo de electrones a través de los fotosistemas mediante reacción de Hill y determinación de la cantidad de clorofila -----	162
5.5. Escalado de los experimentos a nivel industrial -----	165
5.5.1. Fase primera de biorremediación: Fase de ida -----	165
5.5.2. Fase de recuperación -----	166
5.5.3. Fase segunda de biorremediación: Fase de vuelta -----	166
5.6. Análisis de toxicidad del agua de taladrina fitorremediada mediante bioluminiscencia -----	168
5.6.1. Toxicidad sobre <i>Anabaena sp.</i> -----	168
5.6.2. Análisis de la toxicidad sobre plantas de maíz: Sistema fitorremediador -----	170

5.7. Análisis ultraestructural de hojas y raíces de maíz tras fitorremediar el agua de taladrina -----	171
5.7.1. Microscopía electrónica de transmisión -----	171
5.7.1.1. Inclusión de las muestras en LR White -----	171
5.7.1.2. Visualización al microscopio óptico de campo claro -----	172
5.7.1.3. Visualización al microscopio electrónico de transmisión -----	173
5.7.2. Microscopía electrónica de barrido -----	173
5.8. Tratamiento estadístico: Análisis de la varianza (ANOVA) -----	173
6. Resultados: Desarrollo y optimización de sistemas planta- microorganismo para fitorremediar agua de taladrina -----	175
6.1. Capacidad de las colonias ensayadas para crecer en agar con agua de taladrina con o sin nutrientes -----	177
6.2. Clasificación taxonómica de las bacterias aisladas -----	177
6.3. Diseño de los sistemas de fitorremediación mediante un sistema planta- microorganismo: Inoculación de la bacteria Esp1 -----	178
6.3.1. Análisis del agua de taladrina fitorremediada -----	178
6.3.2. Variación de los parámetros biométricos -----	181
6.3.3. Variación de los parámetros fotosintéticos, reacción de Hill y concentración de clorofilas -----	183
6.4. Diseño de los sistemas de fitorremediación mediante un sistema planta- microorganismo: Inoculación de la levadura Esp14 -----	186
6.4.1. Análisis del agua de taladrina fitorremediada -----	186
6.4.2. Variación de los parámetros biométricos -----	189
6.4.3. Variación de los parámetros fotosintéticos, reacción de Hill y cantidad de clorofilas -----	192
6.5. Diseño de los sistemas de fitorremediación mediante un sistema planta- microorganismo: Inoculación de la bacteria Aur 6 -----	195
6.5.1. Análisis del agua de taladrina fitorremediada -----	195
6.5.2. Variación de los parámetros biométricos -----	198
6.5.3. Variación de los parámetros fotosintéticos, reacción de Hill y cantidad de clorofilas -----	200
6.6. Patente -----	202
6.7. Resultados de los experimentos de fitorremediación por fases -----	203

6.7.1. Análisis del agua de taladrina fitorremediada -----	204
6.7.2. Variación de los parámetros biométricos -----	207
6.7.3. Variación de los parámetros fotosintéticos, reacción de Hill y cantidad de clorofilas -----	208
6.8. Análisis de bioluminiscencia -----	216
6.8.1. Toxicidad sobre <i>Anabaena sp</i> -----	216
6.8.2. Análisis de la toxicidad sobre plantas de maíz: Sistema fitorremediador -----	220
6.9. Análisis ultraestructural de hojas y raíces de maíz tras fitorremediar el agua de taladrina -----	223
6.9.1. Visualización de hojas -----	223
6.9.1.1. Microscopía óptica de campo claro -----	223
6.9.1.2. Microscopía electrónica de transmisión -----	225
6.9.1.3. Microscopía electrónica de barrido -----	228
6.9.2. Visualización de raíces -----	231
6.9.2.1. Microscopía óptica de campo claro -----	231
6.9.2.2. Microscopía electrónica de transmisión -----	232
6.9.2.3. Microscopía electrónica de barrido -----	234
6.10. Aportaciones a congresos -----	236
7. Discusión: Desarrollo y optimización de sistemas planta- microorganismo para fitorremediar agua de taladrina -----	237
8. Materiales y métodos: Estudio de la dinámica de comunidades microbianas en un reactor biológico de membrana durante el proceso de biorremediación de taladrinas y su empleo en sistemas de fitorremediación -----	253
8.1. Reactor biológico de membrana (R. B. M.) -----	255
8.2. Medidas de seguimiento del R. B. M. -----	257
8.2.1 Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) -----	257
8.2.2. Determinación de la concentración de sólidos en suspensión -----	258
8.2.3. Determinación de la turbidez del permeado -----	259
8.2.4. pH -----	259
8.2.5. Velocidad del caudal de permeado -----	259
8.3. Limpieza de la membrana -----	260

8.3.1. Limpieza tradicional -----	260
8.3.2. Limpieza de la membrana específica para las taladrinas -----	260
8.3.3. Medida de la permeabilidad intrínseca de la membrana -----	261
8.4. Bacterias aisladas del R. B. M. -----	261
8.5. Estudios sobre las bacterias cultivables aisladas del biorreactor -----	262
8.5.1. Clasificación taxonómica -----	262
8.5.2. Estudios de diversidad -----	263
8.5.2.1. Estimación de la riqueza -----	263
8.5.2.2. Medida de la diversidad biológica -----	264
8.5.2.3. Comparación de cobertura -----	264
8.6. Estudios de las distintas librerías metagenómicas realizadas con el gen 16s rRNA amplificado a partir del ADN aislado de la comunidad total del biorreactor en cada momento de muestreo -----	265
8.6.1 Clasificación taxonómica -----	265
8.6.2. Análisis estadísticos realizados con las secuencias -----	266
8.7. Estudio de la diversidad metabólica de las comunidades microbianas que se desarrollan en el R. B. M. mediante el uso de placas Biolog® -----	266
8.8. Experimentos con <i>Lemna minor</i> inoculada con un consorcio del biorreactor -----	269
8.9. Diseño de sistema planta-microorganismo con cepas aisladas del biorreactor -----	270
8.9.1. Primer experimento: Realizado en la universidad del País Vasco y con una sola inoculación del consorcio -----	270
8.9.2. Segundo experimento: Realizado en la universidad San Pablo-CEU con dos inoculaciones del consorcio -----	270
8.10. Tratamiento estadístico -----	271
8.10.1 Análisis de la varianza (ANOVA) -----	271
8.10.2. Análisis estadísticos multivariantes -----	271
9. Resultados: Estudio de la dinámica de comunidades microbianas en un reactor biológico de membrana durante el proceso de biorremediación de taladrinas y su empleo en sistemas de fitorremediación -----	273
9.1. Seguimiento del reactor biológico de membrana (R. B. M.) -----	275
9.1.1 Evolución de la demanda química de oxígeno (DQO) -----	275

9.1.2. Determinación de la concentración de sólidos en suspensión -----	276
9.1.3. Determinación de la turbidez del permeado -----	276
9.1.4. pH -----	277
9.1.5. Velocidad del caudal de permeado -----	277
9.1.6. Medida de la permeabilidad intrínseca de la membrana -----	278
9.2. Estudios de las bacterias cultivables aisladas del R. B. M. -----	279
9.2.1. Clasificación taxonómica -----	279
9.2.2 Estudios de diversidad -----	281
9.2.2.1. Índice de Chao -----	281
9.2.2.2. Estimador de Jackknife -----	282
9.2.2.3. Diversidad biológica: Índice de Shannon-Wiener -----	282
9.2.2.4. Comparación de Libshuff -----	282
9.2.2.5. Diagrama de Venn -----	283
9.3 Estudios de las distintas librerías metagenómicas realizadas con el gen 16s rRNA amplificado a partir del ADN aislado de la comunidad total del biorreactor en cada momento de muestreo -----	284
9.3.1. Clasificación taxonómica -----	284
9.3.1.1. Muestreo A -----	284
9.3.1.2. Muestreo B -----	291
9.3.1.3. Muestreo C -----	296
9.3.1.4. Muestreo D -----	301
9.3.1.5. Muestreo E -----	307
9.3.1.6. Distribución de clases en el conjunto de muestreos realizados -----	312
9.3.2. Análisis estadísticos realizados con las secuencias -----	313
9.3.2.1. Curvas de rarefacción -----	313
9.3.2.2. Estimación de la riqueza y diversidad -----	314
9.3.2.3. Comparación de Libshuff -----	315
9.3.2.4. Diagrama de Venn -----	315
9.4. Estudio de la diversidad metabólica de las comunidades microbianas que se desarrollan en el R. B. M. mediante el uso de placas Biolog® -----	316
9.4.1. Biolog® Gram negativa (GN) -----	316

9.4.1.1. Evolución del AWCD (average well colour development) -----	316
9.4.1.2. Diversidad metabólica -----	317
9.4.1.3. Consumo de fuentes nutritivas -----	317
9.4.1.4. Análisis de correspondencias de las placas Biolog® Gram-negativa -----	319
9.4.2. Biolog® gram positiva (GP) -----	319
9.4.2.1. Evolución del AWCD -----	319
9.4.2.2. Diversidad metabólica -----	320
9.4.2.3. Consumo de fuentes nutritivas -----	320
9.4.2.4. CA de las placas Biolog® Gram-positiva -----	322
9.4.3. Biolog® Anaerobia (AN) -----	322
9.4.3.1. Evolución del AWCD -----	322
9.4.3.2. Diversidad metabólica -----	323
9.4.3.3. Consumo de fuentes nutritivas -----	324
9.4.3.4. Análisis de correspondencias de las placas Biolog® Anaerobia -----	325
9.5. Experimentos de fitorremediación con <i>Lemna minor</i> inoculada con un consorcio bacteriano procedente del biorreactor -----	326
9.5.1. Análisis del agua fitorremediada: DQO -----	326
9.5.2. Parámetros biométricos: Peso fresco y fluorescencia -----	326
9.5.2.1. Peso fresco -----	326
9.5.2.2. Fluorescencia -----	327
9.5.3. Análisis de pigmentos fotosintéticos -----	328
9.6. Diseño sistema fitorremediación planta-microorganismo inoculado con un consorcio bacteriano de cepas aisladas del biorreactor -----	329
9.6.1. Primer experimento: Realizado en la universidad del País Vasco y con una sola inoculación del consorcio -----	329
9.6.1.1. Análisis del agua fitorremediada -----	329
9.6.1.2. Parámetros biométricos -----	330
9.6.1.3. Fluorescencia y pigmentos fotosintéticos -----	331
9.6.1.3.a. Fluorescencia -----	331
9.6.1.3.b. Pigmentos fotosintéticos -----	331

9.6.2. Segundo experimento: Realizado en la universidad San Pablo-CEU con dos inoculaciones del consorcio -----	333
9.6.2.1. Análisis del agua fitorremediada -----	333
9.6.2.2. Variación de los parámetros biométricos -----	336
9.6.2.3. Eficiencia fotosintética de las plantas, reacción de Hill y cantidad de clorofila -----	338
9.7. Aportaciones a congresos -----	341
10. Discusión: Estudio de la dinámica de comunidades microbianas en un reactor biológico de membrana durante el proceso de biorremediación de taladrinas y su empleo en sistemas de fitorremediación -----	343
11. Conclusiones -----	357
Bibliografía -----	361
Anexo 1: Legislación -----	415
Índice legislativo -----	417
A1.1. CONSTITUCIÓN ESPAÑOLA: Artículo 45 -----	419
A1.2. DIRECTIVA 2000/60/CE, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas (DOCE número L- 327 de 22/12/2000): Considerando (1) y artículos 1 a 3 -----	421
A.1.3. REAL DECRETO LEGISLATIVO 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la LEY DE AGUAS (BOE número 176, de 24/07/2001): Artículo 1 y Título V, Capítulos I y II -----	427
A1.4. DIRECTIVA 91/271/CEE, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas (DOCE número L-135 de 30/05/1991) -----	433
A1.5. REAL DECRETO-LEY 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas (BOE número 312, de 30/12/1995) -----	447
A1.6. REAL DECRETO 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas (BOE número 77, de 29/03/1996) -----	451
A1.7. LEY AUTONÓMICA 10/1993, de 26 de octubre, de la Comunidad de Madrid, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento (BOCAM número 269 de 12/11/1993) -----	455
A1.8. LEY AUTONÓMICA 5/2003, de 20 de marzo, de Residuos de la Comunidad de Madrid (BOCAM número 76 de 31/03/2003): Disposición adicional segunda.	

Modificación de la Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento	465
A1.9. DECRETO 57/2005, de 30 de junio, de la Comunidad de Madrid, por el que se revisan los Anexos de la Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento (BOCAM nº 159 de 06/07/2005)	467
A1.10. ORDENANZA GENERAL PARA LA PROTECCIÓN DEL MEDIO AMBIENTE DEL MUNICIPIO DE GETAFE (BOCAM número 154 de 30/06/2004, suplemento): Título I, Capítulo I: Normas Generales y Título IV: Normas particulares aguas	471
Anexo 2: Colección de bacterias aisladas de la zona franca de Barcelona	479
Anexo 3: Medios de Cultivo	487
A3.1. Medio TPYG	489
A3.2. Medio Hutner (para <i>Lemna</i>)	489
A3.3. Medio Hoagland's y Arnon (pH 5.5)	490
Anexo 4: Bacterias aisladas de la zona franca de Barcelona y de taladrina pretratada capaces de crecer en agar con agua de taladrina	491
Anexo 5: Análisis fisicoquímicos de las muestras de agua de taladrina ..	497
Anexo 6: Cromatogramas correspondientes al análisis de hidrocarburos de la muestra de John Deere del 19/01/2009	501
Anexo 7: Análisis elemental de las muestras de agua de taladrina	517
Anexo 8: Cromatogramas correspondientes al análisis de pigmentos fotosintéticos de <i>Lemna minor</i> de los tratamientos control y 5 días en agua de taladrina	531
Anexo 9: Cromatogramas correspondientes al análisis de hidrocarburos de las muestras iniciales y fitorremediadas	535
Anexo 10: Cromatogramas correspondientes al análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) de las muestras iniciales y fitorremediadas	553
Anexo 11: Fichas informativas del aceite de corte	571
Anexo 12: Preparaciones utilizadas en microscopía electrónica	579
A12.1. Preparación de Citrato de plomo (fijador)	581
A12.2. Preparación de Tetróxido de Osmio (ácido ósmico) 2%	581
A12.3. Preparación de Tampón de Cacodilato 0,05 M	582

A12.4. Preparación de Cacosacarosa -----	582
A12.5. Preparación de Acetato de Uranilo en etanol -----	582
A12.6. Tinción de rejillas con Citrato de Plomo para microscopio electrónico -----	582
Anexo 13: Patente “Procedimiento para la reducción de la DQO de efluentes líquidos aceitosos mediante fitorremediación con maíz-esparto; su aplicación al tratamiento de taladrinas agotadas” -----	583
Anexo 14: Comparación del análisis de hidrocarburos de las muestras iniciales y fitorremediadas durante un periodo de 5 días -----	599
Anexo 15: Cepas aisladas del reactor biológico membrana (R. B. M.) -----	603
Anexo 16: Medidas de seguimiento de un reactor biológico de membrana (R. B. M.) -----	613
Anexo 17: Cromatogramas correspondientes al análisis de pigmentos fotosintéticos de <i>Lemna minor</i> de los tratamientos control, control con inóculo, 5 días en agua de taladrina y 5 días en agua de taladrina con inóculo -----	617
Anexo 18: Cromatogramas correspondientes al análisis de pigmentos fotosintéticos de <i>Zea mays</i> de los tratamientos control, control con inóculo, 5 días en agua de taladrina y 5 días en agua de taladrina con inóculo -----	623
Anexo 19: Aportaciones a congresos -----	629
XIII National Meeting of the Spanish Society of Nitrogen Fixation II Portuguese-Spanish Congress on Nitrogen Fixation. Zaragoza. 15-18 Junio 2010: Abstract y póster: Phytoremediation of aqueous solutions of lubricants from industrial activities using maize plants grown in hydroponic conditions inoculated with different bacterial strains -----	631
XIX Reunión de la sociedad española de Fisiología Vegetal. Castellón de la plana. Junio 2011. Abstract y póster: Efectos fisiológicos en plantas de maíz utilizadas en ensayos de fito-rizoremediación de aguas de taladrinas -----	635
IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. BioMicroWorld2011. Torremolinos. 14-16 September 2011. Abstract y poster: Structural diversity of microbial communities in a bioreactor fed with bio-remediated metal-working fluid -----	637
IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. BioMicroWorld2011. Torremolinos. 14-16 September 2011. Abstract y poster: Functional diversity of microbial communities in a bioreactor fed with bio-remediated metal-working fluid -----	640

ÍNDICE DE TABLAS

1. Introducción-----	5
Tabla 1.1. Resumen comparativo de las diferencias de rendimiento entre una planta con reactores biológicos de membrana (R. B. M.) y una convencional (con o sin complementos) -----	31
Tabla 1.2. Comparación entre ambas configuraciones de R. B. M. (con membrana sumergida y con membrana externa). Fuente: Centro canario del Agua (2003) -----	34
Tabla 1.3. Microorganismos usados en el bioaumentación de suelos contaminados con compuestos aromáticos (Mrozik y Piotrowska-Seget, 2010) -----	40
Tabla 1.4. Organismos modificados genéticamente utilizados en estudios de bioaumentación (Mrozik y Piotrowska-Seget, 2010) -----	41
2. Materiales y métodos: Puesta a punto de un sistema de cultivo optimizado para la fitorremediación de agua de taladrina -----	57
Tabla 2.1. Condiciones del horno de columna en el cromatógrafo Varian 3800 -----	64
Tabla 2.2. Condiciones del horno de columna en el cromatógrafo Varian 3900 -----	65
Tabla 2.3. Longitud de onda de absorción máxima y coeficiente de conversión para xantofilas, clorofilas y carotenoides -----	83
Tabla 2.4. Longitud de onda de excitación y emisión y factor de conversión para protoclorofilida, tocoferol y feofitina -----	83
3. Resultados: Puesta a punto de un sistema de cultivo optimizado para la fitorremediación de agua de taladrina -----	95
Tabla 3.1. Hidrocarburos presentes en muestra de agua de taladrina del 19/01/2009. Los compuestos mostrados fueron seleccionados de la librería generada por los espectros de masas de cada compuesto. En cada caso se seleccionó la molécula que tenía una mayor probabilidad de semejanza con los espectros obtenidos en el análisis de las muestras -----	101
Tabla 3.2. Resistencia de diversas plantas a dos concentraciones distintas de agua de taladrina con Hoagland -----	111
Tabla 3.3. Concentración de pigmentos totales en plantas de <i>Lemna minor</i> expuestas 5 días a agua de taladrina de distintos valores DQO (DQO 1 = 185,40 ppm, DQO 2 = 737,48 ppm, DQO 3 = 1563,41 ppm, DQO 4 = 1819,51 ppm y DQO 5 = 2220,21 ppm). Para cada pigmento, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	118
Tabla 3.4. Concentración de pigmentos totales en plantas de <i>Lemna minor</i> expuestas 5 días a taladrina pretratada de distintos valores de DQO (DQO 1 =	

309,06 ppm, DQO 2 = 821,25 ppm, DQO 3 = 1.396,17 ppm, DQO 4 = 1.772,47 ppm, DQO 5 = 2.324,74 ppm y DQO 6 = 2.885,71 ppm). Para cada pigmento, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	120
Tabla 3.5. Picos presentes en la muestra de agua de taladrina inicial y en las muestras fitorremediadas -----	132
4. Discusión: Puesta a punto de un sistema de cultivo optimizado para la fitorremediación de agua de taladrina -----	137
5. Materiales y métodos: Desarrollo y optimización de sistemas planta-microorganismo para fitorremediar agua de taladrina -----	157
6. Resultados: Desarrollo y optimización de sistemas planta-microorganismo para fitorremediar agua de taladrina -----	175
Tabla 6.1. Clasificación taxonómica de las bacterias aisladas del esparto -----	177
Tabla 6.2. Picos presentes en la muestra de agua de taladrina inicial y en las muestras fitorremediadas con y sin Esp1. Los compuestos mostrados fueron seleccionados de la librería generada por los espectros de masas de cada compuesto. En cada caso se seleccionó la molécula que tenía una mayor probabilidad de semejanza con los espectros obtenidos en el análisis de las muestras -----	180
Tabla 6.3. Picos presentes en la muestra de agua de taladrina inicial y en las muestras fitorremediadas con y sin Esp14. Los compuestos mostrados fueron seleccionados de la librería generada por los espectros de masas de cada compuesto. En cada caso se seleccionó la molécula que tenía una mayor probabilidad de semejanza con los espectros obtenidos en el análisis de las muestras -----	188
Tabla 6.4. Picos presentes en la muestra de agua de taladrina inicial y en las muestras fitorremediadas con y sin Aur 6. Los compuestos mostrados fueron seleccionados de librería generada por los espectros de masas de cada compuesto. En cada caso se seleccionó la molécula que tenía una mayor probabilidad de semejanza con los espectros obtenidos en el análisis de las muestras -----	197
Tabla 6.5. Picos presentes en muestra de agua de taladrina inicial y en las muestras fitorremediadas en el experimento en fases. Los compuestos mostrados fueron seleccionados de librería generada por los espectros de masas de cada compuesto. En cada caso se seleccionó la molécula que tenía una mayor probabilidad de semejanza con los espectros obtenidos en el análisis de las muestras -----	206
Tabla 6.6. Valores de la IC_{50}^2 de las muestras de agua de taladrina iniciales y fitorremediadas en los distintos sistemas de fitorremediación ensayados (ensayo con la levadura Esp14, ensayo con la bacteria Aur 6, ensayo con la bacteria Esp1,	

ensayo con la bacteria TP9, ensayo con el consorcio bacteriano y ensayo con el planteamiento en fases). En rojo se muestra el tratamiento de cada ensayo que presentó una menor biotoxicidad. Para cada ensayo, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)-----	218
Tabla 6.7. Valores de IC_{10}^2 de las muestras de agua de taladrina inicial y fitorremediada de los distintos ensayos de fitorremediación ensayados (ensayo con la levadura Esp14, ensayo con la bacteria Aur 6, ensayo con la bacteria Esp1, ensayo con la bacteria TP9, ensayo con el consorcio bacteriano y ensayo con el planteamiento en fases). En rojo se muestra el tratamiento de cada ensayo que presentó una menor biotoxicidad. Para cada ensayo, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	219
7. Discusión: Desarrollo y optimización de sistemas planta-microorganismo para fitorremediar agua de taladrina -----	237
8. Materiales y métodos: Estudio de la dinámica de comunidades microbianas en un reactor biológico de membrana durante el proceso de biorremediación de taladrinas y su empleo en sistemas de fitorremediación-----	253
9. Resultados: Estudio de la dinámica de comunidades microbianas en un reactor biológico de membrana durante el proceso de biorremediación de taladrinas y su empleo en sistemas de fitorremediación -----	273
Tabla 9.1. Número de géneros observados en cada muestreo. Cero: ausencia del género en ese muestreo; uno: presencia del género en ese muestreo. En azul los géneros que aparecen sólo en un muestreo; en verde, los géneros que aparecen en dos muestreos -----	281
Tabla 9.2. Clasificación taxonómica de los clones aislados en el muestreo A -----	284
Tabla 9.3. Clasificación taxonómica de los clones aislados en el muestreo B -----	291
Tabla 9.4. Clasificación taxonómica de los clones aislados en el muestreo C -----	296
Tabla 9.5. Clasificación taxonómica de los clones aislados en el muestreo D -----	301
Tabla 9.6. Clasificación taxonómica de los clones aislados en el muestreo E -----	307
Tabla 9.7. Contenido de pigmentos totales en plantas de <i>Lemna minor</i> . Tratamientos: Control sin consorcio, control con consorcio, agua de taladrina sin consorcio y agua de taladrina con consorcio. Para cada pigmento, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	328
Tabla 9.8. Contenido de pigmentos totales en plantas de <i>Zea mays</i> . Tratamientos: Control sin consorcio, control con consorcio, agua de taladrina sin consorcio y agua	

de taladrina con consorcio. Para cada pigmento, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	332
Tabla 9.9. Picos presentes en muestras de taladrina inicial y en muestras fitorremediadas con y sin consorcio. Los compuestos mostrados fueron seleccionados de librería generada por los espectros de masas de cada compuesto. En cada caso se seleccionó la molécula que tenía una mayor probabilidad de semejanza con los espectros obtenidos en el análisis de las muestras -----	335
10. Discusión: Estudio de la dinámica de comunidades microbianas en un reactor biológico de membrana durante el proceso de biorremediación de agua de taladrina y su empleo en sistemas de fitorremediación -----	343
11. Conclusiones -----	357
Bibliografía -----	361
Anexo 1: Legislación -----	415
Anexo 2: Colección de bacterias aisladas de la zona franca de Barcelona -----	479
Tabla A1. Bacterias aisladas de la zona franca de Barcelona. “H”: aisladas de la rizosfera de <i>Piptatherum miliaceum</i> ; “C”: aisladas de la rizosfera de <i>Ipomoea indica</i> ; “S”: aisladas de la rizosfera de <i>Conyza canadensis</i> ; “SL”: aisladas del suelo libre -----	481
Anexo 3: Medios de Cultivo -----	487
Anexo 4: Bacterias aisladas de la zona franca de Barcelona y de taladrina pretratada capaces de crecer en agar con agua de taladrina ----	491
Tabla A2. Bacterias capaces de crecer en agar para métodos estándar (PCA) con 100% de agua de taladrina. “H”: aisladas de la rizosfera de <i>Piptatherum miliaceum</i> ; “C”: aisladas de la rizosfera de <i>Ipomoea indica</i> ; “S”: aisladas de la rizosfera de <i>Conyza canadensis</i> ; “SL”: aisladas del suelo libre, “TP”: aisladas de la taladrina pretratada -----	493
Anexo 5: Análisis fisicoquímicos de las muestras de agua de taladrina --	497
Tabla A3. Resultados de los análisis fisicoquímicos medidos en las muestras de agua de taladrina -----	499
Anexo 6: Cromatogramas correspondientes al análisis de hidrocarburos de la muestra de John Deere del 19/01/2009 -----	501
Anexo 7: Análisis elemental de las muestras de agua de taladrina -----	517

Anexo 8: Cromatogramas correspondientes al análisis de pigmentos fotosintéticos de <i>Lemna minor</i> de los tratamientos control y 5 días en agua de taladrina	531
Anexo 9: Cromatogramas correspondientes al análisis de hidrocarburos de las muestras iniciales y fitorremediadas	535
Anexo 10: Cromatogramas correspondientes al análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) de las muestras iniciales y fitorremediadas	553
Anexo 11: Fichas informativas del aceite de corte	571
Anexo 12: Preparaciones utilizadas en microscopía electrónica	579
Anexo 13: Patente “Procedimiento para la reducción de la DQO de efluentes líquidos aceitosos mediante fitorremediación con maíz-esparto; su aplicación al tratamiento de taladrinas agotadas”	583
Anexo 14: Comparación del análisis de hidrocarburos de las muestras iniciales y fitorremediadas durante un periodo de 5 días	599
Tabla A4. Análisis de hidrocarburos cualitativo de las muestras inicial y fitorremediadas durante un periodo de 5 días con las cepas Aur 6, Esp1, Esp14, TP9 y el consorcio. (+) indica la presencia del hidrocarburo en la muestra; (-) indica la ausencia del mismo	601
Tabla A5. Análisis de hidrocarburos cuantitativo de las muestras inicial y fitorremediadas durante un periodo de 5 días con las cepas Aur 6, Esp1, Esp14, TP9 y el consorcio	601
Anexo 15: Cepas aisladas reactor biológico de membrana (R. B. M.)	603
Tabla A6. Bacterias aisladas del reactor biológico de membrana (R. B. M.). RBM-A: cepas aisladas en el muestreo A; RBM-B: cepas aisladas en el muestreo B; RBM-C: cepas aisladas en el muestreo C; RBM-D: cepas aisladas en el muestreo D; RBM-E: Cepas aisladas en el muestreo E	605
Anexo 16: Medidas de seguimiento de un reactor biológico de membrana (R. B. M.)	613
Tabla A7. Medidas de seguimiento del Reactor Biológico de Membrana (RBM) en los distintos periodos: puesta en funcionamiento - aclimatación (26/04/2010 – 10/05/2010) y funcionamiento al 100% (14/05/2010 – 17/06/2010). DQOt: DQO total; DQOs: DQO soluble; SST: sólidos en suspensión; Rendimiento: (DQOt influente – DQOt efluente)*100/DQOt influente	615

Anexo 17: Cromatogramas correspondientes al análisis de pigmentos fotosintéticos de <i>Lemna minor</i> de los tratamientos control, control con inóculo, 5 días en agua de taladrina y 5 días en agua de taladrina con inóculo -----	617
Anexo 18: Cromatogramas correspondientes al análisis de pigmentos fotosintéticos de <i>Zea mays</i> de los tratamientos control, control con inóculo, 5 días en agua de taladrina y 5 días en agua de taladrina con inóculo -----	623
Anexo 19: Aportaciones a congresos -----	629

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Introducción	5
Figura 1.1. Distribución del agua en la superficie terrestre (earth`s water distribution, 2007)	7
Figura 1.2. Las fases de interacción: I - Sorción de contaminantes. II - Sorción de la molécula de surfactante. III - Solubilización del contaminante. IV - Contaminante fase acuosa para los microorganismos. V - Partición de contaminante entre la fase agua y la micela. VI - Sorción de micela al microorganismo. VII - Contaminante fase sólida al microorganismo. VIII - Sorción del microorganismo al suelo. Imagen modificada de Volkering <i>et al.</i> (1998)	24
Figura 1.3. Propuesta de los procesos más importantes que participan en la hiperacumulación (Yang <i>et al.</i> , 2005)	25
Figura 1.4. Mineralización (esquema original de la autora)	26
Figura 1.5. Concentración mínima de sustrato necesaria para su utilización. Km: concentración a la cual la velocidad de degradación es la mitad de velocidad máxima; Vmax: velocidad máxima; Vmax/2: mitad de la velocidad máxima; [s] sustrato (esquema original de la autora)	26
Figura 1.6. Implantación de reactores biológicos de membrana (R. B. M.) en Europa. (Huisjes <i>et al.</i> , 2009)	32
Figura 1.7. Número de instalaciones de R. B. M. en cada país de la Unión Europea (De Wever <i>et al.</i> , 2009)	32
Figura 1.8. Esquema de un R. B. M. con membrana sumergida (Delgado Díaz, 2009) -	33
Figura 1.9. Esquema de un R. B. M. con membrana externa (Terán Díaz, 2006)	34
Figura 1.10. Estrategias de fitorremediación de compuestos orgánicos (Campos <i>et al.</i> , 2008). El contaminante (círculo marrón) puede ser estabilizado en la matriz del suelo, secuestrado dentro de las plantas, degradado o volatilizado. Como consecuencia de la modificación enzimática, formas menos peligrosas del contaminante son originadas (Círculos amarillos).....	46
Figura 1.11. Sección lateral de una unidad de fitofiltración. La mayor parte de las raíces está expuesta a la solución contaminada y aireada. Esta parte asegura el suministro de agua a la planta y la absorción del contaminante. Los nutrientes se aplican exclusivamente a través de la capa de suelo artificial colocada por encima de la solución, asegurando la nutrición de la planta y evitando las reacciones químicas (Dushenkov y Kapulnik, 2000)	49
Figura 1.12. Trilogía del suelo (Lynch, 1990)	51

2. Materiales y métodos: Puesta a punto de un sistema de cultivo optimizado para la fitorremediación de agua de taladrina -----	57
Figura 2.1. Etapas del proceso físico (Imagen tomada de la empresa JDISA) -----	60
Figura 2.2. Separador de aceites (Imagen tomada de la empresa JDISA) -----	60
Figura 2.3. VacuDest (Imagen tomada de la empresa JDISA)-----	60
Figura 2.4. Proceso realizado para la medida de la demanda biológica de oxígeno en cinco días (DBO ₅). Esquema original de la autora -----	61
Figura 2.5. Proceso realizado para la medir la demanda química de oxígeno (DQO). Esquema original de la autora -----	62
Figura 2.6. A - <i>Piptatherum miliaceum</i> (imagen tomada de la web del herbario virtual del Àrea de Botànica, Departament de Biologia, Universitat de les Illes Balears; B - <i>Conyza canadensis</i> (Imagen tomada de la web de Connecticut Botanical Society); C - <i>Ipomea indica</i> (imagen tomada de la web de Jungle Plants) -----	66
Figura 2.7. Método de filtración para aislar las bacterias existentes en las muestras de agua de taladrina. Esquema original de la autora -----	67
Figura 2.8. Método de suspensiones-diluciones para aislar las bacterias existentes en las muestras de agua de taladrina. Esquema original de la autora -----	67
Figura 2.9. Experimento para conocer la evolución de las cepas bacterianas en agua de taladrina. Esquema original de la autora -----	71
Figura 2.10. Plantas de alfalfa (<i>Medicago sativa</i>). Imagen tomada de la web de la Saludable naturaleza -----	72
Figura 2.11. Plantas de altramuZ (<i>Lupinus sp.</i>). Imagen tomada de la web de la Asociación de Hortelanos Tricantinos -----	73
Figura 2.12. Plantas de arroz (<i>Oriza sativa</i>). Imagen tomada de la web de Wonjoy -----	73
Figura 2.13. Plantas de girasol (<i>Helianthus annuus</i>). Imagen tomadad de la web del Museo chileno de arte precolombino -----	74
Figura 2.14. Plantas de judía (<i>Phaseolus vulgaris</i>). Imagen tomada de la web de Henriette`s herbal -----	74
Figura 2.15. Plantas de maíz (<i>Zea mays</i>). Fotografía original de la autora -----	75
Figura 2.16. Plantas de mostaza negra (<i>Brassica nigra</i>). Imagen tomada de la web de Gyengénlátóknak -----	75
Figura 2.17. Plantas de mostaza blanca (<i>Sinapis alba</i>). Imagen tomada de la web de Photaki -----	75

Figura 2.18. Plantas de Ciperó (<i>Cyperus alternifolius</i>). Fotografía realizada en la UPV -	76
Figura 2.19. Plantas de espadaña (<i>Typha dominguensis</i>). Imagen tomada de la web de Infojardín -----	76
Figura 2.20. Plantas de Elodea (<i>Elodea canadensis</i>). Imagen tomada de la web de Flor de planta -----	77
Figura 2.21. Planta de jacinto de agua (<i>Eichornia crassipes</i>). Imagen tomada de la web de Allbiz -----	77
Figura 2.22. Plantas de lenteja de agua (<i>Lemna minor</i>). Imagen tomada de la web de Wikipedia -----	78
Figura 2.23. Plantas de mienrama de agua (<i>Myriophyllum</i>). Imagen tomada de la web de El estanque -----	78
Figura 2.24. Experimento para determinar la capacidad de diversas semillas para germinar en las muestras de agua de taladrina. Esquema original de la autora -----	79
Figura 2.25. Experimento para determinar la resistencia de las semillas al agua de taladrina. Esquema original de la autora -----	80
Figura 2.26. Experimento para determinar la capacidad de <i>Lemna minor</i> para fitorremediar la taladrina pretratada o el agua de taladrina. Esquema original de la autora -----	81
Figura 2.27. Experimento para determinar la capacidad de <i>Myriophyllum</i> y <i>Elodea</i> para fitorremediar el agua de taladrina. Esquema original de la autora -----	84
Figura 2.28. Experimento para determinar la capacidad de <i>Cyperus</i> para fitorremediar el agua de taladrina. Esquema original de la autora -----	85
Figura 2.29. Determinación de la capacidad de fitorremediación del maíz en 5 días. Esquema original de la autora -----	87
Figura 2.30. Esquema del procedimiento de cultivo: entramado de raíces de maíz-espato (1) en contacto con el líquido contaminado (2), con aireación continua de las raíces mediante bomba de flujo de aire. Esquema obtenido de la patente 2 350 433 -----	87
Figura 2.31. Esquema de los parámetros utilizados para medir la eficiencia fotosintética. Esquema original de la doctora Ana García-Villaraco -----	89
Figura 2.32. Experimento para determinar la capacidad de biorremediación del maíz en el tiempo. Esquema original de la autora -----	91
Figura 2.33. Experimento para diseñar un sistema planta-microorganismo. Esquema original de la autora -----	93

3. Resultados: Puesta a punto de un sistema de cultivo optimizado para la fitorremediación de agua de taladrina	95
Figura 3.1. Representación de los resultados de la conductividad, para las muestras de agua de taladrina analizadas desde el 17/09/2008 hasta el 24/04/2009	97
Figura 3.2. Representación de los resultados del parámetro residuo seco, para las muestras de agua de taladrina analizadas desde el 17/09/2008 hasta el 24/04/2009	98
Figura 3.3. Representación de los resultados de pH, para las muestras de agua de taladrina analizadas desde el 17/09/2008 hasta el 24/04/2009. La franja roja corresponde con el intervalo de pH (6-10) permitido por la Ley 10/1993	98
Figura 3.4. Representación de los resultados del parámetro demanda química de oxígeno (DQO), para las muestras de agua de taladrina analizadas desde el 17/09/2008 hasta el 24/04/2009. La línea roja representa el valor máximo de DQO (1.750 ppm) permitido por la Ley 10/1993	99
Figura 3.5. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos de la muestra del 19/01/2009. Los picos corresponden a los hidrocarburos aromáticos policíclicos Fluoreno y Pireno	100
Figura 3.6. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos de la muestra del 19/01/2009. Los picos enumerados corresponden a los principales hidrocarburos encontrados en la muestra, los cuales fueron analizados a partir de su correspondiente espectro de masas	100
Figura 3.7. A - Representación de los elementos químicos presentes en las muestras cuyo valor medio oscila entre 0,1 y 0,7 ppm. B - Representación del silicio presente en las muestras de agua de taladrina cuyo valor medio es de 28,7 ppm. C - Representación de los elementos químicos presentes en las muestras cuyo valor medio oscila entre 0,0004 y 0,02 ppm	102
Figura 3.8. Porcentaje de distribución de los géneros de las colonias capaces de crecer en agar con agua de taladrina	104
Figura 3.9. Representación de la cinética de crecimiento en agua de taladrina de las distintas cepas ensayadas. A – Cepa C1 19, recontada a las 18 horas, 32 horas y 192 horas; B – Cepas C2 36 y S1 24, recontadas a las 18 horas, 32 horas y 192 horas; C – Cepas C1 28 y TP16, recontadas a las 18 horas, 32 horas y 192 horas; D- Cepa TP5, recontada a las 18 horas, 44 horas y 133,5 horas; E – Cepa TP9 recontada a las 12 horas, 20,5 horas, 36 horas, 61,5 horas y 133,5 horas; F – Cepa TP10, recontada a las 12 horas, 20,5 horas, 36 horas, 61,5 horas y 133,5 horas; G- Cepas TP11 y TP18, recontadas a las 18 horas, 44 horas y 133,5 horas	105

- Figura 3.10. A - Representación del porcentaje de germinación de la alfalfa en el tratamiento de control (agar para métodos estándar - P.C.A., línea azul), P.C.A. con 10% de agua de taladrina (línea roja), P.C.A. con 50% de agua de taladrina (línea verde) y P.C.A. con 100% de agua de taladrina (línea morada), medido durante cinco días consecutivos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$); B - disminución del tamaño de la raíz en las semillas de alfalfa debido al incremento de la concentración de agua de taladrina. Fotografía original de la autora ----- 106
- Figura 3.11. A - Representación porcentaje de germinación altramuz en tratamiento control (P.C.A., línea azul), P.C.A. con 10% agua taladrina (línea roja), P.C.A. con 50% agua taladrina (línea verde) y P.C.A. con 100% agua taladrina (línea morada), medido durante 7 días consecutivos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$); B - Disminución tamaño raíz semillas de altramuz debido al incremento de la concentración de agua de taladrina. Fotografía original de la autora 107
- Figura 3.12. A - Representación del porcentaje de germinación del arroz en el tratamiento control (P.C.A., línea azul), P.C.A. con 10% de agua de taladrina (línea roja), P.C.A. con 50% de agua de taladrina (línea verde) y P.C.A. con 100% de agua de taladrina (línea morada), medido durante ocho días consecutivos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). B - Disminución del tamaño de la raíz en las semillas de arroz debido al incremento de la concentración de agua de taladrina. Fotografía original de la autora ----- 107
- Figura 3.13. A - Representación del porcentaje de germinación de la espadaña en el tratamiento control (P.C.A., línea azul), P.C.A. con 10% de agua de taladrina (línea roja), P.C.A. con 50% de agua de taladrina (línea verde) y P.C.A. con 100% de agua de taladrina (línea morado), medido durante ocho días consecutivos. B - Disminución del tamaño de la raíz en las semillas de espadaña debido al incremento de la concentración de agua de taladrina. Fotografía original de la autora ----- 108
- Figura 3.14. A - Representación del porcentaje de germinación del girasol en el tratamiento control (P.C.A., línea azul), P.C.A. con 10% de agua de taladrina (línea roja), P.C.A. con 50% de agua de taladrina (línea verde) y P.C.A. con 100% de agua de taladrina (línea morada), medido durante 5 días consecutivos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). B - Disminución del tamaño de la raíz en las semillas de girasol debido al incremento de la concentración de agua de taladrina. Fotografía original de la autora ----- 109
- Figura 3.15. A - Representación del porcentaje de germinación del maíz en el tratamiento control (P.C.A., línea azul), P.C.A. con 10% de agua de taladrina (línea roja), P.C.A. con 50% de agua de taladrina (línea verde) y P.C.A. con 100% de agua de taladrina (línea morada), medido durante 5 días consecutivos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). B - Disminución del tamaño de la raíz en las semillas de maíz debido al incremento de la concentración de agua de taladrina. Fotografía original de la autora ----- 109

- Figura 3.16. Representación del porcentaje de germinación de la mostaza en el tratamiento control (P.C.A., línea azul), P.C.A. con 10% de agua de taladrina (línea roja), P.C.A. con 50% de agua de taladrina (línea verde) y P.C.A. con 100% de agua de taladrina (línea morada), medido durante 5 días consecutivos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) ----- 110
- Figura 3.17. Representación de la capacidad de fitorremediación de la especie acuática *Lemna minor* en diferentes concentraciones de agua de taladrina (DQO 1 = 185,40 ppm; DQO 2 = 737,48 ppm; DQO 3 = 1.563,41 ppm; DQO 4 = 1.819,51 ppm; DQO 5 = 2.220,21 ppm) y de taladrina pretratada (DQO 1 = 309,06 ppm; DQO 2 = 821,25 ppm; DQO 3 = 1.396,17 ppm; DQO 4 = 1.772,47 ppm; DQO 5 = 2.324,74 ppm; DQO 6 = 2.885,71 ppm). Se realizó de forma independiente la estadística para los tratamientos con agua de taladrina y con taladrina pretratada. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) ----- 112
- Figura 3.18. Efecto de diferentes valores de DQO de agua de taladrina sobre plantas de *Lemna minor*. Las letras indican los distintos valores de DQO: A (control), B (185,40 ppm), C (737,48 ppm), D (1.563,41 ppm), E (1.819,51 ppm) y F (2.220,21 ppm). Fotografía original de la autora ----- 113
- Figura 3.19. Efecto de diferentes valores de DQO de taladrina pretratada sobre plantas de *Lemna minor*. Las letras indican las distintas DQO: A (309,06 ppm), B (821,25 ppm), C (1.396,17 ppm), D (1.772,47 ppm), E (2.324,74 ppm) y F (2.885,71 ppm). Fotografía original de la autora ----- 113
- Figura 3.20. Porcentaje de variación del peso fresco final de *Lemna minor* después de 5 días en agua de taladrina con distintos valores de DQO (DQO 1 = 185,40 ppm, DQO 2 = 737,48 ppm, DQO 3 = 1.563,41 ppm, DQO 4 = 1.819,51 ppm y DQO 5 = 2.220,21 ppm). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) ----- 114
- Figura 3.21. Porcentaje de variación del peso fresco final de *Lemna minor* después de 5 días en taladrina pretratada con distintos valores de DQO (DQO 1 = 309,06 ppm, DQO 2 = 821,25 ppm, DQO 3 = 1.396,17 ppm, DQO 4 = 1.772,47 ppm, DQO 5 = 2.324,74 ppm y DQO 6 = 2.885,71 ppm). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) ----- 114
- Figura 3.22. A - Variación de la fluorescencia emitida en condiciones de luz suave por plantas que provienen de oscuridad (F_o) en *Lemna minor* después de estar cinco días en agua de taladrina con distintos valores de DQO (DQO 1 = 185,40 ppm, DQO 2 = 737,48 ppm, DQO 3 = 1.563,41 ppm, DQO 4 = 1.819,51 ppm y DQO 5 = 2.220,21 ppm). B - Variación de la máxima fluorescencia en el estado de adaptación a la oscuridad (F_m) en *Lemna minor* después de estar 5 días en agua de taladrina con distintos valores de DQO (DQO 1 = 185,40 ppm, DQO 2 = 737,48 ppm, DQO 3 = 1.563,41 ppm, DQO 4 = 1.819,51 ppm y DQO 5 = 2.220,21 ppm). C - Variación de la eficiencia potencial máxima del fotosistema II (F_v/F_m) en *Lemna minor* después de

estar 5 días en agua de taladrina con distintos valores de DQO (DQO 1 = 185,40 ppm, DQO 2 = 737,48 ppm, DQO 3 = 1.563,41 ppm, DQO 4 = 1.819,51 ppm y DQO 5 = 2.220,21 ppm). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	115
Figura 3.23. A - Variación de Fo en <i>Lemna minor</i> después de estar 5 días en taladrina pretratada con distintos valores de DQO (DQO 1 = 309,06 ppm, DQO 2 = 821,25 ppm, DQO 3 = 1.396,17 ppm, DQO 4 = 1.772,47 ppm, DQO 5 = 2.324,74 ppm y DQO 6 = 2.885,71 ppm). B - Variación de Fm en <i>Lemna minor</i> después de estar cinco días en taladrina pretratada con distintos valores de DQO (DQO 1 = 309,06 ppm, DQO 2 = 821,25 ppm, DQO 3 = 1.396,17 ppm, DQO 4 = 1.772,47 ppm, DQO 5 = 2.324,74 ppm y DQO 6 = 2.885,71 ppm). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	116
Figura 3.24. Variación de Fv/Fm en <i>Lemna minor</i> después de estar 5 días en taladrina pretratada con distintos valores de DQO (DQO 1 = 309,06 ppm, DQO 2 = 821,25 ppm, DQO 3 = 1396,17 ppm, DQO 4 = 1772,47 ppm, DQO 5 = 2324,74 ppm y DQO 6 = 2885,71 ppm). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) ---	117
Figura 3.25. Representación de la variación de la DQO para los tratamientos de control (agua de taladrina, línea azul), agua de taladrina con esparto (línea roja) y agua de taladrina con maíz y esparto (línea verde). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	122
Figura 3.26. A - Representación de la altura de las plantas de maíz en función del tratamiento (sin agua de taladrina, color azul, o con agua de taladrina, color rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). B - Plantas de maíz tras cinco días en agua de taladrina. Fotografía original de la autora -----	123
Figura 3.27. Representación del número de hojas de las plantas de maíz en función del tratamiento (sin agua de taladrina, color azul, o con agua de taladrina color rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	123
Figura 3.28. A - Representación del parámetro Fo en función del tratamiento. B - Representación del parámetro Fv/Fm en función del tratamiento. C - Representación del parámetro Φ PSII (eficiencia máxima del fotosistema II) en función del tratamiento. D - Representación del parámetro qP (quenching fotoquímico de la variación de la fluorescencia de la clorofila) en función del tratamiento. E - Representación del parámetro ETR (tasa relativa del transporte de electrones) en función del tratamiento. F - Representación del parámetro NPQ (quenching no fotoquímico) en función del tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Tratamientos: color azul - sin agua de taladrina; color rojo - con agua de taladrina -----	124
Figura 3.29. Representación de la variación de la DQO en el tiempo para los tratamientos de esparto no estéril (azul), esparto estéril (rojo), maíz sin esparto (verde), maíz con esparto estéril (rosa) y maíz con esparto no estéril (gris). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	125

Figura 3.30. A - Representación de la variación de la altura de las plantas de maíz a los 5 días (azul) y 9 días (rojo) en agua de taladrina. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). B - Imagen de los distintos tratamientos. Dentro del círculo se encuentran los contenedores correspondientes al tratamiento de maíz con agua de taladrina. Fotografía original de la autora -----	126
Figura 3.31. Representación de la variación del número de hojas de las plantas de maíz a los 5 días (azul) y 9 días (rojo) en agua de taladrina. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	126
Figura 3.32. A - Representación de la variación del parámetro F_o a lo largo del tiempo. B - Representación de la variación del parámetro F_v/F_m a lo largo del tiempo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Tiempo: color azul - cinco días en agua de taladrina; color rojo - 9 días en agua de taladrina -----	127
Figura 3.33. A - Representación de la variación del parámetro Φ_{psII} a lo largo del tiempo. B - Representación de la variación del parámetro qP a lo largo del tiempo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Tiempo: color azul - cinco días en agua de taladrina; color rojo - 9 días en agua de taladrina -----	128
Figura 3.34. A - Representación de la variación del parámetro ETR a lo largo del tiempo. B - Representación de la variación del parámetro NPQ a lo largo del tiempo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Tiempo: color azul - cinco días en agua de taladrina; color rojo - 9 días en agua de taladrina -----	129
Figura 3.35. Representación de la reducción del valor de la DQO en función del tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Tratamientos: azul: sistema de fitorremediación sin inocular; rojo: sistema de fitorremediación inoculado -----	130
Figura 3.36. Representación de la reducción del pH en función del tratamiento. Tratamientos: azul: sistema de fitorremediación sin inocular; rojo: sistema de fitorremediación inoculado -----	130
Figura 3.37. Cromatogramas correspondientes al análisis de hidrocarburos de la muestra inicial (A), sin TP9 (B) y con TP9 (C). 1: pico 6,80 min; 2: pico 7,30 min; 3: pico 7,32 min; 4: 8,54 min; 5: 9,17 min; 6: 9,55 min; 7: 9,59 min; 8: 11,19 min; 9: 11,49 min; 10: 12,25 min; 11: 14,92 min -----	131
Figura 3.38. Plantas de maíz procedentes de los distintos tratamientos (A - control sin TP9, B - control con TP9, C - Agua de taladrina sin TP9, D - Agua de taladrina con TP9). Fotografía original de la autora -----	133
Figura 3.39. Raíces de planta de maíz procedente de los distintos tratamientos (A - control sin TP9, B - control con TP9, C - agua de taladrina sin TP9, D - agua de taladrina con TP9). Fotografía original de la autora -----	133

Figura 3.40. Representación de la influencia de la bacteria en la variación de la altura de las plantas de maíz a los 5 días de estar en contacto con agua de taladrina. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	134
Figura 3.41. A - Representación de la variación de F_o en función del tratamiento. B - Representación de la variación de F_v/F_m en función del tratamiento. C - Representación de la variación de ϕ_{psII} en función del tratamiento. D - Representación de la variación de qP en función del tratamiento. E - Representación de la variación del ETR en función del tratamiento. F - Representación de la variación de NPQ en función del tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Tratamientos: control sin TP9, control con TP9, agua de taladrina sin TP9 y agua de taladrina con TP9 -----	135
4. Discusión: Puesta a punto de un sistema de cultivo optimizado para la fitorremediación de agua de taladrina -----	137
5. Materiales y métodos: Desarrollo y optimización de sistemas planta-microorganismo para fitorremediar agua de taladrina -----	157
Figura 5.1. Esquema del método empleado para aislar microorganismos del esparto. Esquema original de la autora -----	159
Figura 5.2. Esquema de los sistemas de fitorremediación planta-microorganismo desarrollados. Esquema original de la autora -----	162
Figura 5.3. Esquema reacción de Hill. Esquema original de la autora -----	163
Figura 5.4. Reducción del DCPIP (Diclorofenol-indofenol). Imagen tomada de Márquez y Zabala (2011), modificada por la autora -----	163
Figura 5.5. Esquema extracción de clorofilas. Esquema original de la autora -----	164
Figura 5.6. Esquema del proceso de fitorremediación en fases. En cada fase, las plantas estuvieron entre 2 y 3 días en contacto con el agua de taladrina. En la fase de ida (azul), las plantas de la tanda 1 estuvieron en contacto con el agua de taladrina de mayor demanda química de oxígeno (DQO), mientras que las plantas de la tanda 4 estuvieron en contacto con el agua de taladrina que había pasado por 3 procesos de fitorremediación. Después de la fase de ida, las plantas estuvieron en agua del grifo con Nitrofoska® (fase de recuperación, verde). Finalmente, en la fase de vuelta (rojo) las plantas de la tanda 4 fueron las que estuvieron en contacto con el agua de taladrina de mayor DQO y las de la tanda 1 estuvieron en contacto con el agua de taladrina que había pasado por 3 procesos de fitorremediación. Las plantas del tratamiento en continuo (azul) estuvieron ocho días en contacto con el agua de taladrina. Esquema original de la autora -----	167
Figura 5.7. Experimento para determinar la toxicidad de las muestras mediante ensayos de bioluminiscencia. Esquema original de la autora -----	169

Figura 5.8. Experimento para conocer el efecto del agua de taladrina fitorremediada sobre la fotosíntesis de las plantas de maíz. Esquema original de la autora -----	170
6. Resultados: Desarrollo y optimización de sistemas planta- microorganismo para fitorremediar agua de taladrina -----	175
Figura 6.1. Variación de la demanda química de oxígeno (DQO) del agua de taladrina tras un proceso de fitorremediación de 5 días, sin la bacteria Esp1 (azul) o con ella (rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	178
Figura 6.2. Variación del pH entre las muestras de agua de taladrina inicial y las muestras resultantes del proceso de fitorremediación sin la bacteria Esp1 (azul) o con ella (rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	179
Figura 6.3. Cromatogramas correspondientes al análisis de hidrocarburos de la muestra inicial (A), sin Esp1 (B) y con Esp1 (C). 1: pico 6,80 min; 2: pico 7,30 min; 3: pico 7,32 min; 4: 8,54 min; 5: 9,17 min; 6: 9,55 min; 7: 9,59 min; 8: 11,19 min; 9: 11,49 min; 10: 12,25 min; 11: 14,92 min -----	179
Figura 6.4. Plantas de maíz procedentes de los distintos tratamientos (A – control sin Esp1, B – control con Esp1, C – agua de taladrina sin Esp1, D – agua de taladrina con Esp1). Fotografía original de la autora -----	181
Figura 6.5. Raíces de plantas de maíz de cada tratamiento (A – control sin Esp1, B – control con Esp1, C – agua de taladrina sin Esp1, D – agua de taladrina con Esp1). Fotografía original de la autora -----	182
Figura 6.6. Variación de la altura de las plantas de maíz en función del tratamiento (control sin Esp1, control con Esp1, con agua de taladrina sin Esp1 y con agua de taladrina con Esp1). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	182
Figura 6.7. Variación del número de hojas de las plantas de maíz en función del tratamiento (control sin Esp1, control con Esp1, con agua de taladrina sin Esp1 y con agua de taladrina con Esp1). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	182
Figura 6.8. A - Variación de la fluorescencia emitida en condiciones de luz suave por plantas que proceden de oscuridad (F_0) en función del tratamiento. B - Variación de la eficiencia potencial máxima del fotosistema II (F_v/F_m) en función del tratamiento. C - Variación de la eficiencia máxima del fotosistema II (ϕ_{PSII}) en función del tratamiento. D - Quenching fotoquímico de la variación de la fluorescencia de la clorofila (qP) en función del tratamiento. E - Variación de la tasa relativa del transporte de electrones (ETR) en función del tratamiento. F - Variación del quenching no fotoquímico (NPQ) en función del tratamiento. Tratamientos: control sin Esp1, control con Esp1, agua de taladrina sin Esp1 y agua de taladrina con Esp1. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	184

Figura 6.9. Variación de la velocidad de la reacción de Hill en función del tratamiento (control sin Esp1, control con Esp1, agua de taladrina sin Esp1 y agua de taladrina con Esp1). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	185
Figura 6.10. A - Evolución de las clorofilas totales en función del tratamiento. B - Evolución de la relación chl a / chl b (clorofila a / clorofila b) en función del tratamiento. Tratamiento: Control sin Esp1, control con Esp1, agua de taladrina sin Esp1 y agua de taladrina con Esp1. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	185
Figura 6.11. Variación de la DQO del agua de taladrina tras un proceso de fitorremediación de 5 días sin la levadura (azul) o con ella (rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	186
Figura 6.12. Variación del pH entre las muestras de agua de taladrina inicial y las muestras resultantes del proceso de fitorremediación sin la levadura (azul) o con ella (rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	187
Figura 6.13. Cromatogramas correspondientes al análisis de hidrocarburos de la muestra inicial (A), sin Esp14 (B) y con Esp14 (C). 1: pico 6,80 min; 2: pico 7,30 min; 3: pico 7,32 min; 4: 8,54 min; 5: 9,17 min; 6: 9,55 min; 7: 9,59 min; 8: 11,19 min; 9: 11,49 min; 10: 12,25 min; 11: 14,90 min; 12: 14,92 min -----	187
Figura 6.14. Plantas de maíz procedentes de los distintos tratamientos (A – control sin Esp14, B – control con Esp14, C – agua de taladrina sin Esp14, D – agua de taladrina con Esp14). Fotografía original de la autora -----	189
Figura 6.15. Raíces de plantas de maíz de cada tratamiento (A – control sin Esp14, B – control con Esp14, C – agua de taladrina sin Esp14, D – agua de taladrina con Esp14). Fotografía original de la autora -----	190
Figura 6.16. Variación de la altura de las plantas de maíz en función del tratamiento (control sin Esp14, control con Esp14, con agua de taladrina sin Esp14 y con agua de taladrina con Esp14). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	190
Figura 6.17. Variación del número de hojas de las plantas de maíz en función del tratamiento (control sin Esp14, control con Esp14, con agua de taladrina sin Esp14 y con agua de taladrina con Esp14). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	191
Figura 6.18. Variación del peso seco de la parte radical de las plantas de maíz enraizadas en esparto en los distintos tratamientos (control sin Esp14, control con Esp14, agua de taladrina sin Esp14 y agua de taladrina con Esp14). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	191
Figura 6.19. A - Variación del parámetro F_o en función del tratamiento. B - Variación del parámetro F_v/F_m en función del tratamiento. C - Variación de parámetro ϕ_{PSII} en función del tratamiento. Tratamiento: control sin Esp14, control con Esp14, agua de	

taladrina sin Esp14 y agua de taladrina con Esp14. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	192
Figura 6.20. A - Quenching fotoquímico del parámetro qP en función del tratamiento. B - Variación del parámetro ETR en función del tratamiento. C - Variación del parámetro NPQ en función del tratamiento. Tratamientos: Control sin Esp14, control con Esp14, agua de taladrina sin Esp14 y agua de taladrina con Esp14. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	193
Figura 6.21. Variación de la velocidad de la reacción de Hill en función del tratamiento (control sin Esp14, control con Esp14, agua de taladrina sin Esp14 y agua de taladrina con Esp14). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	194
Figura 6.22. A - Evolución de las clorofilas totales en función del tratamiento. B - Evolución de la relación chl a / chl b en función del tratamiento. Tratamientos: Control sin Esp14, control con Esp14, agua de taladrina sin Esp14 y agua de taladrina con Esp14. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	194
Figura 6.23. Variación de la DQO del agua de taladrina tras un proceso de fitorremediación de 5 días sin la bacteria Aur 6 (azul) o con ella (rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	195
Figura 6.24. Variación del pH entre las muestras de agua de taladrina inicial y las muestras resultantes del proceso de fitorremediación sin la bacteria Aur 6 (azul) o con ella (rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	196
Figura 6.25. Cromatogramas correspondientes al análisis de hidrocarburos de la muestra inicial (A), sin Aur 6 (B) y con Aur 6 (C). 1: pico 6,80 min; 2: pico 7,30 min; 3: pico 7,32 min; 4: 8,54 min; 5: 9,17 min; 6: 9,55 min; 7: 9,59 min; 8: 11,19 min; 9: 11,49 min; 10: 12,25 min; 11: 14,92 min -----	196
Figura 6.26. Plantas de maíz procedentes de los distintos tratamientos (A – control sin Aur 6, B – control con Aur 6, C – agua de taladrina sin Aur 6, D – agua de taladrina con Aur 6). Fotografía original de la autora -----	198
Figura 6.27. Raíces plantas de maíz de cada tratamiento (A – control sin Aur 6, B – control con Aur 6, C – agua de taladrina sin Aur 6, D – agua de taladrina con Aur 6). Fotografía original de la autora -----	199
Figura 6.28. Variación de la altura de las plantas de maíz en función del tratamiento (control sin Aur 6, control con Aur 6, con agua de taladrina sin Aur 6 y con agua de taladrina Aur 6). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	199
Figura 6.29. Variación del número de hojas de las plantas de maíz en función del tratamiento (control sin Aur 6, control con Aur 6, con agua de taladrina sin Aur 6 y con agua de taladrina con Aur 6). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	199

Figura 6.30. A - Variación del parámetro F_o en función del tratamiento. B - Variación del parámetro F_v/F_m en función del tratamiento. Tratamientos: Control sin Aur 6, control con Aur 6, agua de taladrina sin Aur 6 y agua de taladrina con Aur 6. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	200
Figura 6.31. A - Variación del parámetro ϕ_{PSII} en función del tratamiento. B - Variación de qP en función del tratamiento. C - Variación del parámetro ETR en función del tratamiento. D - Variación de NPQ en función del tratamiento. Tratamientos: Control sin Aur 6, control con Aur 6, agua de taladrina sin Aur 6 y agua de taladrina con Aur 6. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) ----	201
Figura 6.32. Variación de la velocidad de la reacción de Hill en función del tratamiento (control sin Aur 6, control con Aur 6, agua de taladrina sin Aur 6 y agua de taladrina con Aur 6). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) ----	201
Figura 6.33. A - Evolución de las clorofilas totales en función del tratamiento. B - Evolución de la relación chl a / chl b en función del tratamiento. Tratamientos: Control sin Aur 6, control con Aur 6, agua de taladrina sin Aur 6 y agua de taladrina con Aur 6. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	202
Figura 6.34. Esquema del proceso de fitorremediación en fases. En cada fase, las plantas estuvieron entre 2 y 3 días en contacto con agua de taladrina. En la fase de ida (azul), las plantas de la tanda 1 estuvieron en contacto con el agua de taladrina de mayor DQO, mientras que las plantas de la tanda 4 estuvieron en contacto con agua de taladrina que había pasado por 3 procesos de fitorremediación. Después de la fase de ida, las plantas estuvieron en agua del grifo con Nitrofoska® (fase de recuperación, verde). Finalmente, fase de vuelta (rojo) las plantas de la tanda 4 fueron las que estuvieron en contacto con agua de taladrina de mayor DQO y las de la tanda 1 estuvieron en contacto con agua de taladrina que había pasado por 3 procesos de fitorremediación. Las plantas tratamiento continuo (azul) estuvieron ocho días en agua de taladrina. Esquema original de la autora -----	203
Figura 6.35. Variación de la DQO en las distintas etapas del experimento en fases. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	204
Figura 6.36. Variación de DQO del agua de taladrina tras proceso de fitorremediación en fases. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	204
Figura 6.37. Variación del pH en las etapas finales de cada fase del sistema de fitorremediación. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	205
Figura 6.38. Cromatogramas correspondientes al análisis de hidrocarburos de la muestra inicial (A), etapa ida 9 días (B), continuo (C) y etapa vuelta 9 días (D). 1: pico 6,80 min; 2: pico 7,30 min; 3: pico 8,54 min; 4: 9,17 min; 5: 9,55 min; 6: 9,59 min; 7: 11,19 min; 8: 11,49 min; 9: 12,25 min -----	205

Figura 6.39. Variación de la altura de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento (ida en azul, recuperación en verde y vuelta en rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	207
Figura 6.40. Variación del número de hojas de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento (ida en azul, recuperación en verde y vuelta en rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	208
Figura 6.41. Variación del parámetro F_o de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento (ida en azul, recuperación en verde y vuelta en rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	209
Figura 6.42. Variación del parámetro F_v/F_m de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento (ida – color azul, recuperación – color verde y vuelta – color rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	210
Figura 6.43. A - Variación del parámetro $\phi PSII$ de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento. B - Variación del parámetro qP de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento. C - Variación del parámetro ETR de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento. Fases: Ida (azul), recuperación (verde) y vuelta (rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	211
Figura 6.44. Variación del parámetro NPQ de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento (ida – color azul, recuperación – color verde y vuelta – color rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	212
Figura 6.45. Variación de la reacción de Hill de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento (ida – color azul, recuperación – color verde y vuelta – color rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	213
Figura 6.46. Variación de la concentración de clorofilas totales de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento (ida – color azul, recuperación – color verde y vuelta – color rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	213
Figura 6.47. Variación de la relación chl a / chl b de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento (ida – color azul, recuperación – color verde y vuelta – color rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	214
Figura 6.48. Variación de la concentración de la clorofila a de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento (ida – color azul, recuperación – color verde y vuelta – color rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	215
Figura 6.49. Variación de la concentración de la clorofila b de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento (ida – color azul, recuperación – color verde y vuelta – color rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	215

- Figura 6.50. Fotografías de *Anabaena sp.* PCC7120 en el agua de taladrina inicial (A y B) y en el agua de taladrina fitorremediada (C, D, E y F) realizadas con un aumento 40 X en un microscopio olympus BH-2 y con una cámara Leica DCF300 FX ----- 220
- Figura 6.51. A - Efecto del agua de taladrina fitorremediada durante 5 días en el parámetro Fv/Fm del sistema fotosintético de las plantas de maíz inoculadas con la bacteria TP9, con la levadura Esp14 y con el consorcio bacteriano. B - Efecto del agua de taladrina fitorremediada durante 5 días en el parámetro Fv/Fm del sistema fotosintético de las plantas de maíz inoculadas con las bacterias Aur 6 y Esp1. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) ----- 220
- Figura 6.52. A - Efecto del agua de taladrina fitorremediada durante 5 días en el parámetro ϕ PSII del sistema fotosintético de las plantas de maíz inoculadas con la cepa TP9. B - Efecto del agua de taladrina fitorremediada durante 5 días en el parámetro ϕ PSII del sistema fotosintético de las plantas de maíz inoculadas con las cepas Aur 6, Esp14 y consorcio. C - Efecto del agua de taladrina fitorremediada durante 5 días en el parámetro ϕ PSII del sistema fotosintético de las plantas de maíz inoculadas con la cepa Esp1. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) ----- 221
- Figura 6.53. A - Efecto del agua de taladrina fitorremediada durante 5 días en el parámetro NPQ del sistema fotosintético de las plantas de maíz inoculadas con la cepa TP9. B - Efecto del agua de taladrina fitorremediada durante 5 días en el parámetro NPQ del sistema fotosintético de las plantas de maíz inoculadas con la cepa Esp1. C - Efecto del agua de taladrina fitorremediada durante 5 días en el parámetro NPQ del sistema fotosintético de las plantas de maíz inoculadas con las cepas Aur 6 y Esp14. D - Efecto del agua de taladrina fitorremediada durante cinco días en el parámetro NPQ del sistema fotosintético de las plantas de maíz inoculadas con el consorcio. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) ----- 222
- Figura 6.54. Imágenes realizadas al microscopio óptico de la hoja de plantas de maíz. A - Control sin Aur 6, B – agua de taladrina sin Aur 6, C - control con Aur 6 y D – agua de taladrina con Aur 6. Células Acompañantes de los Haces Vasculares (CAHV), Cloroplastos (Cl), Epidermis (E), Estoma (Es), Haces Vasculares (HV) y Mesófilo (Me) ----- 223
- Figura 6.55. Imágenes realizadas al microscopio óptico de la hoja de plantas de maíz control y sin Aur 6 (A, B), con agua de taladrina, sin Aur 6 (C, D), control y con Aur 6 (E, F) y con agua de taladrina, con Aur 6 (G, H). Células Acompañantes de los Haces Vasculares (CAHV), Cloroplasto (Cl), Epidermis (E), Estoma (Es), Haz Vascular (HV) y Mesófilo (Me) ----- 224

Figura 6.56. Imágenes realizadas al microscopio electrónico de transmisión de la hoja de plantas de maíz controles y sin Aur 6 (A y B) y con agua de taladrina y sin Aur 6 (C, D, E y F). Almidón (Al), Cloroplasto (Cl), Grana (Gr), Membrana plasmática (Mp), Membrana Cloroplasto (MCl), Mitocondria (M), Núcleo (N), Nucleolo (Nc), Pared celular (Pc), Plasmodesmos (Pl), Plastoglóbulos (Pg), Ribosomas (R), Tonoplasto (T), Tilacoides (Ti), Vacuola (V) y Vesículas (Ve) -----	226
Figura 6.57. Imágenes realizadas al microscopio electrónico de transmisión de hoja de plantas maíz control con Aur 6 (A y B) y con agua de taladrina y Aur 6 (C, D, E y F). Almidón (Al), Cloroplasto (Cl), Grana (Gr), Gránulos lipídicos (GL), Membrana del Cloroplasto (MCl), Membrana plasmática (MP), Mitocondria (M), Pared celular (Pc), Plasmodesmos (Pl), Plastoglóbulos (Pg), Tilacoides (Ti) y Vacuola (V) -----	227
Figura 6.58. Imágenes realizadas al microscopio electrónico de barrido de la hoja de plantas de maíz control y sin Aur 6 (A), con agua de taladrina, sin Aur 6 (B), control con Aur 6 (C), y con agua de taladrina, con Aur 6 (D). Células acompañantes de los haces vasculares (CAHV), Haces Vasculares (HV), Mesófilo (Me) y Vacuola (V) -----	228
Figura 6.59. Imágenes realizadas al microscopio electrónico de barrido de la hoja de plantas de maíz control sin Aur 6 (A y B), con agua de taladrina sin Aur 6 (C y D), control con Aur 6 (E y F) y con agua de taladrina y con Aur 6 (G y H). Células Acompañantes de los Haces Vasculares (CAHV), Cloroplasto (Cl), Haces Vasculares (HV), Núcleo (N), Pared Celular (PC), Tonoplasto (T) y Vacuola (V) -----	230
Figura 6.60. Imágenes realizadas al microscopio óptico de raíces de maíz en distintos tratamientos: control sin Aur 6 (A, B, C), agua de taladrina sin Aur 6 (D, E, F), control con Aur 6 (G, H, I) y agua de taladrina con Aur 6 (J, K, L). Floema (Fl), Haces Vasculares (HV), Parénquima (P) y Xilema (X) -----	231
Figura 6.61. Imágenes realizadas al microscopio electrónico de transmisión de la raíz de plantas de maíz control con Aur 6 (A y B) y con agua de taladrina con Aur 6 (C y D). Citoplasma (Ci), Membrana nuclear (Mn), Mitocondria (M), Núcleo (N), Nucleolo (Nc), Pared celular (Pc), Vacuola (V) y Vesícula (Ve) -----	232
Figura 6.62. Imágenes realizadas al microscopio electrónico de transmisión de raíz de plantas maíz control sin Aur 6 (A y B) y con agua de taladrina sin Aur 6 (C, D, E y F). Citoplasma (Ci), Membrana nuclear (Mn), Membrana plasmática (Mp), Mitocondria (M), Núcleo (N), Nucleolo (Nc), Pared celular (Pc), Peroxisoma (Pe), Retículo endoplasmático rugoso (Rer), Vacuola (V) y Vesícula (Ve) -----	233
Figura 6.63. Imágenes realizadas al microscopio electrónico de barrido de la raíz de plantas de maíz control sin Aur 6 (A), con agua de taladrina sin Aur 6 (B), control con Aur 6 (C), y con agua de taladrina con Aur 6 (D). Epidermis (Ep), Endodermis (En), Floema (Fl), Haz Vasculares (HV), Parénquima (P), Periciclo (Pe), Tricoma (Tr) y Xilema (X) -----	234

Figura 6.64. Imágenes realizadas al microscopio electrónico de barrido de la raíz de plantas de maíz control sin Aur 6 (A), con agua de taladrina sin Aur 6 (B), control con Aur 6 (C), y con agua de taladrina con Aur 6 (D). Epidermis (Ep), Endodermis (En), Floema (Fl), Haz Vascular (HV), Parénquima (P), Periciclo (Pe), Vacuola (V) y Xilema (X) -----	235
7. Discusión: Desarrollo y optimización de sistemas planta-microorganismo para fitorremediar agua de taladrina -----	237
8. Materiales y métodos: Estudio de la dinámica de las comunidades microbianas que se desarrollan en un reactor biológico de membrana durante el proceso de biorremediación de taladrinas y su empleo en sistemas de fitorremediación -----	253
Figura 8.1. Módulo de membrana fibra hueca polifluoruro de vinilideno (PVDF). Fotografía original de la fundación Gaiker -----	255
Figura 8.2. Esquema del funcionamiento de la membrana utilizada en el reactor biológico de membrana (R. B. M.). Esquema original de la fundación Gaiker -----	255
Figura 8.3. Planta piloto del R. B. M. donde se realizaron los experimentos. Esquema original de la fundación Gaiker -----	255
Figura 8.4. Esquema del funcionamiento del R. B. M. Esquema original de la fundación Gaiker -----	257
Figura 8.5. Medida de la demanda química de oxígeno (DQO) de la alimentación y permeado del R. B. M. Esquema original de la autora -----	258
Figura 8.6. Método para determinar la concentración de sólidos en suspensión. Esquema original de la autora -----	259
Figura 8.7. Esquema de aislamiento de las bacterias del R. B. M. Esquema original de la autora -----	262
Figura 8.8. Esquema ensayo Biolog [®] con fango activo del R. B. M. Esquema original de la autora -----	267
Figura 8.9. Experimento de fitorremediación de agua de taladrina con un consorcio aislado del biorreactor. Esquema original de la autora -----	270
9. Resultados: Estudio de la dinámica de comunidades microbianas en un reactor biológico de membrana durante el proceso de biorremediación de taladrinas y su empleo en sistemas de fitorremediación -----	273
Figura 9.1. Evolución de la demanda química de oxígeno (DQO) en el reactor biológico de membrana (R. B. M.). Azul (DQO entrada); rojo (DQO salida). La línea negra indica el valor límite de este parámetro (1.750 ppm) permitido por la Ley	

10/1993 de la Comunidad de Madrid, de 26 de octubre, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento -----	275
Figura 9.2. Evolución del rendimiento del R. B. M. (Diferencia entre la DQO total del influente y la DQO total del efluente multiplicado por 100 y dividido entre la DQO total del influente) -----	276
Figura 9.3. Evolución de la concentración de sólidos en suspensión en el R. B. M. ----	276
Figura 9.4. Evolución de turbidez del permeado durante funcionamiento del R. B. M.---	277
Figura 9.5. Evolución del pH en el R. B. M. -----	277
Figura 9.6. Evolución del caudal de permeado del R. B. M. -----	278
Figura 9.7. A - Permeabilidad inicial de la membrana. B - Permeabilidad de la membrana tras la primera limpieza química (19 de mayo de 2011). C - Permeabilidad de la membrana tras la segunda limpieza química (15 de junio de 2011) -----	278
Figura 9.8. Árbol filogenético no enraizado realizado con las secuencias del gen 16s rRNA de las bacterias cultivables aisladas del R. B. M. El árbol filogenético ha sido realizado con el programa MEGA4 usando secuencias alineadas con el servicio MAFFT v6.0. La distancia evolutiva fue inferida utilizando el método del vecino más próximo y seguidamente la curva de Jukes y Cantor. El bootstrap del consenso del árbol inferido con 500 réplicas fue tomado como representante de la distancia evolutiva del taxón analizado. El porcentaje de réplicas del árbol en el que los taxones del clúster asociados juntos en más de un 50% de las réplicas de los bootstraps se muestran entre paréntesis. <i>Pseudomonas sp.</i> (RBM-A1, RBM-A3, RBM-A4, RBM-A11, RBM-A13, RBM-A15, RBM-A17, RBM-A19, RBM-A22, RBM-B1, RBM-B8, RBM-B9, RBM-B15, RBM-B18, RBM-C1, RBM-C12, RBM-C15, RBM-C18, RBM-C25, RBM-E20, RBM-E29,), <i>Shewanella sp.</i> (RBM-A5, RBM-A26, RBM-B3, RBM-C6), <i>Morganella sp.</i> (RBM-B17, RBM-B21, RBM-B23), <i>Citrobacter sp.</i> (RBM-B2, RBM-B24, RBM-B20, RBM-B25, RBM-B26, RBM-B27, RBM-C3), <i>Acinetobacter sp.</i> (RBM-A12, RBM-A16, RBM-C13, RBM-E25, RBM-E26), <i>Stenotrophomonas sp.</i> (RBM-D11, RBM-D13, RBM-E18, RBM-E27), <i>Acidovorax sp.</i> (RBM-A24, RBM-A27, RBM-C16, RBM-C21, RBM-D9, RBM-D12, RBM-E16, RBM-E32, RBM-E33), <i>Novosphingobium sp.</i> (RBM-B13, RBM-C10, RBM-E17, RBM-E22), <i>Bosea sp.</i> (RBM-A10, RBM-D3, RBM-D8, RBM-D14, RBM-E1, RBM-E10, RBM-E15, RBM-E21), <i>Brevundimonas sp.</i> (RBM-E6, RBM-E9, RBM-E13), <i>Paracoccus sp.</i> (RBM-B22, RBM-E19, RBM-E28), <i>Rizobium sp.</i> (RBM-B12, RBM-C17, RBM-D6,), <i>Ancylobacter sp.</i> (RBM-B14, RBM-C27, RBM-D5, RBM-E3), <i>Riemerella sp.</i> (RBM-B4, RBM-C7, RBM-C11) -----	280
Figura 9.9. Diversidad biológica de cada muestreo según el índice de Shannon. La distancia considerada entre OTUs (unidades taxonómicas operativas) fue de 0,03 (3%) -----	282

Figura 9.10. Resultados obtenidos con J-Libshuff. Se trata de una matriz asimétrica con los p-valores. 1 (muestreo A), 2 (muestreo B), 3 (muestreo C), 4 (muestreo D) y 5 (muestreo E). En verde están marcados los valores menores a 0,0026; en rojo el valor por debajo del cual existen diferencias significativas entre los muestreos con un 95% de confianza. La distancia considerada entre OTUs fue de 0,03 (3%) -----	283
Figura 9.11. Diagrama de Venn en el que se muestran el número de OTUs compartidos y endémicos de cada muestreo. La distancia considerada entre OTUs fue de 0,03 (3%). Azul grisáceo (muestreo A), naranja (muestreo B), verde (muestreo C), azul claro (muestreo D) y rosa (muestreo E) -----	283
Figura 9.12. Porcentaje de distribución de los distintos órdenes aislados en el muestreo A -----	289
Figura 9.13. Árbol filogenético no enraizado realizado con secuencias del gen 16s rRNA de bacterias no cultivables aisladas del R. B. M. en el muestreo A. Árbol filogenético realizado con programa MEGA4 usando secuencias alineadas con servicio MAFFT v6.0. Distancia evolutiva inferida utilizando el método del vecino más próximo y después curva de Jukes y Cantor. Bootstrap del consenso del árbol inferido con 500 réplicas fue tomado como representante de distancia evolutiva del taxón analizado. El porcentaje de réplicas del árbol en el que los taxones del clúster asociados juntos en más de un 50% de las réplicas de los bootstraps se muestran entre paréntesis -----	290
Figura 9.14. Porcentaje de distribución de los distintos órdenes aislados en el muestreo B -----	291
Figura 9.15. Árbol filogenético no enraizado realizado con secuencias del gen 16s rRNA de bacterias no cultivables aisladas del R. B. M. en muestreo B. Árbol filogenético realizado con programa MEGA4 usando secuencias alineadas con servicio MAFFT v6.0. Distancia evolutiva inferida utilizando método del vecino más próximo y después curva de Jukes y Cantor. Bootstrap del consenso del árbol inferido con 500 réplicas fue tomado como representante de distancia evolutiva del taxón analizado. El porcentaje de réplicas del árbol en el que los taxones del clúster asociados juntos en más de un 50% de las réplicas de los bootstraps se muestran entre paréntesis -----	295
Figura 9.16. Porcentaje de distribución de los distintos órdenes aislados en el muestreo C -----	296
Figura 9.17. Árbol filogenético no enraizado realizado con secuencias del gen 16s rRNA de bacterias no cultivables aisladas del R. B. M. en muestreo C. Árbol filogenético realizado con programa MEGA4 usando secuencias alineadas con servicio MAFFT v6.0. Distancia evolutiva inferida utilizando método del vecino más próximo y después curva de Jukes y Cantor. Bootstrap del consenso del árbol inferido con 500 réplicas fue tomado como representante de distancia evolutiva del	

taxón analizado. El porcentaje de réplicas del árbol en el que los taxones del clúster asociados juntos en más de un 50% de las réplicas de los bootstraps se muestran entre paréntesis -----	300
Figura 9.18. Porcentaje de distribución de órdenes en el muestreo D -----	301
Figura 9.19. Árbol filogenético no enraizado realizado con secuencias del gen 16s rRNA de bacterias no cultivables aisladas del R. B. M. en muestreo D. Árbol filogenético realizado con programa MEGA4 usando secuencias alineadas con servicio MAFFT v6.0. Distancia evolutiva inferida utilizando método del vecino más próximo y después curva de Jukes y Cantor. Bootstrap del consenso del árbol inferido con 500 réplicas fue tomado como representante de distancia evolutiva del taxón analizado. El porcentaje de réplicas del árbol en el que los taxones del clúster asociados juntos en más de un 50% de las réplicas de los bootstraps se muestran entre paréntesis -----	306
Figura 9.20. Porcentaje de distribución de órdenes en el muestreo E -----	307
Figura 9.21. Árbol filogenético no enraizado realizado con secuencias del gen 16s rRNA de bacterias no cultivables aisladas del R. B. M. en muestreo E. Árbol filogenético realizado con programa MEGA4 usando secuencias alineadas con servicio MAFFT v6.0. Distancia evolutiva inferida utilizando método del vecino más próximo y después curva de Jukes y Cantor. Bootstrap del consenso del árbol inferido con 500 réplicas fue tomado como representante de distancia evolutiva del taxón analizado. El porcentaje de réplicas del árbol en el que los taxones del clúster asociados juntos en más de un 50% de las réplicas de los bootstraps se muestran entre paréntesis -----	311
Figura 9.22. Distribución de las distintas clases filogenéticas en función del muestreo. Azul (muestreo A), rojo (muestreo B), verde (muestreo C), granate (muestreo D) y gris (muestreo E) -----	312
Figura 9.23. Curva rarefacción de secuencias obtenidas en la electroporación de distintos muestreos (71 secuencias muestreo A; 56 muestreo B; 55 muestreo C; 64 muestreo D; 57 muestreo E; 303 el conjunto de secuencias). El número de OTUs obtenido fue 39 para muestreo A; 19 para el B; 29 para el C; 33 para el D; 23 para el E; 103 para todos los muestreos. La distancia considerada entre OTUs fue 0,02 (2%)	313
Figura 9.24. Comparativa entre riqueza observada y riqueza estimada. Índice de Chao1 para estimar la riqueza en cada muestreo. Número de OTUs observados: 39 en el muestreo A; 19 en el muestreo B; 29 en el muestreo C; 33 en el muestreo D; 23 en el muestreo E; 103 en el todos los muestreos. Número de OTUs estimados: 126 OTUs muestreo A; 28 OTUs muestreo B; 106 OTUs muestreo C; 75 OTUs muestreo D; 31 OTUs muestreo E; 261 OTUs todos los muestreos. Los valores observados se obtuvieron con la curva de rarefacción. La distancia considerada entre OTUs fue de 0,02 (2%) -----	314

- Figura 9.25. A - Estimación biodiversidad en cada muestreo según índice de Shannon-Weber (3,2 OTUs muestreo A; 2,25 OTUs muestreo B; 2,96 OTUs muestreo C; 3,13 OTUs muestreo D; 2,82 OTUs muestreo E; 3,83 OTUs todos los muestreos). B - Evolución diversidad según índice de Simpson (0,0684 muestreo A; 0,17 muestreo B; 0,064 muestreo C; 0,05 muestreo D; 0,062 muestreo E; 0,046 todos los muestreos). La distancia considerada entre OTUs fue de 0,02 (2%) ----- 314
- Figura 9.26. Resultados obtenidos con J-Libshuff. Se trata de una matriz asimétrica con los p-valores. 1 (muestreo A), 2 (muestreo B), 3 (muestreo C), 4 (muestreo D) y 5 (muestreo E). En verde están marcados los valores menores a 0,0026; en rojo el valor por debajo del que existen diferencias significativas entre los muestreos con un 95% de confianza ----- 315
- Figura 9.27. Diagrama de Venn en el que se muestra el número de OTUs compartidos y endémicos de cada muestreo. La distancia considerada entre OTUs fue de 0,02 (2%). Gris (muestreo A), rosa (muestreo B), verde (muestreo C), azul claro (muestreo D) y crema (muestreo E). En el diagrama no se muestran los OTUs compartidos entre los muestreos A.C.D. (1 OTUs) y B.A.E. (3 OTUs) ----- 316
- Figura 9.28. Evolución del average well colour development (AWCD) en las placas Biolog[®] Gram-negativa entre los distintos muestreos. Azul (muestreo A), rojo (muestreo B), verde (muestreo C), amarillo (muestreo D), negro (muestreo E). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) ----- 317
- Figura 9.29. Diversidad metabólica ($H_{(e)}$) de las placas Biolog[®] Gram-negativa. Azul (muestreo A, 262 horas), rojo (muestreo B, 94 horas), verde (muestreo C, 94 horas), amarillo (muestreo D, 94 horas), negro (muestreo E, 94 horas). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) ----- 317
- Figura 9.30. Consumo fuentes nutritivas en Biolog[®] Gram-negativa. Fuentes nutrientes (alcoholes, compuestos aromáticos, polímeros, ésteres, ácidos carboxílicos, carbohidratos, aminoácidos, aminas/amidas). Azul (muestreo A, 262 horas), rojo (muestreo B, 94 horas), verde (muestreo C, 94 horas), amarillo (muestreo D, 94 horas), negro (muestreo E, 94 horas). Se realizó ANOVA unidireccional para cada compuesto. Además se realizó un ANOVA factorial para conocer las diferencias entre fuentes teniendo en cuenta todos los muestreos (longitud de las barras). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$), letras minúsculas (ANOVA unidireccional), letras mayúsculas (ANOVA factorial) ----- 318
- Figura 9.31. Ordenación de las muestras obtenida a partir del análisis de correspondencias (CA) realizado con los datos de absorbancia corregidos (595 nm) de las 95 fuentes de carbono de la placa Biolog[®] Gram-negativa, medidas a las 262 horas (muestreo A) y 94 horas (muestreos B, C, D y E) ----- 319
- Figura 9.32. Evolución del AWCD en las placas Biolog[®] Gram-positiva entre los distintos muestreos. Azul (muestreo A), rojo (muestreo B), verde (muestreo C),

amarillo (muestreo D), negro (muestreo E). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	320
Figura 9.33. $H_{(e)}$ de las placas Biolog [®] Gram-positiva. Azul (muestreo A, 262 horas), rojo (muestreo B, 166 horas), verde (muestreo C, 166 horas), amarillo (muestreo D, 94 horas), negro (muestreo E, 166 horas). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	320
Figura 9.34. Consumo fuentes nutritivas en Biolog [®] GP. Fuentes de nutrientes (alcoholes, compuestos aromáticos, polímeros, ésteres, ácidos carboxílicos, carbohidratos, aminoácidos, aminas/amidas). Azul (muestreo A, 262 horas), rojo (muestreo B, 166 horas), verde (muestreo C, 166 horas), amarillo (muestreo D, 94 horas), negro (muestreo D, 166 horas). Se realizó un ANOVA unidireccional para cada compuesto. Además se realizó un ANOVA factorial para conocer las diferencias entre fuentes teniendo en cuenta todos los muestreos (longitud de las barras). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$), letras minúsculas (a, b, c: ANOVA unidireccional), letras mayúsculas (ANOVA factorial) y letras minúsculas (x, y, z) ANOVA factorial que considera sólo los muestreos -----	321
Figura 9.35. Ordenación de las muestras obtenida a partir del CA realizado con los datos de absorbancia corregidos (595 nm) de las 95 fuentes de carbono de la placa Biolog [®] Gram-positiva, medidas a las 262 horas (muestreo A), 166 horas (muestreos B, C y E) y 94 horas (muestreos D) -----	322
Figura 9.36. Evolución del AWCD en las placas Biolog [®] Anaerobia entre los distintos muestreos. Azul (muestreo A), rojo (muestreo B), verde (muestreo C), amarillo (muestreo D), negro (muestreo E). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	323
Figura 9.37. Diversidad Metabólica ($H_{(e)}$) de las placas Biolog [®] Anaerobia. Azul (muestreo A, 262 horas), rojo (muestreo B, 262 horas), verde (muestreo C, 262 horas), amarillo (muestreo D, 262 horas), negro (muestreo E, 94 horas). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	323
Figura 9.38. Consumo fuentes nutritivas Biolog [®] Anaerobia. Fuentes de nutrientes (dipéptidos, alcoholes, compuestos aromáticos, polímeros, ésteres, ácidos carboxílicos, carbohidratos, aminoácidos, aminas/amidas). Azul (muestreo A, 262 horas), rojo (muestreo B, 262 horas), verde (muestreo C, 262 horas), amarillo (muestreo D, 262 horas), negro (muestreo E, 94 horas). Se realizó un análisis unidireccional para cada compuesto y un análisis multidireccional para los muestreos y los compuestos. Se realizó un ANOVA unidireccional para cada compuesto y así conocer las diferencias entre muestreos. Además se realizó un ANOVA factorial para conocer las diferencias entre fuentes teniendo en cuenta todos los muestreos (longitud de las barras). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$),	

letras minúsculas (ANOVA unidireccional), letras mayúsculas (ANOVA factorial) y letras minúsculas (x, y) ANOVA factorial que considera sólo los muestreos -----	325
Figura 9.39. Ordenación de las muestras realizada a partir del CA realizado con los datos de absorbancia corregidos (595 nm) de 95 fuentes de carbono de placa Biolog [®] Anaerobia, medidas a las 262 horas (muestreo A, B, C y E) y 94 horas (muestreo D) -	325
Figura 9.40. Variación de la DQO realizada por el sistema fitorremediador formado por la especie acuática <i>Lemna minor</i> inoculada o sin inocular con el consorcio formado por las cepas RBM-A11, RBM-A12, RBM-A16 y RBM-A23. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	326
Figura 9.41. Incremento del peso fresco de la especie acuática <i>Lemna minor</i> tanto en los controles como en los tratamientos con agua de taladrina. En ambos tratamientos hubo plantas sin inocular y otras inoculadas con el consorcio. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	326
Figura 9.42. A - Variación de la fluorescencia emitida en condiciones de luz suave por plantas que provienen de oscuridad (F_o). B - Variación de la fluorescencia máxima en el estado de adaptación a la oscuridad (F_m). C - Variación de la eficiencia potencial máxima del PSII (F_v/F_m). Tratamientos: control sin consorcio, control con consorcio, agua de taladrina sin consorcio y agua de taladrina con consorcio. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	327
Figura 9.43. Variación de la DQO realizada por el sistema fitorremediador. En azul: sistema fitorremediador sin inocular; en rojo: sistema fitorremediador inoculado con el consorcio. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	329
Figura 9.44. Variación del pH ejercido por el sistema fitorremediador. Azul: sistema sin inocular; rojo: sistema inoculado con el consorcio. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	330
Figura 9.45. Estado de las plantas controles (izquierda) y del tratamiento (derecha, cinco días después de estar en contacto con el agua de taladrina). Fotografía original de la autora -----	330
Figura 9.46. A - Variación del parámetro fotosintético F_o . B - Variación del parámetro F_m . C - Variación del parámetro F_v/F_m . Tratamientos: Control sin consorcio, control con consorcio, agua de taladrina sin consorcio y agua de taladrina con consorcio. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	331
Figura 9.47. Variación de la DQO del agua de taladrina tras un proceso de fitorremediación de 5 días. Azul - sin consorcio; rojo - con consorcio. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	333
Figura 9.48. Variación del pH entre las muestras de agua de taladrina inicial y las muestras resultantes del proceso de fitorremediación. Azul - sin consorcio; rojo - con consorcio. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	334

Figura 9.49. Cromatogramas correspondientes al análisis de hidrocarburos de la muestra inicial (A), sin consorcio (B) y con consorcio (C). 1: pico 5,77 min; 2: pico 6,80 min; 3: pico 7,30 min; 4: 7,32; 5: 8,54 min; 6: 9,17 min; 7: 9,55 min; 8: 9,59 min; 9: 11,19 min; 10: 11,49 min; 11: 12,25 min; 12: 14,92 min -----	334
Figura 9.50. Plantas de maíz procedentes de los distintos tratamientos (A – control sin consorcio, B – control con consorcio, C – agua de taladrina sin consorcio, D – agua de taladrina con consorcio). Fotografía original de la autora -----	336
Figura 9.51. Raíces de plantas de maíz de cada tratamiento (A – control sin consorcio, B – control con consorcio, C – agua de taladrina sin consorcio, D – agua de taladrina con consorcio). Fotografía original de la autora -----	337
Figura 9.52. Variación de la altura de las plantas de maíz en función del tratamiento (control sin consorcio, control con consorcio, agua de taladrina sin consorcio y agua de taladrina con consorcio). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	337
Figura 9.53. Variación del número de hojas de las plantas de maíz en función del tratamiento (control sin consorcio, control con consorcio, agua de taladrina sin consorcio y agua de taladrina con consorcio). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	338
Figura 9.54. A - Variación del parámetro fotosintético F_o . B - Variación de la eficiencia potencial máxima del fotosistema II (F_v/F_m). C - Variación de la eficiencia máxima del fotosistema II (ϕ_{PSII}). D - Quenching fotoquímico de la variación de la fluorescencia de la clorofila (qP). E - Variación de la tasa relativa del transporte de electrones (ETR). F - Variación del Quenching no fotoquímico (NPQ). Tratamientos: Control sin consorcio, control con consorcio, agua de taladrina sin consorcio y agua de taladrina con consorcio. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	339
Figura 9.55. Variación de la velocidad de la reacción de Hill en función del tratamiento (control sin consorcio, control con consorcio, agua de taladrina sin consorcio y agua de taladrina con consorcio). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	340
Figura 9.56. A - Variación de las clorofilas totales. B - Evolución de la relación chl a / chl b (Clorofila a / clorofila b). Tratamientos: control sin consorcio, control con consorcio, agua de taladrina sin consorcio y agua de taladrina con consorcio. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) -----	340
10. Discusión: Estudio de la dinámica de comunidades microbianas en un reactor biológico de membrana durante el proceso de biorremediación de agua de taladrina y su empleo en sistemas de fitorremediación -----	343
11. Conclusiones -----	357

Bibliografía	361
Anexo 1: Legislación	415
Anexo 2: Colección de bacterias aisladas de la zona franca de Barcelona	479
Anexo 3: Medios de Cultivo	487
Anexo 4: Bacterias aisladas de la zona franca de Barcelona y de taladrina pretratada capaces de crecer en agar con agua de taladrina ----	491
Anexo 5: Análisis fisicoquímicos de las muestras de agua de taladrina --	497
Anexo 6: Cromatogramas correspondientes al análisis de hidrocarburos de la muestra de John Deere del 19/01/2009	501
Figura A1. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 5,78 minutos	503
Figura A2. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 6,48 minutos	504
Figura A3. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 6,70 minutos	505
Figura A4. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 7,30 minutos	506
Figura A5. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 9,02 minutos	507
Figura A6. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 9,45 minutos	508
Figura A7. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 11,36 minutos	509
Figura A8. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 12,06 minutos	510
Figura A9. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 12,10 minutos	511
Figura A10. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 12,60 minutos	512
Figura A11. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 12,85 minutos	513

Figura A12. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 13,59 minutos -----	514
Figura A13. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 14,37 minutos -----	515
Figura A14. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 14,69 minutos -----	516
Anexo 7: Análisis elemental de las muestras de agua de taladrina -----	517
Figura A15. Espectro de TXRF (fluorescencia de rayos X por reflexión total) de la muestra de agua de taladrina del 28/01/2009 -----	525
Figura A16. Espectro de TXRF de la muestra de agua de taladrina del 13/02/2009 -----	526
Figura A17. Espectro de TXRF de la muestra de agua de taladrina del 29/10/2008 -----	527
Figura A18. Espectro de TXRF de la muestra de agua de taladrina del 05/02/2009 -----	528
Figura A19. Espectro de TXRF de la muestra de agua de taladrina del 19/01/2009 -----	529
Anexo 8: Cromatogramas correspondientes al análisis de pigmentos fotosintéticos de <i>Lemna minor</i> de los tratamientos control y 5 días en agua de taladrina -----	531
Figura A20. Cromatograma de fluorescencia correspondiente a los antioxidantes lipofílicos de un extracto de <i>Lemna minor</i> del tratamiento control. (1) δ -Tocoferol, (2) β + γ -Tocoferol, (3) α -Tocoferol, (4) Feofitina. Unidades eje Y: mV (milivoltios); unidades eje X: minutos -----	533
Figura A21. Cromatograma de fluorescencia correspondiente a los antioxidantes lipofílicos de un extracto de <i>Lemna minor</i> del tratamiento 5 días en agua de taladrina. (1) δ -Tocoferol, (2) β + γ -Tocoferol, (3) α -Tocoferol, (4) Feofitina. Unidades eje Y: mV (milivoltios); unidades eje X: minutos -----	533
Figura A22. Cromatograma a 445 nm correspondiente a los pigmentos fotosintéticos de un extracto de <i>Lemna minor</i> del tratamiento control. (1) Neoxantina, (2) Violaxantina, (3) Luteína epóxido, (4) Antheraxantina, (5) Luteína, (6) Zeaxantina, (7) Clorofila b, (8) Clorofila a, (9) β -Caroteno. Unidades eje Y: AU (Absorbance Units); unidades eje X: minutos -----	534
Figura A23: Cromatograma a 445 nm correspondiente a los pigmentos fotosintético de un extracto de <i>Lemna minor</i> del tratamiento 5 días en agua de taladrina. (1) Neoxantina, (2) Violaxantina, (3) Luteína epóxido, (4) Antheraxantina, (5) Luteína, (6) Zeaxantina, (7) Clorofila b, (8) Clorofila a, (9) β -Caroteno. Unidades eje Y: AU (Absorbance Units); unidades eje X: minutos -----	534

Anexo 9: Cromatogramas correspondientes al análisis de hidrocarburos de las muestras iniciales y fitorremediadas ----- 535

Figura A24. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos de la muestra inicial correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La demanda química de oxígeno (DQO) de esta muestra era de 1.648 ppm -----	537
Figura A25. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del tratamiento sin consorcio correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 836 ppm -----	538
Figura A26. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del tratamiento con consorcio correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 755 ppm -----	539
Figura A27. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del tratamiento sin Aur 6 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de cinco días. La DQO de esta muestra era de 809 ppm -----	540
Figura A28. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del tratamiento con Aur 6 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de cinco días. La DQO de esta muestra era de 818 ppm -----	541
Figura A29. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del tratamiento sin Esp1 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de cinco días. La DQO de esta muestra era de 633 ppm -----	542
Figura A30. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del tratamiento con Esp1 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de cinco días. La DQO de esta muestra es de 684 ppm -----	543
Figura A31. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del tratamiento sin TP9 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de cinco días. La DQO de esta muestra era de 527 ppm -----	544
Figura A32. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del tratamiento con TP9 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de cinco días. La DQO de esta muestra era de 634 ppm -----	545
Figura A33. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del tratamiento sin Esp14 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de cinco días. La DQO de esta muestra era de 902 ppm -----	546
Figura A34. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del tratamiento con Esp14 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de cinco días. La DQO de esta muestra era de 922 ppm -----	547
Figura A35. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del proceso de ida del experimento en fases. La DQO de esta muestra era de 561 ppm -----	548

Figura A36. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del tratamiento en continuo del experimento en fases. La DQO de esta muestra era de 680 ppm -----	549
Figura A37. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos de la muestra inicial del experimento en fases. La DQO de esta muestra era 1.742 ppm ----	550
Figura A38. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del proceso de vuelta a los 9 días del experimento en fases. La DQO de esta muestra era de 447 ppm -----	551
Anexo 10: Cromatogramas correspondientes al análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) de las muestras iniciales y fitorremediadas -----	553
Figura A39. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) de la muestra inicial correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La demanda química de oxígeno (DQO) de esta muestra era de 1.648 ppm -----	555
Figura A40. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del tratamiento sin consorcio correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 836 ppm -----	556
Figura A41. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del tratamiento con consorcio correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 755 ppm -----	557
Figura A42. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del tratamiento sin Aur 6 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 809 ppm -----	558
Figura A43. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del tratamiento con Aur 6 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 818 ppm -----	559
Figura A44. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del tratamiento sin Esp1 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 633 ppm -----	560
Figura A45. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del tratamiento con Esp1 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra es de 684 ppm -----	561
Figura A46. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del tratamiento sin TP9 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 527 ppm -----	562

Figura A47. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del tratamiento con TP9 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 634 ppm -----	563
Figura A48. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del tratamiento sin Esp14 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 902 ppm -----	564
Figura A49. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del tratamiento con Esp14 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 922 ppm -----	565
Figura A50. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del proceso de ida del experimento en fases. La DQO de esta muestra era de 561 ppm -----	566
Figura A51. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del tratamiento en continuo del experimento en fases. La DQO de esta muestra era de 680 ppm -----	567
Figura A52. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs de la muestra inicial del experimento en fases. La DQO de esta muestra era de 1742 ppm -----	568
Figura A53. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del proceso de vuelta a los 9 días del experimento en fases. La DQO de esta muestra era de 447 ppm -----	569
Anexo 11: Fichas informativas del aceite de corte -----	571
Anexo 12: Preparaciones utilizadas en microscopía electrónica -----	579
Anexo 13: Patente “Procedimiento para la reducción de la DQO de efluentes líquidos aceitosos mediante fitorremediación con maíz-esparto; su aplicación al tratamiento de taladrinas agotadas” -----	583
Anexo 14: Comparación del análisis de hidrocarburos de las muestras iniciales y fitorremediadas durante un periodo de 5 días -----	599
Anexo 15: Cepas aisladas reactor biológico de membrana (R. B. M.) -----	603
Anexo 16: Medidas de seguimiento de un reactor biológico de membrana (R. B. M.) -----	613
Anexo 17: Cromatogramas correspondientes al análisis de pigmentos fotosintéticos de <i>Lemna minor</i> de los tratamientos control, control con inóculo, 5 días en agua de taladrina y 5 días en agua de taladrina con inóculo -----	617
Figura A54. Cromatograma de fluorescencia correspondiente a los Antioxidantes lipofílicos de un extracto de <i>Lemna minor</i> del tratamiento control. (1) δ -Tocoferol, (2)	

β+γ-Tocoferol, (3) α-Tocoferol, (4) Feofitina. Unidades eje Y: mV (milivoltios); unidades eje X: minutos -----	619
Figura A55. Cromatograma de fluorescencia correspondiente a los Antioxidantes lipofílicos de un extracto de <i>Lemna minor</i> del tratamiento control con inóculo. (1) δ-Tocoferol, (2) β+γ-Tocoferol, (3) α-Tocoferol, (4) Feofitina. Unidades eje Y: mV (milivoltios); unidades eje X: minutos -----	619
Figura A56. Cromatograma de fluorescencia correspondiente a los Antioxidantes lipofílicos de un extracto de <i>Lemna minor</i> del tratamiento 5 días en agua de taladrina. (1) δ-Tocoferol, (2) β+γ-Tocoferol, (3) α-Tocoferol, (4) Feofitina. Unidades eje Y: mV (milivoltios); unidades eje X: minutos -----	620
Figura A57. Cromatograma de fluorescencia correspondiente a los Antioxidantes lipofílicos de un extracto de <i>Lemna minor</i> del tratamiento 5 días en agua de taladrina con inóculo. (1) δ-Tocoferol, (2) β+γ-Tocoferol, (3) α-Tocoferol, (4) Feofitina. Unidades eje Y: mV (milivoltios); unidades eje X: minutos -----	620
Figura A58. Cromatograma a 445 nm correspondiente a los pigmentos fotosintéticos de un extracto de <i>Lemna minor</i> del tratamiento control. (1) Neoxantina, (2) Violaxantina, (3) Luteína epóxido, (4) Anteraxantina, (5) Luteína, (6) Zeaxantina, (7) Clorofila <i>b</i> , (8) Clorofila <i>a</i> , (9) β-Caroteno. Unidades eje Y: AU (Absorbance Units); unidades eje X: minutos -----	621
Figura A59. Cromatograma a 445 nm correspondiente a los pigmentos fotosintéticos de un extracto de <i>Lemna minor</i> del tratamiento control con inóculo. (1) Neoxantina, (2) Violaxantina, (3) Luteína epóxido, (4) Anteraxantina, (5) Luteína, (6) Zeaxantina, (7) Clorofila <i>b</i> , (8) Clorofila <i>a</i> , (9) β-Caroteno. Unidades eje Y: AU (Absorbance Units); unidades eje X: minutos -----	621
Figura A60. Cromatograma a 445 nm correspondiente a los pigmentos fotosintéticos de un extracto de <i>Lemna minor</i> del tratamiento 5 días en agua de taladrina. (1) Neoxantina, (2) Violaxantina, (3) Luteína epóxido, (4) Anteraxantina, (5) Luteína, (6) Zeaxantina, (7) Clorofila <i>b</i> , (8) Clorofila <i>a</i> , (9) β-Caroteno. Unidades eje Y: AU (Absorbance Units); unidades eje X: minutos -----	622
Figura A61. Cromatograma a 445 nm correspondiente a los pigmentos fotosintéticos de un extracto de <i>Lemna minor</i> del tratamiento 5 días en agua de taladrina con inóculo. (1) Neoxantina, (2) Violaxantina, (3) Luteína epóxido, (4) Anteraxantina, (5) Luteína, (6) Zeaxantina, (7) Clorofila <i>b</i> , (8) Clorofila <i>a</i> , (9) β-Caroteno. Unidades eje Y: AU (Absorbance Units); unidades eje X: minutos -----	622
Anexo 18: Cromatogramas correspondientes al análisis de pigmentos fotosintéticos de <i>Zea mays</i> de los tratamientos control, control con inóculo, 5 días en agua de taladrina y 5 días en agua de taladrina con inóculo -----	623

Figura A62. Cromatograma de fluorescencia correspondiente a los Antioxidantes lipofílicos de un extracto de una hoja de <i>Zea mays</i> del tratamiento control. (1) δ -Tocoferol, (2) β + γ -Tocoferol, (3) α -Tocoferol, (4) Feofitina. Unidades eje Y: mV (milivoltios); unidades eje X: minutos -----	625
Figura A63. Cromatograma de fluorescencia correspondiente a los Antioxidantes lipofílicos de un extracto de una hoja de <i>Zea mays</i> del tratamiento control con inóculo. (1) δ -Tocoferol, (2) β + γ -Tocoferol, (3) α -Tocoferol, (4) Feofitina. Unidades eje Y: mV (milivoltios); unidades eje X: minutos -----	625
Figura A64. Cromatograma de fluorescencia correspondiente a los Antioxidantes lipofílicos de un extracto de una hoja de <i>Zea mays</i> del tratamiento 5 días en agua de taladrina. (1) δ -Tocoferol, (2) β + γ -Tocoferol, (3) α -Tocoferol, (4) Feofitina. Unidades eje Y: mV (milivoltios); unidades eje X: minutos -----	626
Figura A65. Cromatograma de fluorescencia correspondiente a los Antioxidantes lipofílicos de un extracto de una hoja de <i>Zea mays</i> del tratamiento 5 días en agua de taladrina con inóculo. (1) δ -Tocoferol, (2) β + γ -Tocoferol, (3) α -Tocoferol, (4) Feofitina. Unidades eje Y: mV (milivoltios); unidades eje X: minutos -----	626
Figura A66. Cromatograma a 445 nm correspondiente a los pigmentos fotosintéticos de un extracto de una hoja de <i>Zea mays</i> del tratamiento control. (1) Neoxantina, (2) Violaxantina, (3) Luteína epóxido, (4) Anteraxantina, (5) Luteína, (6) Zeaxantina, (7) Clorofila <i>b</i> , (8) Clorofila <i>a</i> , (9) β -Caroteno. Unidades eje Y: AU (Absorbance Units); unidades eje X: minutos -----	627
Figura A67. Cromatograma a 445 nm correspondiente a los pigmentos fotosintéticos de un extracto de una hoja de <i>Zea mays</i> del tratamiento control con inóculo. (1) Neoxantina, (2) Violaxantina, (3) Luteína epóxido, (4) Anteraxantina, (5) Luteína, (6) Zeaxantina, (7) Clorofila <i>b</i> , (8) Clorofila <i>a</i> , (9) β -Caroteno. Unidades eje Y: AU (Absorbance Units); unidades eje X: minutos -----	627
Figura A68. Cromatograma a 445 nm correspondiente a los pigmentos fotosintéticos de un extracto de una hoja de <i>Zea mays</i> del tratamiento 5 días en agua de taladrina. (1) Neoxantina, (2) Violaxantina, (3) Luteína epóxido, (4) Anteraxantina, (5) Luteína, (6) Zeaxantina, (7) Clorofila <i>b</i> , (8) Clorofila <i>a</i> , (9) β -Caroteno. Unidades eje Y: AU (Absorbance Units); unidades eje X: minutos -----	628
Figura A69. Cromatograma a 445 nm correspondiente a los pigmentos fotosintéticos de un extracto de una hoja de <i>Zea mays</i> del tratamiento 5 días en agua de taladrina con inóculo. (1) Neoxantina, (2) Violaxantina, (3) Luteína epóxido, (4) Anteraxantina, (5) Luteína, (6) Zeaxantina, (7) Clorofila <i>b</i> , (8) Clorofila <i>a</i> , (9) β -Caroteno. Unidades eje Y: AU (Absorbance Units); unidades eje X: minutos -----	628
Anexo 19: Aportaciones a congresos -----	629

Índice de abreviaturas

A: Número de géneros representados solamente por un único individuo en esa muestra.

ABE: Agar bacteriológico europeo.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AI: Almidón.

AN: Anaerobias.

ANOVA: Análisis de la varianza.

ARN: Ácido ribonucleico.

AU: Absorbance units. Unidades de absorbancia.

AWCD: Average well colour development.

B: Número de géneros representados por exactamente dos individuos en la muestra.

BLAST: Basic local alignment search tool.

BOCAM: Boletín Oficial de la Comunidad Autónoma de Madrid.

BOE: Boletín Oficial del Estado.

B. S. E.: Back Scattered Electrons.

BTEX: Benceno, tolueno, etileno y xileno.

C: Microorganismos aislados de la rizosfera de *Ipomoea indica*.

CA: Análisis de correspondencia.

CAHV: Células acompañantes de los haces vasculares.

CAR/PL: Centro de Actividad Regional para la Producción Limpia.

Ci: Citoplasma.

Cl: Cloroplastos.

CLH: Compañía logística de hidrocarburos.

CLPP: Perfiles fisiológicos a nivel de la comunidad.

Chl a / chl b: Clorofila a / Clorofila b.

CEE: Comunidad Económica Europea.

CEU: Centro de Estudios Universitarios.

Co: Producción del color por cada pocillo (densidad óptica medida a 595 nm)

Control: Medio sin agua de taladrina.

- COV:** Compuestos orgánicos volátiles.
- CPY enzimas:** Complejo enzimático citocromo P450 mono-oxigenasas.
- CSIC:** Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- CV%:** Coeficiente de variación.
- DBO₅:** Demanda biológica de oxígeno.
- DCPIP:** Diclorofenol-indofenol.
- DDT:** Diclorofenil tricloroetano.
- DL₅₀:** Dilución que causa un 50% de mortalidad.
- DMSO:** Dimethyl sulfoxide. Dimetilsulfóxido.
- DNA:** Deoxyribonucleic acid.
- dNTPs:** Deoxyribonucleotide triphosphate. Desoxinucleótidos trifosfato.
- DQO:** Demanda química de Oxígeno.
- DOCE:** Diario Oficial de la Comunidad Europea.
- E. D. A. R.:** Estaciones depuradoras de aguas residuales.
- EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid. Ácido etilendiaminotetraacético.
- Eh-s:** Habitantes equivalentes.
- EI:** Método de ionización por impacto electrónico.
- En:** Endodermis.
- Ep:** Epidermis.
- EPA:** United State Environmental Protection Agency.
- Es:** Estoma.
- ETR:** Tasa relativa del transporte de electrones.
- FAMES:** Ácidos grasos de membrana.
- FAO:** Food and Agriculture Organization of the United Nations. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura.
- FID:** Detección de ionización de llama.
- Fl:** Floema.
- FLC:** Lamelas cloroplásticas.
- F/M:** Relación comida/microorganismo.
- Fm:** Fluorescencia máxima.
- Fm`:** Fluorescencia máxima medida en un estado adaptado a la luz.

FMS2: Fluorescence Monitoring System.

Fo: Fluorescencia emitida en condiciones de luz suave por plantas que provienen de oscuridad.

FPU: Formación del personal universitario.

Fq`: Diferencia entre Fm` y Fs.

Fs: Fluorescencia emitida por la hoja adaptada a la luz.

Fv: Fluorescencia variable.

Fv`: Fluorescencia variable de hojas adaptadas a la luz.

Fv/Fm: Eficiencia potencial máxima o rendimiento cuántico máximo del PSII.

GC/MS: Cromatografía de gases combinada con espectrometría de masas.

GL: Gránulos lipídicos.

GN: Gram negativa.

GP: Gram positiva.

Gr: Grana.

GSH: Conjugación con glutation.

GS-MS: Cromatografía de gases combinada con espectrometría de masas.

GTN: Glicerol trinitrato.

H: Microorganismos aislados de la rizosfera de *Piptatherum miliaceum*.

H`: Medida de la diversidad biológica.

H_(e): Medida de la diversidad metabólica.

HRTs: Tiempos de retención hidráulica.

HPLC: High-performance liquid chromatography. Cromatografía líquida de alta eficiencia.

HV: Haces vasculares.

IC: Intervalos de confianza.

IC₁₀²: es la dilución de un tóxico que causa una inhibición de la luminiscencia del sensor en un 10%.

IC₅₀²: Concentración efectiva de un tóxico que causa una inhibición de un 50% de la bioluminiscencia respecto al control no tratado.

IC_{Lower 95%} y IC_{upper 95%}: Intervalos de confianza al 95% inferior y superior respectivamente.

ICp: Inhibition concentration. Concentración de inhibición.

- IHOBE S. A.:** Sociedad pública de gestión ambiental del gobierno vasco.
- IPPC:** Integrated pollution prevention and control. Prevención y control integrados de la contaminación.
- ISO:** Organización internacional para la estandarización.
- JDISA:** John Deere Ibérica, S. A.
- Km:** Concentración a la cual la velocidad de degradación es la mitad de la velocidad máxima.
- L:** Número de géneros que aparecen solamente en una muestra.
- LRW:** L R white.
- LSD:** Least significant difference.
- LX:** Luteína epóxido.
- M:** Mitocondria.
- MCI:** Membrana del cloroplasto.
- MDG Report:** The Millenium development Goals Report.
- Me:** Mesófilo.
- Mn:** Membrana nuclear.
- Mp:** Membrana plasmática.
- Mu:** Número de muestras.
- N:** Núcleo.
- Na:** Suma de los 95 valores de absorbancia corregidos.
- Nc:** Nucleolo.
- NCBI:** National center for biotechnology information.
- Nip:** Absorbancia corregida de cada sustrato (pocillo)
- Nm:** Neomicina sulfato.
- NPL:** Lista nacional prioritaria.
- NPQ:** Quenching no fotoquímico.
- Ns:** Número de sustratos de la placa Biolog[®]
- OMS:** Organización mundial de la salud.
- ONU:** Organización de naciones unidas.
- OTUs:** Unidades taxonómicas operativas.
- P:** Parénquima.
- PAHs:** Polycyclic aromatic hydrocarbons. Hidrocarburos aromáticos policíclicos.

- Pc:** Pared celular.
- PCA:** Agar para métodos estándar.
- PCBs:** Bifenilos policlorados, policloruros de bifenilo.
- PCR:** Polymerase chain reaction. Reacción en cadena de la polimerasa.
- Pe:** Peroxisoma.
- Per:** Periciclo.
- PF:** Peso fresco.
- Pg:** Plastoglobulos.
- PGPRs:** Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.
- pH:** Potencial de hidrógeno.
- Pi:** Abundancia proporcional de un género o de una especie.
- PI:** Plasmodiosmos.
- PSI:** Fotosistema I.
- PSII:** Fotosistema II.
- PTFE:** Polytetrafluoroethylene. Politetrafluoroetileno o teflón.
- PVDF:** Polifluoruro de vinilideno.
- QA:** Quinona.
- qP:** Quenching fotoquímico de la variación de la fluorescencia de la clorofila.
- Quimera:** Secuencias que pertenecen a más de un individuo, amplificadas como un solo contig, dando lugar a un amplicón de individuos diferentes.
- R:** Ribosomas.
- Rab:** Valor de absorbancia del pocillo de control.
- R. B. M.:** Reactor biológico de membrana.
- R B. M. s:** Reactor biológico de membrana sumergida.
- RD:** Real Decreto.
- RDX:** Hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina.
- Rendimiento:** % de reducción de la DQO. Diferencia entre la DQO total del influente y la DQO total del efluente multiplicado por 100 y dividido entre la DQO total del influente.
- Rer:** Retículo endoplasmático rugoso.
- R. P. M.:** Revoluciones por minuto.
- ROS:** Especies reactivas de oxígeno.

S: Microorganismos aislados de la rizosfera de *Conyza canadensis*.

SD: desviación estándar.

SIDI: Servicio interdepartamental de la Universidad Autónoma de Madrid.

SL: Suelo libre.

SOD: Superóxido dismutasa.

SPME: Microextracción en fase sólida.

S_r: Número de géneros en una muestra.

SRT: Tiempo de retención de sólidos.

SS: Sólidos en suspensión.

T: Tonoplasto.

TAE: Tampón Tris Acetato-EDTA.

TCA: 2,4,6-tricloroanisol.

TCE: Tricloro etileno.

Ti: Tilacoides.

TNT: 2,4,6-trinitrotolueno.

TPYG: Triptona, peptona, extracto de levadura y glucosa.

Tratamiento: Con agua de taladrina.

TSA: Agar para soja triptófana.

TXRF: Fluorescencia de rayos X por reflexión total.

U. f. c.: Unidades formadoras de colonias.

UPV: Universidad del País Vasco.

US: United States.

V: Vacuola.

VAZ: Conjunto formado por los pigmentos violaxantina, anteroxantina y zeaxantina.

Ve: Vesículas.

WHO: World Health Organization.

X: Xilema.

ΦPSII: Eficiencia máxima o rendimiento cuántico del fotosistema II.

% Inh¹: Porcentaje de inhibición de luminiscencia que produce la muestra sin ninguna dilución.

RESUMEN

El desarrollo industrial supone la emisión de múltiples sustancias contaminantes a nuestro entorno (sólidas, líquidas y gaseosas), con el consiguiente deterioro del mismo. En cuanto a las emisiones líquidas, objeto del presente trabajo, la legislación actual (Ley 10/1993, de la Comunidad de Madrid, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento), es cada vez más exigente con respecto a parámetros químicos y biológicos (DQO, pH, conductividad, DBO₅).

En los procesos de descontaminación se utilizan, en muchas ocasiones, métodos físico-químicos pero éstos suelen ser perjudiciales para el medio ambiente. Por eso se han desarrollado métodos biológicos, más respetuosos, que son conocidos como mecanismos de biorremediación (uso de plantas y/o microorganismos para eliminar la contaminación existente en un determinado medio).

El medio para biorremediar utilizado en este trabajo se conoce como agua de taladrina. La taladrina es una emulsión de agua y aceite (2%) que se utiliza para lubricar y refrigerar la zona de contacto entre las herramientas de corte y los materiales a mecanizar. Pero con el uso, este líquido pierde sus cualidades y se convierte en un residuo (taladrina agotada). La empresa John Deere Ibérica S. A. (JDISA), que suministró el líquido a fitorremediar, realiza un tratamiento de la taladrina agotada mediante el sistema del vacuest, obteniendo una reducción importante de la DQO, desde más de 25.000 ppm hasta alrededor de 4.000 ppm. Después de este tratamiento se obtiene un residuo conocido como agua de taladrina.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un sistema biológico capaz de reducir la DQO de las muestras de agua de taladrina procedentes de los procesos de producción de JDISA.

Las muestras están formadas, principalmente, por hidrocarburos lineales, ramificados, aromáticos y aromáticos policíclicos (fluoreno y pireno), aunque aparecen otros elementos químicos de diferente naturaleza. Presentan unos valores de DQO superiores a 1.750 ppm (límite legal establecido por la Ley 10/1993 de la Comunidad de Madrid).

El desarrollo del sistema biorremediador se dividió en dos partes. En primer lugar se determinó la especie vegetal con mayor capacidad para reducir la DQO. Para ello, se utilizaron especies con hábitos acuáticos y terrestres y se realizaron diversos ensayos para determinar su resistencia al medio contaminado. La especie que tuvo una mayor resistencia y que era capaz de reducir la DQO por debajo de los límites establecidos por la ley, fue el maíz (*Zea mays*), con la que se realizaron los ensayos de biorremediación.

Paralelamente se buscó un medio en el que las plantas pudiesen enraizar. Este medio tenía que ser biodegradable y no tóxico. El esparto resultó ser el soporte de crecimiento vegetal que más favoreció el enraizamiento de las plantas.

En segundo lugar, se aislaron microorganismos de un medio contaminado con hidrocarburos, de las propias taladrinas, del esparto y de un reactor biológico de membrana (R. B. M.). Con estas cepas se desarrollaron sistemas maíz-esparto-microorganismo.

Fruto de este trabajo, se solicitó y fue concedida la patente, titulada "Procedimiento para la reducción de la DQO de efluentes líquidos aceitosos mediante fitorremediación con maíz-esparto; su aplicación al tratamiento de taladrinas agotadas" (P201000684).

El sistema maíz-esparto fue el más eficaz en el proceso de fitorremediación, consiguiendo reducciones del parámetro de la DQO en torno a un 60% partiendo de niveles próximos a los 2.000 ppm. Estas reducciones permiten obtener un residuo con estándares de contaminación por debajo de los límites establecidos por la ley 10/1993 de la Comunidad de Madrid.

Sólo el sistema de bioaumentado desarrollado con un consorcio bacteriano formado por cepas adaptadas a medios contaminados con taladrinas fue capaz de mejorar la fitorremediación.

Paralelamente, se realizaron estudios ultraestructurales, observándose una reducción del número de cloroplastos y una fuerte alteración morfológica de los mismos en las plantas que crecieron en agua de taladrina. En la zona radical no se observó una modificación de los haces vasculares, lo que podría permitir la translocación de productos tóxicos a la zona aérea.

El sistema de fitorremediación realizado en fases disminuyó el daño causado por el agua de taladrina en las plantas, lo que permitió realizar una segunda fase de fitorremediación mejorando el rendimiento del proceso. Se observó también que la reducción de la DQO ejercida por este sistema fue mayor que la obtenida por el sistema en continuo.

Finalmente, se buscó determinar si el sistema de fitorremediación era capaz de reducir la toxicidad del agua de taladrina. Para ello, se realizó un análisis de pérdida de bioluminiscencia con la cianobacteria sensor *Anabaena* CPB4337, que es muy sensible a la presencia de contaminantes. Se observó que la bioluminiscencia emitida por dicha cianobacteria crecida en las muestras fitorremediadas era 2 veces mayor a la emitida en las muestras iniciales, de manera que el sistema de fitorremediación no sólo es capaz de reducir la DQO sino que a su vez es capaz de disminuir la toxicidad del medio.

ABSTRACT

Industrial development involves emission of a high variety of pollutants (solids, liquids and gas) that results in environmental damage. Current regulations concerning liquid emissions, which are the objective of the present work, (Law 10/1993, from the Madrid Community, related to the liquid industrial emissions to the sewer system) are becoming more restrictive with chemical and biological parameters (COD, pH, conductivity, COB₅).

Physical-chemical methods are the most commonly used to reduce toxicity, but these methods are harmful to the environment. In the recent years biological methods, have been developed since they are more environmentally friendly. Among these, the bioremediation mechanism is found and it consists on the use of plants and/or microorganisms to reduce the pollution of an environment.

Metal-working fluids are an oil-water emulsion (2%) used to lubricate and refrigerate the contact between machines and pieces and is the residue used in this study. Upon use, this lubricant loses its qualities and becomes a residue (depleted metal-working fluid). John Deere Ibérica S. A. (JDISA), the company that supplies the residue, makes a physical-chemical treatment of the depleted lubricant in the vacudest system, in which the COD parameter is reduced from over 25.000 ppm to almost 4.000 ppm. The residue obtained after this treatment is known as metal-working fluid water.

The main objective of this work was the development of a biological system that is able to reduce the COD from the JDISA's water metal-working fluid.

Samples composition consist of mixtures of linear, branched, aromatics and polycyclic aromatic hydrocarbons (fluorenes and pyrenes) and other chemical elements of different nature. These samples have COD values (1.750 ppm) over the legal limits (Law 10/1993 Madrid Community).

The bioremediation system was developed in two steps. In the first one, the plant species with the best COD reducing capacity was identified. To this aim, some aquatic and terrestrial species were assayed to evaluate its resistance to the pollutant residue. Zea Mays (corn) was the species with the best resistance and the one capable to reduce the COD parameter under the legal limits and therefore, it was used for subsequent bioremediation assays. In addition, several physical supports were evaluated to provide a proper plant development; spartum was identified as a biodegradable and non toxic support that allowed an excellent plant rooting.

In the second step, specialized microorganisms were isolated from a hydrocarbon polluted environment, from the metal-working fluid, from the spartum and from a biological membrane bioreactor (M. B. R.). The isolated microorganisms were used to inoculate the corn-spartum bioremediating system. This system has been patented (P201000684).

The corn-esparto system reduced COD by 60%, the initial metal-working fluid water has a COD next to 2.000 ppm. The phytoremediated product has a COD under the limit

established by 10/1993 Madrid Community Regulations). When this system was inoculated with a consortium of microorganisms adapted to a metal-working fluid medium, phytoremediation was further improved.

Ultrastructural studies were developed on plants grown in the phytoremediation system. These plants showed a reduction in the chloroplast number and a marked morphological alteration. Vascular bundles in roots were not affected, therefore, translocation of the pollutants to the aerial part was not compromised.

The phytoremediating system was able to reduce the damage caused by the metal-working fluid water in the plants. Therefore a second bioremediation period was implemented right after, resulting in an improved performance of the system, with a more efficient COD reduction as compared by the continuous system.

Finally, toxicity of the water metalworking fluids was determined. To this objective, a bioluminescence analysis with the sensor cyanobacteria *Anabaena* CPB4337, that is really sensitive to pollutants was carried out. Bioluminescence emitted by this organism grown in the phytoremediated samples was two fold higher than that of the cyanobacteria grown up in the original samples, confirming that the phytoremediating system is able to reduce COD and medium toxicity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El agua

El agua es indispensable para que exista vida. Es el componente fundamental de nuestro planeta (71% de la superficie terrestre) y de la materia viva (por ejemplo, los fluidos corporales de muchos seres vivos se asemejan al agua del mar). El agua representa entre el 50 y el 90% de la masa de los seres vivos (aproximadamente el 75% del cuerpo humano es agua; en el caso de las algas, el porcentaje ronda el 90%). Además, es fuente de oxígeno, tanto en el proceso de fotodescomposición atmosférica como en el de fotosíntesis.

Se localiza principalmente en los océanos donde se concentra el 97 % del agua total, mientras que sólo el 3 % de su volumen es agua dulce. Los glaciares y casquetes polares poseen el 1,74 %, los depósitos subterráneos (acuíferos), los permafrost y los glaciares continentales suponen el 1,72 % y el restante 0,04 % se reparte en orden decreciente entre lagos, humedad del suelo, atmósfera, embalses, ríos y seres vivos (earth`s water distribution, 2007).

Esta distribución puede verse en la figura "earth`s water distribution" (<http://water.usgs.gov/edu/earthwherewater.html>).

El ciclo hidrológico

El agua se puede encontrar en los tres estados físicos (gas, líquido y sólido) y la cantidad total de agua permanece prácticamente en equilibrio gracias a los procesos del ciclo hidrológico (evaporación, transpiración, precipitación y escorrentía). Este ciclo permite el continuo intercambio de agua dentro de la hidrosfera, entre la atmósfera, el agua superficial y subterránea y los organismos vivos. El agua se mueve entre las distintas etapas del ciclo de agua, implicando básicamente los siguientes procesos físicos:

- Evaporación de los océanos y otras masas de agua y transpiración de los seres vivos (animales y plantas) hacia la atmósfera.
- Precipitación, originada por la condensación de vapor de agua, que puede adoptar múltiples formas.
- Escorrentía o movimiento de las aguas superficiales hacia los océanos.

La energía del sol calienta la tierra, generando corrientes de aire que hacen que el agua se evapore, ascienda y se condense en capas superiores de la atmósfera (más frías). Este agua evaporada proviene de los cuerpos acuáticos y de la transpiración de los seres vivos. Cuando alcanza una concentración suficiente, cae sobre la tierra en forma de lluvia. El ciclo se termina con el proceso de la escorrentía, por el cual el agua de los ríos vuelve al océano.

Pero este ciclo es modificado por diferentes actuaciones humanas: creación de embalses y canales, aprovechamiento de los recursos de las aguas subterráneas mediante pozos, vertidos, infiltraciones de agua salada por sobreexplotación de acuíferos subterráneos, etcétera. Estas actuaciones producen la contaminación de las aguas, la cual puede

extenderse de unas zonas a otras (de aguas superficiales a aguas subterráneas, de aguas fluviales a aguas marinas). Además, encontramos una relación entre los problemas de contaminación atmosférica de suelos con los de contaminación de las aguas, como ocurre por ejemplo en el caso de la lluvia ácida (Orozco *et al.*, 2002).

1.2. Usos del agua

El agua es un elemento esencial para mantener nuestras vidas. Algunas necesidades vitales de los seres humanos, como el abastecimiento de alimentos, dependen de ella. Los recursos energéticos y las actividades industriales que necesitamos también dependen del agua. El acceso al agua potable se ha incrementado durante las últimas décadas en la superficie terrestre (Lomborg, 2001; MDG Report, 2008). Sin embargo estudios de la FAO, estiman que uno de cada cinco países en vías de desarrollo tendrá problemas de escasez de agua antes del 2030; en esos países es vital un menor gasto de agua en la agricultura modernizando los sistemas de riego (FAO, 2009).

La población mundial ha pasado de 2.630 millones en 1950 a 6.671 millones en 2008. En este periodo (de 1950 a 2010) la población urbana ha pasado de 733 millones a 3.505 millones. La Asamblea General de Naciones Unidas, aprobó el 28 de julio de 2010, una resolución que reconoce al agua potable y al saneamiento básico como derecho humano esencial para el pleno disfrute de la vida y de todos los derechos humanos. La Asamblea de Naciones Unidas se mostró “profundamente preocupada porque aproximadamente 884 millones de personas carecen de acceso al agua potable y más de 2.600 millones de personas no tienen acceso al saneamiento básico, y alarmada porque cada año fallecen aproximadamente 1,5 millones de niños menores de 5 años y se pierden 443 millones de días lectivos a consecuencia de enfermedades relacionadas con el agua y el saneamiento”.

Se estima que aproximadamente el 70% del agua dulce es usada para agricultura (Baroni *et al.*, 2007), la industria absorbe una media del 20% del consumo mundial de agua, empleándose en tareas de refrigeración, transporte y como disolvente de una gran variedad de sustancias químicas. El consumo doméstico absorbe el 10% restante (FAO, 2009)

La industria precisa el agua para múltiples aplicaciones: para calentar, para enfriar, para producir vapor de agua o como disolvente, como materia prima o para limpiar. La mayor parte, después de su uso, se elimina devolviéndola nuevamente a la naturaleza. Estos vertidos a veces se tratan, pero otras el agua residual industrial vuelve al ciclo del agua sin tratarla adecuadamente. La calidad del agua de muchos ríos del mundo se está deteriorando y con ello se está afectando negativamente al medio ambiente acuático por los vertidos industriales de metales pesados, sustancias químicas o materia orgánica. También se puede producir una contaminación indirecta: residuos sólidos pueden llevar agua contaminada u otros líquidos, como el lixiviado, que se acaban filtrando al terreno y contaminando acuíferos si los residuos no se aíslan adecuadamente. Los mayores consumidores de agua para la industria en el año 2000 fueron: EE.UU. 220,7 km³; China 162 km³; Federación Rusa 48,7

km³; India 35,2 km³; Alemania 32 km³; Canadá 31,6 km³ y Francia 29,8 km³. En los países de habla hispana, España 6,6 km³; México 4,3 km³; Chile 3,2 km³ y Argentina 2,8 km³ (ONU, 2006).

1.3. Normativa legal aplicable

En el mundo actual se está incrementando la población humana y los problemas de contaminación, pero también se está aumentando la preocupación por la necesidad de una protección ambiental. Nuestra habilidad para controlar la contaminación causada por las actividades humanas es, en gran medida, crucial para el futuro desarrollo de la humanidad (Amann *et al.*, 1998).

La Constitución Española establece en su artículo 45 el derecho a disfrutar de un medio ambiente adecuado para el desarrollo de la persona, así como el deber de conservarlo, encomendando a los poderes públicos velar por la utilización racional de los recursos naturales y sancionar su incumplimiento.

En el medio ambiente el agua es un elemento fundamental. Su importancia ha justificado la adopción a nivel de toda Europa de la Directiva 2000/60/CE, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. Su primera consideración es que: "(1) El agua no es un bien comercial como los demás, sino un patrimonio que hay que proteger, defender y tratar como tal". En su artículo 2, número 33, se define la contaminación como: "la introducción directa o indirecta, como consecuencia de la actividad humana, de sustancias o calor en la atmósfera, el agua o el suelo, que puedan ser perjudiciales para la salud humana o para la calidad de los ecosistemas acuáticos o de los ecosistemas terrestres que dependen directamente de ecosistemas acuáticos, y que causen daños a los bienes materiales o deterioren o dificulten el disfrute y otros usos legítimos del medio ambiente." El proceso de descontaminación al que debe someterse un agua contaminada depende del origen de la misma (industrial o doméstica-urbana), pero también de la utilidad de ese agua, es decir, el tratamiento de un agua que se va a utilizar para riego de parques y jardines será menos estricto que el de un agua que se vaya a utilizar para consumo humano.

La directiva comentada en el párrafo anterior, ha sido transpuesta por el RD Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas, que junto a sus sucesivas modificaciones y desarrollos (entre otras, la Ley 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrados de la contaminación, IPPC; Ley 62/2003, de 30 de diciembre, de medidas fiscales, administrativas y del orden social; el RD 606/2003, de 23 de mayo, por el que se modifica de nuevo el Reglamento del Dominio Público Hidráulico; el RD 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas) son la base del ordenamiento jurídico en materia de los recursos hídricos.

Esta normativa tiene por objeto alcanzar el máximo nivel de protección de las aguas, en particular, “una mayor protección y mejora del medio acuático, entre otras formas mediante medidas específicas de reducción progresiva de los vertidos, las emisiones y las pérdidas de sustancias prioritarias, y mediante la interrupción o supresión gradual de los vertidos, las emisiones y las pérdidas de sustancias peligrosas prioritarias”, según dispone el artículo 1.c) de la citada Directiva 2000/60/CE.

El tratamiento de las aguas contaminadas es fundamental para preservar el medio ambiente. En España, para garantizar que todos los usuarios, públicos y privados, realicen eficazmente este tratamiento del agua se ha dictado una extensa y estricta normativa europea, estatal, autonómica y local. Específicamente, los vertidos y el tratamiento de las aguas contaminadas están regulados en las siguientes normas:

a) A nivel europeo, por la Directiva 91/271/CEE, de 21 de mayo, relativa al tratamiento de las aguas residuales urbanas, que señala la necesidad de que los vertidos de aguas residuales industriales que entren en los sistemas colectores e instalaciones de depuración de aguas residuales urbanas sean objeto de un tratamiento previo para garantizar, principalmente, que no tengan efectos nocivos sobre las personas y el medio ambiente y no deterioren las infraestructuras de saneamiento.

b) A nivel estatal, por el Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas, y por su desarrollo reglamentario mediante el Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo.

c) A nivel autonómico en la Comunidad Autónoma de Madrid, por la Ley Autonómica 10/1993, de 26 de octubre, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento, modificada por la Ley autonómica 5/2003, de 20 de marzo y el Decreto autonómico 57/2005, de 30 de junio, por el que se revisan los Anexos de la citada ley.

d) A nivel local en el municipio de Getafe, por la Ordenanza General de Protección del Medio Ambiente del municipio de Getafe de fecha 3 de junio de 2004, que regula la solicitud, obtención y renovación de la preceptiva autorización de vertidos que necesitan todos los establecimientos con actividad industrial o comercial que viertan sus aguas al sistema integral de saneamiento del municipio.

Actualmente se están mejorando los sistemas de tratamiento de agua y se están desarrollando nuevas técnicas como la biorremediación (en la que se ha centrado este trabajo), pero también se están mejorando los procesos de producción para reducir las sustancias contaminantes emitidas. Por ello, también la legislación aplicable anteriormente mencionada está en continua evolución reduciendo los límites máximos de contaminantes autorizados en los vertidos industriales en la medida en que se van logrando mejoras técnicas en este campo.

Toda la legislación citada en este punto se ha obtenido del Diario Oficial de la Unión Europea, Boletín Oficial del Estado y del Boletín Oficial de la Comunidad de Madrid. La normativa más importante se encuentra recogida en el anexo 1 de la presente memoria.

1.4. La contaminación del agua

La contaminación del agua se ha incrementado desde que comenzó la Revolución Industrial, debido a los vertidos producidos por la industria. Una parte importante de la contaminación del agua se debe al vertido de residuos agrícolas, domésticos e industriales, que tienen una gran variedad de compuestos biodegradables y no biodegradables.

Las condiciones de permanencia de los contaminantes en el agua dependen de:

a. La presión de vapor, es decir, de la tendencia a volatilizarse. Ésta aumenta con la temperatura, al incrementarse la energía cinética de las moléculas de la superficie aumenta la presión de vapor.

b. De las características físicoquímicas que definen su tendencia a permanecer en un medio u otro.

c. De su estabilidad. Está determinada por distintos procesos químicos como la hidrólisis y la oxidación, así como por la temperatura, pH y naturaleza de la sustancia absorbente.

1.5. Causas de contaminación

Muchos esfuerzos asociados con el progreso humano y el bienestar tienen como consecuencia el vertido de compuestos tóxicos y metales pesados en el entorno (Campos *et al.*, 2008).

- Actividad Industrial: Producida por los vertidos y las emisiones industriales, cuya composición varía dependiendo del tipo de industria.

La actividad industrial de industrias químicas, siderometalúrgicas, del petróleo, farmacéuticas, etcétera, produce materiales en suspensión (partículas), en disolución (ácidos, bases, sales) y contaminación física (calor, color). Para reducir esta contaminación es necesario un tratamiento del efluente en la fuente, porque así conseguimos reducir el líquido a procesar, una mayor facilidad de tratamiento, menos recorrido y menos daño del contaminante por el medio natural.

Las partículas emitidas a la atmósfera precipitarán con las lluvias contaminando las aguas superficiales y subterráneas. Actualmente se están promulgando legislaciones cada vez más estrictas en materia de emisiones de sustancias contaminantes.

La producción industrial de compuestos químicos así como su inapropiado uso, incorrecta eliminación y vertido accidental ha producido la contaminación de numerosas áreas (Mrozik y Piotrowska-Seget, 2010). En España existen provincias, entre ellas Madrid, con una contaminación acusada de su sistema hidrológico de la que en parte es responsable la actividad industrial.

Se pueden destacar numerosos accidentes industriales que han supuesto graves problemas de contaminación acuática con dañinas consecuencias para los seres vivos. Algunos ejemplos son: el vertido de Aznalcollar en 1998 debido a una rotura en la presa de contención de la balsa de decantación de la mina de pirita (FeS_2), fue un vertido de $4,5 \text{ Hm}^3$ de agua ácida y lodos con un alto contenido en metales pesados; o el vertido de 100.000 m^3 de cianhídrico y metales pesados en Baia Mare (noroeste de Rumanía) originado por una rotura en las conducciones de estos residuos en enero del 2000 (World Health Organization, 2004).

- Actividad agropecuaria: La agricultura y la ganadería son unas de las actividades humanas que mayor contaminación producen. El uso excesivo de fertilizantes contamina las aguas tanto por percolación como por escorrentía de las aguas pluviales y de regadío. Estos fertilizantes, formados principalmente por nitrógeno, fósforo y potasio, producen también eutrofización. Además, los purines originados en las explotaciones ganaderas suponen una fuente fundamental de contaminación de los acuíferos.

Otro problema son los efluentes líquidos producidos en gran cantidad, que son efluentes contaminados con pesticidas, que llegan a las aguas a través de las lluvias y el riego. Entre los pesticidas encontramos los plaguicidas, los cuales contienen además del ingrediente activo otras sustancias que facilitan su absorción, las cuales ejercen unos efectos adversos mayores que los ingredientes activos, como es el caso del tetracloruro de carbono y del cloroformo, que son compuestos tóxicos para el hígado y el sistema nervioso central respectivamente (Sanz, 1998).

En estas actividades se generan elevadas cantidades de purines, que debido a su composición producen diversos problemas de contaminación y toxicidad. Por ejemplo, genera problemas de metahemoglobinemia y, por su alto contenido en nitrógeno, genera problemas de contaminación de las aguas (Castrillón, 2000)

- Actividad derivada del desarrollo urbano: En los hogares se producen vertidos de productos orgánicos e inorgánicos. En las aguas residuales domésticas encontramos principalmente papel, jabón, orina, heces y detergentes. Estos contaminantes, aunque son tratados en las E.D.A.R. (Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales), llegan a los ríos porque los sistemas de tratamiento utilizados no tienen una eficiencia del 100%. Otra fuente de contaminación urbana son las emisiones producidas por los tubos de escape de los coches y por las chimeneas que, junto con las emisiones industriales, producen la lluvia ácida.

La forma en que cada contaminante se introduce en el medio es específica de dicho contaminante. Dependiendo de la estructura química del compuesto, éste puede ser biodegradable o recalcitrante, en función de si puede ser degradado por los seres vivos o no. Algunos contaminantes no biodegradables se acumulan en el interior de los seres vivos debido a su similitud con algunos elementos traza, produciendo daños en las estructuras vitales que pueden llegar a ser letales. Con algunos tóxicos se produce un proceso de biomagnificación, esto se produce cuando los compuestos tóxicos son almacenados en los

organismos primarios (en la base de la cadena trófica), la concentración del contaminante se va incrementando a medida que se asciende en la cadena trófica, de manera que cuando se alcanza el nivel trófico más alto se ha biomagnificado cientos de miles de veces, produciendo con más facilidad la enfermedad e incluso la muerte.

Por otra parte, es interesante conocer el efecto que tiene la mezcla de distintos tóxicos porque podemos encontrar efectos aditivos, sinérgicos (cuando la toxicidad es mayor que la suma de los efectos tóxicos por separado) o antagónicos (cuando la toxicidad se reduce con la mezcla). Los efectos de uno o varios tóxicos pueden ser inocuos, letales o subletales (no matan al individuo pero producen daños genéticos o fisiológicos).

1.6. Clasificación de la contaminación

Según el RD Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas, la contaminación es la acción o efecto de introducir materias o formas de energía, o inducir condiciones en el agua que de modo directo o indirecto, impliquen una alteración perjudicial de su calidad en relación con los usos posteriores o con su función ecológica.

1.6.1. Contaminación química

La presencia de sustancias en el agua modifica la claridad, el color y el sabor del agua. Esta contaminación altera los ecosistemas porque destruye los hábitats y las especies que en ellos viven, reduciendo la biodiversidad. Entre los contaminantes químicos tenemos:

1.6.1.1. Contaminantes orgánicos

Son compuestos formados por gran cantidad de enlaces carbono-carbono o de carbono con otros elementos (hidrógeno, oxígeno, azufre, etc.). Su comportamiento en el agua depende de su estructura molecular, tamaño y forma, por lo que es importante conocer la estructura de los compuestos orgánicos para predecir su destino en los seres vivos y en el medio ambiente.

Un ejemplo de la toxicidad producida por estos contaminantes la encontramos en la Bahía de Minamata (Japón), donde el metilo de mercurio originado por un vertido produjo procesos de biomagnificación y causó numerosas parálisis (Sastre, 2000). Este brote tóxico se extendió desde 1953 hasta 1963 y afectó a 121 personas (Irukayama, 1969).

Entre los contaminantes orgánicos encontramos:

► **Hidrocarburos:** Son cadenas más o menos largas formadas por enlaces carbono-hidrógeno. Son compuestos insolubles. En función de la longitud de su cadena encontramos compuestos gaseosos o líquidos (alcanos de enlace simple, alquenos de enlace doble y alquinos de triple enlace) y compuestos líquidos o sólidos (hidrocarburos aromáticos). Estos

últimos son compuestos muy recalcitrantes y por tanto persisten en la naturaleza ya que son muy resistentes al ataque biológico debido a que presentan estructuras químicas muy estables. Cuanto mayor número de sustituyentes tengan más difícil será su degradación.

► Bifenilos policlorados (PCBs): Son sustancias químicas de síntesis que pertenecen a la familia de los organoclorados. Están formados por 2 anillos de benceno unidos y 10 carbonos que pueden incorporar hasta 10 átomos de cloro. Son fluidos estables y no reactivos utilizados como fluidos hidráulicos, refrigerantes o como aislantes en transformadores y plastificadores en pinturas. Estos compuestos además de ser difíciles de degradar (la dificultad aumenta con el incremento del átomos de cloro) se acumulan en los seres vivos (son liposolubles) y se biomagnifican al pasar de unos seres vivos a otros. En muchos países están prohibidos.

Kuratsune *et al.* (1972) han descrito consecuencias de estos compuestos en los seres humanos, como es el caso de la enfermedad de Yuso debida al consumo de arroz contaminado con 2.000-3.000 ppm de PCBs y que produjo diversas enfermedades en unas 1.000 personas.

► Insecticidas organoclorados: Son compuestos aromáticos. Dentro de este grupo se encuentra el diclorofenil tricloroetano (DDT), el aldrín. Son compuestos persistentes y bioacumulables, por lo que están prohibidos en la mayoría de los países.

El DDT, debido a su persistencia y liposolubilidad, se concentra en los tejidos grasos de muchas especies vegetales y animales, produciendo la muerte y problemas reproductores de ciertas especies piscícolas y aviares, como el salmón de New Brunswick y el halcón peregrino (Carson, 1962).

► Detergentes: Están formados por una zona polar (soluble en agua) y otra apolar (insoluble en agua pero soluble en grasas), además tienen fosfatos, sustancias surfactantes y tensoactivos. El principal problema es que la mayoría de los detergentes no son biodegradables por lo que son persistentes. Además, estos compuestos tienen tensoactivos, que reducen el contenido de oxígeno disuelto en el agua dificultando así la vida de los organismos acuáticos, y los que tienen fosfatos producen la eutrofización de las aguas.

1.6.1.2. Contaminantes inorgánicos: metales

El mayor problema lo constituyen los metales pesados, que son aquellos que tienen una densidad mayor de 5. Estos elementos no son biodegradables. En pequeñas cantidades son necesarios para la salud de los organismos, porque algunos de ellos son componentes esenciales de las enzimas.

Los metales pueden unirse a compuestos orgánicos formando sustancias lipófilas que son muy tóxicas y que se almacenan en las reservas de grasa de los seres vivos y además pueden unirse a macromoléculas celulares en el cuerpo humano. Un ejemplo de estos contaminantes es el mercurio, que provoca desórdenes neurológicos. El mercurio inorgánico, procedente de plantas químicas, llega a ser metilado en los sedimentos y a bioacumularse en los mejillones (Sastre, 2000).

1.6.2. Contaminación física

Este tipo de contaminación supone una alteración de la temperatura, el color y las partículas en suspensión. Puede ser consecuencia de los vertidos de sustancias orgánicas e inorgánicas, así como de vertidos de agua procedentes de procesos de refrigeración.

1.6.3. Contaminación radiactiva

Es el caso de los isótopos radiactivos. Un 87% de la radiación que recibimos proviene de fuentes naturales, el resto proviene de actividades humanas. Cada isótopo radiactivo tiene una vida media y una forma de descomposición que determina su peligrosidad para los humanos.

1.6.4. Contaminación biológica

Se trata de la presencia en las aguas de bacterias, virus, hongos y algas. Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), la contaminación microbiológica es generalmente la más importante para la salud, como consecuencia de las enfermedades infecciosas producidas por los diferentes grupos bacterianos, que pueden causar epidemias.

1.7. Parámetros generales indicadores de contaminación acuática

Según Orozco (2002), los parámetros indicadores de la contaminación acuática se dividen en:

1.7.1. Parámetros de carácter físico

Dentro de estos parámetros se encuentran:

- Características organolépticas: Éstas a su vez se subdividen en:

- Color: Su origen puede ser de tipo interno (debido a los materiales disueltos, dispersos o suspendidos) o de tipo externo (absorción de las radiaciones de mayor longitud de onda).

- Olor y sabor: Las fuentes que los originan pueden ser naturales o artificiales. En general, los compuestos inorgánicos no producen olor, excepto el cloro, el sulfuro de hidrógeno... pero sí producen sabor. Los compuestos orgánicos y determinados organismos (algas, bacterias, hongos) producen malos olores y/o sabores.

- Turbidez y materias en suspensión: La turbidez es provocada por la materia insoluble, en suspensión o dispersión coloidal que produce una absorción de la luz combinada con un proceso de difusión. Una de las medidas que se utilizan para determinar la materia en suspensión es el residuo seco a 105 °C.

- Temperatura: La consecuencia fundamental de este parámetro es la disminución de la solubilidad con el aumento de la temperatura y la aceleración de los procesos de putrefacción. Esta contaminación se debe fundamentalmente al empleo de las aguas como medio de refrigeración de procesos industriales.

- Conductividad: Indica la resistencia que pone el agua al paso de la corriente eléctrica. Este parámetro está relacionado con la concentración de iones en disolución y su incremento supone un aumento de la salinidad y valores anómalos de pH.

1.7.2. Parámetros de carácter químico

- Salinidad: Representa el contenido iónico total del agua. El incremento de la salinidad supone problemas para el regadío y para la vida, originando aguas no aptas para beber.

- Dureza: Mide la presencia de los cationes alcalinotérreos mayoritarios (Ca^{2+} y Mg^{2+}) y también de otros metales menos abundantes como Fe^{2+} y Mn^{2+} . Un valor elevado de este parámetro puede causar problemas en procesos de lavado y en calderas de calor.

- pH: Indica el comportamiento ácido o básico de un agua y es una propiedad de vital importancia para el desarrollo de la vida acuática.

- Oxígeno disuelto: Es un indicador importante de la calidad del agua ya que es un elemento indispensable para la vida en el seno de la misma.

- Parámetros indicadores de materia orgánica:

- Demanda biológica de oxígeno (DBO₅): Es la cantidad de O₂ necesaria para biodegradar las materias orgánicas en un periodo de 5 días. Permite conocer la carga del agua en materias putrescibles y su poder autodepurador (Seoáñez *et al.*, 1998).

- Demanda química de oxígeno (DQO): Es la cantidad de O₂ necesaria para degradar toda la materia orgánica. Indica la cantidad de oxígeno que no estaría disponible para los organismos acuáticos porque es captado por sustancias químicas reductoras.

1.7.3. Parámetros de carácter radiactivo

Se determina (Dávila, 2001):

- La radiación α : radioisótopos con energías altas y gran poder de ionización, como los radioisótopos ²³⁸U, ²³⁴U, ²²⁶Ra, ²²²Rn, ²¹⁸Po, ²¹⁴Po, ²¹⁰Po, ²²⁸Th, ²²⁴Ra, ²²⁰Rn y ²¹⁶Po. La actividad α global es la actividad de todos los emisores α una vez que el radón ha sido eliminado.

- La radiación β : radioisótopos de energías bajas. Por ejemplo: ³H, ¹⁴C, ⁸⁷Rb, ²²⁸Ra, ²¹⁰Pb, ⁴⁰K y ⁹⁴Sr. La actividad β global es la actividad de todos los emisores β excluyendo el ³H y el ¹⁴C.

Esta radiación se mide en bequerelio/L (Bq/L).

1.7.4. Parámetros de carácter microbiológico

Se estudia la concentración de microorganismos causantes de enfermedades como: *Coliformes* totales, *Streptococcus* fecales, *Clostridium*s sulfito-reductores, etcétera.

1.8. Efecto de los contaminantes sobre los seres vivos

Estos efectos dependen del contaminante y del organismo, algunos de ellos son:

- **Genotoxicidad:** Son compuestos denominados genotoxinas que cuando se degradan producen compuestos de vida corta que son muy reactivos y causan daños en el ADN. Si estos daños no se reparan, se originan células mutantes que también pueden dividirse, extendiendo por lo tanto el daño. Si la alteración genética se produce en las células reproductoras, los descendientes no serán viables y si lo son tendrán graves problemas de salud. Entre las genotoxinas encontramos: Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) (Wei *et al.*, 2009), aflatoxinas (Santacroce *et al.*, 2008) y cloruro de vinilo (Fernández, 2005).

- **Carcinogenicidad:** Estimula la aparición y propagación del cáncer en los seres vivos, destruyendo las células sanas y perjudicando los sistemas inmunitarios. En función del tipo de contaminante encontramos:

- Inductores: Introducen propiedades cancerígenas en las células de un organismo.
- Promotores: Favorecen el crecimiento de células con propiedades cancerígenas.
- Progresores: Favorecen la división incontrolada y la propagación de dichas células.

Entre las sustancias carcinogénicas tenemos: arsénico (Schuhmacher-Wolz *et al.*, 2009), níquel (Thomas *et al.*, 2009) y otros contaminantes presentes en el medio ambiente (Zhang *et al.*, 2009).

- **Neurotoxicidad:** Es una consecuencia de las neurotoxinas, presentes por ejemplo en los insecticidas. Consiste en una alteración de la transmisión de los impulsos nerviosos en los nervios y a través de las sinapsis, produciendo temblores musculares, convulsiones, mareos, depresiones e incluso parálisis de los músculos que puede producir hasta la muerte si se trata de los músculos del diafragma. Entre los principales neurotóxicos tenemos los PCBs (Miller-Perez *et al.*, 2009), el benzo(a)pireno (Bouayed *et al.*, 2009), el metilo de mercurio (Liu *et al.*, 2009), el Pb o el Hg (Xing *et al.*, 2009).

- **Fallo reproductor:** Consecuencia de un daño producido por alteradores endocrinos, como pueden ser los estrógenos artificiales que imitan a los estrógenos naturales uniéndose a sus receptores, esto produce un fallo reproductivo por alteración del sistema reproductor o un bloqueo de los efectos de los estrógenos provocando una masculinización en el caso de las hembras. También podría producirse una feminización en el caso de los machos cuando el compuesto químico imita las hormonas femeninas. Es decir, estos contaminantes producen organismos hermafroditas. Esto se ha demostrado por ejemplo en el caracol púrpura (*Nucella lapillos*) con el tributil (Barreiro *et al.*, 2004). También los PCBs producen alteraciones endocrinas (Miller-Perez *et al.*, 2009). Los alteradores endocrinos también pueden producir infertilidad cuando el compuesto químico bloquea el receptor durante un largo periodo de tiempo.

- **Efectos comportamentales:** Los contaminantes pueden afectar algunos comportamientos de los seres vivos, como por ejemplo las estrategias para el aprendizaje, la búsqueda y los sistemas sensoriales, disminuyendo las probabilidades de supervivencia de los organismos, principalmente de los animales. Estos efectos son originados, por ejemplo, por exposición a metales (Bao *et al.*, 2009) o al benzo(a)pireno (Bouayed *et al.*, 2009)

1.9. Las taladrinas

Los procesos de fabricación generan grandes cantidades de residuos con una gran heterogeneidad química que deben ser tratados antes de abandonar la zona. Muchos de los actuales métodos de tratamiento (evaporación, relleno sanitario o incineración) son opciones no viables porque son procesos antieconómicos, ineficientes o ambientalmente inaceptables. Debido a estas limitaciones, se está incrementando el interés por el desarrollo de tratamientos biológicos para este tipo de residuos industriales, como las taladrinas (Van der Gast *et al.*, 2004).

Las taladrinas son compuestos químicamente complejos y específicamente formulados que contienen constituyentes para mejorar la lubricación y la refrigeración, y para evitar la corrosión de los metales y la degradación microbiana. Las taladrinas y los líquidos refrigerantes usados tradicionalmente en operaciones mecánicas están formados típicamente por etanolaminas, poliglicoles, parafinas cloradas o sulfonatadas, aceite mineral y otras moléculas parecidas. La composición exacta varía dependiendo del fabricante y de las especificaciones de uso. Estas mezclas hacen que las taladrinas sean compuestos potencialmente tóxicos para el medio ambiente (Van der Gast *et al.*, 2004).

Las taladrinas se comercializan como concentrados que posteriormente son diluidos *in situ* con agua (IHOBE, 1993). Estas sustancias forman una emulsión estable cuando la concentración orgánica está diluida con agua al 2-5% antes de su uso (Baker *et al.*, 1983). Además, la composición de las taladrinas presenta compuestos que inhiben la corrosión metálica y la actividad microbiana (biocidas) (Van der Gast *et al.*, 2002). Las taladrinas se caracterizan por ser un medio de una gran alcalinidad, con un rango de pH de entre 9 y 11 (Van der Gast *et al.*, 2003).

Las taladrinas, como todos los fluidos de mecanizado, se emplean básicamente en la transformación del metal y en menor medida en la del vidrio. Las funciones principales de los fluidos utilizados en la fabricación de piezas metálicas son (IHOBE, 1993):

- La lubricación, con objeto de prolongar la vida de las herramientas y reducir la energía de fricción.
- La refrigeración, con el fin de evitar un sobrecalentamiento de las piezas y herramientas.
- La evacuación de limaduras, indispensable para evitar el efecto abrasivo de las mismas y poder proseguir con la actividad en cuestión.

Se estima que el consumo anual excede los $2 * 10^9$ L y los residuos pueden superar en más de 10 veces el volumen de taladrina usada, porque ésta debe ser diluida antes de su uso. El rango de crecimiento anual de ventas de taladrina en Europa se estima en un 9-12%, con una generación anual de residuos de $22,4 * 10^9$ L/año (Bio-wise, 2000). Para la industria del Reino Unido, el coste de almacenamiento de estos residuos se estima en más de £16 millones por año (Cheng *et al.*, 2005).

El uso de las taladrinas causa altos niveles de contaminación y malos olores debido a la presencia de complejos químicos, biocidas, etcétera, por lo que su tratamiento y almacenamiento final debe realizarse cuidadosamente (Cheng *et al.*, 2005). Las taladrinas agotadas tienen cualidades irritantes y ecotóxicas debido a que contienen metales pesados, biocidas, gérmenes nocivos y productos de descomposición de carácter mal oliente y/o tóxico, nitrosaminas, compuestos de boro, etcétera (IHOBE, 1993).

El impacto ambiental de los fluidos de corte agotados se genera por la emisión a la atmósfera de partículas contaminantes por incineración y por los vertidos de aguas residuales

que contienen estos fluidos. En este último caso, los fluidos de corte o taladrinas son más problemáticos, ya que al dispersarse con facilidad en medio acuoso transmiten a este medio los contaminantes presentes en su composición (CAR/PL, 2005). En caso de vertido a cauce, las taladrinas agotadas pueden causar una importante mortandad en la fauna piscícola debido a los numerosos componentes tóxicos que contienen, tales como nitritos y fenoles. Las emulsiones aceitosas dificultan aún más el intercambio de oxígeno entre aire y atmósfera, contribuyendo a la desoxigenación de las aguas con los consiguientes efectos negativos (IHOBE, 1993).

Debido al endurecimiento de las leyes, los métodos tradicionales de almacenamiento no son económica ni ambientalmente viables (European Union, 2000 a; European Union, 2000 b), de manera que los tratamientos biológicos son la principal alternativa. Hasta el momento, la mayoría de la taladrina es incinerada, almacenándola en zonas con relleno sanitario o tratada como agua residual (Van der Gast *et al.*, 2004).

Convencionalmente, el tratamiento de estos residuos se ha realizado mediante la combinación de métodos físicoquímicos, como la ultrafiltración o la evaporación (Bio-wise, 2000), pero debido al endurecimiento de la legislación, estas rutas no son aceptables. Ahora, se está incrementando el uso de los tratamientos biológicos ya que parecen ofrecer una alternativa que permite ahorrar costes. El tratamiento biológico de las taladrinas por los microorganismos en los reactores biológicos ha sido investigado por Baker *et al.*, 1983; Kim *et al.*, 1994; Roberts *et al.*, 2000 y Taylor, 2001.

1.10. Biorremediación

Una variedad de tecnologías, está disponible para tratar suelos contaminados con materiales peligrosos. Incluye la excavación y la contención de rellenos sanitarios seguros, la extracción con vapor o solventes, la estabilización y la solidificación, el lavado del suelo, la extracción de solventes, la desorción térmica, la vitrificación y la incineración (US Environmental Protection Agency, 1988; Russel, 1992). Muchas de estas tecnologías son costosas o no suponen la destrucción total de la contaminación.

Sólo en los Estados Unidos la restauración de todos los sitios contaminados costará aproximadamente 1,7 trillones de dólares. Las técnicas convencionales no son suficientes (Dixon, 1996) y a su vez suponen nuevos problemas de contaminación. Por ejemplo, la incineración supone la contaminación del aire, los lixiviados de los vertederos, en forma de agua y gases, pueden alcanzar las aguas subterráneas y las de consumo; y la excavación de suelos genera emisiones tóxicas al aire (Kuiper *et al.*, 2004). Por eso, tratamientos biológicos (biorremediación) aparecen entre los más prometedores métodos para el tratamiento de un amplio rango de compuestos orgánicos, particularmente hidrocarburos.

La biorremediación se define como la acción de los microorganismos u otros sistemas biológicos para degradar contaminantes ambientales (Caplan, 1993; Watanabe, 2001; Dua *et*

al. 2002). Es un método más barato, más respetuoso con el entorno y menos laborioso que los procedimientos físicos o químicos. Adicionalmente, la ineficiencia, alto coste y complejidad de operación de los tratamientos fisicoquímicos existentes parece estimular la aplicación de la biorremediación (Silva *et al.*, 2010). Esta tecnología está aprobada y recomendada por varias agencias reguladoras en todo el mundo como por ejemplo la EPA (United States Environmental Protection Agency).

La biorremediación ha sido generalmente utilizada en las refinerías de petróleo como una práctica internacional y ha mostrado resultados prometedores para los tratamientos de agua residual y el establecimiento de agua reutilizada en estas industrias (Mariano, 2001). El empleo de esta técnica se ha incrementado en las últimas décadas, tratando lugares contaminados con PAHs con cierto éxito, como la biorremediación del petróleo vertido por el Exxon Valdez (Pritchard *et al.* 1992).

La biorremediación tiene una serie de ventajas (Sánchez y Rodríguez, 2003):

- Amplio ámbito de aplicabilidad en cuanto a compuestos orgánicos.
- En la biorremediación se transfiere poca contaminación de un medio a otro, mientras que los tratamientos físicos y buena parte de los químicos están basados en transferir la contaminación entre medios gaseoso, líquido y sólido.
- Es una tecnología poco intrusiva en el medio y generalmente no requiere componentes estructurales o mecánicos dignos de destacar.
- Comparativamente, es económica y, al tratarse de un proceso natural, suele tener aceptación por parte de la opinión pública.

Pero también tiene una serie de inconvenientes:

- La biodegradación incompleta puede generar intermediarios metabólicos inaceptables, con un poder contaminante similar o incluso superior al producto de partida.
- Algunos compuestos son resistentes o inhiben la biorremediación.
- El tiempo requerido para un tratamiento adecuado puede ser difícil de predecir y el seguimiento y control de la velocidad y/o extensión del proceso es laborioso.

1.10.1. Factores que condicionan la biorremediación

Según Vidali (2001) el control y la optimización de los procesos de biorremediación está condicionado por varios factores que incluyen la existencia de una población microbiana capaz de degradar los contaminantes, la disponibilidad del contaminante para la población microbiana y factores ambientales (tipo de suelo, temperatura, pH, presencia de oxígeno u otros aceptores de electrones y nutrientes). Otros factores que condicionan estos procesos son el tiempo y los costes.

a. Tiempo: En general el uso de microorganismos seleccionados acelera los procesos de biorremediación, pasando de meses a semanas.

b. Costes: Los procedimientos biológicos se emplean en un número reducido de casos (15-20%) de los totales en recuperación pero son métodos más baratos ya que se ahorra en mano de obra, tiempo y en el procesamiento posterior de desechos e instalaciones.

c. Condiciones ambientales y bióticas: Determinan la técnica más apropiada para utilizar. Entre otros condicionantes, se debe analizar: la distribución de las aguas subterráneas, la permeabilidad del terreno, el potencial redox (disponibilidad de oxígeno), la temperatura, el pH, un estudio microbiológico y la disponibilidad de nutrientes (C: N: P) para el metabolismo celular.

d. Tipo y concentración del contaminante: Para determinar la técnica más adecuada para la descontaminación del suelo se debe atender a la naturaleza de los contaminantes, estructura del suelo e hidrogeología (movimiento de los contaminantes a través del suelo y en el agua subterránea) y al estado nutritivo y la composición microbiana del lugar (Blackburn y Hafker, 1993; Long, 1993; Dua *et al.*, 2002).

- **Compuestos orgánicos**: En general poseen una alta hidrofobicidad y su biodegradación depende de la capacidad de los microorganismos para absorberlos desde una fase acuosa.

Estos compuestos, como PCBs, PAHs, compuestos nitroaromáticos o hidrocarburos lineales halogenados pueden ser mineralizados completamente mediante el proceso de fitorremediación, utilizando álamos, sauces, alfalfa y diferentes variedades de césped (Kuiper *et al.*, 2004)

Dentro de los compuestos orgánicos, los compuestos alifáticos de cadena lineal (parafínicos) se degradan fácilmente, generalmente en procesos aeróbicos, mediante la oxidación de los grupos metilos y entran en la ruta de la degradación de ácidos grasos. Sin embargo, cuando se incluyen como sustituyentes alcanos de cadena larga, se forman estructuras ramificadas estéricamente inaccesibles para la degradación. De la misma forma, los compuestos alifáticos insaturados se degradan más lentamente que los saturados.

Con respecto a los compuestos aromáticos simples se degradan por diferentes aperturas del anillo. Los hidrocarburos aromáticos de un solo anillo son aeróbicamente degradados por numerosos microorganismos. Las tasas de degradación de cicloalcanos son algo variables, pero tienden a ser más lentas que la de alcanos y generalmente suponen la combinación de varias especies microbianas (Perry, 1981).

Cuando poseen dos o tres anillos (PAHs) como el naftaleno o el antraceno son degradados más lentamente en presencia de oxígeno. Se sabe también que algunos microorganismos son capaces de degradar un amplio rango de compuestos aromáticos (Cerniglia, 1984; Gibson y Subramanian, 1984; Weissenfels *et al.*, 1990). La degradación de PAHs por los microorganismos depende, entre otros factores, de sus pesos moleculares

(Weissenfels *et al.*, 1990; Balba, 1993). Los tetra y pentacíclicos como el benzo[a]pireno son considerados como recalcitrantes. La incorporación de halógenos disminuye la degradabilidad por estabilización del anillo.

Finalmente los compuestos orgánicos nitrogenados y azufrados se degradan lentamente, mientras que las fibras sintéticas son los compuestos más recalcitrantes. Es sabido que los compuestos aromáticos altamente condensados y estructuras cicloparafínicas, alquitrán, betún y materiales asfálticos, tienen los mayores puntos de ebullición y presentan una gran resistencia a la biodegradación (Blakebrough, 1978; Atlas, 1981).

Los asfaltos son los hidrocarburos de petróleo terrestres que parece que presentan una mayor resistencia a la degradación microbiana (Bossert y Bartha, 1984). Se ha propuesto que este tipo de materiales tienen una degradación similar, y pueden ser incluso considerados como, el material húmico (Jobson *et al.*, 1972).

Para incrementar la biodisponibilidad de los compuestos orgánicos y así conseguir una biorremediación más efectiva, los microorganismos utilizan 2 técnicas:

- Biosurfactantes: Son moléculas con una parte hidrofílica y otra hidrofóbica que forman micelas y mejoran la desorción de los xenobióticos cuando se encuentran en una matriz que los retiene (por ejemplo, el suelo) y su posterior absorción. La biodisponibilidad del compuesto mejora cuando los microorganismos son capaces de producir estas sustancias (Kuiper *et al.*, 2004).

Existen microorganismos que pueden producir emulsiones con lo que consiguen:

- * Aumentar la superficie de contacto con el hidrocarburo.
- * Aumentar la biodisponibilidad del compuesto hidrofóbico, consiguiendo de esta manera que los compuestos adsorbidos a los sustratos estén biodisponibles.

Los biosurfactantes pueden ser de origen químico o bacteriano. Atendiendo a su peso molecular se dividen en:

- * Surfactantes de bajo peso molecular: Suelen ser glicolípidos como el rhamnolípido producido por una *Pseudomonas*. Reducen las tensiones entre fases (agua-roca)
- * Surfactantes de alto peso molecular: Suelen ser polisacáridos, proteínas, lipoproteínas, lipopolisacáridos o mezcla de estos compuestos. Se ha demostrado que son eficaces a bajas concentraciones y que tienen una afinidad considerable por el sustrato.

Los biosurfactantes bacterianos tienen muchas ventajas respecto a los emulsionantes químicos:

- * Son selectivos.
- * Tienen mayor eficiencia para aumentar la biodisponibilidad de compuestos hidrofóbicos.
- * Son menos estables, por lo tanto más ecológicos.

* Además, se ha visto que los biosurfactantes químicos pueden tener un efecto positivo o negativo en la biorremediación dependiendo del sustrato y del tipo de microorganismo.

Véase la figura modificada de Volkering *et al.* (1998).

- Quimiotaxis: Es la movilidad dirigida hacia un posible sustrato o en contra de un compuesto con efecto negativo para los microorganismos (Barrionuevo *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que la mayoría de los genes implicados en este proceso están relacionados con los de las vías catabólicas de los microorganismos. Esta estrategia permitiría a las cepas entrar en contacto con el contaminante a degradar, reduciendo así los problemas de biodisponibilidad. No se ha observado esta estrategia en condiciones anaerobias.

- **Compuestos inorgánicos: metales y sales:** Muchos de estos elementos están presentes de forma natural en la tierra, a varios niveles de concentración, y muchos de ellos son esenciales para las células (cobre, hierro, manganeso, níquel, zinc), pero en altas concentraciones son tóxicos. Un metal (o metaloide) puede considerarse un contaminante si se encuentra en el sitio indeseado o en una forma o concentración que causa un daño al ambiente o al ser humano (McIntyre, 2003). La concentración típica de los metales en el suelo abarca desde menos de 1 mg/Kg hasta más de 100.000 mg/Kg.

Estos contaminantes no pueden ser biodegradados. Sin embargo, los microorganismos pueden interactuar con ellos transformándolos, por ejemplo modificando el estado de oxidación. Esto influye de forma drástica en la movilidad del contaminante, ya que en algunos casos aumenta su solubilidad, favoreciendo así su eliminación del medio, y en otros casos disminuye, produciéndose una inmovilización del contaminante. También influyen la concentración salina, el tipo de respiración aerobia o anaerobia de los microorganismos presentes y la disminución del pH.

En el caso de las plantas, éstas pueden extraer los metales pesados del suelo, gracias a unos mecanismos constitutivos y adaptativos que les permiten tolerar y acumular altas concentraciones de estos elementos en sus rizosferas. La hiperacumulación de los metales por las plantas superiores es un fenómeno complejo que supone una serie de etapas, como el transporte de los metales a través de la membrana plasmática de las células radicales, el transporte vía xilema y la translocación de estos elementos, y la detoxificación y almacenamiento en toda la planta y a nivel celular (Lombi *et al.*, 2002). Las primeras plantas clasificadas como hiperacumuladoras pertenecen a la familia de las *Brassicaceae* y de las *Fabaceae*. Más de 400 especies han sido descritas como hiperacumuladoras de metales (Baker *et al.*, 2000; McIntyre, 2003) y se ha visto que un número considerable de especies son capaces de acumular dos o más elementos (He *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002a; McIntyre, 2003; Yang *et al.*, 2004). La mayoría de las especies descritas son capaces de acumular Ni, pero algunas pueden acumular también Co, Cu, Zn e incluso unas pocas pueden acumular Mn y Cd.

Los mecanismos de la hiperacumulación de los metales en plantas no están claramente entendidos. Se puede decir que la habilidad de acumulación para un metal dado está determinada por la capacidad de extraerlo y transportarlo al interior de las células.

La mayoría de los procesos que determinan la acumulación de los metales en las plantas pueden verse en Yang y Roemheld, 1999; Clemens *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002b; Yang *et al.*, 2005.

1.10.2. Estrategias de biorremediación

1.10.2.1. Mineralización

Los procesos biológicos que involucran enzimas como catalizadores, pueden modificar moléculas orgánicas produciendo cambios en su estructura así como en sus propiedades toxicológicas incluso, dar como resultado la completa conversión de dichos compuestos en productos inorgánicos como agua, CO₂ o formas inorgánicas de N, P y S; además de componentes celulares y productos de las rutas metabólicas (Alexander 1994; Eweis *et al.*, 1998). El microorganismo, por lo tanto, puede degradar el compuesto orgánico contaminante y convirtiéndolo en sustancias inorgánicas. Utiliza el contaminante como fuente de energía (y/o C, N, P, S), lo que supone la división del microorganismo, de manera que a medida que disminuye la concentración del contaminante se produce un incremento de la biomasa bacteriana.

En los procesos de biorremediación se debe prestar especial atención a la concentración del contaminante por diversos motivos:

- a) Las bacterias sólo toleran unas concentraciones de contaminante máximas.
- b) Si la concentración es muy baja no puede ser absorbida por los microorganismos.
- c) La cantidad de contaminante debe ser superior a la concentración a la cual la velocidad de degradación es la mitad de la velocidad máxima (K_m).

Como es lógico, no todas las bacterias capaces de utilizar el contaminante como fuente de energía son capaces de tolerar la misma concentración de contaminante. Por ello, se deben realizar ensayos de laboratorio para conocer la concentración máxima de contaminante que la bacteria es capaz de tolerar.

Aunque la concentración del contaminante sea inferior al máximo que la bacteria puede soportar, la biorremediación está condicionada por la cantidad de contaminante presente en el medio. Para que esta se produzca, la concentración del contaminante debe ser superior al valor de la constante K_m.

La mineralización tiene una serie de limitaciones:

a) La aclimatación: es el tiempo durante el cual no se observa degradación del contaminante. Cuanto más tiempo pasa desde que se produce la contaminación, más difícil es eliminar el contaminante porque éste envejece y disminuye su biodisponibilidad.

La causa de aclimatación es que las bacterias utilizan aquellas sustancias con las que obtienen una mayor cantidad de energía. Además del contaminante, en el medio encontramos diversas sustancias que las bacterias podrán utilizar como fuente de energía, por lo que antes de utilizar el contaminante (que generalmente aporta menos energía) agotarán las sustancias más energéticas. Por ejemplo, si en el medio tuviésemos glucosa y maltosa, las bacterias utilizarían en primer lugar la glucosa ya que es la sustancia más energética, y cuando se termine esta sustancia comenzarían a degradar la maltosa.

b) No se produce la descontaminación total del medio porque al degradar el contaminante disminuye su concentración y llegará un momento en que la bacteria no será capaz de obtenerlo del medio (éste tendría una concentración menor a K_m).

También puede ocurrir que con los métodos de medición existentes no observemos la degradación del contaminante pero que sí se esté produciendo. Esto puede deberse:

- La población microbiana capaz de degradar los contaminantes suele ser pequeña.
- Si la población degradadora es pequeña y la cantidad de contaminante es muy grande no se observará degradación.

1.10.2.2. Cometabolismo

Es la oxidación de sustancias que no permiten el crecimiento durante el crecimiento de un organismo en otra fuente de carbono o energía (Kuiper *et al.*, 2004). Las bacterias degradan un contaminante pero no obtienen beneficio de su degradación e incluso en algunos casos pueden salir perjudicadas porque los productos secundarios formados son más tóxicos.

Este proceso tiene su origen en la baja especificidad de sustrato de muchas enzimas bacterianas. Puede ocurrir que la sustancia contaminante tenga una conformación muy similar a otra sustancia para la cual la bacteria dispone de una ruta de degradación específica, de manera que ambas puedan ser transformadas por una misma enzima. Lo que suele ocurrir es que la siguiente enzima de la ruta de degradación de la sustancia A tiene una mayor especificidad, de manera que la sustancia B` procedente de la degradación del contaminante por la enzima A se acumula en el medio. Esta sustancia B` generalmente es más tóxica que la sustancia contaminante inicial.

Otra causa de cometabolismo es el uso de la sustancia como aceptora de electrones, de manera que el compuesto contaminante se puede oxidar transformándose en otro compuesto distinto.

Para PAHs con más de 3 anillos unidos, el cometabolismo generalmente es la principal ruta de degradación. Cuando estos contaminantes tienen dos o tres anillos funcionan como

fuelle de carbono durante el cometabolismo de PAHs con mayor número de anillos (Schwab *et al.*, 1995).

1.10.3. Técnicas de biorremediación

1.10.3.1. Técnicas *Ex situ* o tratamientos por encima del suelo

El material contaminado puede ser trasladado a una planta donde se descontamina en biorreactores. Incluyen land farming / biorremediación en fase sólida, compostaje, lavado biológico del suelo y biorreactores con lecho activo. Los dos primeros son los más comunmente usados (Balba *et al.*, 1998).

Puede realizarse mediante procesos en fase sólida, con un contenido mínimo de agua donde el tratamiento tiene lugar en fosas excavadas o en contenedores con la atmósfera controlada; o también puede realizarse en biorreactores, donde la biodegradación ocurre en agua o en procesos en fase de lodo dentro de contenedores especiales. Este último se utiliza mucho en la recuperación de aguas residuales, donde el tipo de biorreactor depende del contaminante mayoritario, así cuando el tratamiento se realiza con aguas contaminadas con productos tóxicos y peligrosos provenientes de acuíferos o industrias se pueden aplicar tratamientos secundarios aerobios (biorreactores de lecho fijo, fluidizado, a chorro, etc), pero si son difícilmente biodegradables se han diseñado otros tratamientos específicos (Levin y Gealt, 1997).

Esta técnica tiene bastantes inconvenientes, como son la alteración de la matriz natural del medio (esto es más grave en el suelo porque supone la alteración del mismo) y el riesgo de contaminación durante el traslado.

1.10.3.2. Técnicas *In situ*

Se realiza la descontaminación en el lugar donde está el contaminante y se utiliza para la biorremediación del subsuelo y del agua subterránea (Balba *et al.*, 1998). Por ejemplo se utilizó en los procesos de biorremediación del vertido del Prestige (Fernández-Álvarez *et al.*, 2006).

La biorremediación *in situ* tiene varias ventajas ya que se evitan los riesgos de contaminación producidos en el transporte, no se perturba el medio y la degradación bacteriana del contaminante produce, por lo general, la mineralización del mismo. Pero también tiene varios inconvenientes como son la inoculación del microorganismo que supone costes energéticos y de mano de obra. Además, si los organismos introducidos en el medio están modificados genéticamente supone la alteración del mismo porque se están introduciendo elementos exógenos. Otra desventaja es que no es posible mejorar las condiciones de pH, temperatura y O₂.

Entre las técnicas in situ se encuentra el bioventing, que consiste en la aplicación de aire para extraer volátiles orgánicos y estimular su biodegradación por los microorganismos aerobios. También, la atenuación natural, el bioaumentación, la fitorremediación o la rizorremediación.

1.11. Técnicas de biorremediación ex situ: Reactores biológicos

El tratamiento biológico es un aspecto importante de los procesos de tratamiento y reutilización de aguas residuales industriales y urbanas (Metcalf y Eddy, 1991), que juega un papel cada vez mayor en el tratamiento del agua potable (Rittmann y Snoeyink, 1984).

La eficacia de los procesos biológicos depende de dos factores principales: la concentración de biomasa en el reactor y la relación de transformación específica de los microorganismos (Manem y Sanderson, 1998).

Las técnicas biológicas de tratamiento de aguas residuales son muy antiguas y se vienen usando desde hace aproximadamente 100 años. De todos los procesos que se han desarrollado para el tratamiento de aguas residuales el sistema convencional de fangos activados ha sido el más extendido.

Los biorreactores de membrana y el fango activo convencional son procesos ampliamente utilizados en el tratamiento biológico del agua residual de procesos petroquímicos (Shokrollahzadeh *et al.*, 2008; Viero *et al.*, 2008).

1.11.1 Reactores biológicos de membrana (R. B. M.)

Los parámetros de los efluentes son cada vez más rigurosos, sin embargo los costes y el proceso de membrana continúa disminuyendo, por eso las aplicaciones de los R. B. M. en las aguas residuales urbanas e industriales se están incrementando ampliamente en todo el mundo (Judd, 2007). El proceso del R. B. M. constantemente proporciona un mejor tratamiento en términos de calidad del agua tratada y de carbono y nutrientes retirados de las aguas residuales, probablemente debido a una gran concentración de biomasa y un rechazo de la membrana a los sólidos suspendidos y a los compuestos orgánicos (Wan *et al.*, 2010).

El R. B. M. es uno de los procesos de tratamiento de agua de nueva generación. Consiste en un sistema de fango activo con crecimiento suspendido que utiliza membranas con microporos para la separación sólido / líquido encaminada a la clarificación del agua resultante. Este sistema presenta una alta edad de fango que permite que la bacteria se adapte a los compuestos contaminantes y presenta una baja tasa comida / microorganismo que se espera que fuerce a la bacteria a mineralizar los compuestos orgánicos poco degradables (Juretschko *et al.*, 2002; Wever *et al.*, 2007), resultando un efluente de agua con una calidad superior a la obtenida en los tratamientos convencionales.

Los biorreactores de membrana se pueden definir como la combinación de dos procesos básicos (degradación biológica y separación por membrana) en un proceso único en el que los sólidos en suspensión y microorganismos responsables de la biodegradación son separados del agua tratada, mediante una unidad de filtración por membrana. La totalidad de biomasa está confinada dentro del sistema (Manem y Sanderson, 1998).

Los R. B. M. combinan eficientemente los tratamientos biológicos con la separación de la membrana y están ampliamente aceptados como avanzadas tecnologías para obtener un efluente de alta calidad (Wan *et al.*, 2010). Trabajan típicamente a amplias concentraciones de fango y una baja relación comida-microorganismo (F/M). Como la energía suministrada es limitada, los microorganismos prefieren usar los recursos del carbono para satisfacer sus necesidades energéticas, dejando de lado el crecimiento de la biomasa (Muller *et al.*, 1995; Low y Chase, 1999).

La membrana deberá ser no biodegradable por los microorganismos presentes en la solución, fácil de limpiar y de regenerar en caso de incrustación. Este último criterio es importante ya que un fallo biológico o modificación repentina del efluente (como caso de aguas residuales industriales) podría resultar en una seria incrustación o ensuciamiento de la membrana (Manem y Sanderson, 1998). Membranas altamente porosas con poros distribuidos uniformemente mejoran el rendimiento de filtración (Fane *et al.*, 1989). Es preferible que la membrana sea hidrófila (Fane *et al.*, 1989) y esté cargada negativamente, o neutra con el fin de limitar la absorción de biomasa (Shimizu *et al.*, 1989).

Ventajas de los R. B. M. (Wan *et al.*, 2010):

- Alta capacidad de biodegradación.
- Alta eficiencia.
- Excelente calidad de permeado: Los porcentajes típicos de eliminación de DQO, DBO y de sólidos en suspensión (SS) superan en muchos casos los 95, 98 y 99 por ciento, respectivamente (Manem y Sanderson, 1998).
- Baja producción de fango.
- Largo tiempo de retención de fango: Las membranas utilizadas en el R. B. M. funcionan bajo mayores concentraciones de biomasa (Manem y Sanderson, 1998).
- Bajo tiempo de retención hidráulica

Pero también existen una serie de inconvenientes:

- A priori las principales limitaciones de la tecnología son de carácter económico ya que requieren una inversión inicial importante porque las unidades de membrana son bastante caras. La polarización y otros problemas de ensuciamiento de las membranas también limitan su uso. En 1992, el precio medio de la membrana era de unos 400 \$/m², mientras que en 2000 ya había bajado a los 100 \$/m².

- El tratamiento de los lodos generados ya que pueden presentar problemas de sedimentabilidad dado que la mayoría de los sólidos en suspensión son retenidos en el biorreactor.

- La posible acumulación en el biorreactor de compuestos inorgánicos no filtrables como metales pesados que a determinadas concentraciones pueden ser dañinos para la población bacteriana o afectar a la integridad de la membrana.

- El consumo energético realizado por el bombeo de la alimentación, la recirculación de la biomasa (en las configuraciones externas), la succión del permeado y la aireación.

La gran concentración de sólidos en suspensión y biomasa en el reactor incrementan la viscosidad del medio. Este hecho se traduce en una reducción de la transferencia de oxígeno al medio, que unido a la falta de agitadores y a su baja solubilidad, provocan un aumento de los costes de aireación.

En Huisjes *et al.*, 2009 puede verse el aumento que ha tenido en Europa la implantación de los R. B. M.. Se demuestra así que esta tecnología aún se encuentra en fase de implantación con un crecimiento potencial muy importante que se está consolidando también en actuaciones a gran escala.

Desglosando el número de instalaciones presentes en Europa en función del país la publicación de De Wever *et al.*, 2009 muestra que España es uno de los países donde más se ha implantado esta tecnología, pasando de 47 plantas en 2006 a 111 en 2008, situándose como el cuarto país con más instalaciones de la Unión Europea.

El limitado número de aplicaciones de los R. B. M. en todo el mundo es debido, en gran medida, al elevado coste de los equipos de filtración desarrollados a lo largo de los últimos veinte años, que se basan principalmente en el diseño de membranas de forro pelicular interior. Con esta tecnología, los procesos de R. B. M. son competitivos con tratamientos convencionales, siempre que se cumpla al menos una de las siguientes condiciones:

1) Efluente de alta concentración (algunas aguas residuales industriales, fangos, etcétera, en donde el sistema de R. B. M. puede aprovechar la alta concentración de biomasa y, por tanto, el depósito biológico de menor tamaño compensa el coste de filtración.

2) Requisitos de desinfección rigurosa para el agua tratada (el mercado exige la reutilización o potabilización de agua).

3) Biomasa compuesta de microorganismos de crecimiento muy lento (degradación xenobiótica, reparación de aguas de suelo o subterráneas).

Actualmente, la mayoría de las instalaciones de R. B. M. están destinadas al reciclado de agua en edificios, aunque las aplicaciones al tratamiento de lixiviados de vertederos y aguas residuales industriales se están haciendo cada vez más importantes (Manem y Sanderson, 1998).

1.11.2. Tipos de Reactores Biológicos de Membrana

Existen dos tipos principales de biorreactores de membrana en base a su configuración:

1.11.2.1. Biorreactores con membrana integrada o sumergida

La unidad de membrana que realiza la separación física está inmersa en el tanque biológico. La fuerza impulsora a través de la membrana es alcanzada presurizando el bioreactor o creando presión negativa en el lado permeado de la membrana.

La limpieza de la membrana se realiza a través de frecuentes retrolavados con agua permeada y aire; ocasionalmente mediante retrolavados con soluciones químicas. Generalmente se coloca un difusor de aire debajo del módulo de la membrana que suministra el oxígeno necesario para homogeneizar el contenido del tanque, lo que permite el proceso biológico y la propia limpieza de la membrana.

1.11.2.2. Membranas externas o con recirculación al biorreactor

Esta configuración de R. B. M. implica que el líquido de mezcla sea recirculado desde el biorreactor hasta la unidad de membrana que se dispone externamente a la unidad biológica. La fuerza impulsora es la presión creada por la alta velocidad del flujo a través de la superficie de la membrana.

Las imágenes explicativas de estos tipos de reactores pueden verse en la web <https://www.egevasa.es/portal/web/Tecnologia/Tecnologia/TratamientoAguaResidual/TratamientoMBR.html>).

Ambas configuraciones se comparan en la tabla 1 de la web <http://www.madrimasd.org/blogs/remtavares/2007/04/12/63351>

1.12. Técnicas de biorremediación *in situ*

Puede realizarse mediante una biodegradación, que es una transformación de las sustancia contaminante en otra que no lo sea (esto no puede ser utilizado para degradar metales pesados); o mediante una bioacumulación, a través de plantas o microorganismos capaces de acumular la sustancia contaminante.

Estas estrategias pueden desarrollarse mediante diversas formas (atenuación natural, bioaumentación, fitorremediación y rizorremediación).

1.12.1. Atenuación natural

Es el proceso más simple de biorremediación por el que las poblaciones microbianas autóctonas degradan xenobióticos. Los microorganismos existentes en ese medio, ante la presencia de un compuesto exógeno, se adaptarán a la nueva situación. Las bacterias capaces de usar los sustratos contaminantes como fuente de nutrientes serán capaces de proliferar y se pueden convertir en dominantes (Liu y Suflita, 1993). La adaptación de los microorganismos autóctonos puede llevar mucho tiempo dependiendo de la naturaleza del xenobiótico introducido (Leahy y Colwell, 1990). Además los microorganismos con los genes catabólicos necesarios para degradar todos los xenobióticos pueden no estar disponibles en el lugar, acumulándose compuestos tóxicos y recalcitrantes en el ambiente.

La Agencia de Protección Ambiental (EPA, Estados Unidos) define la atenuación natural o remediación intrínseca como una combinación de degradación, dispersión, dilución, sorción, volatilización y estabilización química y bioquímica de los contaminantes.

En condiciones ideales, los contaminantes se transformarían en compuestos químicos más simples, no peligrosos para los posibles receptores ni para el medio. Además de la propia recalcitrancia intrínseca de la molécula, hay bastantes factores que pueden limitar o impedir la atenuación natural en un medio contaminado (King *et al.*, 1997):

- Carencia de nutrientes esenciales para los microorganismos (por ejemplo, nitrógeno y/o fósforo).
- Ausencia de aceptores adecuados de electrones (generalmente oxígeno).
- Inexistencia de condiciones medioambientales apropiadas (pH, potencial redox, humedad, temperatura).
- Ausencia de poblaciones microbianas con el potencial enzimático adecuado necesario para degradar los contaminantes.
- Presencia de componentes tóxicos en la mezcla contaminante.

April y Sims (1990) demostraron que la biodegradación de varios contaminantes se intensificó debido al crecimiento de pastos en los suelos contaminados con hidrocarburos.

Este tipo de Biorremediación se aplica fundamentalmente a zonas donde el tiempo no es un factor limitante (porque este proceso puede ser mucho más largo, incluso de décadas) o a sitios donde no se pueden aplicar otras técnicas de restauración. Sin embargo, no puede aplicarse en lugares cercanos a áreas domésticas o a sitios con alto valor ambiental. Tampoco puede utilizarse en zonas contaminadas con metales pesados porque estos no se degradan (sólo pueden ser inmovilizados o volatilizados). La atenuación natural ya ha sido exitosa para benceno, tolueno, etileno y xileno (BTEX), que son compuestos presentes en el agua subterránea (Barton, 2000; Grossl, 2000; Spadaro, 2000).

1.12.2. Bioestimulación

El éxito de la biorremediación está condicionado por factores como el O₂, pH, temperatura, aceptores de electrones, presión, disponibilidad de los contaminantes y la presencia de nutrientes (Leahy y Colwell, 1990).

La bioestimulación es la adición de nutrientes en un sitio contaminado para mejorar el crecimiento de los microorganismos autóctonos capaces de degradar de forma natural los compuestos químicos (Mrozik y Piotrowska-Seget, 2010).

La fertilización de la zona utilizando compost, nitrógeno, fósforo y carbono incrementan la degradación de los contaminantes tanto por las poblaciones autóctonas como por las introducidas (Ramadan *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1990; Brodkorb y Legge 1992; Mahro *et al.*, 1994; Namkoong *et al.*, 2002). Especialmente durante la degradación de PAHs, que contienen hidrógeno, carbono y algunas veces pequeñas cantidades de nitrógeno y azufre, los microorganismos necesitan adicionalmente fósforo, azufre y Nitrógeno (Rosenberg, 1993).

1.12.3. Bioaumentación

El bioaumentación es la aplicación de microorganismos indígenas o alógenos, modificados genéticamente o sin modificar, en sitios contaminados con contaminantes peligrosos para acelerar la degradación de los compuestos indeseados (Mrozik y Piotrowska-Seget, 2010). Es un método para mejorar la degradación y aumentar la tasa de transformación de compuestos xenobióticos que consiste en la introducción de microorganismos exógenos (Van Vliet *et al.*, 2006).

Se cree que el bioaumentación debe ser aplicado cuando la bioestimulación y la bioatenuación han fallado (Vogel, 1996; Iwamoto y Nasu, 2001; El Fantroussi y Agathos, 2005).

Se utiliza cuando se requiere el tratamiento inmediato de un sitio contaminado, o cuando la microflora autóctona es insuficiente en número o capacidad degradadora. El volumen de inóculo a utilizar, depende del tamaño de la zona contaminada, de la dispersión de los contaminantes y de la velocidad de crecimiento de los microorganismos degradadores (Riser-Roberts, 1998).

De acuerdo con Forsyth *et al.* (1995) el bioaumentación debe ser aplicado en suelos:

1. Con una cantidad baja o no detectable de microorganismos degradadores.
2. Que presentan compuestos cuya ruta de degradación es multiproceso, incluyendo procesos perjudiciales o tóxicos para los microorganismos.
3. Para sitios pequeños o donde el coste de los procesos no biológicos exceda el coste del bioaumentación.

La introducción de microorganismos en los suelos está particularmente recomendada para zonas contaminadas con compuestos que requieren una larga aclimatación o un periodo de tiempo de adaptación (Mrozik y Piotrowska-Seget, 2010).

Se han descrito numerosos microorganismos que poseen las herramientas necesarias para mineralizar contaminantes recalcitrantes como PAHs, compuestos clorados alifáticos y aromáticos, compuestos aromáticos con nitrógeno y alcanos de cadena larga (Cerniglia y Heitkamp 1987; Grosser *et al.*, 1991; Cerniglia 1993; Kästner y Mahro, 1996; Heidelberg *et al.*, 2002). Estos microorganismos pueden ser cepas puras, pero también pueden ser cepas modificadas genéticamente con plásmidos formados por genes catabólicos (King *et al.*, 1990; Dixon, 1996; Yee *et al.*, 1998)

Esta técnica tiene las siguientes limitaciones (Alexander, 1999):

- La concentración de los contaminantes puede ser demasiado baja para permitir el crecimiento del inóculo o los contaminantes pueden no estar biodisponibles.

- La presencia de ciertos compuestos en el ambiente pueden inhibir el crecimiento o actividad del inóculo.

- La tasa de alimentación de los protozoos sobre el inóculo puede ser mayor que la tasa de crecimiento de las bacterias, dando como resultado un descenso en la población bacteriana.

- El inóculo puede preferir otras fuentes de carbono presentes en el suelo en lugar del contaminante.

- Incapacidad del los microorganismos inoculados de dispersarse a través del suelo y llegar al contaminante.

- Los ambientes selectivos y el uso de consorcios microbianos favorecen el bioaumentación.

1.12.3.1. Factores que determinan el bioaumentación

Uno de los aspectos más difíciles es la supervivencia de las cepas introducidas en el suelo. Se ha visto que el número de microorganismos inoculados se ha reducido después de la inoculación (Mrozik y Piotrowska-Seget, 2010).

Muchos aspectos bióticos y abióticos determinan la efectividad del bioaumentación (Cho *et al.*, 2000; Bento *et al.*, 2005; Wolski *et al.*, 2006). Los factores abióticos más importantes son la temperatura, la humedad, el pH y el contenido en material orgánica. También determinan este proceso la aireación, el contenido en nutrientes y el tipo de suelo.

Mashreghi y Prosser (2006) han demostrado que una baja cantidad de agua en el suelo reduce la actividad de la bacteria, debido a una limitada difusión del sustrato y a efectos fisiológicos adversos asociados con la deshidratación celular.

Greer y Shelton (1992) observaron que la degradación del ácido 2,4-diclorofenolacético fue menor en los suelos con alto contenido en materia orgánica, posiblemente como consecuencia de menores rangos de desorción y crecimiento microbiano.

Entre los factores bióticos se encuentran la competencia entre organismos indígenas y exógenos por los limitados recursos de carbono, y las interacciones antagonistas y la predación por protozoos y bacteriofagos. Todas estas interacciones disminuyen potencialmente el número de células introducidas (England *et al.*, 1993; Sorensen *et al.*, 1999).

La inoculación de los microorganismos es fundamental para mantener un adecuado número y biomasa de las cepas introducidas. Este proceso puede realizarse mediante (Mrozik y Piotrowska-Seget, 2010):

- Inóculo en caldo nutritivo: Esta vía no siempre garantiza la correcta distribución de la bacteria en el perfil del suelo, su propia vida y su actividad.

- Nuevas técnicas: La opción más prometedora en la limpieza de los sitios contaminados parece ser la utilización de materiales portadores que mantengan la suficiente actividad de los inoculantes durante un tiempo prolongado después de su liberación en el medio. Según Van Veen *et al.* (1997) las características ideales de estos materiales incluyen: aportar un nicho protector, una nutrición temporal para los microorganismos introducidos y no deben de ser tóxicos tanto para los inoculantes como para el suelo.

Los siguientes materiales pueden servir como portadores: carbón vegetal modificado (Beck, 1991), arcilla (Omar *et al.*, 1990), nilon (Heitkamp y Steward, 1996), quitina o quitosano (Gentili *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007) y zeolita (Liang *et al.*, 2009)

Estos portadores mejoran la difusión de oxígeno, la transferencia de nutrientes y la capacidad de almacenamiento de agua, que son los factores limitantes para la biodegradación de contaminantes como el crudo.

La degradación de compuestos aromáticos puede ser más rápida si se introducen células inmovilizadas. Estos tratamientos ofrecen protección a los microorganismos inoculados frente a las subóptimas condiciones ambientales (pH inadecuado, presencia de sustancias tóxicas) y reduce la competencia frente a la flora indígena (Lin y Wang, 1991; Pritchard, 1992). Además, la inmovilización aumenta la estabilidad biológica de las células, incluyendo los plásmidos (Cassidy *et al.*, 1996). Pero no siempre la inmovilización de las células incrementa la degradación de hidrocarburos (Chen *et al.*, 2007).

1.12.3.2. Selección de microorganismos para el bioaumentación

La selección del cultivo debe realizarse tomando en consideración las siguientes características de los microorganismos: rápido crecimiento, facilidad de cultivo, que resistan altas concentraciones del contaminante y que sean capaces de sobrevivir en un amplio rango de condiciones ambientales.

Es importante obtener un cultivo formado por microorganismos bien caracterizados, que tengan una amplia habilidad catabólica y tolerancia en un variado rango de estreses químicos y ambientales. (Thompson *et al.*, 2005). Estos microorganismos, conocidos como cepas "heirloom", merecen una atención especial ya que son mantenidos durante años y están específicamente modificados para el bioaumentación (Singer *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2005).

Antes de llevar a cabo esta técnica, deben realizarse cultivos de enriquecimiento, aislar microorganismos capaces de cometabolizar o utilizar el contaminante como fuente de carbono y cultivarlos hasta obtener grandes cantidades de biomasa (Alexander, 1999). El éxito potencial del bioaumentación puede estar incrementado por el uso de cepas indígenas (capaces de degradar los contaminantes) previamente adaptadas a los contaminantes, definido como suelo activo (Mrozik y Piotrowska-Seget, 2010).

Para este propósito, las bacterias deben ser aisladas de suelos contaminados, cultivadas bajo condiciones de laboratorio preadaptadas al cultivo puro para devolverlas al mismo suelo. Esto se conoce como reinoculación de microorganismos indígenas. Otra posibilidad es la selección de los microorganismos apropiados de zonas con contaminantes similares (Mrozik y Piotrowska-Seget, 2010).

En la mayoría de los estudios realizados, cepas disponibles para la biorremediación fueron aisladas de zonas contaminadas con hidrocarburos aromáticos o de agua residual de industrias en plantas de tratamiento (Dong *et al.*, 2008; Córdova-Rosa *et al.*, 2009).

El bioaumentación puede realizarse con cepas individuales o con consorcios. La mayoría de los experimentos en los que se ha realizado un bioaumentación han consistido en el uso de cepas Gram negativas que pertenecen al género *Pseudomonas* (Heinaru *et al.*, 2005), *Flavobacterium* (Crawford y Mohn, 1985), *Sphingobium* (Dams *et al.*, 2007), *Alcaligenes* (Haluska *et al.*, 1995) y *Achromobacter* (Ronen *et al.*, 2000). O con cepas Gram positivas que pertenecen a los géneros *Rhodococcus* (Briglia *et al.*, 1990), *Mycobacterium* (Jacques *et al.*, 2008) y *Bacillus* (Silva *et al.*, 2009 b)

Está generalmente aceptado por la comunidad científica que ninguna de las especies de microorganismos es capaz de degradar completamente un hidrocarburo (Colwel y Walker, 1977). La degradación del contaminante por un consorcio bacteriano, bacterias con diferentes partes de la ruta catabólica de degradación, habitualmente es más eficiente que la introducción de una única cepa con la ruta completa (Rahman *et al.*, 2002). La degradación del aceite refinado y del crudo parece envolver a un conjunto de microorganismos, incluyendo formas eucarióticas y procarióticas. Por eso, algunos estudios han demostrado que el uso de consorcios formados por microorganismos capaces de degradar compuestos aromáticos ha

sido más efectivo en la retirada de los contaminantes en comparación con las cepas individuales selectamente aisladas (Goux *et al.*, 2003; Ghazali *et al.*, 2004). En muchos casos, los consorcios son más efectivos que el uso de cepas individuales debido a que las sustancias intermedias originadas en una ruta catabólica de una cepa pueden ser más degradadas por otras cepas que tengan la ruta catabólica adecuada (Heinaru *et al.*, 2005).

En la publicación de Mroziak y Piotrowska-Seget (2010) se muestra una tabla con los principales microorganismos usados en el bioaumentación de suelos contaminados con compuestos aromáticos.

También se han utilizado microorganismos modificados genéticamente para bioaumentar los sitios contaminados. Se sabe que los microorganismos indígenas, después de un tiempo expuestos a xenobióticos evolucionan para crear la capacidad de degradar esos compuestos. La evolución, supone mutaciones y transferencia horizontal de genes y tiene lugar constantemente, pero es relativamente baja en la naturaleza. Debido a esto, es necesario mejorar la actividad degradativa de las bacterias usando la biología molecular, que ofrece numerosas tecnologías para la ingeniería o el aumento de los genes de redemediación (Halden *et al.*, 1999; Liphthay *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2006).

Muchos de las rutas catabólicas están localizadas en plásmidos como TOL/pWW0, TOL/pWW53, TOL/pDK1, BPH/ pWW110, NAH/NAH7 y PHE/pVI150, transposones u otros elementos móviles y/o integrados (Top *et al.*, 2002; Jussila *et al.*, 2007).

Distintas cepas modificadas genéticamente se han utilizado en estudios recientes para la degradación de hidrocarburos en suelos. El complemento de vías catabólicas puede jugar un papel importante en la evolución de nuevas capacidades degradativas.

En la publicación de Mroziak y Piotrowska-Seget (2010) se muestra una tabla con los principales organismos modificados genéticamente utilizados en estudios de bioaumentación.

1.12.4. Fitorremediación

La fitorremediación supone el uso de plantas para estabilizar (transformar compuestos tóxicos en otros menos tóxicos), extraer contaminantes y acumularlos en los tejidos aéreos, degradarlos o volatilizarlos (Kuiper *et al.*, 2004). Históricamente, se ha documentado el empleo de las plantas para tratar aguas residuales municipales en Europa pero éstas poseen más aplicaciones debido a su capacidad para adaptarse a ambientes extremos.

Esta técnica de biorremediación es una de las tecnologías promovidas por la Agencia de Protección Ambiental (EPA). El listado de dicha agencia incluye cerca de 150 proyectos que utilizan esta tecnología para remediar varios contaminantes como compuestos clorados, explosivos, pesticidas, PAHs, hidrocarburos de petróleo, radionucleidos y metales pesados (Campos *et al.*, 2008).

La fitorremediación puede realizarse mediante una estrategia directa y explanta (Anderson *et al.*, 1993 a; Cunningham *et al.*, 1995; Salt *et al.*, 1998). Esta última se basa en

los exudados radicales, que sustentan el crecimiento y las actividades metabólicas de diversas comunidades fúngicas y bacterianas de la rizosfera (Shimp *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1994).

Existe un amplio número de sitios con un gran potencial para realizar procesos de bajo coste como las aplicaciones de fitorremediación. Best *et al.*, (1997) establece que aproximadamente un 80% de los contaminantes de las aguas subterráneas se encuentran a unos 20 metros de la superficie.

Según Chang y Corapcioglu (1998), el proceso por el que las plantas eliminan los contaminantes químicos constan de:

1. Modificación física y química de las propiedades de los suelos contaminados.
2. Eliminación de exudados radicales, incrementando el carbono orgánico.
3. Mejora de la aireación mediante la liberación de oxígeno a la zona radical, así como incrementando la porosidad de la zona superior del suelo.
4. Interceptando y retardando el movimiento de los compuestos químicos.
5. Efecto conjunto de la acción enzimática de las plantas y los microorganismos sobre los compuestos recalcitrantes.
6. Decrecimiento de la migración lateral y vertical de los contaminantes a las aguas subterráneas, mediante la extracción del agua disponible y la inversión del gradiente hidráulico.

Según Garbisu *et al.* (2002), la planta ideal para la fitoextracción debe tener las siguientes características:

- (i) Ser tolerante a altos niveles de metal en el suelo.
- (ii) Acumular altos niveles de metal en la parte cosechable.
- (iii) Tener un crecimiento alto y una elevada producción de biomasa en el campo.
- (iv) Tener un sistema radical profundo.
- (v) No ser un cultivo de consumo humano o animal.
- (vi) Tener prácticas agronómicas conocidas.
- (vii) Adaptarse a distintas condiciones edafoclimáticas.

A fin de aplicar la fitorremediación de una forma eficiente hay que tener en cuenta las limitaciones de esta técnica. Estas limitaciones son (Khan *et al.*, 2000):

- 1) El tiempo necesario para obtener efectos aceptables.
- 2) La profundidad limitada del sistema radical.
- 3) El lento crecimiento de las plantas.
- 4) La sensibilidad hacia ciertos contaminantes.

5) El problema de formar parte de una cadena alimenticia.

6) La dependencia a los cambios del clima y la dormancia o letargo de invierno.

El uso de plantas transgénicas, que estén ambientalmente bien adaptadas, de crecimiento rápido y de raíces profundas puede ayudar a superar estos problemas y hacer más efectiva la fitorremediación (Kuiper *et al.*, 2004). Además, la fitoextracción puede mejorarse con un incremento en la tasa de transpiración de las plantas. La mostaza parda con una tasa de transpiración 130% mayor que la del genotipo puro es capaz de extraer 104% más plomo del suelo (Gleba *et al.*, 1999).

1.12.4.1. Contaminantes fitorremediados

Los contaminantes que pueden ser fitorremediados se dividen en dos grupos (Meagher, 2000):

- Contaminantes orgánicos: Pueden ser mineralizados completamente usando chopo, sauce, alfalfa y distintas variedades herbáceas. En función de sus propiedades, podrán ser degradados en la zona de la raíz o ser captados por las plantas para degradarlos, acumularlos o volatilizarlos. Aunque el conocimiento de la degradación del contaminante por los sistemas metabólicos de las plantas todavía es limitado, comparado con lo que se sabe para bacterias.

La fitorremediación de compuestos orgánicos se ha centrado generalmente en tres tipos de compuestos: solventes clorados, explosivos e hidrocarburos de petróleo. Los investigadores han comenzado a direccionar el potencial de la fitorremediación para tratar otros compuestos orgánicos, incluyendo PAHs y bifenilos policlorados (Ferro *et al.*, 1994)

El concepto de utilizar plantas para remediar suelos contaminados con contaminantes orgánicos se basa en las observaciones. Se sabe que estos contaminantes desaparecen más rápido en suelos con vegetación en comparación con los suelos libres que les rodean (Cunningham y Berti, 1993; Burken y Schnoor, 1996). Notables artículos sobre fitorremediación de compuestos orgánicos se han escrito (Cunningham y Berti, 1993; Cunningham *et al.*, 1995 y 1996). La utilización de enzimas de plantas para la degradación de compuestos como el tricloroetileno (TCE) (Gordon *et al.*, 1998), los explosivos 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX), glicerol trinitrato (GTN) y nitroglicerina (Best *et al.*, 1997); y PCBs (Kas *et al.*, 1997) muestra las posibilidades de la fitorremediación. Además la construcción de plantas transgénicas puede aumentar el rango de contaminantes que pueden ser degradados.

- Contaminantes elementales o simples: Este grupo contiene contaminantes como los metales pesados tóxicos y los radionucléidos. Los compuestos inorgánicos no pueden ser degradados, pero sí pueden ser acumulados o estabilizados en los tejidos de las plantas. Esto último es lo que ocurre con elementos no esenciales como el Cd, macronutrientes, elementos traza e isótopos radiactivos. Según Meagher (2000) estos contaminantes inorgánicos pueden ser adsorbidos e hiperacumulados por plantas como maíz, girasol, tabaco

o mostaza. En plantas que crecen en suelos enriquecidos con metales pesados se encontró una capacidad natural para hiperacumular metales pesados y se cree que esta acumulación es un mecanismo de defensa contra herbívoros (Gleba *et al.*, 1999). En comparación con los contaminantes orgánicos sólo hay disponibles unas pocas técnicas de remediación para este tipo de contaminantes, y el uso de plantas para eliminar los metales pesados del suelo es una herramienta emergente (Khan *et al.*, 2000; Clemens *et al.*, 2002; Cobbett y Goldsbrough, 2002). En estos casos los principios más importantes de la fitorremediación son (Kuiper *et al.*, 2004):

1) Extracción del contaminante del suelo y translocación a los tejidos aéreos (above ground tissues).

2) Secuestro del contaminante en las raíces para evitar que se disperse más allá y llegue al agua del suelo.

3) Conversión a compuestos químicos menos tóxicos.

Para este tipo de biorremediación se usan varias especies de plantas, entre otras, el tabaco, el girasol, la mostaza o el maíz, basándose en la habilidad de adsorber o hiperacumular el contaminante (Meagher, 2000). Alteraciones genéticas de las plantas pueden mejorar el éxito de la fitorremediación. Por ejemplo, la fitoextracción puede mejorarse aumentando la tasa de respiración de las plantas. Bizily *et al.* (2000), describieron el uso de plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con genes de bacterias para transformar y detoxificar mercurio orgánico; por su parte, Limura *et al.* (2005) describieron la expresión de un gen manganeso-peroxidasa en tabaco transgénico.

1.12.4.2. Fases de la fitorremediación

Una planta fitorremediadora realiza este proceso siguiendo tres fases (López Martínez *et al.*, 2005):

1. **Absorción:** se realiza a través de las raíces y de las hojas, mediante los estomas y la cutícula de la epidermis (Watt y Evans, 1999). Esta absorción ocurre en la epidermis de las raíces jóvenes, que absorben los compuestos por ósmosis dependiendo de factores externos como la temperatura y el pH. Otros factores importantes que inciden en la penetración del contaminante son su peso molecular y la hidrofobicidad que determina que estas moléculas atraviesen las membranas celulares de la planta. Después de cruzar la membrana, los contaminantes son distribuidos a través de toda la planta (Harvey *et al.*, 2002).

2. **Excreción:** Los contaminantes que se absorben por las raíces, se excretan por la parte aérea (fitovolatilización). Cuando las concentraciones de los contaminantes son elevadas, sólo pequeñas fracciones (menos del 5%) se excretan sin cambios en su estructura química.

3. Desintoxicación de los contaminantes: Los compuestos orgánicos se mineralizan hasta dióxido de carbono. Esta transformación de las moléculas orgánicas xenobióticas se realiza en 3 etapas:

a) Etapa de transformación: Esta etapa es fundamental en el proceso de fitorremediación (López Martínez *et al.*, 2005). Se realizan reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, donde las moléculas orgánicas xenobióticas pierden parte de su estructura. En estas transformaciones se forman metabolitos polares e hidrosolubles a través de dos sistemas enzimáticos que tienen la función de introducir en el contaminante un átomo de oxígeno proveniente del oxígeno molecular (oxigenasas de función mixta). Estos dos sistemas son las aminooxigenasas y los citocromos P450 que se encuentran localizados en el retículo endoplásmico. Los citocromos P450 están formados por dos proteínas diferentes: una tiene una función reductasa y la otra es una hemoproteína con actividad oxigenasa (Khatishashvili *et al.*, 1997; Varazashvili *et al.*, 2001 b).

Las reacciones que se dan en esta primera etapa son: hidroxilación (catalizada por monooxigenasas o subfamilias de CYTP450), desaminación, desulfuración, epoxidación, peroxigenación y reducción. En función de la localización de la transformación, las reacciones de oxidación se dividen en: (i) microsómicas, (ii) citosólicas y (iii) mitocondriales.

Una de las enzimas más descritas para la oxidación de los contaminantes es el CYTP450 (Kvesitadze *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001). En general, las enzimas que participan en esta etapa requieren de grupos no polares en la molécula del contaminante.

Para agilizar la oxidación de las moléculas orgánicas xenobióticas en plantas, se han realizado estudios de modificación transgénica en vegetales como el centeno y el maíz (Chapple, 1998), demostrándose que las enzimas pueden ser inducibles por algunos contaminantes como herbicidas, nitroaromáticos, compuestos aromáticos, fenólicos, hidrocarburos aromáticos policíclicos y dioxinas (Robineau *et al.*, 1998; Werck *et al.*, 2000).

b) Etapa de conjugación: La conjugación actúa en los mecanismos de desintoxicación, uniendo carbohidratos, aminoácidos, péptidos y proteínas. Estas enzimas se conocen como transferasas. Como resultado de esta transformación, la toxicidad del contaminante disminuye porque generalmente incrementa la polaridad de las moléculas generando una mayor movilidad de los contaminantes, promoviendo su depósito en vacuolas.

La conjugación se considera el último acto de la fitoacumulación y puede ser un estadio intermedio en la transformación incompleta de los contaminantes. Los contaminantes conjugados, acumulados en vacuolas, son fácilmente sometidos a oxidaciones posteriores.

c) Etapa de acumulación: En esta etapa, las moléculas de los contaminantes que incrementaron su polaridad quedan encapsuladas en las vacuolas.

La adaptación implica en algunos casos la inducción de enzimas desintoxicadoras. Algunos ejemplos de estas enzimas son: alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, carbonil reductasa, glutatión peroxidasa, aldehído oxidasa, quinona reductasa, fenoloxidasa,

peroxidasa, lacasa, monoxigenasa dependiente de CYTP450 amino N – metiltransferasa, alcohol sulfotransferasa, entre otras. (Jakoby y Ziegler, 1990; Varazashvili *et al.*, 2001 a; Günter y Martinoia, 2002; Harvey *et al.*, 2002)

1.12.4.3. Estrategias de la fitorremediación

Los procesos que intervienen en una fitorremediación son: fitoextracción o fitoacumulación, fitodegradación, fiovolatilización, fitoestabilización y rizofiltración. Estas estrategias están recogidas en la publicación Campos *et al.*, 2008).

1.12.4.3.a. Fitoextracción o fitoacumulación

Es el uso de plantas para limpiar los contaminantes mediante su acumulación en los tejidos cosechables (Pilon-Smiths, 2005). El método consiste en plantar especies seleccionadas por sus capacidades acumuladoras en la zona contaminada. Cuando las plantas crecen se recolectan y se incineran. Las cenizas se pueden lavar para recuperar los metales o bien pueden confinarse en vertederos de tóxicos con la ventaja de que ocupará un espacio mucho menor que el que se usaría si se desechara el suelo contaminado. La energía obtenida de la incineración de la biomasa puede utilizarse para mantener la rentabilidad de la tecnología, si los humos son limpiados adecuadamente (Krämer, 2005).

Comprende la captación de iones metálicos, radiactivos y ciertos compuestos orgánicos por las raíces de la planta. Está basado en el hecho de que hay plantas que absorben selectivamente grandes cantidades de metales, acumulando en los tejidos concentraciones mucho más altas que las presentes en el suelo o en el agua (Meagher, 2000). Este proceso también se ha utilizado para eliminar hidrocarburos de agua y suelo con cultivos como la alfalfa o los álamos, y está directamente relacionado con la capacidad de evapotranspiración de estas plantas.

Las plantas hiperacumuladoras tienen de forma natural la capacidad de acumular elementos traza, primariamente Ni, Zn, Cd, As o Se, en sus tejidos aéreos, sin desarrollar ningún síntoma de toxicidad (Baker y Brooks, 1989). La concentración de estos elementos en la biomasa seca de la hoja es normalmente 100 veces mayor que la concentración en el suelo (McGrath y Zhao, 2003). Característicamente, la relación brote / raíz de la concentración de hiperacumuladoras es alrededor de 1 (Krämer *et al.*, 1996; Becher *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2004).

Un factor limitante de esta técnica es la escasa biodisponibilidad del elemento en cuestión. Por ejemplo, en el caso del Pb, metal muy contaminante, queda fuertemente adherido al suelo y no está disponible para las plantas (Marín *et al.*, 2005).

1.12.4.3.b. Fitodegradación

Es un proceso de modificación química de los contaminantes, transformándolos generalmente en otros menos peligrosos, junto con un almacenamiento o eliminación (Campos *et al.*, 2008). En determinadas ocasiones, los productos de la degradación le sirven

a la planta para acelerar su crecimiento, en otros casos, los contaminantes son biotransformados (López Martínez *et al.*, 2005).

Esta técnica se puede emplear en suelos, agua superficial y subsuperficial y se utiliza sobre compuestos como disolventes, pesticidas, explosivos y petróleo (De la Fuente *et al.*, 2005).

Por ejemplo el TCE, que es metabolizado por monooxigenasas a tricloroetanol, ácido tricloroacético y residuos no extraíbles, pero sin conversión a CO₂ (Gordon *et al.*, 1998).

1.12.4.3.c. Fitovolatilización

Es el proceso por el que las plantas toman los contaminantes del suelo o del agua, los emiten a la atmósfera mediante la transpiración, o los transforman en compuestos volátiles (Campos *et al.*, 2008).

Algunos de los contaminantes pueden llegar hasta las hojas y evaporarse o volatilizarse a la atmósfera. Los álamos, volatilizan el 90% del tricloroetileno que absorben (Núñez *et al.*, 2004).

Tiene lugar, por ejemplo, cuando los árboles absorben agua contaminada con compuestos orgánicos volátiles (COV), eliminando la gran mayoría de los COV en la evotranspiración de las hojas.

1.12.4.3.d. Fitoestabilización

Es un mecanismo que utiliza la planta para desarrollar un sistema denso de raíces que le permite reducir la biodisponibilidad y la movilidad de los contaminantes evitando el transporte a capas subterráneas o a la atmósfera (López Martínez *et al.*, 2005). En este caso, las plantas, reducen la viabilidad de los contaminantes mediante inmovilización en la matriz del sustrato (Campos *et al.*, 2008). El proceso se basa en un cambio en las condiciones edáficas. De este modo el metal precipita o toma formas no disponibles, reduciendo el riesgo de dispersión y el paso del contaminante a la cadena trófica (Marín *et al.*, 2005).

En estos procesos no hay transportadores específicos en las plantas para estos compuestos manufacturados por lo que el movimiento de los xenobióticos en la planta depende de sus propiedades fisicoquímicas. Los compuestos entran en el simplasto y son modificados mediante reacciones de oxidación, reducción y /o hidrólisis seguidos por conjugación con glutatión (GSH), azúcares o ácidos orgánicos (Campos *et al.*, 2008). Estas transformaciones permiten que sean más solubles y que puedan unirse a enzimas, transportadores y otras proteínas relevantes (Dietz y Schnoor, 2001; Pilon-Smits, 2005). Estos compuestos conjugados son secuestrados por los polímeros insolubles de la pared celular o por compartimentos celulares como las vacuolas, donde son metabolizados, idealmente a CO₂ (Pilon-Smits, 2005). Aunque esta acción de las enzimas y transportadores es accidental, debido a que su función natural es otra, muchas enzimas vegetales tienen importantes roles en la degradación, como son mono y dioxigenasas, deshidrogenasas,

hidrolasas, peroxidasas, nitrorreductasas, nitrilasas, deshalogenasas, fosfatasas, carboxilesterasas y otras (Dietz y Schnoor, 2001; Wolfe y Hoehamer, 2003; Pilon-Smits, 2005)

Una vez que los contaminantes han sido extraídos y concentrados en la planta, más o menos modificados por procesos metabólicos, la biomasa es utilizada como cosecha y después en producción de energía o de fibra (Campos *et al.*, 2008).

1.12.4.3.e Rizofiltración

Es una tecnología que se basa en el crecimiento de raíces (rizofiltración) o plántulas (blastofiltración) en agua contaminada con un suministro continuo de aire (Marín *et al.*, 2005). En esta técnica se ha basado el presente trabajo. Es similar al anterior, pero en lugar de cultivar las plantas en el suelo se cultivan en invernaderos por procesos hidropónicos. Para comprobar que esta técnica es efectiva se han de cultivar en condiciones estériles en las que los microorganismos no interfieran con los procesos estudiados. Posteriormente las plantas se cultivan en tanques con agua contaminada y los tóxicos quedan fijados en sus raíces. A medida que las raíces se saturan del tóxico se van cortando y eliminando.

En la publicación de Dushenkov y Kapulnik, 2000 puede verse una sección lateral de una unidad de fitofiltración. La mayor parte de las raíces está expuesta a la solución contaminada y aireada. Esta parte asegura el suministro de agua a la planta y la absorción del contaminante. Los nutrientes se aplican exclusivamente a través de la capa de suelo artificial colocada por encima de la solución, asegurando la nutrición de la planta y evitando las reacciones químicas.

Las plantas empleadas deben reunir las siguientes características: raíces densas de rápido crecimiento, deben ser tolerantes y emplear métodos de precipitación, absorción o adsorción, para retirar el metal del agua y, por último, deben estar capacitados para mantener esta capacidad durante un periodo prolongado (Marín *et al.*, 2005).

Algunos estudios han demostrado la eficacia de las raíces de plantas para acumular metales pesados, como es el caso del girasol o Brassica juncea y también de plantas acuáticas como Eichornia crassipes, Hydrocotyle umbellata, Lemna *minor* y Azolla *pinnata* (Dushenkov *et al.*, 1995; Dushenkov y Kapulnik, 2000;)

También se están utilizando otras partes de la planta en procesos de fitofiltración como es el caso de la corteza de *Hemidesmus indicus* inmovilizada en una columna para eliminar Pb de soluciones acuosas (Sekhar *et al.*, 2004).

Pero una limitación de esta técnica es que no puede ser empleada directamente sobre corrientes de aguas como ríos o arroyos porque requiere de un soporte físico para mantener las plantas y un circuito donde se haga recircular el agua (Marín *et al.*, 2005).

Este método se probó satisfactoriamente para eliminar iones radioactivos en las lagunas contaminadas en el accidente de la planta nuclear de Chernobyl, utilizando plantas de girasol.

1.12.5. Rizorremediación

La técnica de rizorremediación consiste en la contribución de las poblaciones bacterianas de la rizosfera de las plantas al proceso de fitorremediación (Anderson *et al.*, 1993a; Schwab y Banks, 1994). Puede favorecerse mediante la inoculación de cepas en el suelo mediante la adición de una cepa bacteriana pura previamente aclimatada, la adición de un consorcio bacteriano previamente aclimatado, la introducción de una bacteria modificada genéticamente o la adición de vectores que llevan genes de biodegradación y que por conjugación se transferirán a los microorganismos del lugar contaminado.

Los primeros estudios sobre degradación de compuestos en la rizosfera se centraban principalmente en la degradación de herbicidas y pesticidas (Hoagland *et al.*, 1994; Zablutowicz *et al.*, 1994; Jacobsen, 1997). Estos trabajos sugerían que las plantas están protegidas contra esos compuestos por las bacterias degradadoras.

Estudios de las especies de plantas más adecuadas para la rizorremediación, mostraron que varias especies de pequeñas Gramíneas y plantas leguminosas, como la alfalfa, son competentes (Qiu *et al.*, 1994; Shann y Boyle, 1994; Kuiper *et al.*, 2001). Esto probablemente es debido a su habilidad para albergar gran número de bacterias en sus sistemas radiculares altamente ramificados. El éxito también depende de factores como el metabolismo primario y secundario y el establecimiento, supervivencia e interacciones ecológicas con otros organismos. Se ha sugerido que las raíces de las plantas son un sustituto del laboreo (arado) del suelo para incorporar nutrientes y para mejorar la aireación (Aprill y Sims, 1990).

El éxito de la rizorremediación dependerá de las diversas formas de vida que existen en el lugar contaminado y de la relación del microorganismo con los factores bióticos y abióticos del suelo, lo que influirá en su supervivencia, actividad y migración. Además, se basa en la competencia rizosférica de los microorganismos (Weller y Thomashow, 1994; Lugtenberg y Dekkers, 1999), que se plasma en la habilidad de éstos para sobrevivir en la rizosfera, la competencia por los nutrientes de los exudados y la eficiente colonización del sistema radical (Lugtenberg y Dekkers, 1990). Como concluyeron Kuiper *et al.* (2001) la rizorremediación puede contribuir a la recuperación de lugares contaminados. Sin embargo, no hay muchos trabajos sobre la selección de un sistema de rizorremediación adecuado (planta-bacteria degradadora).

Este tipo de biorremediación puede ser muy eficaz debido a la asociación planta-microorganismo porque:

- Las raíces de la planta permiten un rápido movimiento del agua y de los gases a través del suelo, incrementando la actividad microbiana.
- Los microorganismos pueden llegar a zonas más profundas gracias a las raíces, sin esta asociación, existirían zonas inaccesibles como las partes internas de los macroagregados densos.

- En la rizosfera se alcanzan densidades de microorganismos muy superiores a las del suelo libre, pero además, la capacidad fisiológica del conjunto para degradar un amplio rango de compuestos orgánicos es apreciablemente mayor, probablemente como resultado del trabajo coordinado de muchas poblaciones bacterianas diferentes.

Experimentos demuestran la importancia de la interacción planta-suelo-microorganismo. En el desierto de Kuwait, la rizosfera de todas las plantas examinadas contenía más microorganismos degradadores de hidrocarburos que el suelo libre (Radwan *et al.*, 1998). Siciliano y Greer (2000), detectan un acusado incremento en la degradación de 2,4,6-Trinitrotolueno en la rizosfera de las plantas tolerantes al contaminante, aunque sin duda, uno de los aspectos más destacables de este trabajo es que al inocular una cepa de *Pseudomonas* sp. capaz de degradar el TNT a mono- y di-amino metabolitos en el sistema rizosférico de las plantas más eficaces, se veía fuertemente potenciada su actividad, debido, según los autores, no sólo a que dicha cepa encontraba un ambiente muy adecuado para su desarrollo sino a la alteración de las comunidades bacterianas que se desarrollaban en el sistema.

1.12.5.1. La rizosfera

La rizosfera fue definida por Hiltner en 1904 como aquella porción del suelo en torno a la raíz de leguminosas, con una mayor actividad microbiana dada la alta concentración de carbono y otros nutrientes existentes en esta zona. Actualmente se considera rizosfera la porción de suelo influida por las raíces vivas.

La comunidad de la rizosfera está constituida por una microbiota (bacterias, hongos y algas) y por la micro y la mesofauna (protozoos, nematodos, insectos y ácaros). Éstos contribuyen significativamente en procesos de descomposición con el catabolismo de sustancias nocivas en la rizosfera (López Martínez *et al.*, 2005).

La planta durante su desarrollo influye en la microflora edáfica por medio de los exudados, y los microorganismos a su vez interaccionan con las plantas. Los microorganismos también interaccionan con los componentes físicos del ambiente radical, alterando la naturaleza del suelo, produciendo polisacáridos y otros compuestos orgánicos que promueven la formación de agregados (Lynch, 1987). En resumen, el entorno rizosférico viene determinado por la triple interacción suelo, planta y microorganismos, lo que definió Lynch como la trílogía del suelo.

En la publicación de Lynch (1990) puede verse una imagen de la rizosfera.

La composición de la población microbiana en la rizosfera depende de los exudados radicales, que contienen compuestos que pueden influir en la estructura y la composición de la comunidad mediante una estimulación o una inhibición (Hartmann *et al.*, 2009). Los exudados radicales tienen azúcares, ácidos orgánicos, ácidos grasos, nucleótidos, fenoles, reguladores del crecimiento vegetal, putrescina, esteroides, vitaminas y aminoácidos como componentes principales (Vancura y Hovadik, 1965; Curl y Truelove, 1986; Uren, 2001;

Dakora y Phillips, 2002; Uren, 2007). La liberación de compuestos orgánicos vía radical de forma continua proporciona lo necesario para el establecimiento, crecimiento y actividad de los microorganismos en la rizosfera (Merbach *et al.*, 1999; Nguyen y Guckert, 2001). Además, el mucigel secretado (exudado) por las células de la raíz o la descomposición de las raíces completas suministran nutrientes (Rovira, 1956; Lynch y Whipps, 1990; Lugtenberg y Deweger, 1992). Se sabe que los componentes de los exudados radicales como los carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos estimulan positivamente la respuesta quimiotáctica de la bacteria (Somers *et al.*, 2004). Además, las raíces también exudan una variedad de metabolitos secundarios que inhibe el crecimiento de hongos y bacterias patógenas en respuesta a inductores como el ácido salicílico, el ácido jasmónico y los quitasanos, que estimulan la respuesta defensiva (Walker *et al.*, 2003).

Se sabe que la exudación radical presenta cambios cuantitativos y cualitativos entre las diferentes especies vegetales (Whipps, 1987; Schilling *et al.*, 1998; Morse *et al.*, 2000; Soderberg *et al.*, 2004). Se ha establecido hace unos años que la diversidad de microorganismos presentes en diferentes rizosferas, y especialmente sus habilidades funcionales, están ligadas a estas variaciones en los exudados (Grayston y Campbell 1996; Grayston *et al.*, 1998).

Existen diferencias en la composición de los exudados entre los distintos tipos de plantas, pero también, para plantas de la misma especie, entre estados de desarrollo y distintos fenotipos (Lynch y Whipps, 1990; Van Veen *et al.*, 1991; Swinnen *et al.*, 1994; Lucas García *et al.*, 2001; Ruiz Palomino *et al.*, 2005). La variación en los tipos y en la cantidad de los exudados ha sido propuesta como un factor principal de actuación que influencia la densidad y la diversidad de los microorganismos rizosféricos, tanto para las bacterias (Bowen y Rovira, 1991; Bolton *et al.*, 1992; Grayston y Campbell, 1996) como para hongos (Castaldini *et al.*, 2005; De Boer *et al.*, 2005; Garbeva *et al.*, 2008).

Otros factores que afectan en la composición de la población microbiana son la especie vegetal (Grayston *et al.*, 1998; Smalla *et al.*, 2001), el cultivar (Shann y Boyle, 1994; Van Overbeek y Van Elsas, 2008; Andreote *et al.*, 2009), el tipo de raíz, la edad de la planta (Herschkovitz *et al.*, 2005; Lerner *et al.*, 2006), cambios estacionales (Dunfield and Germida, 2003; Van Overbeek y van Elsas, 2008), el tipo del suelo y la historia del suelo (Anderson *et al.*, 1993 b).

Los organismos de la rizosfera también tienen un gran impacto en las plantas está descrito que muchos de los microorganismos aislados tienen propiedades estimuladoras o inhibitoras del crecimiento de las raíces (Campbell y Greaves, 1990). En primer lugar, a través de los microorganismos fitoestimuladores y biofertilizadores pueden mejorar la salud de la planta. En segundo lugar algunos microorganismos rizosféricos pueden inducir respuestas sistémicas en la planta, como resultado de la activación de sus mecanismos de defensa (Pieterse *et al.*, 2003)

Como resultado de estos factores, la rizosfera es rica en microorganismos. Paul y Clark (1989), estiman que la densidad microbiana es 100 veces superior en la rizosfera que fuera

de ella. El número de bacterias encontrado en la rizosfera es mayor que en el suelo libre del efecto radical y este efecto, provocado por la exudación radical, disminuye a medida que aumenta la distancia de la raíz (Bazin *et al.*, 1990), de hecho, hay significativamente mayor cantidad de ADN extraído del suelo rizosférico que del suelo libre (Macrae *et al.*, 2001). Se ha encontrado que las densidades bacterianas y fúngicas presentes en esta zona de directo intercambio con la planta pueden llegar a ser entre 10 y 50 veces más grandes que en el suelo no rizosférico (Reyes *et al.*, 2006). Las diferencias existentes en la composición de los exudados hacen que varíe la composición de las poblaciones microbianas rizosféricas (Curl y Truelove, 1986; Bowen y Rovira, 1991).

Se sabe que la rizosfera está dominada por Gram negativas (Curl y Truelove, 1986) como *Pseudomonas* sp (Kuiper *et al.*, 2004). La capacidad de colonizar de una forma eficiente las raíces de las plantas varía fuertemente entre las distintas cepas de *Pseudomonas*. Posiblemente, éstas dominan en la rizosfera debido a que tienen un rápido crecimiento y a que son especies oportunistas (Buée *et al.*, 2009)

Sin embargo, en el estudio realizado por Schwieger y Tebbe (2000), en el que secuenciaron el ADN del suelo rizosférico de *Medicago sativa* y *Chenopodium album*, observaron que los aislados más abundantes correspondían con bacterias Gram positivas, como las *Arthrobacter*. Esto también ha ocurrido en otros estudios (Heuer *et al.*, 2002), posiblemente la predominancia de las cepas Gram positivas o Gram negativas se deba a los organismos no cultivables existentes en la rizosfera estudiada (Buée *et al.*, 2009).

Actualmente se dispone del apoyo experimental suficiente como para señalar que la estructura de la comunidad bacteriana en la rizosfera es el resultado de un proceso de coadaptación, coevolución y selección (Chanwya *et al.*, 1988; Lucas García *et al.*, 2001) que conduce a la presencia en el sistema rizosférico de bacterias útiles para la planta, por ejemplo pueden movilizar nutrientes (Zhang *et al.*, 1997), evitar el desarrollo de patógenos (Sutherland, 1991; Reyes y Valery, 2007) o degradar hidrocarburos, entre los muchos aspectos que se podrían citar. Con respecto al incremento de comunidades degradadoras de hidrocarburos, podemos citar los trabajos de Banks *et al.* (2000), que encuentran del orden de 10 veces más bacterias degradadoras de hidrocarburos en la rizosfera de trébol (*Trifolium repens*) y festuca (*Festuca arundinacea*) que en el suelo libre de vegetación, y lo que es más importante, de una forma sostenida, estable y eficaz, ya que los niveles de hidrocarburos totales descienden del orden de un 20% más en los suelos tratados con la vegetación y sus comunidades microbianas asociadas; los resultados más llamativos se obtuvieron al considerar algunos marcadores importantes como el pireno, cuyos niveles descendieron en más de un 80% en un mes.

Según Neal *et al.* (1973), Westover *et al.* (1997) o Rengel *et al.* (1998), cada especie y genotipo de planta tiene asociada una microflora específica.

1.12.5.2. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs)

Son bacterias que, en su mayoría, ejercen efectos beneficiosos en las plantas y que además pueden desarrollarse fuera del sistema rizosférico (Bashan y Holguin, 1998). Este tipo de bacterias pertenecen a multitud de géneros bacterianos como *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Brown, 1974; Kloepper *et al.*, 1988; Bashan y Levanony, 1990; Okon y Labandera-González, 1994; Tang, 1994; Probanza *et al.*, 1996; Arshad y Frankenberger, 1998).

Estas cepas ejercen su acción de diversas maneras mejorando el estado de la planta. Estos mecanismos de acción pueden ser indirectos o directos:

- Indirectos: Se producen cuando la estimulación del crecimiento es indirecta. La bacteria libera algún metabolito, que a su vez, afecta a otros factores rizosféricos que revierten en una mejora o estimulación del crecimiento de la planta (Kloepper, 1993). Son por ejemplo (Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2003):

- Aquellos que resultan de una actividad bacteriana que ponga más nutrientes a disposición de la planta.

- La inhibición de microorganismos que alteren negativamente el crecimiento de la planta (exclusión de nicho).

- La fijación biológica de nitrógeno en el sistema rizosférico, fijación libre, que pone a disposición de la planta nitrógeno asimilable.

- Directos: Son aquellos en los que el microorganismo promotor del crecimiento produce un metabolito que por sí mismo es capaz de estimular el crecimiento vegetal (Kloepper, 1993). Son por ejemplo (Gutiérrez-Mañero, *et al.*, 2003):

- Los que alteran los niveles hormonales de la planta, ya sea porque provoquen la pérdida de hormonas a través del sumidero radical o porque la bacteria produzca y libere reguladores del crecimiento que sean incorporados por la planta.

- Los que inducen un cambio en el metabolismo de la planta que suponga una mejora de su capacidad adaptativa. En este grupo tenemos mecanismos tan importantes como la inducción de resistencia sistémica frente a patógenos o la inducción de resistencia frente a salinidad.

1.13. Objetivos

Los objetivos generales planteados en el presente trabajo fueron los siguientes:

- Aislamiento y caracterización de sistemas biológicos (microorganismos y plantas) capaces de desarrollarse en presencia de agua de taladrinas.

- Desarrollo de sistemas biológicos planta-microorganismos capaces de biorremediar el agua de taladrina.

- Estudio de la toxicidad ambiental del agua de taladrina utilizando sistemas biológicos como testigos de toxicidad.

- Estudio de la diversidad funcional y estructural de un reactor biológico de membrana (R. B. M.) alimentado con taladrina pretratada como fuente de microorganismos altamente especializados para el desarrollo de sistemas de biorremediación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS: PUESTA A PUNTO DE UN SISTEMA DE CULTIVO OPTIMIZADO PARA LA FITORREMEDIACIÓN DE AGUA DE TALADRINA

2.1. Residuo industrial objeto de la fitorremediación: agua de taladrina

El agua de taladrina utilizada en este trabajo procede del residuo del líquido refrigerante utilizado por la empresa John Deere Ibérica S. A. (JDISA) durante su proceso productivo. La taladrina es una emulsión de agua y aceite (2%). Es un líquido que se utiliza para lubricar y refrigerar la zona de contacto entre las herramientas de corte y los materiales a mecanizar. De esta forma se impide que la temperatura aumente como consecuencia de la fricción y que las piezas y herramientas puedan incluso llegar a soldarse. Además, permite obtener mejor calidad en la superficie mecanizada y que las dimensiones de la pieza fabricada no varíen como consecuencia de la dilatación provocada por el calor.

Debido a su utilización como agente refrigerante en los equipos de fabricación de piezas, con el tiempo se rompe la emulsión perdiendo sus propiedades. La taladrina es analizada periódicamente y reutilizada siempre que sea posible. No obstante, cuando pierde sus propiedades fisicoquímicas se desecha sometiéndola a un tratamiento previo a su gestión. Este tratamiento consiste en un proceso físico que consta de las siguientes fases (Figura 2.1):

1. La taladrina bruta que ha perdido sus propiedades se almacena en un tanque de 25.000 litros.

2. Esta taladrina se trasvasa, por etapas, a un depósito de pretratamiento de 6.000 L. En este depósito, la taladrina es tratada mediante un separador de aceites (figura 2.2) que separa la porción oleosa de la taladrina, que al haber sido insolubilizada, es decantable por diferencia de densidad. Como resultado se obtiene la **taladrina pretratada**, que todavía contiene aceite emulsionado.

3. A través de una canalización inferior la **taladrina pretratada** se trasvasa a un equipo denominado Vacuest 200 (Figura 2.3), donde se realiza una ruptura de la emulsión a 87 °C y 500 mbares. El método, por lo tanto, consiste en romper la taladrina emulsionada por calentamiento de la misma al vacío. En este proceso, debido a la baja presión utilizada, se consigue evaporar el agua.

El Vacuest gestiona un caudal de 3,5 m³/h. Hace ciclos de entre 3 a 6 horas (dependiendo del nivel de saturación o concentración de la **taladrina pretratada**). El destilado obtenido se condensa y se pasa a una arqueta. Este residuo es el **agua de taladrina** (con la que trabajaremos en el desarrollo del presente trabajo).

La separación de agua y aceite en el Vacuest no es eficaz al 100%, por lo que en el **agua de taladrina** quedan restos de aceite que hacen que su valor de Demanda Química de Oxígeno (DQO) esté muy por encima del límite permitido por la **Ley 10/1993, de la Comunidad de Madrid, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento**. Por esta razón, normalmente, el agua de taladrina se vierte al sistema integral de saneamiento diluida con agua de diferentes procedencias para disminuir su DQO.



Figura 2.1. Etapas del proceso físico



Figura 2.2. Separador de aceites



Figura 2.3. VacuDest

2.2. Análisis químicos de las muestras de agua de taladrina

Antes de llevar a cabo los experimentos que se detallan más adelante, se realizaron análisis químicos del agua de taladrinas en los que se midieron los siguientes parámetros.

2.2.1. Demanda biológica de Oxígeno (DBO₅)

La DBO₅ es la cantidad de oxígeno consumida durante 5 días para eliminar la materia orgánica contenida en un agua mediante procesos biológicos aerobios. Por lo tanto, da una idea de la cantidad de oxígeno que requieren las bacterias para estabilizar la materia orgánica que puede descomponerse y de la cuál obtienen energía.

Para hacer que la prueba sea cuantitativa, las muestras se deben proteger del aire evitando la reaireación a medida que el nivel de oxígeno disuelto disminuye.

El equipo utilizado para medir la DBO₅ fue el WTW Oxitop IS 6 que realiza una medida de la presión en sistema cerrado. Los microorganismos que se encuentran en la muestra consumen oxígeno y generan CO₂ que es absorbido por NaOH creando una presión negativa que puede leerse directamente en forma mg/L (ppm).

A 435 mL de agua de taladrina se añaden 5 gotas de inhibidor de nitrificación (WTW inhibidor de nitrificación), que impide la acción de las bacterias nitrificantes para que ésta no interfiera en la medida y que el resultado obtenido provenga sólo de las bacterias degradadoras de la materia orgánica; y 2 lentejas de NaOH para retirar el CO_2 derivado del consumo de O_2 , formando carbonato sódico, de manera que la diferencia de presión causada por el CO_2 no interfiera en la medida. Las muestras se colocan en una plataforma de agitación con sistema térmico de circulación forzada de aire, que permite mantener la muestra a temperatura constante y una buena distribución de oxígeno. Transcurridos 5 días a 20 °C se mide la DBO_5 (Figura 2.4).

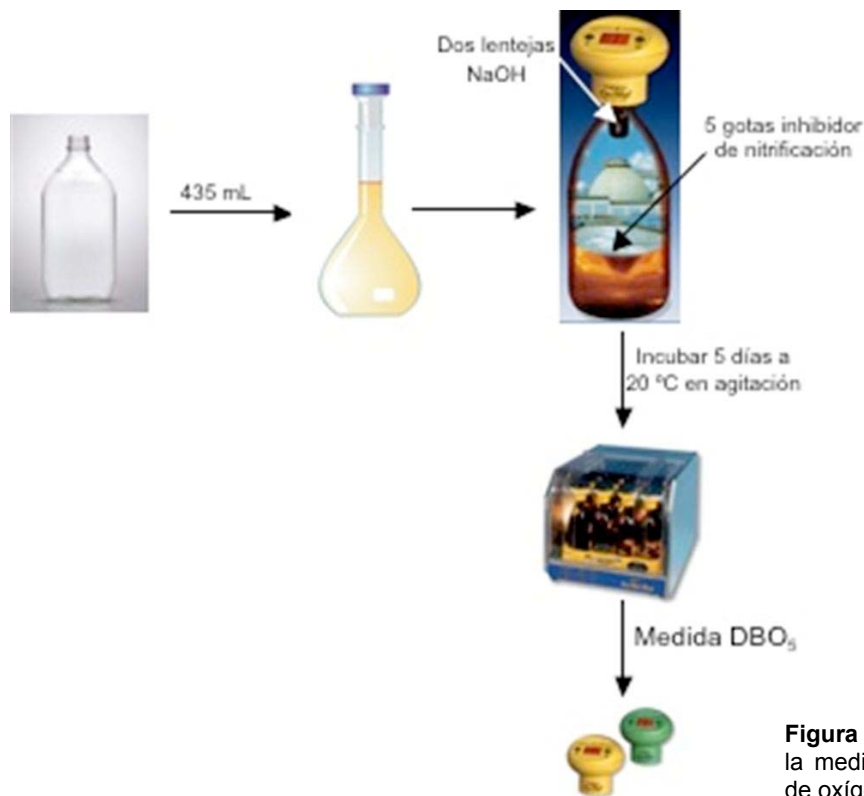


Figura 2.4. Proceso realizado para la medida de la demanda biológica de oxígeno (DBO_5).

2.2.2 Demanda química de Oxígeno (DQO)

La DQO es la medida de la cantidad total de oxígeno necesario para la oxidación de la materia orgánica a CO_2 y agua. Esta prueba se basa en que todos los compuestos orgánicos, con unas pocas excepciones, pueden ser oxidados por la acción de agentes oxidantes fuertes en condiciones ácidas.

El procedimiento utilizado es análogo al de la EPA 410.4, US Standar Methods 5220 D y también al de la ISO 15705. Se realiza a través de una digestión ácida en ambiente cerrado que consiste en un ataque con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ disuelto en H_2SO_4 , utilizando como catalizador sales de plata y sales de mercurio. Con este método se ataca a todos los compuestos que se pueden oxidar (materia orgánica, NH_4^+ , Fe^{2+} , etcétera) ya que el ión dicromato es un agente oxidante muy potente en soluciones fuertemente ácidas. Los cloruros son enmascarados con

sulfato de mercurio. Este valor indica la cantidad de oxígeno procedente de dicromato potásico que reacciona con las sustancias oxidables de un litro de agua.

Para realizar esta medida se utilizaron los test de celdilla de Merck que permiten medir en un rango de 500 mg/L a 10000 mg/L de DQO, en cada vial de este test están todos los reactivos ($K_2Cr_2O_7$, H_2SO_4 , sales de plata y sales de mercurio). Al vial se le añade 1 mL de la muestra. Tras calentarlos a 148 °C en un digestor (Thermoreaktor TR 300 Merck) durante 2 horas, se realizó la medida colorimétrica con el espectrofotómetro de Merck (Photometer SQ 118) (Figura 2.5).

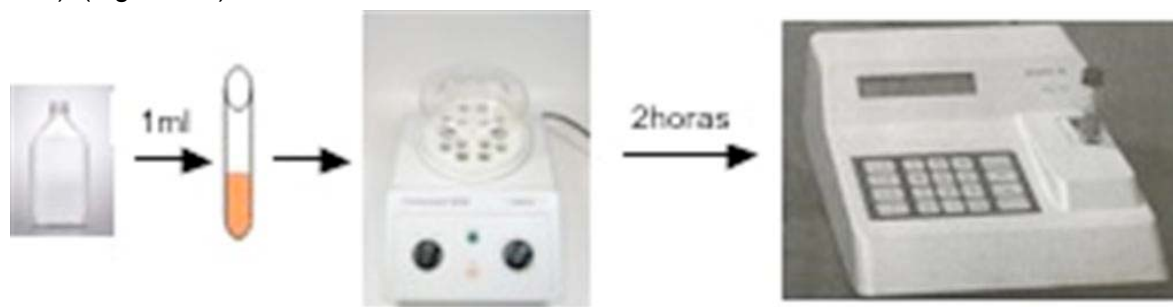


Figura 2.5. Proceso realizado para la medida de la demanda química de oxígeno (DQO).

2.2.3 Medida de pH

Para medir el pH se utilizó un pHmetro portátil CRISON micro pH 2001. La medida se realiza directamente en el agua de taladrina a temperatura ambiente (18 °C).

2.2.4. Conductividad eléctrica y residuo seco

Para medir la conductividad eléctrica se utilizó un equipo portátil CRISON micro CM 2201. Las muestras se midieron previa calibración del equipo con una solución de cloruro potásico 0,1 M que tiene una conductividad de 1.415 $\mu S/cm$ a 20 °C.

A partir de la medida de la conductividad se pudo conocer el residuo seco de una muestra. Este parámetro determina el peso de todas las sustancias disueltas de la muestra, sean o no volátiles y está directamente relacionado con la conductividad a través de la siguiente fórmula:

$$C (\mu S/cm) = A * R_s (ppm)$$

Siendo, a 18°C, los valores de A (modificado de Hem, 1959, página 40; Custodio, 1965):

- En casos extremos: $A = 0,86 - 1,72$

- En casos normales: $A = 1,15 - 1,56$. Para los cálculos utilizamos el valor medio de los dos suministrados para casos normales (1.355), ya que consideramos que aunque las muestras tenían restos aceitosos la concentración de éstos entraba dentro de la normalidad.

2.3. Análisis cuantitativo y cualitativo de los hidrocarburos (aromáticos y no aromáticos) en las muestras de agua de taladrinas

Dos litros de agua de taladrina se filtraron a vacío a través de un filtro de 0,45 µm. El líquido filtrado fue analizado por el SIDI (servicio interdepartamental de la Universidad Autónoma de Madrid), donde realizaron el siguiente procedimiento.

2.3.1. Análisis cualitativo de los hidrocarburos

2.3.1.1. Cromatografía de gases combinada con espectrometría de masas (GC/MS) cualitativo

Para realizar este análisis, se tomaron 100 mL de muestra y se extrajo con diclorometano (50 mL x 3). La fase orgánica se secó con sulfato sódico anhidro y se eliminó el disolvente. El residuo se redisolvió en 1 mL de diclorometano.

Condiciones cromatográficas:

- Equipo: Cromatógrafo Varian 3800 con triple cuadrupolo 1200 L
- Columna: Factor IV (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
- Flujo: 1 mL/min
- Temperatura del inyector: 250 °C
- Split: 50
- Volumen de inyección: 0,5 µL
- Modo de ionización: EI, scan 50-650 umas.
- Temperatura línea de transferencia: 250 °C
- Temperatura de la fuente: 200 °C
- Delay: 5.0 min
- Horno de columna (condiciones en tabla 2.1):

Tabla 2.1. Condiciones del horno de columna en el cromatógrafo Varian 3800.

Temperatura (°C)	°C/min	Hold	Total
40	0,0	2,0	5,00
300	15,0	1,0	20,33

Las muestras se analizaron mediante cromatografía de gases combinada con espectrometría de masas (GS-MS). Se utilizó un cromatógrafo de gases (Varian 3800 con triple cuadrupolo 1200 L), utilizando una columna Factor IV de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, a una temperatura de horno de 40 °C. Las temperaturas del inyector, de la línea de transferencia y de la fuente fueron de 250 °C, 250 °C y 200 °C respectivamente. Se utilizó el método de ionización por impacto electrónico (EI). Los espectros de masa se adquirieron mediante barridos desde 50 a 650 umas.

Una vez obtenido el cromatograma, se compararon los espectros de masas correspondientes a los picos más significativos del mismo con una librería de espectros de masas, para conocer con la mayor exactitud posible los compuestos más importantes de la muestra.

2.3.1.2. Microextracción en fase sólida (SPME)

Para realizar este análisis, se inyectó la muestra acuosa (1 mL), sin ningún tipo de tratamiento, en un cromatógrafo de gases empleando la técnica de inyección en SPME, acoplado a un detector de masas con el fin de determinar si la muestra contiene productos del tipo de hidrocarburos poliaromáticos (PAHs).

Con los cromatogramas obtenidos mediante esta técnica y de acuerdo con las condiciones cromatográficas utilizadas (las mismas que en el apartado 2.3.1.1), se comparó el espectro de masas y el tiempo de retención con un patrón de PAHs, con el objetivo de determinar la presencia de este tipo de compuestos.

2.3.2. Cuantificación de hidrocarburos totales

Se toman 1.000 mL de muestra y se extrae con disolvente de extracción éter de petróleo dopado con n-decano y tetracontano (50 mL x 1). Para ello, se añade sobre los 1.000 mL de agua 150 μ L de ácido clorhídrico y 50 mL del disolvente de extracción. Se deja agitar durante 15 min y se separa la fase orgánica de la acuosa. La fase orgánica se seca con sulfato sódico anhidro y se elimina el disolvente. El residuo se redisuelve en 1 mL de disolvente de extracción. Se inyecta esta disolución y la vista de la concentración resultante, dicha muestra se diluye 100 veces.

Condiciones cromatográficas:

- Equipo: Cromatógrafo Varian 3900 con detector FID
- Columna: Factor IV (Factor IV 30, 25 mm x 0,25 μ m)
- Flujo: 1 mL/min
- Temperatura del inyector: 300 °C
- Inyección en splittles.
- Volumen de inyección: 1 μ L

- Temperatura detector: 300 °C
- Horno de columna (condiciones en tabla 2.2):

Tabla 2.2. Condiciones del horno de columna en el cromatógrafo Varian 3900.

Temperatura	°C/min	Hold	Total
40	0,0	5,0	5,00
300	10,0	30,0	61,00

Las muestras se analizaron mediante cromatografía de gases en combinación con detección de ionización de llama. Se utilizó un cromatógrafo de gases (Varian 3900 con detector FID), utilizando una columna Factor IV de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, a una temperatura de horno de 40 °C. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 300 °C en ambos casos.

Para la cuantificación de esta muestra, se prepararon patrones de hidrocarburo total a distintas concentraciones en agua de grifo, siguiendo el mismo protocolo de extracción que el empleado para la muestra. Se crea así una curva de calibrado de los patrones extraídos. Los valores de la curva son: R²: 0,996 y RSD%: 18%

2.4. Análisis cuantitativo y cualitativo de los elementos químicos de las muestras de agua de taladrina

Para conocer los elementos químicos presentes en el agua de taladrina y saber si éstos varían en función de la DQO, se hizo un análisis de las muestras del 29/10/2008 (DQO de 5.622 ppm), 19/01/2009 (DQO de 1.930 ppm), 28/01/2009 (DQO de 5.281 ppm), 05/02/2009 (DQO de 2.363 ppm) y 13/02/2009 (DQO de 4.773 ppm).

Para evitar las interferencias producidas por las grasas presentes en la muestra, se realizó un filtrado al vacío de 45 mL de muestra, utilizando filtros de 0,45 µm. El líquido filtrado se analizó en el SIDI.

Se hizo un análisis cualitativo (espectros para determinar su perfil elemental) y un análisis cuantitativo (determinación de concentraciones) mediante TXRF (fluorescencia de rayos X por reflexión total). Para el análisis cuantitativo se estandarizó la muestra con un patrón de vanadio de concentración conocida.

El equipo usado es un espectrómetro de TXRF modelo EXTRA II, fabricante Rich & Seifert, año de fabricación 1990.

2.5. Bacterias utilizadas en los experimentos

2.5.1. Bacterias procedentes de la colección de cepas del grupo de investigación Biotecnología de la Rizosfera de la Universidad San Pablo-CEU: Cepas procedentes de la zona franca de Barcelona

La zona de donde se aislaron es propiedad de la empresa CLH (compañía logística de hidrocarburos) y tiene un amplio historial de vertidos de este tipo de compuestos.

Se encuentra situada en la zona franca de Barcelona y fue cedida para el muestreo debido a que la zona permanecía fuera de usos y servicios desde hacía varios años, lo que permitió el crecimiento de la vegetación espontánea de la zona. Dicha vegetación adaptada se utilizó como fuente rizosférica de microorganismos.

Las bacterias fueron aisladas del suelo libre (SL), de la rizosfera de *Piptatherum miliaceum* (figura 2.6, se designan con la letra H), de la rizosfera de *Conyza canadensis* (figura 2.6, se designan con la letra S) y de la rizosfera de *Ipomoea indica* (figura 2.6, se designan con la letra C).

Figura 2.6. Imagen de *Piptatherum miliaceum*, *Conyza canadensis* e *Ipomoea indica* eliminada porque procede de internet

En el Anexo 2 se adjunta una tabla en la que se recoge el nombre de cada cepa así como la morfología de la colonia y la de la bacteria.

2.5.2. Bacterias aisladas de agua de taladrinas

Para aislar estas bacterias se siguieron dos procedimientos:

2.5.2.1. Método de filtración

Se filtra al vacío 1 L de muestra con un equipo de filtración de Millipore y filtros de celulosa de 0,2 μm . Después, se puso a agitar el filtro durante una hora en un matraz estéril con 50 mL de sulfato magnésico 10 mM. Finalmente, se sembraron 200 μL en los medios: PCA (agar para métodos estándar, Pronadisa), TPYG (tristona, peptona, extracto de levadura y glucosa; descripción en el anexo 3), Agar nutritivo (Pronadisa), TSA (agar para soja triptófana, Pronadisa) y Medio King B (Pronadisa) para poder recoger la mayor diversidad bacteriana posible (Figura 2.7).

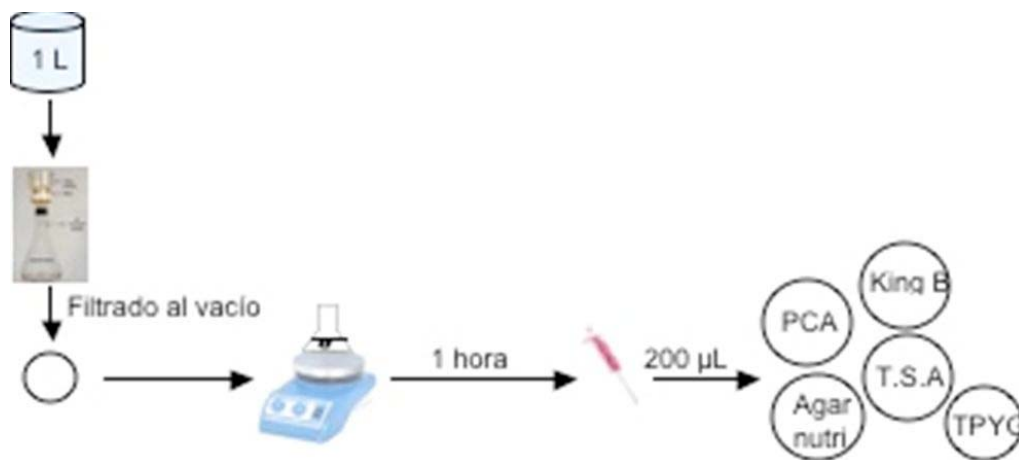


Figura 2.7. Método de filtración para aislar las bacterias existentes en las muestras de agua de taladrina.

2.5.2.2. Método de suspensiones-diluciones

Otra forma de extracción de bacterias consistió en realizar suspensiones-diluciones seriadas y sembrar posteriormente 10 μL de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} en placas de PCA, medio King, TSA, Agar nutritivo y TPYG (Figura 2.8).

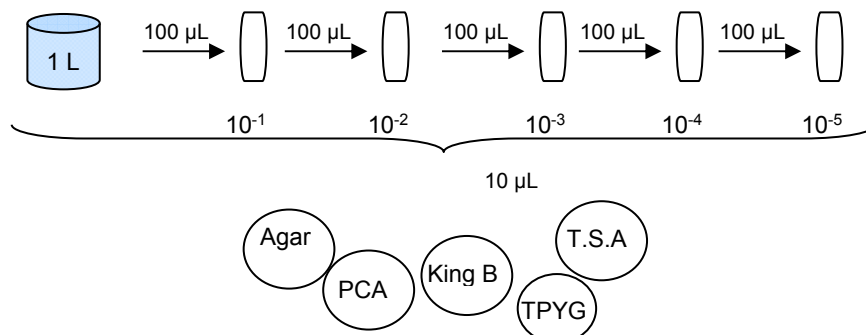


Figura 2.8. Método de suspensiones-diluciones para aislar las bacterias existentes en las muestras de agua de taladrina.

2.6. Determinación de la capacidad de las bacterias para crecer en presencia de agua de taladrinas

Para conocer en qué concentraciones de agua de taladrina eran capaces de crecer las bacterias, se sembraron en PCA suplementado con concentraciones crecientes de agua de taladrina:

- a) Control: Medio PCA.
- b) Medio PCA con 10% de agua de taladrina.
- c) Medio PCA con 50% de agua de taladrina.
- d) Medio PCA con 100% agua de taladrina.

Las bacterias crecieron en estufa a 25 °C durante 9 días. Después se observó cuáles habían crecido en los distintos medios.

2.7. Determinación de la capacidad de las bacterias para crecer en agua de taladrina como única fuente de nitrógeno y carbono

Del experimento anterior se obtuvieron 53 cepas capaces de crecer en PCA con 100% de agua de taladrina. Estas bacterias son las que aparecen en la tabla del anexo 4 y son las que se utilizan en este experimento.

En la determinación de la capacidad de las bacterias para utilizar el agua de taladrina como única fuente de nitrógeno y carbono se utilizaron 3 medios:

- a) Control: Medio PCA.
- b) Medio PCA con 100% de agua de taladrina. Se quería saber si las bacterias seguían teniendo la capacidad de crecer en el agua de taladrina.
- c) Medio agar-agar (Pronadisa) con 100% agua de taladrina. Este medio no tiene nutrientes, por lo que las bacterias que crezcan en él serán capaces de degradar las sustancias del agua de taladrina.

Se sembraron las bacterias en cada uno de los tratamientos y estuvieron en la estufa a 25 °C durante 9 días. En este caso, además de interesar la capacidad de las bacterias para degradar las sustancias del agua de taladrina, también se quería conocer cuánto tardaban en crecer las bacterias en cada uno de los medios, por lo que cada día se anotaba la aparición o ausencia de crecimiento bacteriano.

2.8. Clasificación taxonómica de las bacterias

Se extrajo el ADN genómico de cada bacteria con el kit Ultraclean™ Microbial DNA isolation (MoBio, CA, EE.UU.), según las indicaciones del fabricante.

Se amplificaron mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) los 1.500 pb correspondientes al gen que codifica para el ARN 16s ribosomal con los siguientes cebadores: directo 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' y reverso 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3' (Devereux y Willis, 1995) en una concentración 0,5 µM cada uno, en una reacción de 25 µL, 1X de 10X PCR Buffer con Mg (Roche), 1,5% de 100% de DMSO (dimetilsulfóxido), 250 µM de cada dNTPs (desoxiribonucleótidos trifosfato), 1.4 unidades de ADN polimerasa (UltraTools DNA Polymerase de Biotools), 100 ng de ADN bacteriano y completado con agua.

La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp 2700 (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 94 °C 2 minutos, seguido de 10 ciclos de 94 °C 30 seg, 50 °C 30 seg y 72 °C 1 minuto, seguido de 20 ciclos de 94 °C 30 seg, 50 °C 30 seg y 72 °C 1 minuto (incrementando 5 segundos en cada ciclo) y finalizando con 7 minutos a 72 °C.

Los productos de PCR se redisolieron en gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE 1×) con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) y se visualizaron en un analizador de imagen GelDoc2000™ 170-8126 (BioRad, CA, EE.UU.).

Una vez comprobada la amplificación, se cortaron las bandas correspondientes a los fragmentos de PCR y se purificaron con el kit Qiaquick^R Gel Extraction kit de Qiagen.

Una vez purificadas, se enviaron para su secuenciación al Centro de Genómica y Proteómica, Unidad de Genómica, Facultad de CC. Biológicas-Servicio de Secuenciación de la Universidad Complutense de Madrid. La secuenciación se llevó a cabo en un equipo ABI PRISM[®] 3730 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Se utilizaron los mismos cebadores empleados en la amplificación.

Las secuencias se compararon en el GenBank por BLAST (Basic local alignment search tool) 2.2.6 (Altschul *et al.*, 1997) en la base de datos del GeneBank (NCBI BLAST^R Home page) estableciendo el grado de homología de las 53 cepas con las presentes en la base de datos.

El ensamblaje y alineamiento de las secuencias se realizó con el programa Clustal X 1.81.

2.9. Cinética de crecimiento de las cepas bacterianas en agua de taladrina

Se construyó una gráfica con los porcentajes de representatividad de los géneros obtenidos en la clasificación taxonómica de las cepas. En base a esta gráfica se eligieron al azar diez cepas de los géneros con mayor representatividad y se determinó su velocidad de crecimiento en agua de taladrina.

Las cepas se crecieron en 25 mL de caldo nutritivo durante 48 horas a 250 rpm y a 25°C. Se realizó un conteo de las unidades formadoras de colonia (u. f. c.) mediante el método gota (Hoben y Somasegaran, 1982).

Una vez conocido el número de u. f. c., se centrifugó el medio durante 10 minutos a 3.930 r. p. m. Se retiró el sobrenadante y se recogió la masa bacteriana precipitada con 5 mL de caldo nutritivo. Después se añadieron 45 mL de agua de taladrina con una DQO de 2.759 ppm y solución nutritiva de Hoagland (Sigma) en cantidad suficiente para alcanzar una concentración de 1 g/L en el medio (este nutriente es el que añadimos en los experimentos realizados con las plantas y necesitamos conocer su influencia en las bacterias para tenerlo en cuenta en el diseño de los sistemas planta-microorganismo).

Los matraces se dejaron en agitación durante 7 días, realizando conteos periódicos para conocer el crecimiento de las poblaciones bacterianas en el agua de taladrina (Figura 2.9).

Las cepas utilizadas fueron:

- C1 19: *Nocardioides* sp. AB461091.1
- C1 28: *Pseudoclavibacter helvolus*. AM284988.1
- C2 36: *Stenotrophomonas* sp. EU734616.1
- S1 24: *Promicromonospora* sp. AM992980.1
- TP5: *Bacillus licheniformis*. DQ979417.1
- TP9: *Bacillus licheniformis*. EF439666.1
- TP10: *Brevibacillus* sp. FJ71933.1
- TP11: *Bacillus thuringiensis*. FJ755919.1
- TP16: *Paenibacillus* sp. S000392964.1
- TP18: *Lysinibacillus sphaericus*. EU741101.1

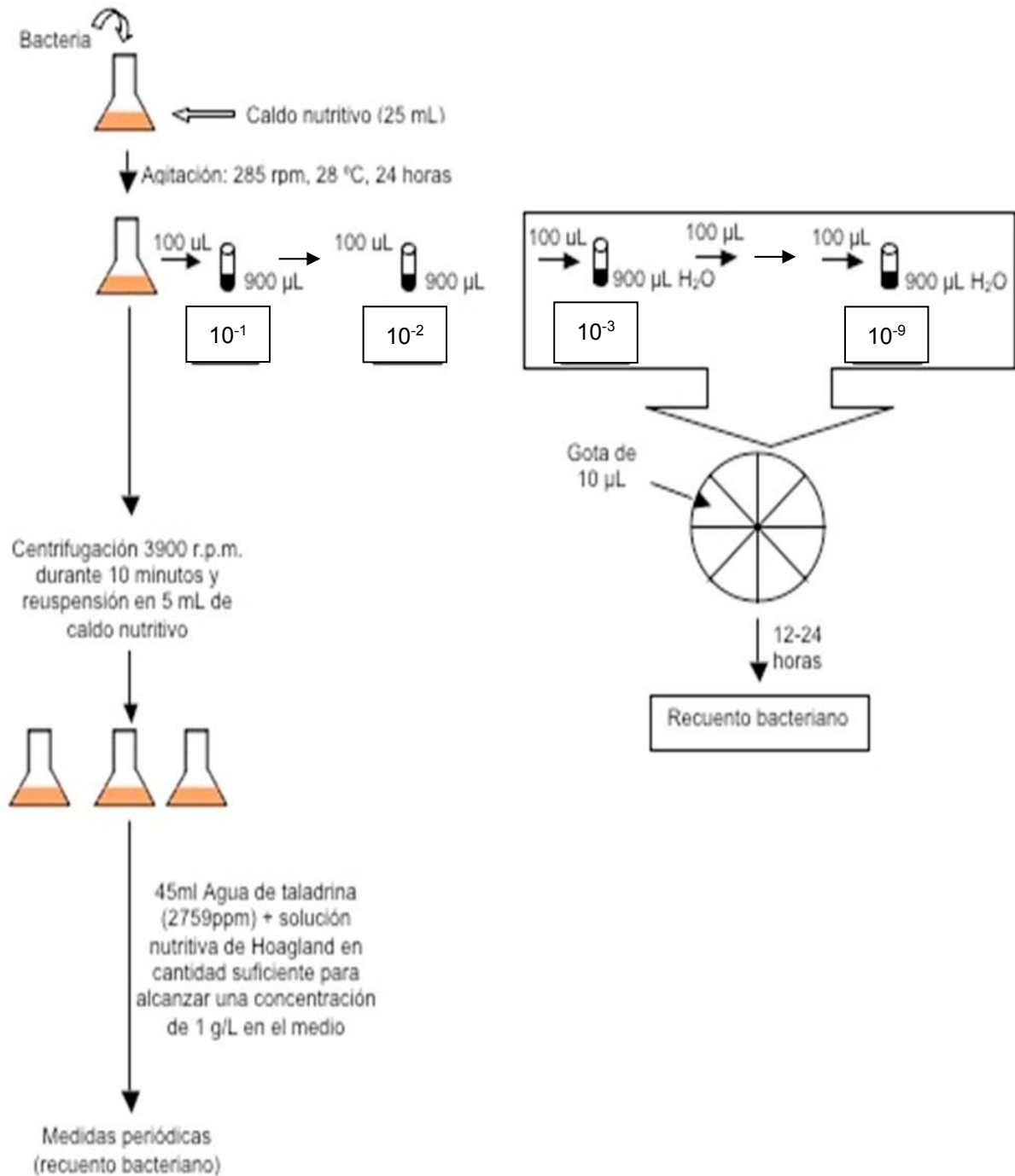


Figura 2.9. Experimento para conocer la evolución de las cepas bacterianas en agua de taladrina.

2.10. Especies vegetales utilizadas en los experimentos de fitorremediación

Las plantas utilizadas se escogieron en base a una amplia búsqueda bibliográfica. Una vez llevada a cabo dicha búsqueda se seleccionaron las especies de las que fuese más fácil obtener y proveerse de semillas, ya que el objetivo final es escalar esta investigación a nivel industrial, por lo que el procedimiento ha de ser lo más sencillo y menos costoso posible.

2.10.1. Especies con hábitos terrestres

Se decidió el ensayo de las siguientes plantas: Alfalfa (*Medicago sativa*), Altramuz (*Lupinus sp*), Arroz (*Oryza sativa*), Girasol (*Helianthus annuus*), Judía (*Phaseolus vulgaris*), Maíz (*Zea mays*), Mostaza negra (*Brassica nigra*) y Mostaza Blanca (*Sinapis alba*).

a) Alfalfa (*Medicago sativa*): planta perenne de 10-80 cm, herbácea, de pilosidad variable. Hojas trifoliadas, folíolos obovados, más o menos estrechos, con el margen aserrado en su extremo, el central peciolulado, estípulas subenteras. Flores con corola de violeta a púrpura o amarilla. Inflorescencia con numerosas flores en racimos densos terminales, con pedúnculo más largo que la hoja adyacente. Legumbre de espiralada (2-3 espiras abiertas) a falcada (Figura 2.10).

Esta especie ha sido utilizada en procesos de fitorremediación de metales (Bonfranceschi *et al*, 2009; Singh *et al*, 2009). También fue utilizado en procesos de fitorremediación de hidrocarburos, en los que se observó que tiene un bajo potencial para fitorremediar estos compuestos pero que sin embargo es capaz de mantener un alto número de microorganismos rizosféricos, incluyendo aquellos capaces de biodegradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) (Muratova *et al.*, 2008). Otro uso identificado (Narayanan *et al.*, 1995) es como especie fitodegradadora de lugares contaminados con tricloro etileno (TCE) y 2,4,6-tricloroanisol (TCA).

Figura 2.10. Imagen de plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) eliminada porque procede de internet.

b) Altramuz (*Lupinus sp.*): Pertenece a la familia *Fabaceae* subfamilia *Lotoideae*, tribu *Genisteas*. Son hierbas anuales o vivaces, con hojas palmado-compuestas, estípulas concrecentes en la base del peciolo, inflorescencia en racimos terminales con las flores verticiladas o alternas, cáliz profundamente bilabiado, estambres monadelfos (Figura 2.11).

El nombre *Lupinus* procede del latín *Lupus*, que significa Lobo. Este término hace referencia a la voracidad que tienen estas plantas para utilizar nutrientes del suelo que no están disponibles para otras plantas (Meredith, 1988). Esta capacidad se debe a la formación de “proteoid roots”, manojos de raíces laterales que se forman en situaciones de baja disponibilidad de fósforo, y a la exudación de ácidos orgánicos que movilizan nutrientes por procesos de quelación (Gerke *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 1994).

Es una planta que se adapta con gran facilidad a condiciones de estrés derivadas de suelos extremadamente pobres, sequías, heladas, altas concentraciones de aluminio, etcétera, por lo que tiene un enorme valor en el desarrollo de la agricultura sostenible, que implica el mínimo uso de fertilizantes, pesticidas, correctores de crecimiento, etcétera (Foy, 1992, 1993). Además, es capaz de acumular metales (Reay y Waugh, 1981; Carpena *et al.* 2001; Ximenez-Embún *et al.* 2001; Vera *et al.* 2002; Pastor *et al.*, 2003).

Figura 2.11. Imagen de plantas de altramuz (*Lupinus sp.*) eliminada porque procede de internet

c) Arroz variedad Thaibonnet R-1 (*Oryza sativa*): El arroz (género *Oryza*) tolera el calor, la humedad, las inundaciones y el frío, y se da en suelos salinos, alcalinos y ácidos (Figura 2.12).

Esta planta ha sido utilizada en procesos de fitorremediación de metales (Murakami y Ae, 2009), de hidrocarburos (Su y Yang, 2009).

Figura 2.12. Imagen de plantas de arroz (*Oryza sativa*) eliminada porque procede de internet.

d) Girasol Híbrido F-1 SH-25 (*Helianthus annuus*): Pertenecen a la familia *Compositaceae*. Presenta flores internas parduscas de hasta 2,8 m. Los capítulos tienen lígulas amarillas (Figura 2.13).

Esta especie ha sido utilizada en procesos de fitorremediación de zonas contaminadas con elementos radiactivos (Vera Tomé 2008), de metales (Simon *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008), de hidrocarburos (Besalatpour *et al.*, 2008).

Figura 2.13. Imagen de plantas de girasol (*Helianthus annuus*) eliminada porque procede de internet

e) Judía (*Phaseolus vulgaris*): Planta anual de la familia de las leguminosas, de tallo trepador que alcanza hasta los 3 m de altura en algunas variedades y de tallo rastrero en otras. Los frutos son unas vainas verdes o amarillas que contienen varias semillas de forma arriñonada (Figura 2.14).

Esta especie ha sido utilizada en procesos de fitorremediación de metales como en el trabajo realizado por Yang *et al.* (2008), de hidrocarburos (Dominguez-Rosado, 2004; Dominguez-Rosado y Pitchel, 2004).

Figura 2.14. Imagen de plantas de judía (*Phaseolus vulgaris*) eliminada porque procede de internet

f) Maíz (*Zea Mays*): Perteneciente a la familia *Gramineae*. Es una planta anual sin ramas vegetativas. Tallos hasta 4 m y 2-5 cm de diámetro, erecto, no fistuloso, radicante en los nudos inferiores. Hojas 3-12 cm de ancho, planas, unduladas; lígula ciliada y truncada de 3-5 mm. Inflorescencia masculina en panícula de más de 20 cm, con espiguillas de 6-15 mm. Inflorescencias femeninas laterales con eje engrosado sobre el que se disponen densamente las flores recubiertas por varias brácteas foliáceas. Espiguillas con una sola flor fértil; glumas y glumillas cortas. Estilos muy largos de 15-40 cm, exertos por el ápice de la inflorescencia desde la antesis y bífidos en el ápice. Fruto, cariopsis, cuneiforme en la base y convexo a truncado (o deprimido) en el ápice (Figura 2.15).

Esta planta ha sido utilizada en procesos de fitorremediación de hidrocarburos (Dominguez-Rosado, 2004; Dominguez-Rosado y Pichtel, 2004), de metales (Murakami y Ae, 2009).



Figura 2.15. Plantas de maíz (*Zea mays*).

g) Mostaza negra (*Brassica nigra*): Pertenece a la familia *Cruciferae* o *Brassicaceae*. Tiene frutos adosados al tallo de hasta varios metros. Pétalos amarillos con venas más oscuras. Aparece en cultivos, cunetas y caminos (Figura 2.16).

Esta especie ha sido utilizada en procesos de fitorremediación de metales (Angelova y Ivanov, 2009), de hidrocarburos (Singer *et al.*, 2003a).

Figura 2.16. Imagen de plantas de mostaza negra (*Brassica nigra*) eliminada porque procede de internet

h) Mostaza Blanca (*Sinapis alba*): Pertenece a la familia *Cruciferae*. Tiene el fruto con el pico muy aplastado. Tiene un tamaño de hasta 90 cm. Pétalos amarillos. Aparece en cultivos, escombreras y caminos (Figura 2.17).

Esta especie ha sido utilizada en procesos de fitorremediación de metales (Evangelou *et al.*, 2007), de hidrocarburos (Hynes *et al.*, 2004).

Figura 2.17. Imagen de plantas de mostaza blanca (*Sinapis alba*) eliminada porque procede de internet

2.10.2. Especies con hábitos acuáticos

Se decidió el ensayo de las siguientes plantas: Ciperó (*Cyperus alternifolius*), Elodea (*Elodea canadensis*), Espadaña (*Typha dominguensis*), Jacinto de agua (*Eichornia crassipes*), Lenteja de agua (*Lemna minor*) y *Myriophyllum*.

a) Ciperó (*Cyperus alternifolius*): Planta herbácea perenne, cespitosa, con los tallos de sección triangular. Generalmente, de poco más de medio metro de altura. En el extremo llevan una umbela de hojas de forma oblongolanceolada y de consistencia cartilaginosa. Flores de color blanquecino, reunidas en panículo. Se encuentra en márgenes de ríos y cursos de agua (Figura 2.18).

Se han utilizado en procesos de fitorremediación, como *Cyperus malaccensis*, en suelos contaminados con pireno (Wang *et al.*, 2008) o *Cyperus aggregatus*, en la descontaminación de suelos contaminados con petróleo (Merkl *et al.*, 2005a).



Figura 2.18. Plantas de Ciperó (*Cyperus alternifolius*).

b) Espadaña (*Typha dominguensis*): Pertenece a la familia *Typhaceae*. Presenta hojas lineares, cuya vaina envuelve al tallo. Las vainas, generalmente, no tienen orejuelas. La parte femenina de la espiga es de unos 15-25 cm. Las flores femeninas tienen escamas parduscas. Presentan estigmas lineares de más de 2,5 m en lagunas, marismas y sitios muy húmedos o encharcados (Figura 2.19).

Ha sido utilizada en la biorremediación de metales (Debusk. *et al.*, 1996; Gallardo-Williams *et al.*, 2002). Además, existen trabajos en los que se han utilizado la *Typha angustata* L. o *Typha latifolia* para extraer o inmovilizar metales pesados (Chandra *et al.*, 2008; Maiti y Jaiswal, 2008); *Typha orientalis* para descontaminar suelos contaminados con Pireno (Wang *et al.*, 2008); *Typha latifolia* y *Typha angustifolia* para descontaminar aguas contaminadas con uranio, metales pesados, arsénico y sulfatos (Groudeva *et al.*, 2004).

Figura 2.19. Imagen de plantas de espadaña (*Typha dominguensis*) eliminada porque procede de internet

c) Elodea (*Elodea canadensis*): Planta acuática que crece en largos cordones separados por verticilos foliares dispuestos a lo largo de los tallos, con hojas dispuestas en roseta muy concentradas, con forma ovalada y tamaño de 2,5 mm de ancho y de 5 a 10 mm de largo, de color verde intenso. Consta de un tallo largo (5 a 15 cm) y ramificado. A cualquier altura de los tallos pueden emerger raíces adventicias que se dirigen rápidamente hacia el fondo. Vive bajo el agua, salvo sus pequeñas flores que flotan, unidas a la planta por tallos (Figura 2.20).

Vive en aguas estancadas o con escasa corriente. La planta crece en un amplio rango de condiciones, desde zonas muy sombreadas a agua profunda, y en muchos tipos de sedimento. Son plantas que liberan sustancias antibacterianas, contribuyendo a oxigenar el agua.

Esta especie ha sido utilizada para fitorremediar aguas contaminadas con níquel (Hansen *et al.*, 2011) y compuestos organofosforados (Gao *et al.*, 1999)

Figura 2.20. Imagen de plantas de Elodea (*Elodea canadensis*) eliminada porque procede de internet

d) Jacinto de agua (*Eichornia crassipes*): Pertenece a la familia de las *Pontederiaceas*. Es una planta perenne, acuática flotante, con hojas sumergidas lineares y las emergidas entre obovadas y redondeadas, provistas de pequeños hinchazones que facilitan la flotación. Flores de color azulado más o menos claro o bien liliácea, con morfología que recuerda vagamente a la del jacinto (Figura 2.21).

Esta especie es una buena acumuladora de metales pesados como se recoge en distintos trabajos de investigación (Cordes *et al.*, 2000; Kelley *et al.*, 2000; Klumpp *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002; Jayaweera, 2007; Alvarado *et al.*, 2008).

Figura 2.21. Imagen de planta de jacinto de agua (*Eichornia crassipes*) eliminada porque procede de internet

e) Lenteja de agua (*Lemna minor*): Pertenece a la familia *Lemnaceae*. Pequeña planta acuática de 1,5-5 mm, flotante, opaca. Tiene forma casi asimétrica, de elíptica a estrechamente ovada u obovada, con el ápice redondeado y plana por ambas caras, habiendo en la inferior 10 a 20 celdillas de 0,1-0,25 mm y 3 nervios, además de una raíz simple. Está formada por 2-3 hojas redondas-ovaladas. Florece en la superficie del agua y, debido al pequeño tamaño de las flores, su determinación se realiza atendiendo a la morfología de la lámina. Tiene dos bolsas laterales donde aparecen las flores, que están formadas por dos estambres y un ovario unilocular, globoso, con el estilo corto, encerrados en una vaina y ésta a su vez en la bolsa. Presenta rafidios. El fruto es un utrículo con 1-4 semillas con costillas longitudinales, más raramente lisas (Figura 2.22).

Vive en aguas estancadas y remansos de ríos, desde el nivel del mar hasta los 600 m de altitud. Se reproducen por vía vegetativa, con una tasa de reproducción muy elevada.

Esta planta ha sido utilizada para fitorremediar aguas contaminadas con arsénico (Alvarado *et al.*, 2008), plomo (Hurd y Stenberg, 2008). También se ha utilizado para descontaminar 2,4,5 triclorofenol (Tront y Saunders, 2006).

Figura 2.22. Imagen de plantas de lenteja de agua (*Lemna minor*) eliminada porque procede de internet

f) Mienrama de agua (*Myriophyllum*): Pertenece a la familia de las *Haloragaceas*. Planta acuática, perenne, de tallos más o menos erguidos. El sistema radicular que desarrolla está adaptado para anclarse al sustrato, aunque también puede desarrollar raíces adventicias desde sus tallos y vivir sólo de ellas. Las hojas poseen segmentos filiformes que le dan un aspecto plumoso y están dispuestas alrededor de un tallo robusto, las que se encuentran sobre el agua están más tiesas que las sumergidas. Las flores son pequeñas con cuatro pétalos y se encuentran en puntos terminales (Figura 2.23).

Esta especie ha sido utilizada en procesos de fitorremediación de pesticidas (Turgut, 2005) y compuestos orgánicos (Rodríguez *et al.*, 2010).

Figura 2.23. Imagen de plantas de mienrama de agua (*Myriophyllum*) eliminada porque procede de internet

2.11. Determinación de la capacidad de germinación, en agua de taladrina, de las semillas de las especies con hábitos terrestres

Las semillas se esterilizaron con hipoclorito sódico al 20%, agitando durante 5 minutos, y luego 5 aclarados con agua destilada estéril y se sembraron en placas de ABE-agar bacteriológico europeo (10 semillas por tratamiento y 3 réplicas de cada uno), conteniendo diferentes % de agua de taladrina. Los tratamientos utilizados fueron:

- Control: ABE con agua destilada.
- 10% agua de taladrinas: ABE con agua de taladrinas al 10%.
- 50% agua de taladrinas: ABE con agua de taladrinas al 50%.
- 100% agua de taladrinas: ABE con agua de taladrinas al 100%.

Las placas se mantuvieron en una estufa a 28 °C y en oscuridad durante 8 días (Figura 2.24).

Diariamente se contó el número de semillas germinadas en cada uno de los tratamientos y de las réplicas, el primer recuento se realizó a las 24 horas desde que se pusieron a germinar las semillas.

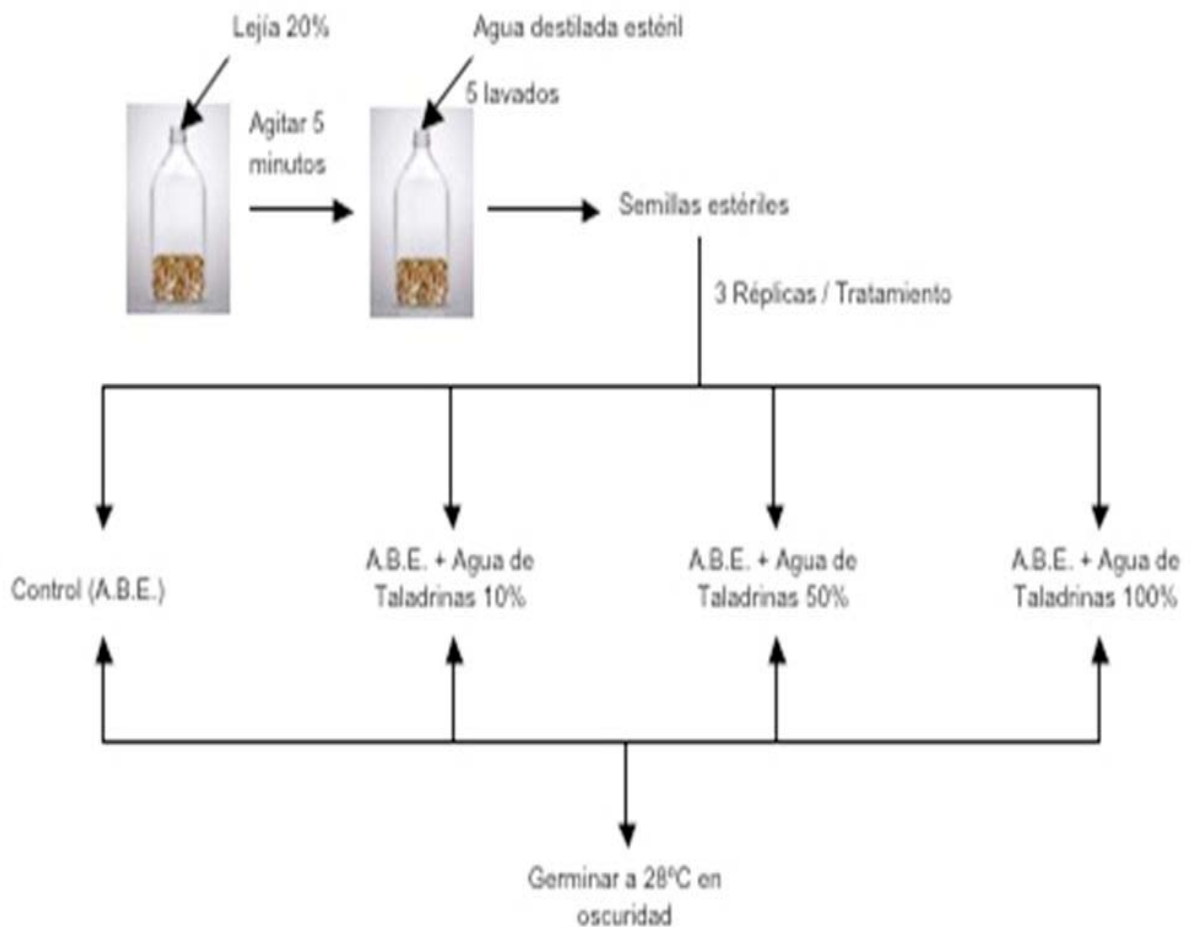


Figura 2.24. Experimento para determinar la capacidad de diversas semillas para germinar en las muestras de agua de taladrina.

2.12. Determinación de la capacidad de crecimiento en agua de taladrina

En primer lugar se seleccionó un soporte que permitiese el enraizamiento de las plantas. Para ello, se probaron la fibra de coco, la estopa comercial y finalmente el esparto. Se observó que este último era el único que garantizaba no sólo el enraizamiento de la planta sino también su correcto desarrollo.

Plántulas procedentes de semillas previamente pregerminadas en placas de ABE durante 48 horas (en este caso, la esterilización fue etanol al 70%, agitando durante 30 segundos, hipoclorito sódico al 5% con una gota de tween 20, agitando durante 6 minutos y 5 aclarados con agua destilada estéril), se pusieron en contenedores de 1 litro de volumen que contenían esparto como soporte y una rejilla metálica, en experimentos anteriores se probaron otros soportes (ver capítulo 4). Se pusieron 8 semillas por contenedor y se dejaron en agua unos 15 días, hasta que alcanzaron una altura que garantizaba un buen desarrollo radical para poder resistir mejor la contaminación, momento en el cual se cambió el agua por agua de taladrina (4.500 ppm en un primer experimento y 1.930 ppm en el segundo) con 1 g/L de solución nutritiva de Hoagland (Sigma – Aldrich) (Figura 2.25).

Para oxigenar el agua se utilizó una bomba de oxigenación (Optima Air Pump) y difusores, creando un sistema conectado mediante T's de manera que a cada tratamiento le llegase la misma cantidad de aire. Se mantuvo la temperatura a unos 25-30 °C, en condiciones de luz ambiental.



Figura 2.25. Experimento para determinar la resistencia de las semillas al agua de taladrina.

2.13. Determinación de la capacidad de desarrollo en agua de taladrina de las plantas con hábitos acuáticos

En colaboración con el equipo de investigación del Dr. José María Becerril (Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Universidad del País Vasco) se desarrollaron distintos experimentos para conocer la capacidad de supervivencia y biorremediación de distintas especies acuáticas.

En todos los casos, las plantas estuvieron en contacto con el medio a fitorremediar durante 5 días. El pH de dicho medio y de la solución control se ajustó a 6,4.

2.13.1. Experimentos con *Lemna minor*

Se pesaron 0,155 g de plantas de *Lemna minor* y se colocaron en placas petri de 6 cm de diámetro con 15 mL de la solución de tratamiento. Como medio nutritivo se utilizó medio Hutner, 1953 (anexo 3) a la mitad de la concentración normal.

Los ensayos se realizaron en cámaras de cultivo con una iluminación de 300 mmol/(s*m²), una humedad relativa de entre un 60 y un 70% y una temperatura de entre 18 y 25 °C.

Se realizaron distintos tratamientos (figura 2.26):

- Control: Solución Hutner a ½ concentración.

- Taladrina pretratada (apartado 2.1): Se realizaron distintas diluciones de manera que se obtuvieron valores de DQO finales de 2.885 ppm, 2.324 ppm, 1.772 ppm, 1.396 ppm, 821 ppm y 309 ppm. Se añadió el medio nutritivo Hutner en una concentración de ½.

- Agua de taladrina (apartado 2.1): Se realizaron distintas diluciones obteniendo valores de DQO finales de 2.220 ppm, 1.819 ppm, 1.563 ppm, 737 ppm y 185 ppm. Se añadió el medio nutritivo Hutner en una concentración de ½.

En cada tratamiento, se realizaron medidas de peso fresco de las plantas, medidas de su capacidad fotosintética mediante la detección de la fluorescencia emitida por el fotosistema II (PSII) y determinación de pigmentos fotosintéticos.

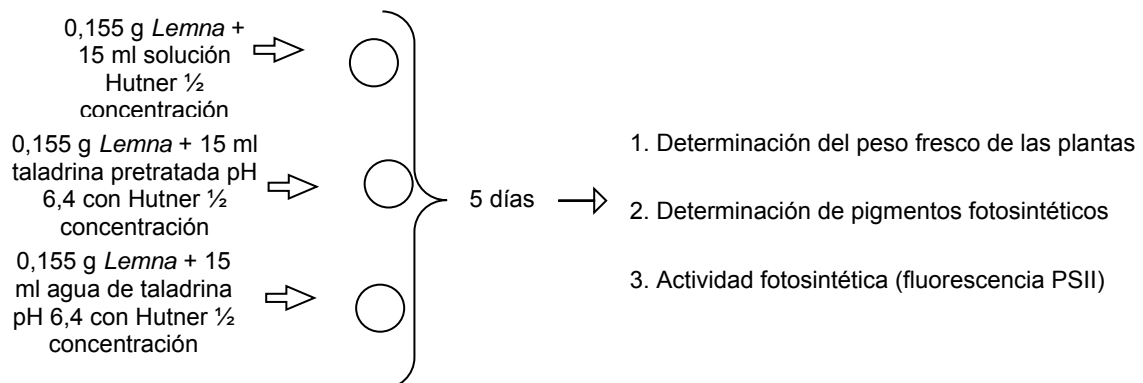


Figura 2.26. Experimento para determinar la capacidad de *Lemna minor* para fitorremediar la taladrina pretratada o del agua de taladrina.

a) Las medidas de fluorescencia de la clorofila se realizaron con un fluorímetro portátil (OS5-FL, Optosciences, Tyngsboro, MA) a temperatura ambiente con hojas adaptadas la oscuridad durante al menos 30 minutos o, en su defecto, sometiendo el tejido foliar a una luz *Far Red* (160 nm durante 60 seg.) para excitar selectivamente el fotosistema I (PSI) y producir una oxidación de todos los intermediarios de la cadena fotosintética.

La fluorescencia máxima (F_m) se midió usando una luz modulada emitida por una fuente de luz con un máximo de 660 nm, con un pulso de saturación emitido por una lámpara halógena de 35 vatios y una intensidad de $8.800 \mu E/(m^2s)$. De esta manera, se consigue una reducción completa de la Quinona (Q_A) y se remite la luz de excitación como fluorescencia. La máxima eficiencia fotoquímica del PSII se estimó por el cociente $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$ (Genty *et al.*, 1989).

b) Análisis de pigmentos y antioxidantes lipofílicos: Los pigmentos fotosintéticos y los antioxidantes lipofílicos (carotenoides y tocoferoles) fueron determinados mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de fase reversa siguiendo el método descrito por García-Plazaola y Becerril (1999) con las modificaciones de García-Plazaola y Becerril (2001) y Polle *et al.* (2001).

La toma de muestras se realizó en tejido adaptado a la oscuridad, "condiciones de *pre-dawn* artificial" (García-Plazaola *et al.*, 2000; Tausz *et al.*, 2003). El material fresco (alrededor de 0,02 g peso fresco - PF) se congeló en nitrógeno líquido y fue almacenado a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis.

La extracción se realizó mediante un homogenizador eléctrico modelo Tissue Tearor 985370 a 5.000 rpm en 1 mL de acetona 100% con carbonato cálcico (0,5 g/L) para evitar que las trazas de ácidos pudiesen alterar los pigmentos. Los extractos se centrifugaron a 13.200r.p.m. a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 minutos, se recogió el sobrenadante y se pasó por un filtro de Politetrafluoroetileno (PTFE) de $0,22 \mu\text{m}$.

El análisis cromatográfico se realizó usando un equipo HPLC Waters (Milford, MA, USA) equipado con dos bombas modelo 510, un autoinyector modelo 717 Plus, un detector de fotodiodos modelo PDA 996 y un detector de fluorescencia modelo SFD 474. El sistema cromatográfico estaba controlado por el programa Empower Pro (Waters Corporation, USA). La cromatografía se realizó en una columna de fase reversa Spherisorb ODS-1 de tamaño de partícula de $5 \mu\text{m}$, $4,6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ (Waters, Irlanda) precedida de una columna guarda Nova-Pak C-18 de tamaño de partícula de $4 \mu\text{m}$, $3,9 \text{ mm} \times 20 \text{ mm}$ (Waters, Irlanda).

La fase móvil se compuso de dos solventes, solvente A: acetonitrilo: metanol: tampón Tris-HCl (0.1 M pH 8) (84:2:14) y el solvente B: metanol: acetato de etilo (68:32). Los pigmentos y tocoferoles fueron separados en 25 minutos, usando un gradiente lineal de 100% de A a 100% de B para los 10 primeros minutos, seguidos de una elución isocrática de 100% de B durante 6 minutos. A continuación se estableció un gradiente lineal de 1 minuto de 100% de B a 100% de A, y se mantuvo una elución isocrática de 100% A durante los posteriores 8 minutos para re-equilibrar la columna hasta el análisis de la siguiente muestra. El flujo de los

solventes fue de 1,2 mL/min, con una presión de alrededor de 800 psi. El volumen de inyección fue de 15 μ L.

c) Detección de clorofilas y xantofilas: Las clorofilas (a y b), xantofilas y carotenos se identificaron y cuantificaron a 445 nm según García-Plazaola y Becerril (1999). Los coeficientes de conversión se encuentran en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Longitud de onda de absorción máxima y coeficiente de conversión para xantofilas, clorofilas y carotenoides.

Compuesto	λ máx. (nm)	Coficiente de conversión (10^{-4} pmol*s/ μ V)	Compuesto	λ max (nm)	Coficiente de conversión (10^{-4} pmol*s/ μ V)
Neoxantina	437,466	1,80	Zeaxantina	451,481	1,62
Violaxantina	441,471	1,54	Clorofila b	469,656	4,14
Anteraxantina	446,476	1,54	Clorofila a	435,666	4,79
Luteína	446,476	1,46	β -caroteno	451,480	1,91

d) Detección de tocoferoles y feofitinas: Simultáneamente se determinaron porfirinas y tocoferoles mediante un detector de fluorescencia SFD 474 como se describe en García-Plazaola y Becerril (1999). El SFD iniciaba el programa con una λ_{ex} 440 y λ_{em} 630 hasta el minuto 7 y mantenía una λ_{ex} 295 y λ_{em} 340 hasta el minuto 15 y acababa el programa con una λ_{ex} 413 y λ_{em} 669. Los tiempos de retención y los coeficientes de conversión se encuentran en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Longitud de onda de excitación y emisión y factor de conversión para protoclorofilida, tocoferol y feofitina.

Compuesto	λ excitación (nm)	λ emisión (nm)	Coficiente de conversión (10^{-4} pmol*s/ μ V)
Protoclorofilida	440	630	9,2
δ -tocoferol	290	340	1,87
γ -tocoferol	290	340	3,8
α -tocoferol	290	340	9
Feofitina b	413	661	2,93
Feofitina a	413	661	9,12

2.13.2. Experimentos con *Myriophyllum* y *Elodea*

Se pesaron entre 2 y 4 g de plantas de *Myriophyllum* y 1 g de peso fresco para las plantas de *Elodea*. En esta ocasión, se utilizaron recipientes con 200 mL de capacidad.

Como medio nutritivo se utilizó medio Hutner (1953) a un cuarto de la concentración normal (anexo 3).

Los ensayos se realizaron en cámaras de cultivo con una iluminación de 150 mmol/(s*m²), una humedad relativa de entre un 60 y un 70% y una temperatura de entre 18 y 25 °C.

Los experimentos constaron de 2 tratamientos (figura 2.29):

- Control: Solución de Hutner a un cuarto de la concentración normal. El pH era de 6,4.
- Agua de taladrina con una DQO de 1.368 ppm. Se añadió medio nutritivo de Hutner a un cuarto de la concentración normal. El pH era de 6,4.

Para conocer si existía una disminución natural de la DQO se dejaron recipientes sin planta.

Posteriormente se realizó un nuevo experimento incrementando el peso fresco de las plantas de *Myriophyllum* (25 g) y el volumen de agua de taladrina (500 mL).

En cada tratamiento, se realizaron medidas de peso fresco de las plantas, medidas de la capacidad fotosintética mediante la detección de la fluorescencia emitida por el PSII (fluorescencia) y extracción de los pigmentos fotosintéticos. El procedimiento de medida se explica en el apartado 2.13.1.

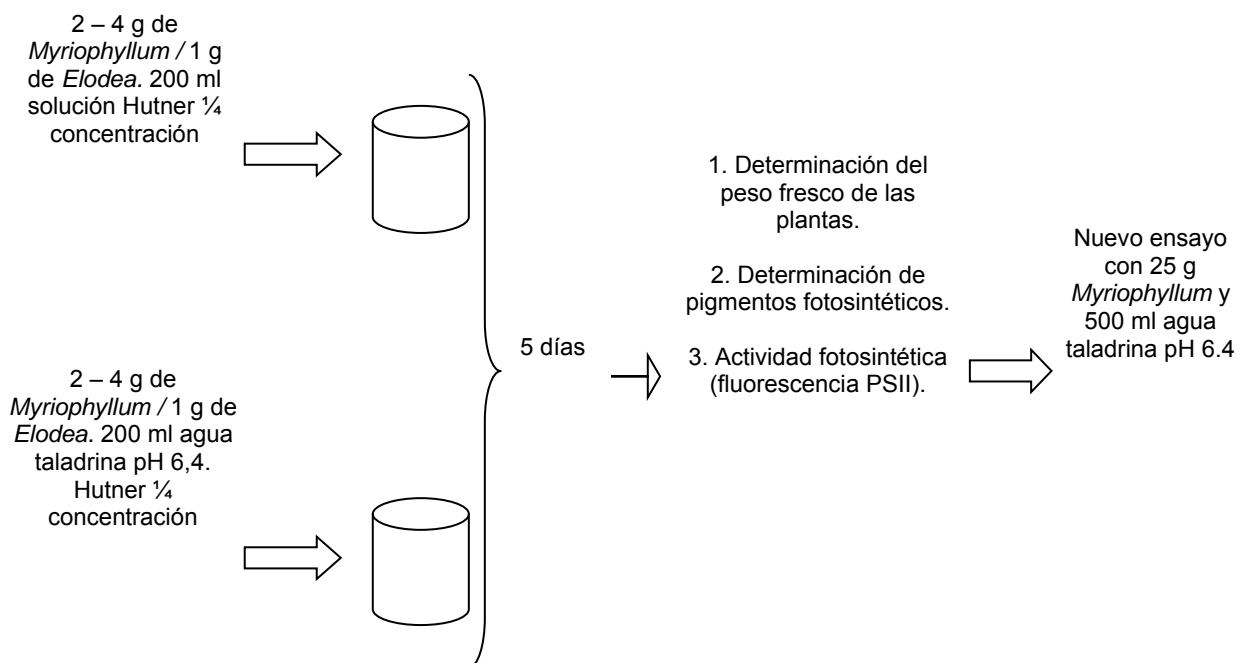


Figura 2.27. Experimento para determinar la capacidad de *Myriophyllum* y *Elodea* para fitorremediar el agua de taladrina.

2.13.3. Experimentos con *Cyperus*

Se pesaron 4 g de estas plantas y se colocaron en recipientes con 200 mL de capacidad. Como medio nutritivo se utilizó la solución de Hoagland y Arnon (1950) a $\frac{1}{4}$ de la concentración normal (anexo 3).

Los ensayos se realizaron en cámaras de cultivo con una iluminación de 300 mmol/(s*m²), una humedad relativa de entre un 60 y un 70% y una temperatura de entre 18 y 25 °C.

Los experimentos constaron de 2 tratamientos (figura 2.28):

- Control: Solución de Hoagland a un cuarto de la concentración normal. El pH era de 6,4.

- Agua de taladrina con una DQO de 1.326 ppm. Se añadió medio nutritivo de Hoagland a un cuarto de la concentración normal. El pH era de 6,4.

En cada tratamiento, se realizaron medidas de peso fresco de las plantas, medidas de la capacidad fotosintética mediante la detección de la fluorescencia emitida por el PSII (fluorescencia) y extracción de los pigmentos fotosintéticos. El procedimiento de medida se explica en el apartado 2.13.1.

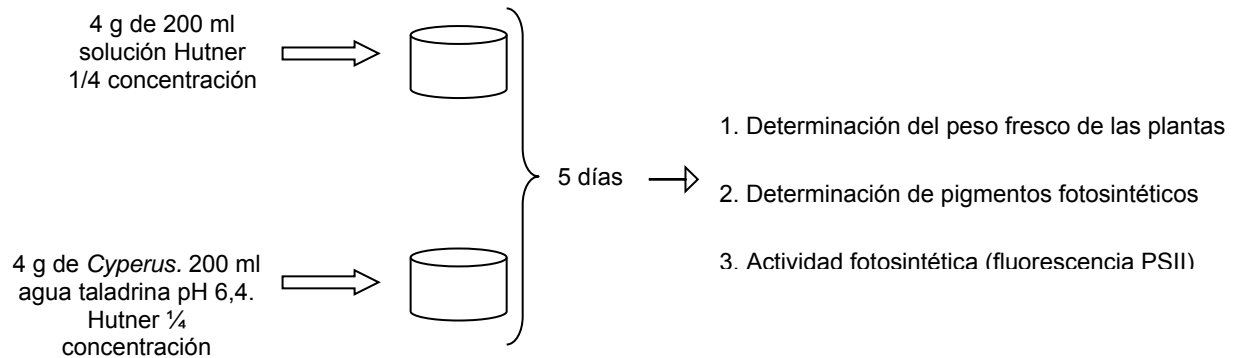


Figura 2.28. Experimento para determinar la capacidad de *Cyperus* para fitorremediar el agua de taladrina.

2.14. Determinación de la capacidad de fitorremediación del maíz en un periodo de cinco días

Después de ensayar distintas especies vegetales con hábitos terrestres, se determinó que la planta más resistente era el maíz, por lo que fue elegida para los siguientes experimentos.

Plántulas procedentes de semillas pregerminadas como se explicó en el apartado 2.12 se pasaron a los contenedores, poniendo 20 semillas por contenedor y 5 réplicas por tratamiento. Cada contenedor se rellenó con una solución de agua del grifo con 1 g/L de solución nutritiva de Hoagland (Sigma).

Los contenedores se regaron 3 días a la semana, con un volumen tal que permitiese cubrir las semillas del maíz. Después de 15 días, cuando las plantas tenían una altura de unos 25 cm, se desarrollaron los siguientes tratamientos:

a) Control: Agua de taladrina con una DQO de 1.823 ppm (sin plantas ni esparto), para determinar si existía una degradación natural de las mismas. 3 contenedores.

b) Esparto sin plantas: Esparto (soporte de las plantas), con 890 mL de agua de taladrina con una DQO de 1.823 ppm con 1 g/L de solución nutritiva de Hoagland y 10 mL/L de caldo nutritivo (8 g/L). En este tratamiento se pretendía determinar si el esparto influye en el valor de la DQO. 5 contenedores.

c) Maíz con esparto y agua del grifo: Esparto y las plantas de maíz, con 890 mL de agua del grifo con 1 g/L de solución nutritiva de Hogland y 10 ml/L de caldo nutritivo (8 g/L). 3 contenedores.

d) Maíz con esparto y agua de taladrinas: Esparto y las plantas de maíz, rellenado con 890 mL de agua de taladrina con una DQO de 1.823 ppm con 1 g/L de solución nutritiva de Hoagland y 10 mL/L de caldo nutritivo (8 g/L). En este tratamiento se pretendía determinar la capacidad de fitorremediación del maíz y el efecto del agua de taladrina sobre esta especie vegetal. 3 contenedores.

El sistema se mantuvo en aireación continua con una bomba de membrana M2K3 de Schego, que produce 350 L/h, creando un sistema conectado mediante T's de manera que a cada tratamiento le llegase la misma cantidad de aire. La temperatura fue de entre 27 y 30 °C. El periodo de luminosidad fue de 8 horas a una intensidad de 42 micromoles/(m²*s).

Después de 6 días de crecimiento de las plantas en el agua de taladrinas, se midió la DQO (según apartado 2.2.2) en cada una de las réplicas, la altura de las plantas, el número de hojas y la eficiencia fotosintética. Después de realizar estas medidas, se cambió el agua de taladrina por una solución con las mismas condiciones que la inicial (DQO 1.823 ppm, 1 g/L de Hoagland y 10 mL/L de caldo nutritivo).

A los 5 días sólo se pudo realizar una medida de la DQO porque las plantas de los tratamientos con agua de taladrinas estaban todas muertas. En la figura 2.29 se esquematiza el procedimiento seguido y en la figura 2.30 se muestra un esquema del sistema de fitorremediación.

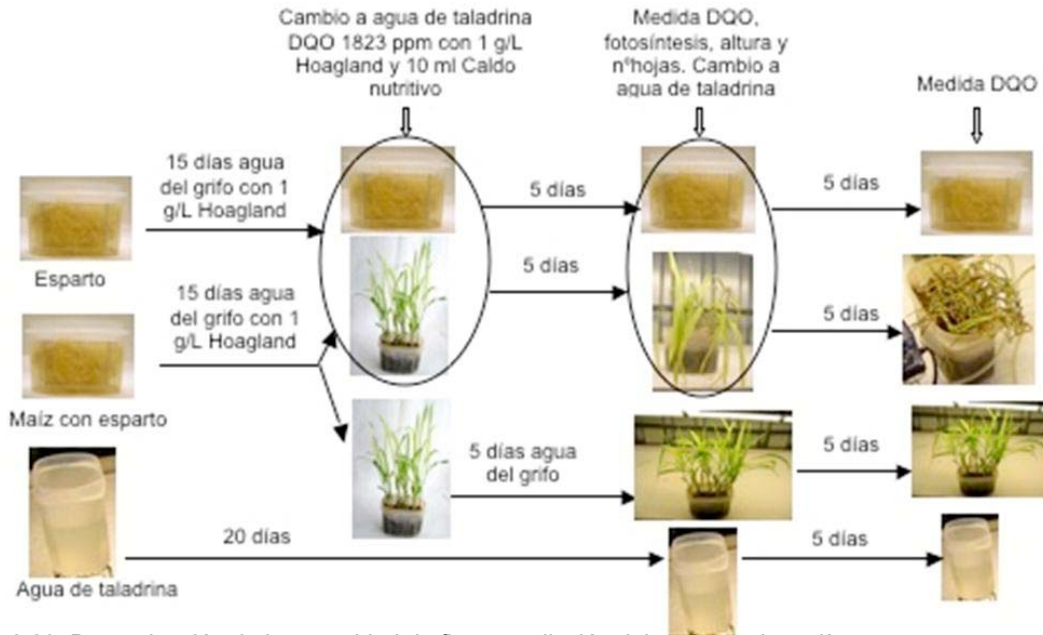


Figura 2.29. Determinación de la capacidad de fitorremediación del maíz en cinco días.

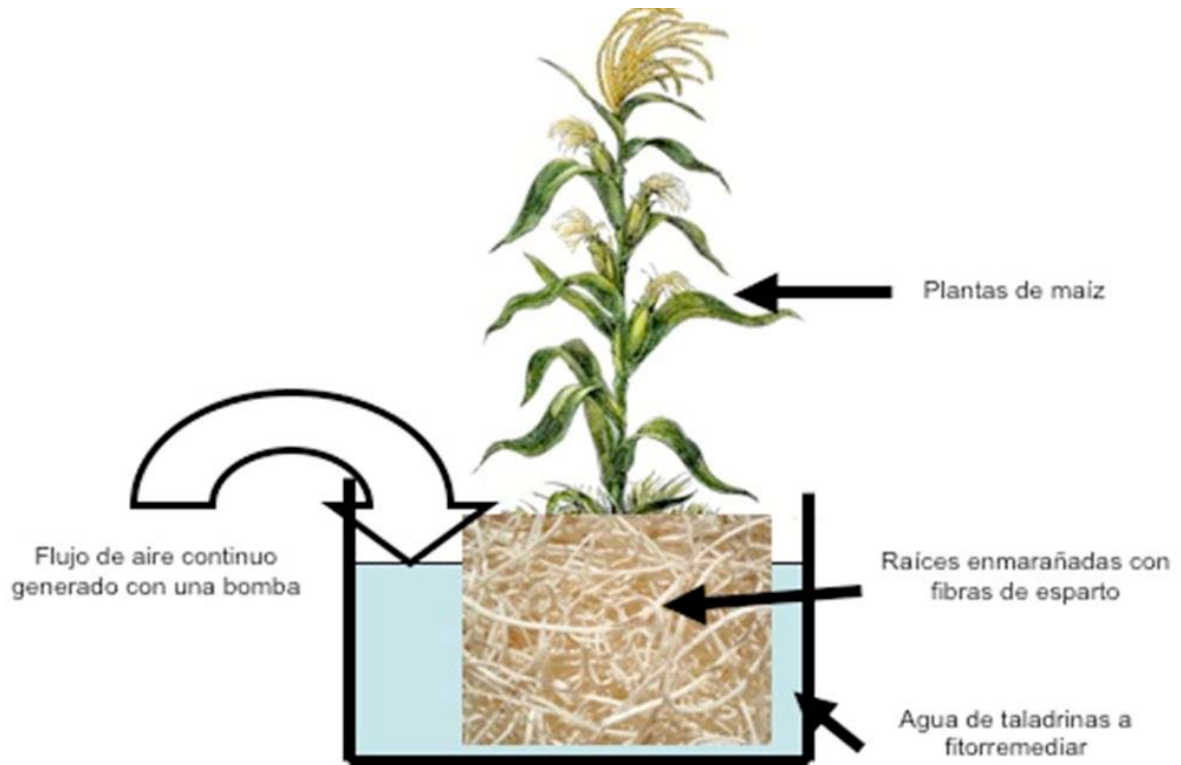


Figura 2.30. Esquema del procedimiento de cultivo: entramado de raíces de maíz-esparto (1) en contacto con el líquido contaminado (2), con aireación continua de las raíces mediante bomba de flujo de aire.

La eficiencia fotosintética se valoró mediante la medida de la emisión de fluorescencia del PSII en hojas previamente adaptadas a oscuridad para determinar la eficiencia de la fotosíntesis y diagnosticar la presencia de factores de estrés que la disminuyen (Krause y Weis, 1991; Baker, 2008). Se trata de una técnica no destructiva.

En primer lugar, se realizó la adaptación de las hojas a la oscuridad. Según Johnson *et al.* (1990) el estado de estabilización de una planta está casi alcanzado durante unos 15-20 minutos, aunque depende de las especies vegetales. Para garantizar la completa estabilización, el tiempo de adaptación de las hojas a la oscuridad fue de 1 hora. Las medidas se realizaron en 10 plantas de cada contenedor, tomando al azar una hoja en cada una de ellas, primero se realizó una medida en condiciones de oscuridad y posteriormente se realizó una medida en condiciones de luz.

Para las medidas de la eficiencia fotosintética (en condiciones de oscuridad y de luz) se utilizó el equipo FMS2 (Fluorescence Monitoring System, Hansatech, Norfolk, UK).

El programa para la toma de estas medidas se compone de distintos pasos que consisten en distintos pulsos de luz emitidos por el fluorímetro. En primer lugar, se activa una luz modulada (aproximadamente $1 \mu\text{mol}$ de fotones $/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$) e inmediatamente se sigue de un pulso de luz saturante durante 0,7 seg (aproximadamente $9.000 \mu\text{mol}$ de fotones $/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$). A continuación se activa luz actínica continua (aproximadamente $80 \mu\text{mol}$ de fotones $/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$) durante 15 seg, para que se produzca la adaptación de las hojas a la luz. Pasado este tiempo, se vuelve a emitir un pulso de luz saturante de las mismas características que el anterior. Tras cada uno de estos pasos el equipo va registrando la emisión de fluorescencia del PSII.

Con la primera medida, tras adaptar las hojas a oscuridad con las pinzas, se obtuvo:

- F_0 -> Fluorescencia emitida en condiciones de luz suave por plantas que provienen de oscuridad o fluorescencia mínima. Obtenida antes del pulso de luz saturante.
- F_m -> Fluorescencia máxima. Tras aplicar el pulso de luz saturante.

Con estos parámetros se calculó el valor de F_v/F_m (eficiencia potencial máxima o rendimiento cuántico máximo del PSII) que indica la cantidad máxima de energía que el PSII podría destinar potencialmente a procesos fotoquímicos. El valor de F_v (fluorescencia variable) es la diferencia entre F_m y F_0 .

Con la segunda medida, en condiciones de luz, se midió:

- F_s -> Fluorescencia emitida por la hoja adaptada a la luz.
- F_m' -> Fluorescencia máxima medida en un estado adaptado a la luz.
- F_v' -> Fluorescencia variable de hojas adaptadas a la luz.

Con estos parámetros se calculó:

- Φ_{PSII} (Eficiencia máxima o rendimiento cuántico del PSII), que se calcula como $(F_m' - F_s) / F_m'$. Este parámetro cuantifica la proporción de energía absorbida por el PSII que es utilizada en el transporte electrónico fotosintético (Genty *et al.*, 1989) y por lo tanto indica la cantidad de energía real que puede ser destinada a procesos fotoquímicos.

- qP (quenching fotoquímico de la variación de la fluorescencia de la clorofila) y se calcula como F_q'/F_v' donde F_q' es la diferencia entre F_m' y F_s .

- ETR (tasa aparente de transporte electrónico), mediante la fórmula: $\Phi\text{PSII} \cdot 0,5 \cdot 0,84 \cdot 62$

- NPQ (quenching no fotoquímico). Se calcula mediante la fórmula $(F_m - F_m') / F_m'$, este parámetro indica la cantidad de energía recibida que es disipada en forma de calor por el fotosistema II y que por lo tanto no es aprovechada en el proceso fotoquímico (Ögren y Baker, 1985; Baker, 2008; Rodríguez-Moreno *et al.*, 2008).

Todos los datos son integrados con el software MODFL2. En la figura 2.31 se esquematizan los parámetros analizados.

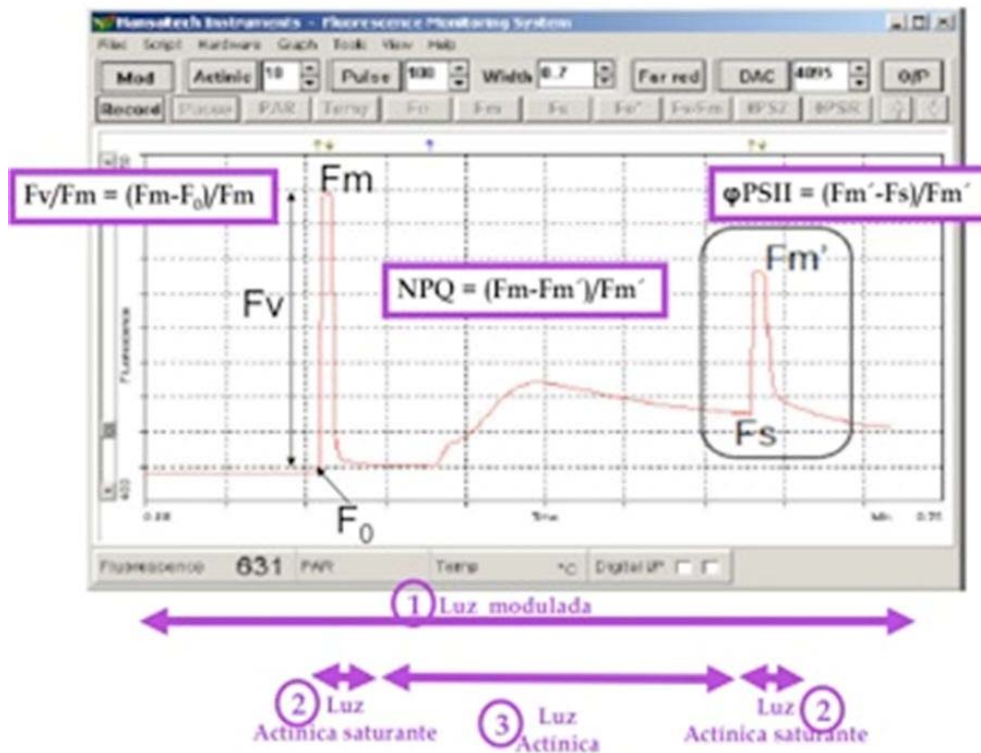


Figura 2.31. Esquema de los parámetros utilizados para medir la eficiencia fotosintética. En condiciones de oscuridad no hay pérdida de energía en forma de calor. Disipación térmica inducida por luz actínica por fotoinhibición que normalmente están relajados en oscuridad.

2.15. Determinación de la capacidad de fitorremediación del maíz en un periodo de nueve días

Plántulas procedentes de semillas pregerminadas como se explicó en el apartado 2.12 se pasaron a los contenedores, poniendo 20 semillas por contenedor y 5 réplicas por tratamiento. Cada contenedor se rellenó con una solución de agua del grifo con 1 g/L de solución nutritiva de Hoagland.

Los contenedores se regaron 3 días a la semana, con un volumen tal que permitiese cubrir las semillas de maíz. Después de 17 días, cuando las plantas tenían una altura de unos 35 cm, se desarrollaron los siguientes tratamientos:

a) Esparto estéril sin semillas: Esparto estéril (autoclavado durante 20 minutos a 121°C) con 890 mL de agua de taladrina con una DQO de 1.477 ppm con 1 g/L de solución nutritiva de Hoagland y 10 mL/L de caldo nutritivo (8 g/L). 5 Contenedores.

b) Esparto no estéril sin semillas: Esparto no estéril con 890 mL de agua de taladrina con una DQO de 1.477 ppm con 1 g/L de solución nutritiva de Hoagland y 10 mL/L de caldo nutritivo (8 g/L). 5 Contenedores.

c) Maíz con esparto estéril y agua del grifo: Plantas de maíz con esparto estéril (autoclavado durante 20 minutos a 121 °C) con 890 mL de agua del grifo con 1 g/L de solución nutritiva de Hoagland y 10 mL/L de caldo nutritivo (8 g/L). 2 Contenedores.

d) Maíz con esparto no estéril y agua del grifo: Plantas de maíz con esparto no estéril con 890 mL de agua del grifo con 1 g/L de solución nutritiva de Hoagland y 10 mL/L de caldo nutritivo (8 g/L). 2 Contenedores.

e) Maíz con esparto estéril y agua de taladrina: Plantas de maíz con esparto estéril (autoclavado durante 20 minutos a 121 °C) con 890 mL de agua de taladrina con una DQO de 1.477 ppm con 1 g/L de solución nutritiva de Hoagland y 10 mL/L de caldo nutritivo (8 g/L). 3 Contenedores.

f) Maíz con esparto no estéril y agua de taladrina: Plantas de maíz con esparto no estéril con 890 mL de agua de taladrina con una DQO de 1.477 ppm con 1 g/L de solución nutritiva de Hoagland y 10 mL/L de caldo nutritivo (8 g/L). 3 Contenedores.

g) Maíz sin esparto y agua del grifo: Plantas de maíz con 890 mL de agua del grifo con 1 g/L de solución nutritiva de Hoagland y 10 mL/L de caldo nutritivo (8 g/L). 2 Contenedores.

h) Maíz sin esparto y agua de taladrinas: Plantas de maíz con 890 mL de agua de taladrina con una DQO de 1.477 ppm con 1 g/L de solución nutritiva de Hoagland y 10 mL/L de caldo nutritivo (8 g/L). 3 Contenedores.

El sistema se mantuvo en aireación con una bomba de membrana M2K3 de Schego, que produce 350 L/h, creando un sistema conectado mediante T's de manera que a cada tratamiento le llegase la misma cantidad de aire. La temperatura fue de entre 27 y 30 °C. El periodo de luminosidad fue de 8 horas a una intensidad de 3400 luxes o 42 micromoles/(m²*s).

Se realizó una primera medida a los 5 días de poner las plantas en agua de taladrina, coincidiendo con el día en que se rellenaron los contenedores. Las medidas fueron: DQO (según apartado 2.2.2), Altura, número de hojas y eficiencia fotosintética (según apartado 2.15). La media de la DQO en cada tratamiento sirvió como valor aproximado con el que rellenar los contenedores (1.018 ppm en el caso del tratamiento de maíz con esparto estéril y 677 ppm en el caso de maíz con esparto no estéril). Dos días después de rellenar, se repitió la medida de DQO para que coincidiese en fecha con la medida del primer experimento. Finalmente, cuando las plantas llevaban 9 días en agua de taladrina, se repitieron las medidas de biometría y DQO (Figura 2.32)

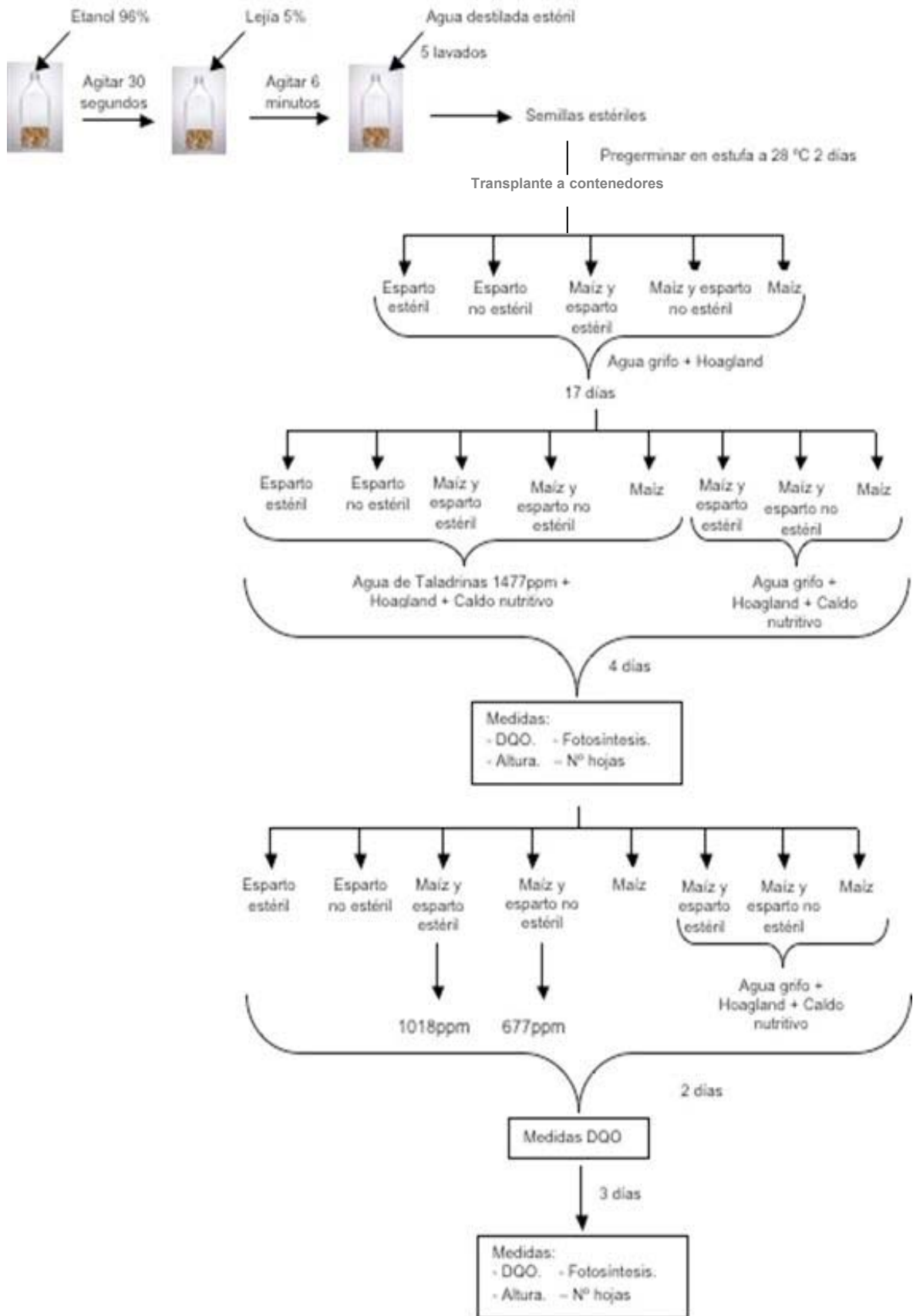


Figura 2.32. Experimento para determinar la capacidad de biorremediación del maíz en el tiempo.

2.16. Diseño de un sistema planta-microorganismo

Las semillas se esterilizaron como se describió en el punto 2.12. Al igual que en experimentos anteriores, se pregerminaron las semillas durante 2 días a 28 °C, se pusieron 20 semillas por contenedor y se rellenó con una solución de agua del grifo con 1 g/L de solución nutritiva de Hoagland.

Los contenedores se regaron 3 días a la semana, con un volumen tal que permitiese cubrir las semillas del maíz.

Después de 12 días, los contenedores se inocularon con una solución bacteriana de 10^8 ufc/mL, de manera que la concentración final de bacterias en el contenedor fue de 10^6 ufc/mL (el volumen de contenedor es de 900 mL). La bacteria utilizada, atendiendo a los experimentos realizados para determinar el comportamiento de las bacterias en el agua de taladrinas, fue TP9 (*Bacillus licheniformis*). En el tratamiento sin bacterias, se añadió caldo nutritivo en lugar de la solución bacteriana en la misma cantidad que el inóculo.

Quince días después de que se pusieran las semillas en los contenedores (3 días después del primer inóculo), cuando las plantas tenían una altura de unos 32 cm, se realizaron los siguientes tratamientos:

a) Maíz sin bacteria y sin agua de taladrina: Plantas de maíz con esparto no estéril. Los contenedores se rellenaron con 890 mL de agua del grifo con 1 g/L de solución nutritiva de Hoagland y 10 mL/L de caldo nutritivo (8 g/L). 3 réplicas.

b) Maíz con bacteria y agua de taladrina: Plantas de maíz con esparto no estéril inoculadas con la cepa TP9. Los contenedores se rellenaron con 890 mL de agua del grifo con 1 g/L de solución nutritiva de Hoagland y 10 mL/L de caldo nutritivo (8 g/L). 3 réplicas.

c) Maíz sin bacteria y sin agua de taladrina: Plantas de maíz con esparto no estéril. Los contenedores se rellenaron con 890 mL de agua de taladrina de DQO 1.555 ppm con 1 g/L de solución nutritiva de Hoagland y 10 mL/L de caldo nutritivo (8 g/L). 3 réplicas.

d) Maíz con bacteria y con agua de taladrina: Plantas de maíz con esparto no estéril inoculadas con la cepa TP9. Los contenedores se rellenaron con 890 mL de agua de taladrina de DQO 1.555 ppm con 1 g/L de solución nutritiva de Hoagland y 10 mL/L de caldo nutritivo (8 g/L). 3 réplicas.

Una hora después de cambiar el agua, se realizó una segunda inoculación de la misma forma descrita anteriormente. El diseño experimental se esquematiza en la figura 2.33.

Este sistema se mantuvo en aireación continua con una bomba de membrana M2K3 de Schego, que produce 350 L/h, creando un sistema conectado mediante T's de manera que a cada tratamiento le llegase la misma cantidad de aire. La temperatura de entre 27 y 30 °C. El periodo de luminosidad fue de 8 horas a una intensidad de 42 micromoles/(m²*s).

A los 5 días de poner las plantas en agua de taladrina se realizaron las siguientes medidas: DQO (según apartado 2.2.2), altura, número de hojas, peso seco de la raíz y de la

parte aérea (después de secar 5 días a una temperatura de 70 °C, como la cantidad de esparto era igual en todos los tratamientos y no se podía separar este soporte de las raíces, el peso seco de la parte radical se refiere al peso del conjunto esparto-raíces). Además, se estudió la eficacia fotosintética de las plantas midiendo la emisión de fluorescencia del PSII, como se explicó en el apartado 2.14.

Respecto al agua de taladrinas, se tomaron muestras antes y después de pasar por el sistema fitorremediador y se midieron: la DQO (según apartado 2.2.2), el pH (según apartado 2.2.3), los hidrocarburos presentes, la presencia de PAHs y los hidrocarburos totales (según apartado 2.3) y se estudió la biotoxicidad según se explica en el apartado 5.6.

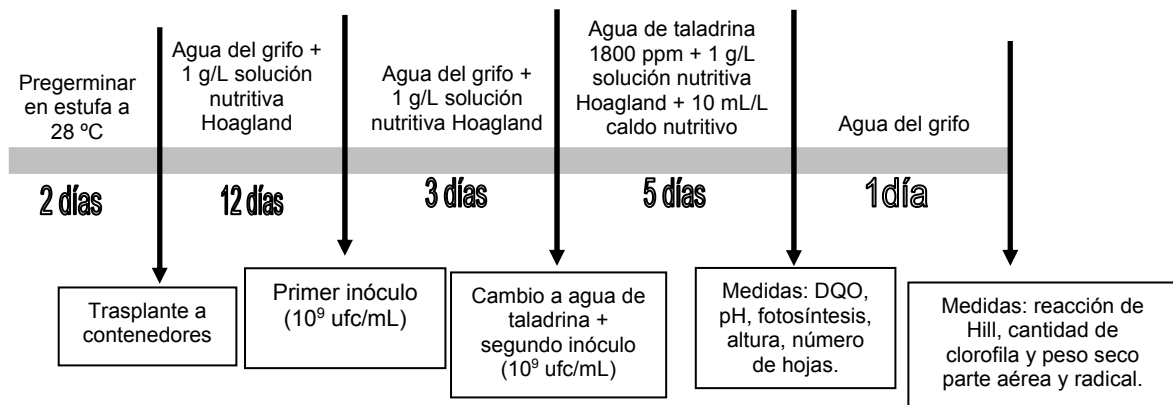


Figura 2.33. Experimento para diseñar un sistema planta-microorganismo.

2.17. Tratamiento estadístico: Análisis de la varianza (ANOVA)

En los experimentos explicados en los apartados 2.11., 2.13., 2.14., 2.15. y 2.16. se realizaron ANOVA, unidireccionales, a partir de los valores de las réplicas. Cuando el valor de P era menor a 0,05 (95% de confianza) se consideró que existían diferencias significativas entre las variables analizadas. En ese caso, se compararon los valores medios mediante el estadístico LSD (Least Significant Difference) de Fisher (Sokal y Rohlf, 1979). Para ello se utilizó el software estadístico Statgraphics Plus 5.1.

3. RESULTADOS: PUESTA A PUNTO DE UN SISTEMA DE CULTIVO OPTIMIZADO PARA LA FITORREMEDIACIÓN DE AGUA DE TALADRINA

3.1. Análisis fisicoquímicos de las muestras de agua de taladrina

A continuación se expone la caracterización fisicoquímica de las muestras enviadas por el departamento de Medio Ambiente de la empresa John Deere Ibérica S. A. (JDISA). En el anexo 5 se recogen los resultados de estos análisis.

3.1.1. Conductividad

En la figura 3.1 se pueden observar los valores de conductividad obtenidos para las distintas muestras de agua de taladrina. Cabe destacar la variabilidad de este parámetro, que oscila entre valores de 745 mS/cm hasta los 108 mS/cm.

En todas las muestras el valor de la conductividad está por debajo del límite permitido por la Ley de la Comunidad de Madrid 10/1993, de 26 de octubre, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento, que es de 5.000 mS/cm.

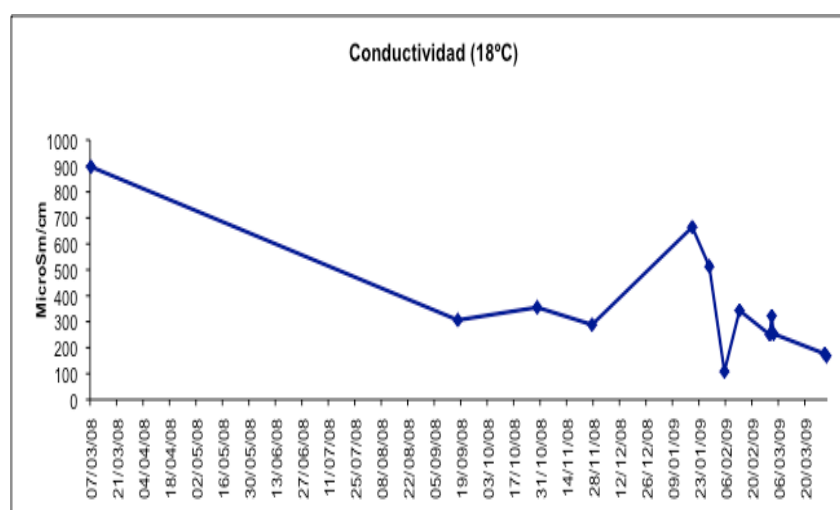


Figura 3.1. Representación de los resultados de la conductividad, para las muestras de agua de taladrina analizadas desde el 17/09/2008 hasta el 24/04/2009.

3.1.2. Residuo seco

En la figura 3.2 se observan los valores de residuo seco obtenidos para las distintas muestras de agua de taladrina. Como este parámetro está directamente relacionado con el parámetro de la conductividad también es muy variable, con valores que van desde los 550 ppm hasta los 80 ppm.

En todas las muestras el valor del residuo seco está por debajo del límite permitido para los sólidos en suspensión por la Ley 10/1993, de la Comunidad de Madrid, que es de 1.000 ppm.



Figura 3.2. Representación de los resultados del parámetro residuo seco, para las muestras de agua de taladrina analizadas desde el 17/09/2008 hasta el 24/04/2009.

3.1.3. pH

En la figura 3.3 se pueden ver los valores de este parámetro para las distintas muestras de agua de taladrina. Se puede destacar que el pH se mantiene estable, con valores que oscilan entre los 8 y los 11. Sin embargo, en alguna muestra se encontraron valores muy básicos (de 13,8 en la muestra de 02/05/2009) o ácidos, como ocurrió en la muestra del 05/02/2009 (pH de 5,5).

Por otra parte, si se comparan los valores de pH obtenidos con el intervalo permitido por la Ley de la Comunidad de Madrid 10/1993, que establece límites de pH entre 6 y 10 (representado en la gráfica con una línea roja), se observa como la gran mayoría de las muestras presentan un pH por encima de dicho intervalo, salvo las muestras del 30 y 31 de marzo de 2009, cuyo pH era de 8,88 y 8,99 respectivamente, que son las únicas que cumplen la ley.

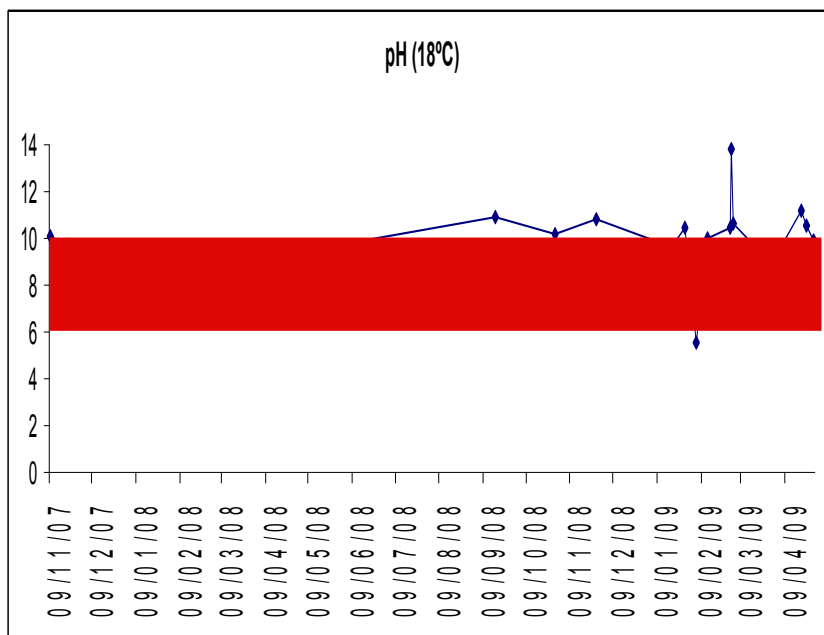


Figura 3.3. Representación de los resultados de pH, para las muestras de agua de taladrina analizadas desde el 17/09/2008 hasta el 24/04/2009. La franja roja corresponde con el intervalo de pH (6-10) permitido por la Ley 10/1993, de la Comunidad de Madrid.

3.1.4. Demanda química de oxígeno (DQO)

En la figura 3.4 se observan los valores de DQO obtenidos para las distintas muestras de agua de taladrina. Todos los valores son superiores al límite permitido por la Ley 10/1993, de la Comunidad de Madrid, que es de 1.750 ppm (representado en el gráfico con una línea roja).

Cuando los análisis se realizaron quincenalmente (a partir del 19 de enero de 2009), se observa una gran variabilidad que coincide con la predicha por el productor de taladrina, la DQO oscilaba desde los 6.206 ppm (muestra del 24/04/2009) hasta los 1.930 ppm (muestra del 19/01/2009).

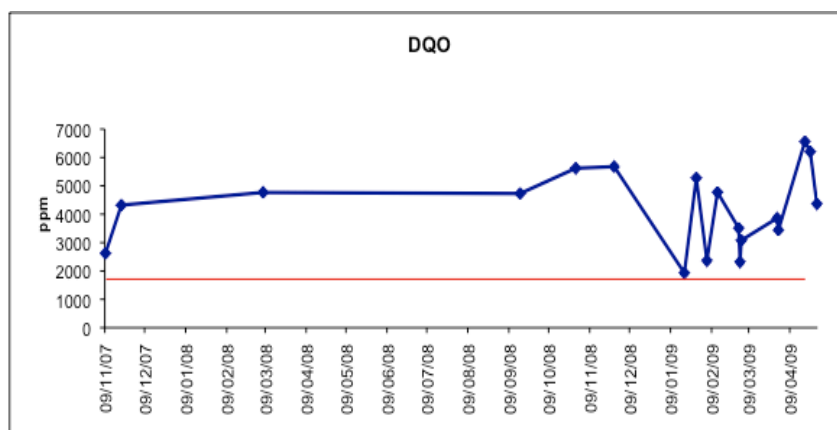


Figura 3.4. Representación de los resultados de la demanda química de oxígeno (DQO), para las muestras de agua de taladrina analizadas desde el 17/09/2008 hasta el 24/04/2009. La línea roja representa el valor máximo de DQO (1.750 ppm) permitido por la Ley 10/1993, de la Comunidad de Madrid.

3.1.5. Demanda biológica de oxígeno (DBO₅)

Cabe destacar que todos los valores obtenidos para este parámetro están por debajo del valor máximo permitido por la Ley 10/1993, que es de 1.000 ppm. Estos valores oscilan entre 0 y 10 ppm.

3.2. Análisis cualitativo y cuantitativo de los hidrocarburos (aromáticos y no aromáticos) de las muestras de agua de taladrinas

Tras obtener el análisis de hidrocarburos del Servicio Interdepartamental (SIDI) de la Universidad Autónoma de Madrid, se realizó una interpolación del área resultante entre el n-decano y el tetracontano en la curva de calibrado de hidrocarburos totales correspondiente ($R^2=0,996$ y $RSD\%=18\%$). Tras corregir este resultado con los valores de concentración y de dilución correspondientes, se obtiene que la cantidad total de hidrocarburos para la muestra del 19/01/2009 es de 12 ppm.

Los análisis cualitativos realizados mostraron la presencia de una gran variedad de compuestos (figura 3.5, figura 3.6 y tabla 3.1):

- Hidrocarburos lineales: Cuyas cadenas tienen entre 14 y 22 átomos de carbono.
- Hidrocarburos ramificados: Con cadenas de entre 8 y 17 átomos de carbono.

- Hidrocarburos aromáticos.
- Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), como el fluoreno y el pireno, catalogados como residuos tóxicos y peligrosos por la Ley 10/1993 de la Comunidad de Madrid.

Los cromatogramas correspondientes a estos hidrocarburos se adjuntan en el Anexo 6.

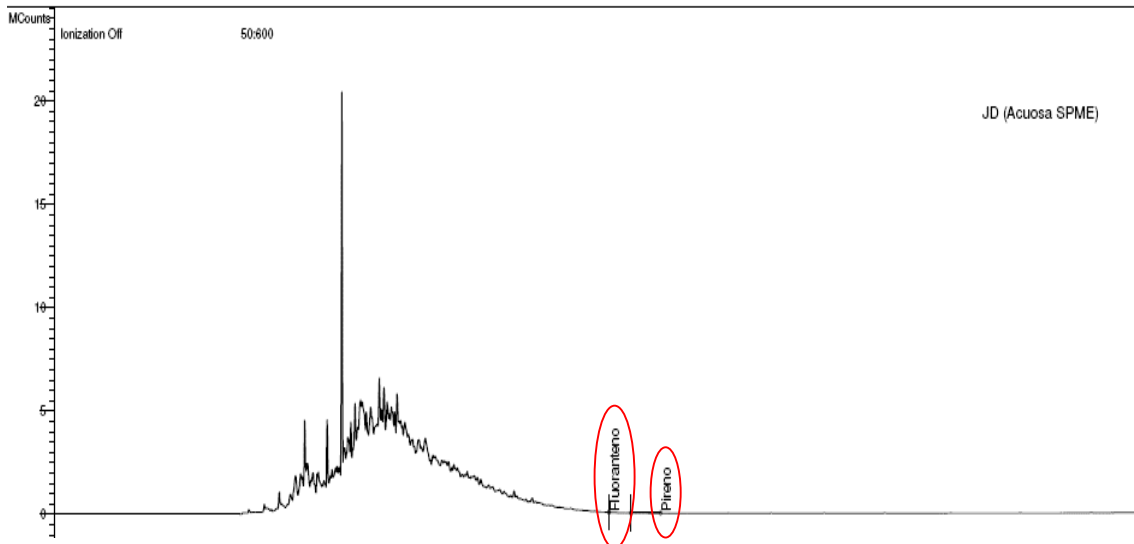


Figura 3.5. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos de la muestra del 19/01/2009. Los picos marcados con un círculo rojo corresponden a los hidrocarburos aromáticos policíclicos fluoreno y pireno.

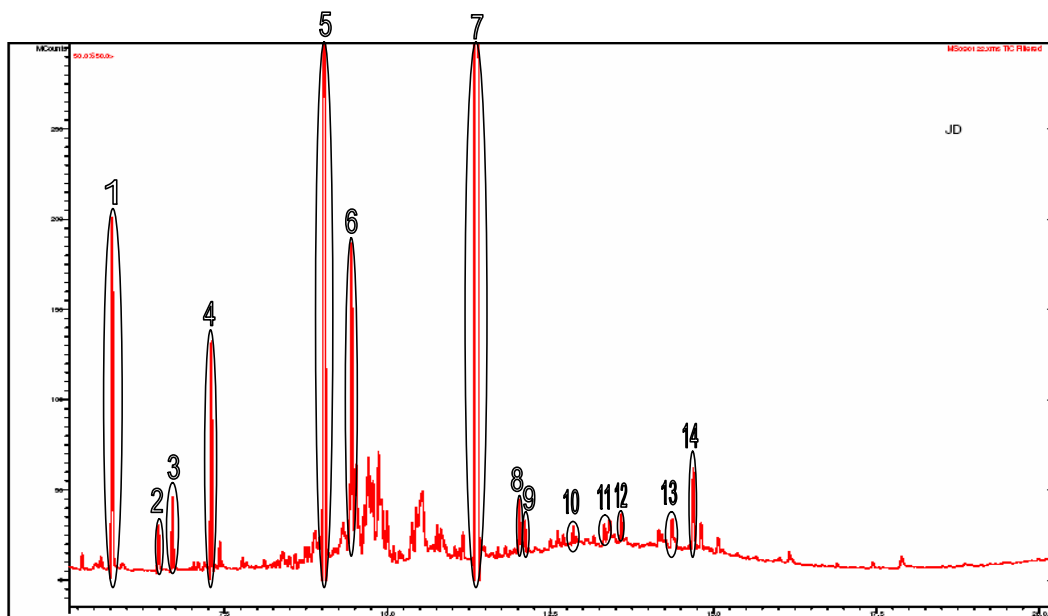
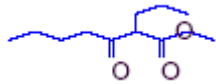

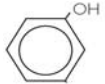



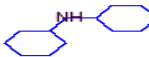

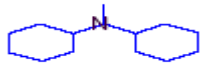
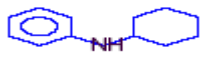

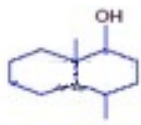

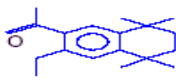


Figura 3.6. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos de la muestra del 19/01/2009. Los picos enumerados corresponden con los principales hidrocarburos encontrados en la muestra, los cuales fueron analizados a partir de su correspondiente espectro de masas.

Tabla 3.1. Hidrocarburos presentes en la muestra de agua de taladrina del 19/01/2009. Los compuestos mostrados fueron seleccionados de la librería generada por los espectros de masas de cada compuesto. En cada caso se seleccionó la molécula que tenía una mayor probabilidad de semejanza con los espectros obtenidos en el análisis de las muestras.

Pico	Tiempo de retención	Nombre	Fórmula	Molécula
1	5,78	Ácido heptanóico 3-oxo-2-propil- metil éster	$C_{11}H_{20}O_3$	
2	6,48	Butilamina N-metil- N-propil-	$C_8H_{19}N$	
3	6,70	Fenol	C_6H_6O	
4	7,30	Heptano 1,1`-oxybis	$C_{14}H_{30}O$	
5	9,02	Etanol 1-(2-butoxietoxi)-	$C_8H_{18}O_3$	
6	9,45	Propanamida, N – (2,6 – dimetilfenil) – 3- (1 – piperidinilo)	$C_{16}H_{24}N_2O$	
7	11,36	Ciclohexanamina N-ciclohexil-	$C_{12}H_{23}N$	
8	12,06	Etanol 2-(dodeciloxi)-	$C_{14}H_{30}O_2$	
9	12,10	Ciclohexanamina N-ciclohexil-N-metil-	$C_{13}H_{25}N$	
10	12,60	N-fenilciclohexilamina	$C_{12}H_{17}N$	
11	12,85	Etanol 2-(eicosiloxi)-	$C_{22}H_{46}O_2$	
12	13,59	Alcohol patchouli	$C_{15}H_{26}O$	
13	14,37	Isopropil miristate	$C_{17}H_{34}O_2$	
14	14,69	7-acetil-6-etil-1,1,4,4-tetramiltetralin	$C_{18}H_{26}O$	

3.3. Análisis elemental, cuantitativo y cualitativo, de las muestras de agua de taladrina

En las figuras 3.7A, 3.7B y 3.7C se puede observar el valor medio de los distintos elementos químicos presentes en las 5 muestras de agua de taladrina analizadas en el SIDI. Cabe destacar que todos estos elementos se encuentran en una concentración inferior a la permitida por la Ley 10/1993, de la Comunidad de Madrid, incluso el silicio que es el más abundante pero que no tiene límite de vertido establecido en dicha ley.

En el Anexo 7 se adjuntan los resultados obtenidos para cada una de las muestras analizadas.

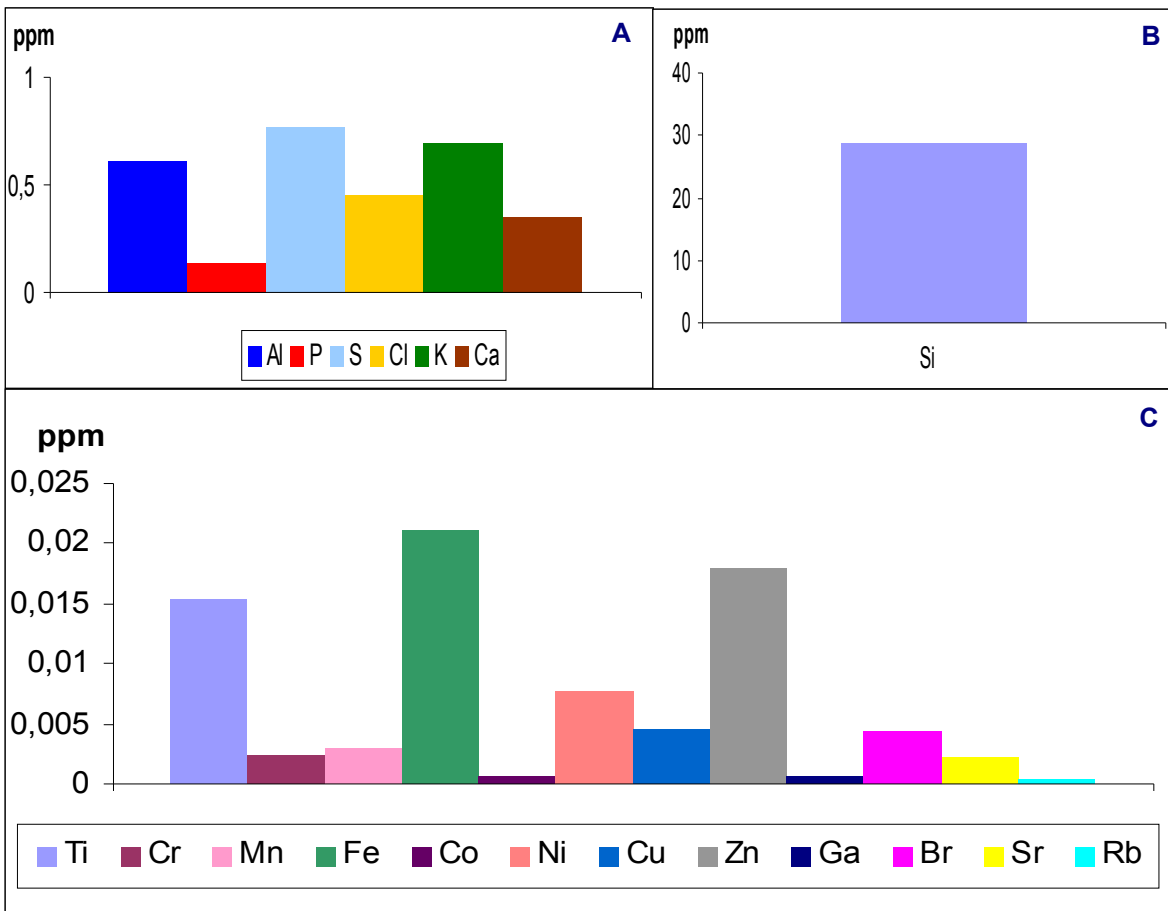


Figura 3.7. A - Representación de los elementos químicos presentes en las muestras cuyo valor medio oscila entre 0,1 y 0,7 ppm. **B** - Representación del silicio presente en las muestras de agua de taladrina cuyo valor medio es de 28,7 ppm. **C** - Representación de los elementos químicos presentes en las muestras cuyo valor medio oscila entre 0,0004 y 0,02 ppm.

3.4. Determinación de la capacidad de las bacterias procedentes de la zona franca de Barcelona y de las cepas aisladas de las taladrinas para crecer en medio sólido con agua de taladrina como única fuente de nutrientes

En los experimentos realizados para determinar la capacidad de crecimiento de las bacterias en agar para métodos estándar (PCA) con distintas concentraciones de agua de taladrina, según lo descrito en el apartado 2.6, se obtuvieron 53 cepas que eran capaces de crecer con el 100% de este medio contaminante, es decir, estas cepas eran capaces de tolerar la presencia de los compuestos del agua de taladrina sin que éstos impidiesen su crecimiento.

Estas 53 cepas, recogidas en el Anexo 4, se utilizaron para determinar su capacidad para degradar los compuestos del agua de taladrina en un medio que no tenía ninguna fuente de carbono fácilmente asimilable, según lo descrito en el apartado 2.7. Cabe destacar que, como se esperaba, no todas las bacterias que crecían con el 100% de agua de taladrina crecieron en agar-agar con el 100% de dicho medio.

Más de la mitad de las cepas capaces de tolerar la presencia de agua de taladrina en el medio (28 de las 53 cepas) fueron también capaces de crecer en agar con dicho medio como única fuente de carbono. Las cepas que no fueron capaces de crecer en este medio son: H2 23, H3 23, C1 24, C1 28, C1 34, C2 21, C2 28, C2 36, C3 21, S2 24, S2 29, S2 33, SL3 35, TP2, TP3, TP5, TP8, TP9, TP10, TP12, TP16, TP18, TP19, TP20 y TP21. Resulta interesante el hecho de que la mayoría de las cepas aisladas de la taladrina necesitaban una fuente de carbono fácilmente asimilable para crecer en dicho medio.

3.5. Clasificación taxonómica de las bacterias aisladas

Tras la amplificación y secuenciación del gen 16S del ARN ribosómico, se realizó una representación de los géneros obtenidos, agrupándolos por clases, como se muestra en la figura 3.8. En dicha figura se puede observar como las principales cepas capaces de crecer en PCA con agua de taladrina pertenecen a las Gram-positivas, concretamente a las clases *Actinobacteria* y *Bacilli*. Los géneros más representativos son *Bacillus sp.* y *Microbacterium sp.*

Entre las cepas Gram-negativas se observa una mayor diversidad filogenética, estas cepas pertenecen a 5 clases. De estas 5 la más abundante es la γ -*proteobacteria*, principalmente el género *Stenotrophomonas sp.*

En el Anexo 4 se muestra la equivalencia entre cada una de las cepas y su afiliación taxonómica según el Genbank.

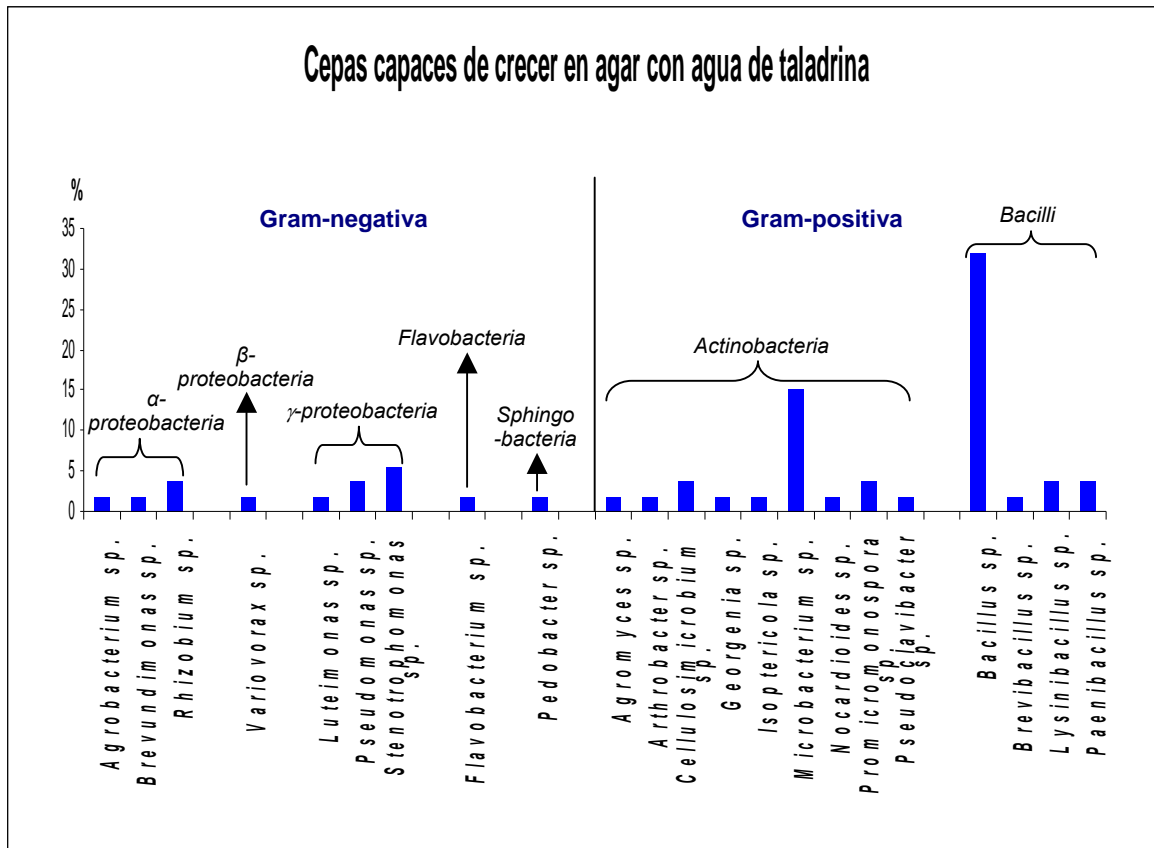


Figura 3.8. Porcentaje de distribución de los géneros de las colonias capaces de crecer en agar con agua de taladrina.

3.6. Cinética de crecimiento en agua de taladrina de las cepas bacterianas seleccionadas

Atendiendo a los géneros con mayor representatividad (figura 3.8), se seleccionaron 10 cepas para determinar su crecimiento en medio líquido de agua de taladrina. Las cepas seleccionadas pertenecían a la clase *Actinobacteria* (cepas C1 19, C1 28 y S1 24), *Bacilli* (cepas TP5, TP9, TP10, TP11, TP16, TP18) y γ -*proteobacteria* (C2 36). Los resultados obtenidos se muestran a continuación (Figura 3.9).

En esta figura se puede observar que todas las cepas sufren un descenso en el número de unidades formadoras de colonias (u. f. c.) después de las 18 horas en contacto con el agua de taladrina, salvo la cepa TP9 (figura 3.9E) donde se observa un ligero incremento del número de u. f. c. para luego reducirse drásticamente.

En las cepas TP11 y TP18 (figura 3.9G), este descenso no es tan acusado como en el resto. Se puede observar como a partir de las 44 horas, momento en el que el número de colonias del resto de las cepas se mantiene estable o incluso comienza a aumentar ligeramente, es cuando en TP11 y TP18 se produce un mayor descenso.

Además podemos destacar una ligera recuperación del número de u. f. c. de las cepas TP5 (figura 3.9D), TP9 (figura 3.9E) y TP16 (figura 3.9C) tras 36 horas en contacto con el agua de taladrina.

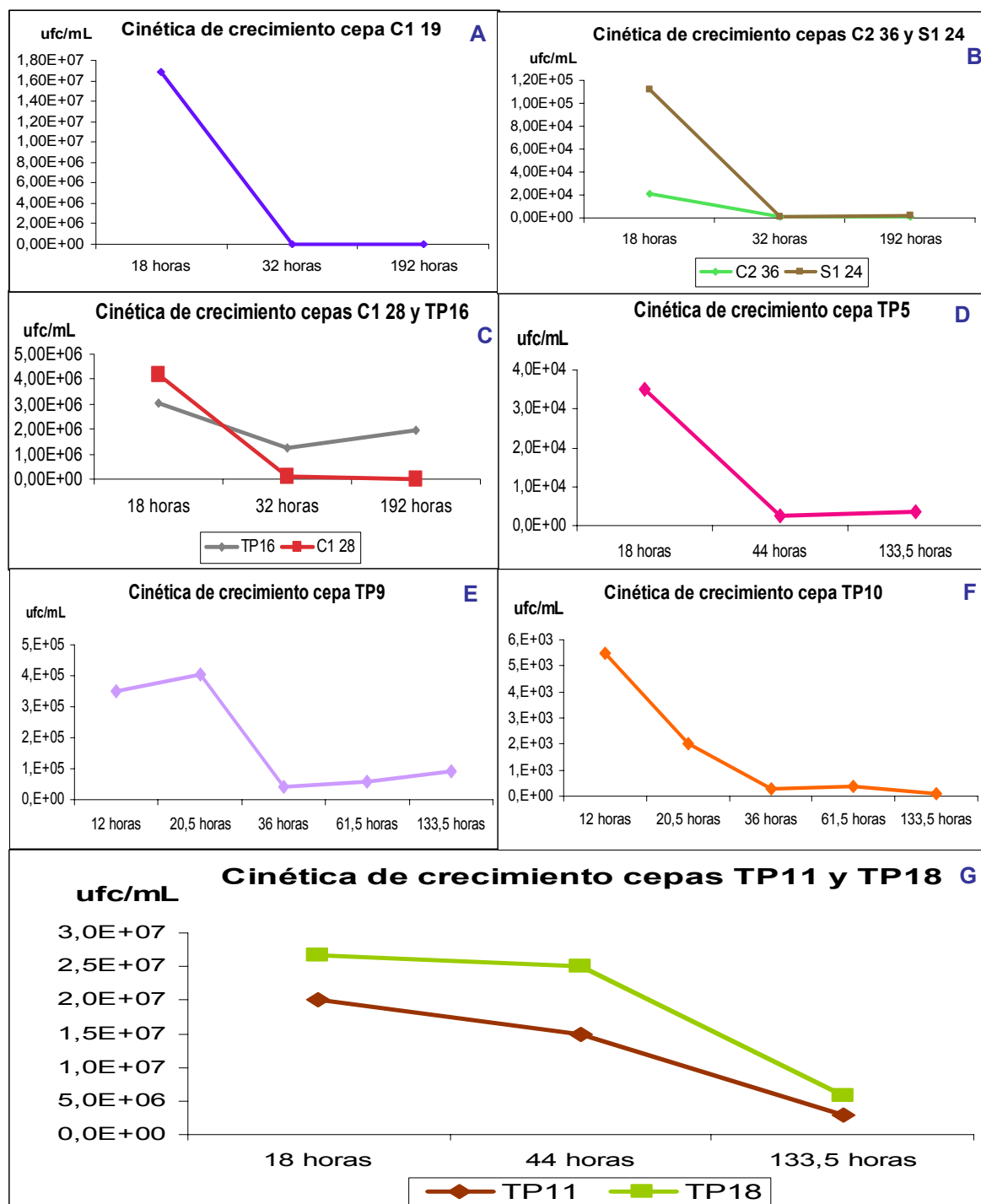


Figura 3.9. Representación de la cinética de crecimiento en agua de taladrina de las distintas cepas ensayadas. **A** – Cepa C1 19, recontada a las 18 horas, 32 horas y 192 horas; **B** – Cepas C2 36 y S1 24, recontadas a las 18 horas, 32 horas y 192 horas; **C** – Cepas C1 28 y TP16, recontadas a las 18 horas, 32 horas y 192 horas; **D** – Cepa TP5, recontada a las 18 horas, 44 horas y 133,5 horas; **E** – Cepa TP9 recontada a las 12 horas, 20,5 horas, 36 horas, 61,5 horas y 133,5 horas; **F** – Cepa TP10, recontada a las 12 horas, 20,5 horas, 36 horas, 61,5 horas y 133,5 horas; **G** – Cepas TP11 y TP18, recontadas a las 18 horas, 44 horas y 133,5 horas.

3.7. Determinación de la capacidad de germinación en agar con agua de taladrina de las semillas de las especies de hábitat terrestre

Los resultados obtenidos para las distintas semillas estudiadas fueron los siguientes:

3.7.1 Alfalfa (*Medicago sativa*)

En la figura 3.10A se observan los resultados obtenidos en los distintos tratamientos y las diferencias existentes entre ambos. Cabe destacar que las semillas fueron capaces de germinar en todos los tratamientos, aunque al ir aumentando la concentración de agua de taladrina en el agar el porcentaje de germinación disminuía significativamente.

Por otra parte, como se observa en la figura 3.10B el tamaño de la raíz disminuía al incrementarse la concentración de agua de taladrina.

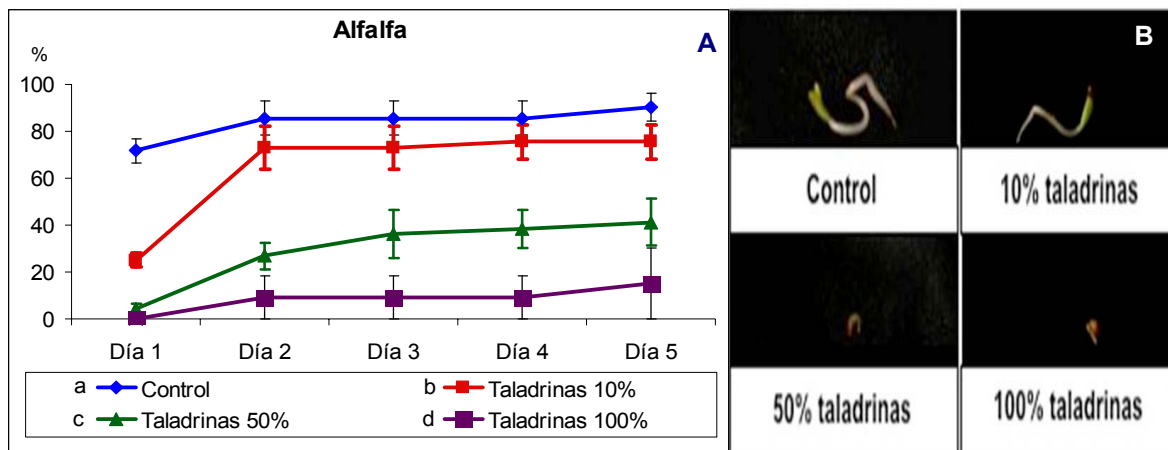


Figura 3.10. A - Representación del porcentaje de germinación de la alfalfa en el tratamiento de control (PCA, línea azul), PCA con 10% de agua de taladrina (línea roja), PCA con 50% de agua de taladrina (línea verde) y PCA con 100% de agua de taladrina (línea morada), medido durante 5 días consecutivos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$); **B** - Disminución del tamaño de la raíz en las semillas de alfalfa debido al incremento de la concentración de agua de taladrina.

3.7.2. Altramuz (*Lupinus sp.*)

En la figura 3.11A se muestran los resultados obtenidos en los distintos tratamientos y las diferencias existentes entre ambos. En función del tratamiento, la germinación se retrasó entre uno y dos días. Cabe destacar que las semillas fueron capaces de germinar en todos los tratamientos. En este caso, se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de germinación entre el control y los tratamientos de agar con agua de taladrina al 50% y al 100%, pero no se encontraron entre éste y el tratamiento del 10 % de agua de taladrina.

De nuevo se observó una disminución en el tamaño de la raíz al incrementar la concentración de agua de taladrina (Figura 3.11B).

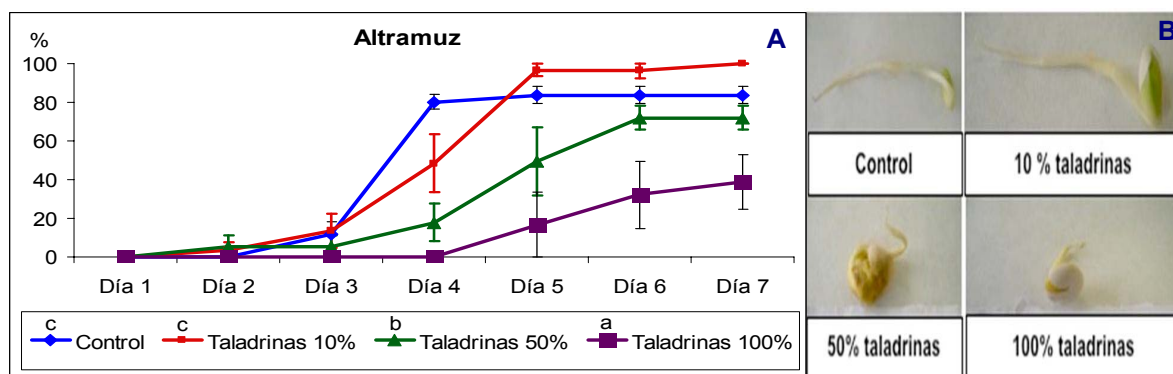


Figura 3.11. A - Representación del porcentaje de germinación del altramuz en el tratamiento control (PCA, línea azul), PCA con 10% de agua de taladrina (línea roja), PCA con 50% de agua de taladrina (línea verde) y PCA con 100% de agua de taladrina (línea morada), medido durante 7 días consecutivos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$); **B** - Disminución del tamaño de la raíz en las semillas de altramuz debido al incremento de la concentración de agua de taladrina.

3.7.3. Arroz (*Oryza sativa*)

En la figura 3.12A se observan los resultados obtenidos para estas semillas en los distintos tratamientos y las diferencias existentes entre ambos. En todos los casos, la germinación se retrasó dos días. Cabe destacar que las semillas fueron capaces de germinar en todos los tratamientos. Sin embargo, con el tratamiento de agar con 100% de agua de taladrina se encontró una disminución significativa en el porcentaje de germinación en relación al resto de tratamientos que no mostraban diferencias entre ellos.

El tamaño de la raíz disminuía al aumentar la concentración de agua de taladrina, pero de una forma menor que en otras especies (figura 3.12B).

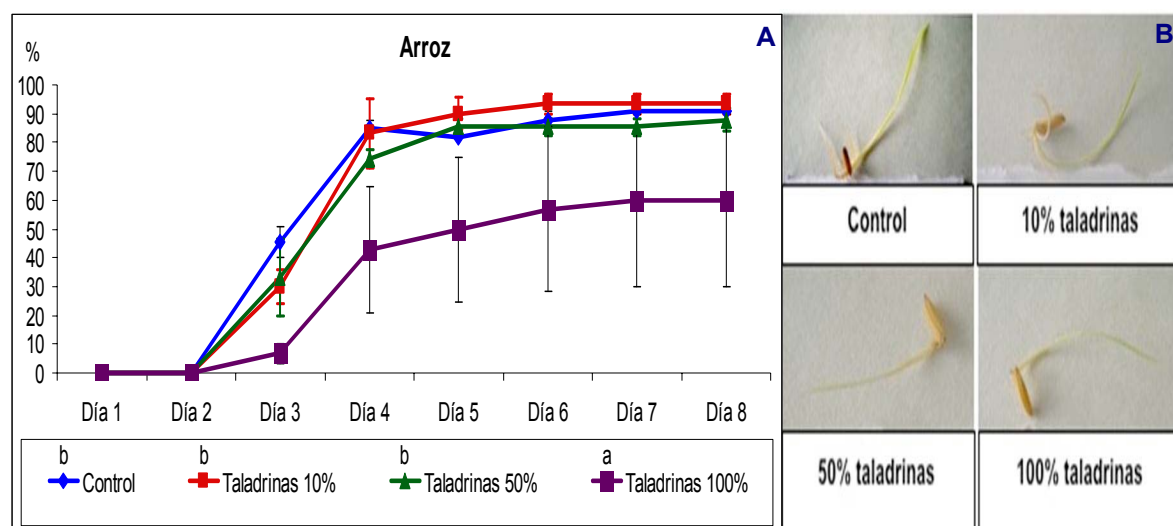


Figura 3.12. A - Representación del porcentaje de germinación del arroz en el tratamiento control (PCA, línea azul), PCA con 10% de agua de taladrina (línea roja), PCA con 50% de agua de taladrina (línea verde) y PCA con 100% de agua de taladrina (línea morada), medido durante 8 días consecutivos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). **B** - Disminución del tamaño de la raíz en las semillas de arroz debido al incremento de la concentración de agua de taladrina.

3.7.4. Espadaña (*Typha angustifolia*)

En la figura 3.13A se ven los resultados obtenidos para estas semillas en los distintos tratamientos y las diferencias existentes entre ambos. Cabe destacar que la germinación se produjo en todos los tratamientos. Las semillas de esta planta mostraron diferencias significativas en el porcentaje de germinación entre el control y los tratamientos al 50% y al 100% de agua de taladrina, pero no con el tratamiento con el 10% de agua de taladrina.

El tamaño de la raíz disminuía al incrementar la concentración de agua de taladrina en cada uno de los tratamientos. Esto puede observarse en la figura 3.13B.

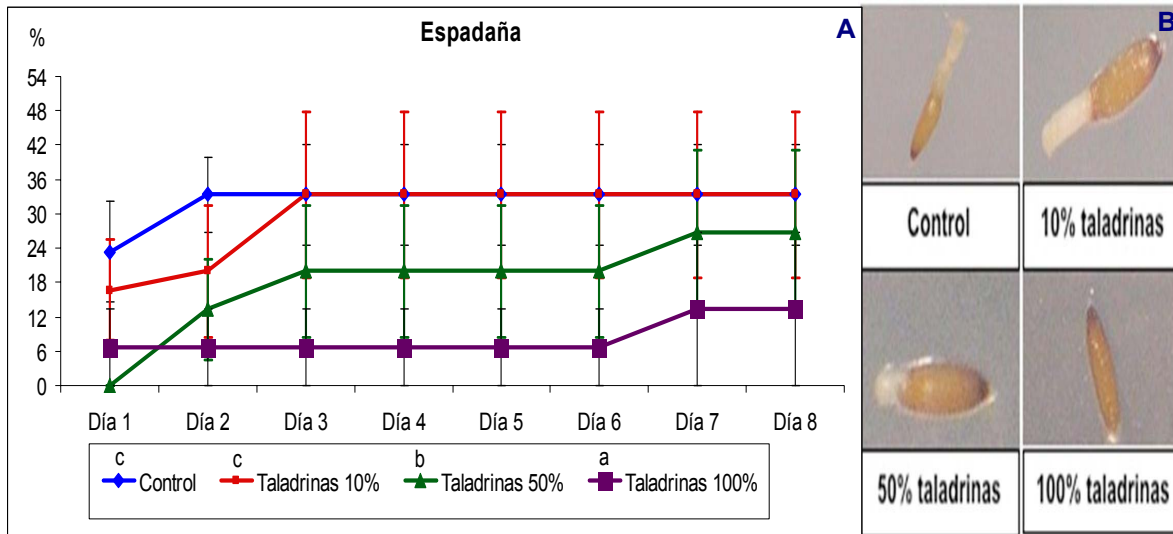


Figura 3.13. A - Representación del porcentaje de germinación de la espadaña en el tratamiento control (PCA, línea azul), PCA con 10% de agua de taladrina (línea roja), PCA con 50% de agua de taladrina (línea verde) y PCA con 100% de agua de taladrina (línea morado), medido durante 8 días consecutivos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). **B** - Disminución del tamaño de la raíz en las semillas de espadaña debido al incremento de la concentración de agua de taladrina.

3.7.5. Girasol (*Helianthus annuus*)

En la figura 3.14A se observa que las semillas fueron capaces de germinar en todos los tratamientos. Se puede destacar que el porcentaje de germinación de las semillas fue superior en el tratamiento de agua de taladrina al 10%, aunque no se encontraron diferencias significativas. Si se constataron diferencias significativas entre el control con los tratamientos al 50% y al 100% de agua de taladrina, en los que disminuía el porcentaje de germinación.

En la figura 3.14B se puede ver como, al igual que en tratamientos anteriores, el tamaño de la raíz disminuía al incrementar la concentración de agua de taladrina en cada uno de los tratamientos.

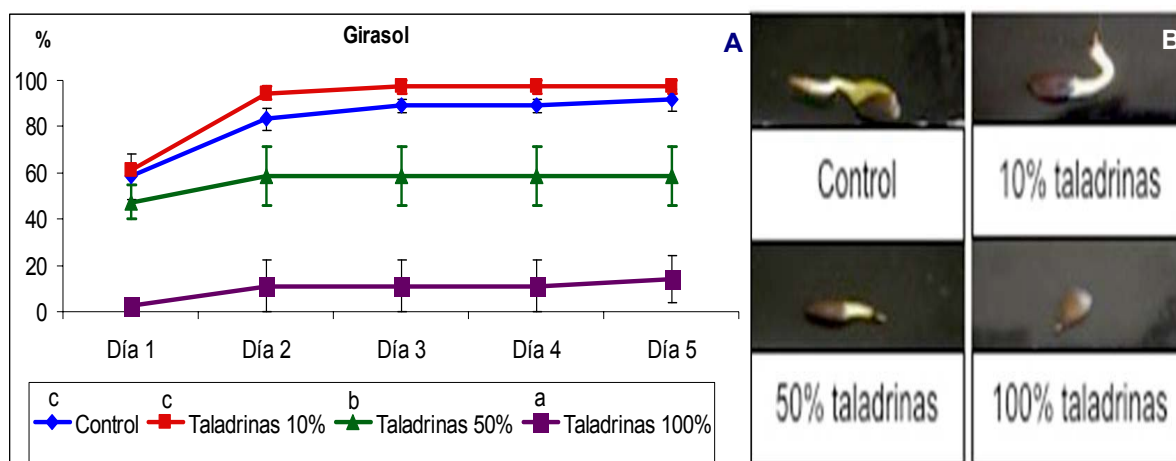


Figura 3.14. A - Representación del porcentaje de germinación del girasol en el tratamiento control (PCA, línea azul), PCA con 10% de agua de taladrina (línea roja), PCA con 50% de agua de taladrina (línea verde) y PCA con 100% de agua de taladrina (línea morada), medido durante 5 días consecutivos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). **B** - Disminución del tamaño de la raíz en las semillas de girasol debido al incremento de la concentración de agua de taladrina.

3.7.6. Maíz (*Zea mays*)

En la figura 3.15A se observa como las semillas fueron capaces de germinar en todos los tratamientos. En este caso prácticamente no hubo diferencias significativas entre el control y el PCA con las distintas concentraciones de agua de taladrina. Sólo se encontraron diferencias en el tratamiento con el 100% de agua de taladrina, derivado probablemente del retardo en el porcentaje de germinación en el 2º día, ya que posteriormente todos los tratamientos tienen el mismo comportamiento.

El maíz ha sido la única especie vegetal terrestre que ha tenido una germinación del 100% en todos los tratamientos.

Por otra parte, en la figura 3.14B, se observa una disminución del tamaño de la raíz al incrementar la concentración de agua de taladrina en cada uno de los tratamientos.

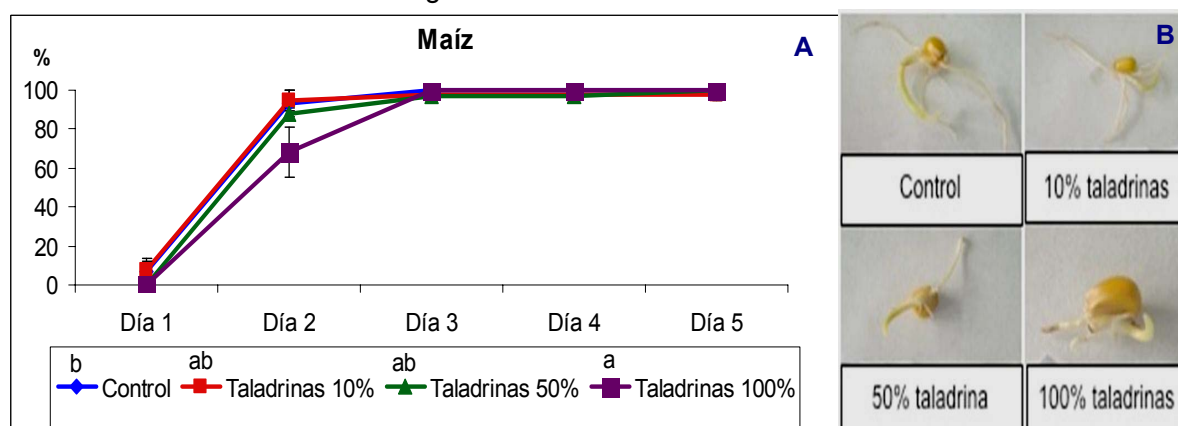


Figura 3.15. A - Representación del porcentaje de germinación del maíz en el tratamiento control (PCA, línea azul), PCA con 10% de agua de taladrina (línea roja), PCA con 50% de agua de taladrina (línea verde) y PCA con 100% de agua de taladrina (línea morada), medido durante 5 días consecutivos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). **B** - Disminución del tamaño de la raíz en las semillas de maíz debido al incremento de la concentración de agua de taladrina.

3.7.7. Mostaza negra (*Brassica nigra*)

En la figura 3.16 se observan los resultados obtenidos. Sólo germinaron semillas en los tratamientos control y con agua de taladrina al 10%, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

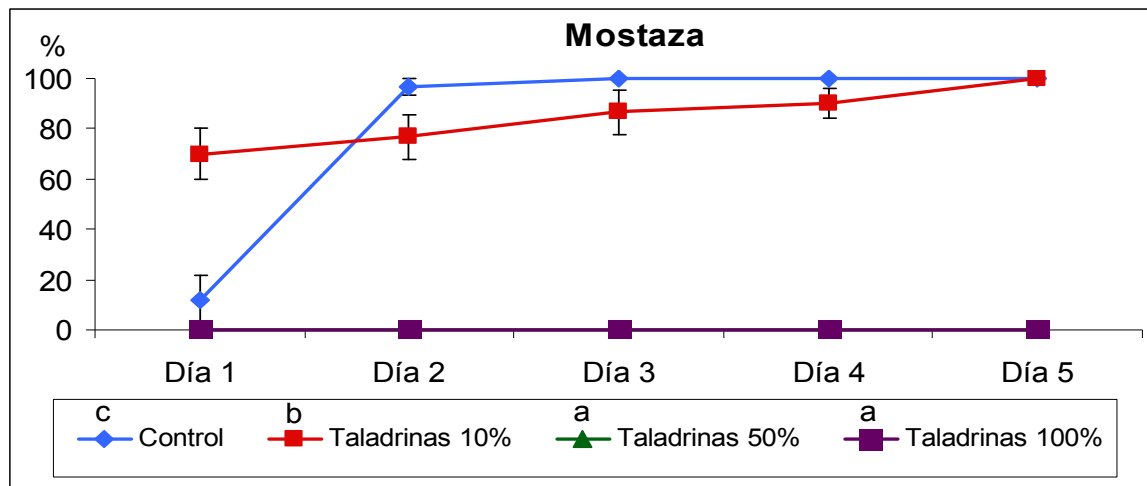









Figura 3.16. Representación del porcentaje de germinación de la mostaza negra en el tratamiento control (PCA, línea azul), PCA con 10% de agua de taladrina (línea roja), PCA con 50% de agua de taladrina (línea verde) y PCA con 100% de agua de taladrina (línea morada), medido durante 5 días consecutivos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.8. Determinación de la capacidad de crecimiento en agua de taladrina

En la tabla 3.2 se muestra la resistencia de diversas plantas a 2 concentraciones distintas de agua de taladrina. Como se puede observar, el maíz y una planta de altramuz fueron capaces de resistir la concentración más elevada (4.500ppm) pero su desarrollo fue muy limitado.

De todas las plantas utilizadas, sólo el maíz fue capaz de crecer en agua de taladrina a una concentración ligeramente superior a la permitida por la ley (1.930 ppm), por eso en los posteriores experimentos se utilizó dicha planta.

Tabla 3.2. Resistencia de diversas plantas a dos concentraciones distintas de agua de taladrina con Hoagland.

Especie	1.930 ppm agua de taladrina	4.500 ppm agua de taladrina
Altramuz		
Girasol		No creció
Jacinto de agua		No creció
Judía		No creció
Maíz		

3.9. Determinación de la capacidad de desarrollo en agua de taladrina de las plantas de hábitat acuático

3.9.1. Experimentos con *Lemna minor*

3.9.1.1. Disminución de la DQO por la especie *Lemna minor*

En la figura 3.17 se muestra el comportamiento de la DQO tras el crecimiento de *Lemna minor* en diferentes concentraciones de agua de taladrina y taladrina pretratada. Por lo general, se observa una reducción de la DQO después de que el medio contaminado estuviese en contacto con la especie acuática.

Cuando se utilizó el agua de taladrina, se produjo en todos los tratamientos una variación estadísticamente significativa entre la DQO inicial y la obtenida después del proceso de fitorremediación. Cuando el medio contaminado era la taladrina pretratada, se observaron variaciones significativas de la DQO en todas las concentraciones, salvo cuando se utilizó la DQO 2 (821,25 ppm), la DQO 3 (1.396,17 ppm) y la DQO 5 (2.324,74 ppm).

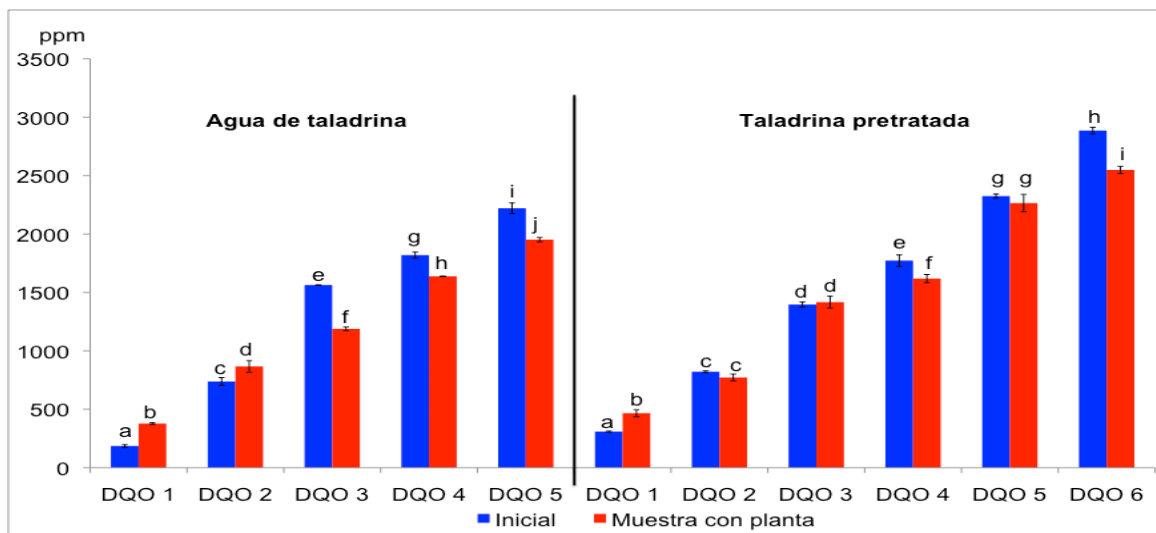


Figura 3.17. Representación de la capacidad de fitorremediación de la especie acuática *Lemna minor* en diferentes concentraciones de agua de taladrina (DQO 1 = 185,40 ppm; DQO 2 = 737,48 ppm; DQO 3 = 1.563,41 ppm; DQO 4 = 1.819,51 ppm; DQO 5 = 2.220,21 ppm) y de taladrina pretratada (DQO 1 = 309,06 ppm; DQO 2 = 821,25 ppm; DQO 3 = 1.396,17 ppm; DQO 4 = 1.772,47 ppm; DQO 5 = 2.324,74 ppm; DQO 6 = 2.885,71 ppm). Se realizó de forma independiente la estadística para los tratamientos con agua de taladrina y con taladrina pretratada. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.9.1.2 Variación del peso fresco, eficiencia fotosintética y pigmentos fotosintéticos de *Lemna minor* creciendo en agua de taladrina y taladrina pretratada

3.9.1.2.a. Variación del peso fresco

En las figuras 3.18 y 3.19, se muestra la reducción de la biomasa producida por diferentes concentraciones de DQO de plantas en contacto con agua de taladrinas y taladrinas pretratadas respectivamente.

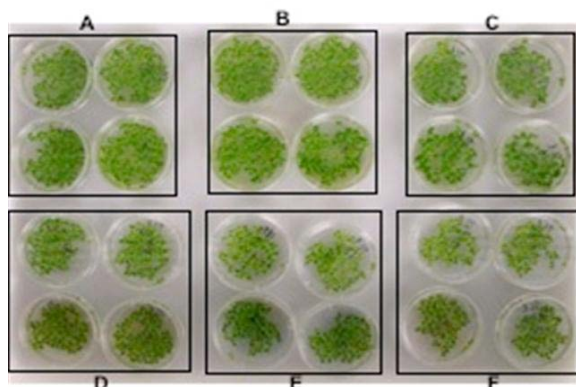


Figura 3.18. Efecto de diferentes valores de DQO de agua de taladrina sobre plantas de *Lemna minor*. Las letras indican los distintos valores de DQO: A (control), B (185,40 ppm), C (737,48 ppm), D (1.563,41 ppm), E (1.819,51 ppm) y F (2.220,21 ppm).

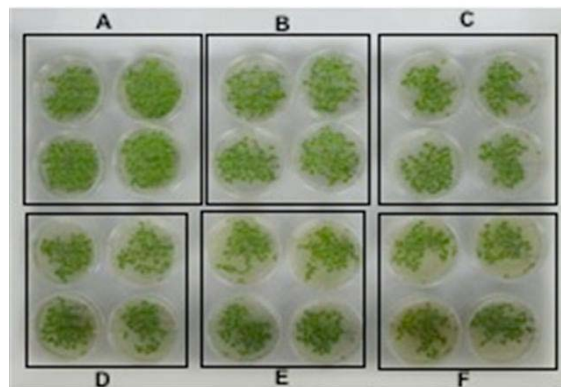


Figura 3.19. Efecto de diferentes valores de DQO de las taladrina pretratada sobre plantas de *Lemna minor*. Las letras indican las distintas DQO: A (309,06 ppm), B (821,25 ppm), C (1.396,17 ppm), D (1.772,47 ppm), E (2.324,74 ppm) y F (2.885,71 ppm).

Si se compara la cantidad de biomasa producida por *Lemna minor* con los distintos valores de DQO del agua de taladrina (figura 3.18) con respecto al control (figura 3.18A), se observa una ligera reducción de la biomasa cuando este parámetro es de 737,48 ppm (figura 3.18C). La biomasa sigue disminuyendo paulativamente al incrementar la DQO sin observar una reducción drástica (figura 3.18C y siguientes).

Sin embargo, en la taladrina pretratada (figura 3.19) se puede observar una ligera reducción a partir de la segunda concentración de la DQO (821,25 ppm, figura 3.18B), disminuyendo la biomasa a la mitad a partir de los 1.396,17 ppm de DQO (figura 3.19C y siguientes).

Esto puede comprobarse si se observan las figuras 3.20 y 3.21 donde se muestra el porcentaje de variación del peso fresco final entre los distintos tratamientos con agua de taladrina o con taladrina pretratada.

En la figura 3.20 se puede comprobar los resultados descritos respecto a la figura 3.18. De esta manera, se observa una disminución significativa del peso fresco en las plantas que crecieron en agua de taladrina a partir de la DQO de 737,48 ppm y una disminución escalonada y significativa de este parámetro biométrico para los valores de DQO mayores.

En la figura 3.21 se observa un incremento significativo de la biomasa respecto al control después de que las plantas de *Lemna minor* estuviesen 5 días en la taladrina pretratada de menor valor de DQO. Al igual que se observa en la figura 3.19, después de que las plantas estuviesen 5 días en la taladrina pretratada con DQO 1.396,17 ppm se observa una reducción significativa del peso fresco, de manera que el valor final de este parámetro en las plantas tratadas es la mitad que el de las plantas controles (pasando de un porcentaje del 20% en los controles a alrededor del 9% en las tratadas). Finalmente, cabe indicar que en los casos donde era mayor la DQO inicial de la taladrina pretratada (DQO 4, DQO 5 y DQO 6) se observa una disminución significativa del peso fresco con respecto al resto de los tratamientos.

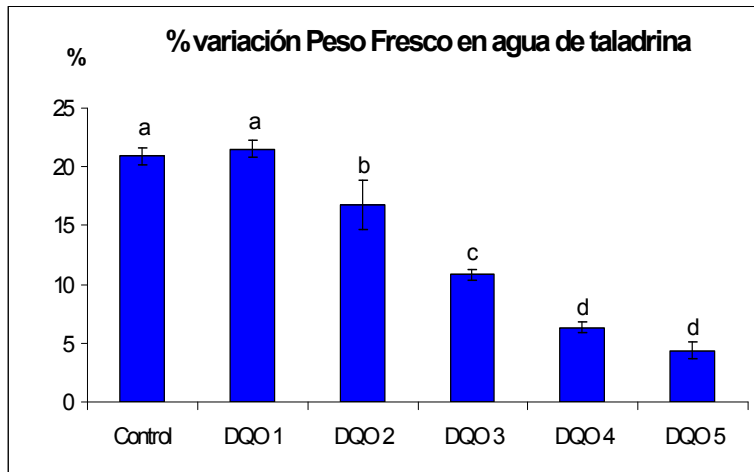
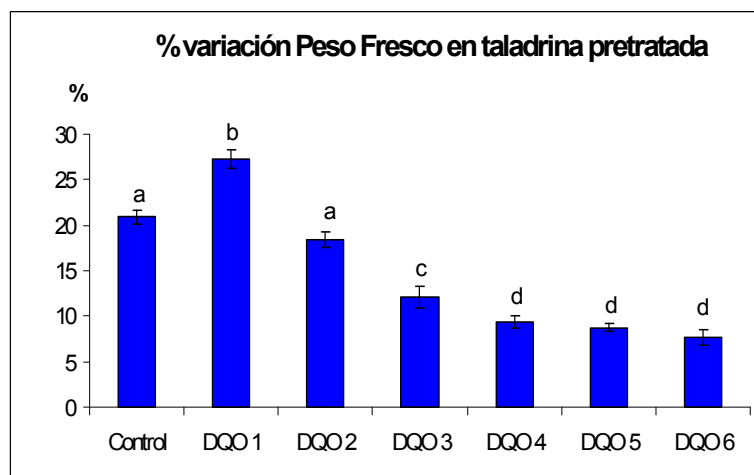


Figura 3.20. Porcentaje de variación del peso fresco final de *Lemna minor* después de 5 días en agua de taladrina con distintos valores de DQO (DQO 1 = 185,40 ppm, DQO 2 = 737,48 ppm, DQO 3 = 1.563,41 ppm, DQO 4 = 1.819,51 ppm y DQO 5 = 2.220,21 ppm). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura 3.21. Porcentaje de variación del peso fresco final de *Lemna minor* después de 5 días en taladrina pretratada con distintos valores de DQO (DQO 1 = 309,06 ppm, DQO 2 = 821,25 ppm, DQO 3 = 1.396,17 ppm, DQO 4 = 1.772,47 ppm, DQO 5 = 2.324,74 ppm y DQO 6 = 2.885,71 ppm). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).



3.9.1.2.b. Variación de la eficiencia fotosintética de las plantas en agua de taladrina

En la figura 3.22 se muestra la variación de los parámetros de eficiencia fotosintética en las plantas de *Lemna minor* en contacto con agua de taladrina de distintos valores de DQO.

El parámetro F_0 (fluorescencia emitida en condiciones de luz suave por plantas que provienen de oscuridad), que se puede observar en la figura 3.22A, aumenta con respecto al control en todos los tratamientos, aunque a partir de los 1.563,41 ppm (DQO3) este incremento no presenta diferencias significativas.

En la figura 3.22B se puede observar como el parámetro F_m (máxima fluorescencia en el estado de adaptación a la oscuridad) disminuye significativamente con respecto al control en las plantas que han estado en contacto con el agua de taladrina con una DQO mayor (1.819,51 ppm y 2.220,21 ppm).

Finalmente, el parámetro F_v/F_m (eficiencia potencial máxima del fotosistema II), mostrado en la figura 3.22C, disminuye progresivamente al aumentar el valor de la DQO del agua de taladrina. Esta disminución presenta diferencias significativas respecto al control cuando la DQO del medio contaminado es mayor de 737,48 ppm.

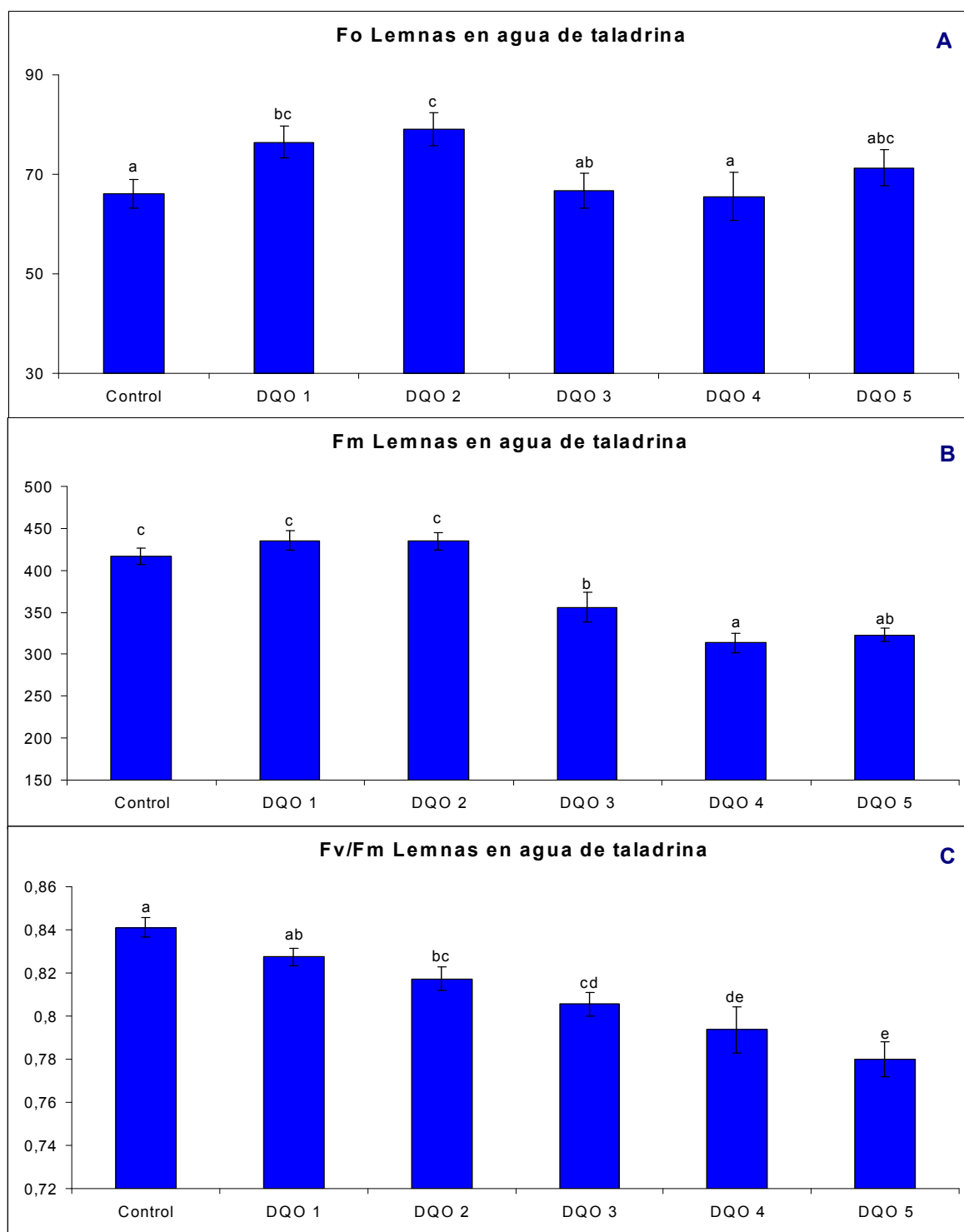


Figura 3.22. **A** - Variación de la fluorescencia emitida en condiciones de luz suave por plantas que provienen de oscuridad (F_o) en *Lemna minor* después de estar 5 días en agua de taladrina con distintos valores de DQO (DQO 1 = 185,40 ppm, DQO 2 = 737,48 ppm, DQO 3 = 1.563,41 ppm, DQO 4 = 1.819,51 ppm y DQO 5 = 2.220,21 ppm). **B** - Variación de la máxima fluorescencia en el estado de adaptación a la oscuridad (F_m) en *Lemna minor* después de estar 5 días en agua de taladrina con distintos valores de DQO (DQO 1 = 185,40 ppm, DQO 2 = 737,48 ppm, DQO 3 = 1.563,41 ppm, DQO 4 = 1.819,51 ppm y DQO 5 = 2.220,21 ppm). **C** - Variación de la eficiencia potencial máxima del fotosistema II (F_v/F_m) en *Lemna minor* después de estar 5 días en agua de taladrina con distintos valores de DQO (DQO 1 = 185,40 ppm, DQO 2 = 737,48 ppm, DQO 3 = 1.563,41 ppm, DQO 4 = 1.819,51 ppm y DQO 5 = 2.220,21 ppm). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.9.1.2.c. Variación de la eficiencia fotosintética de las plantas en taladrina pretratada

En las figuras 3.23 y 3.24 se puede observar la variación de distintos parámetros fotosintéticos en las plantas de *Lemna minor* como consecuencia de los distintos valores de DQO de las taladrinas pretratadas.

Al igual que se describió en los tratamientos con agua de taladrina, en la figura 3.23A se observa un incremento del parámetro Fo respecto al control en todos los tratamientos con taladrina pretratada. Este incremento es significativo para los tratamientos con DQO de 821,25 ppm, 1.396,17 ppm, 1.772,47 ppm y 2.885,71 ppm.

En la figura 3.24B se observan ligeras oscilaciones en los valores de Fm de las plantas que estuvieron 5 días en distintas DQO de taladrina pretratada. Sólo se observa una variación significativa respecto al control en el tratamiento con una DQO de 2.324,74 ppm, donde este parámetro disminuye significativamente.

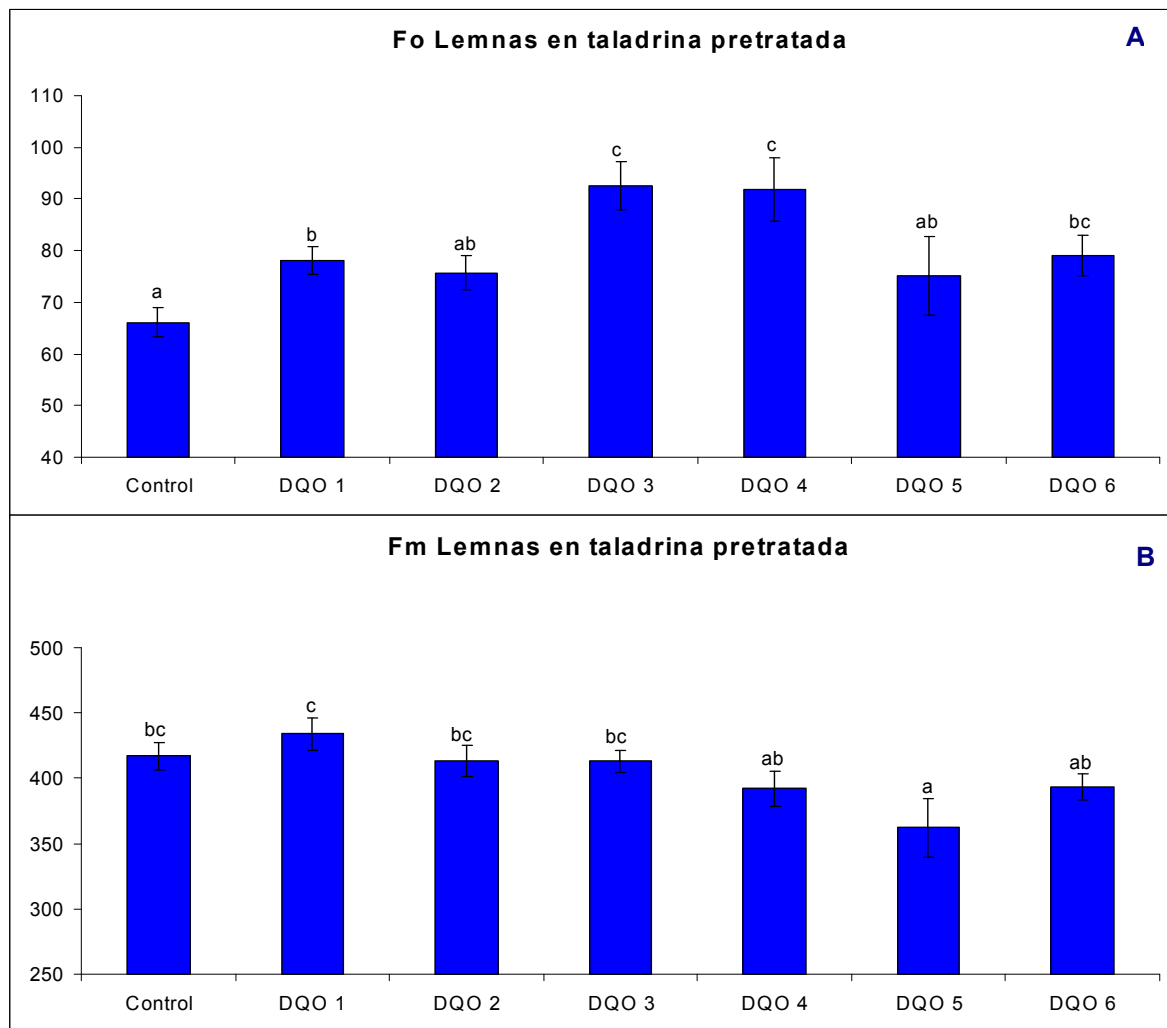


Figura 3.23. A - Variación de Fo en *Lemna minor* después de estar 5 días en taladrina pretratada con distintos valores de DQO (DQO 1 = 309,06 ppm, DQO 2 = 821,25 ppm, DQO 3 = 1.396,17 ppm, DQO 4 = 1.772,47 ppm, DQO 5 = 2.324,74 ppm y DQO 6 = 2.885,71 ppm). **B** - Variación de Fm en *Lemna minor* después de estar 5 días en taladrina pretratada con distintos valores de DQO (DQO 1 = 309,06 ppm, DQO 2 = 821,25 ppm, DQO 3 = 1.396,17 ppm, DQO 4 = 1.772,47 ppm, DQO 5 = 2.324,74 ppm y DQO 6 = 2.885,71 ppm). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

El parámetro Fv/Fm disminuye con respecto al control en todos los tratamientos (figura 3.24), siendo esta disminución significativa a partir de la DQO 821,25 ppm. Cuando la DQO era de 1.396,17 ppm y de 1.772,47 ppm se obtuvieron los valores de Fv/Fm significativamente más bajos

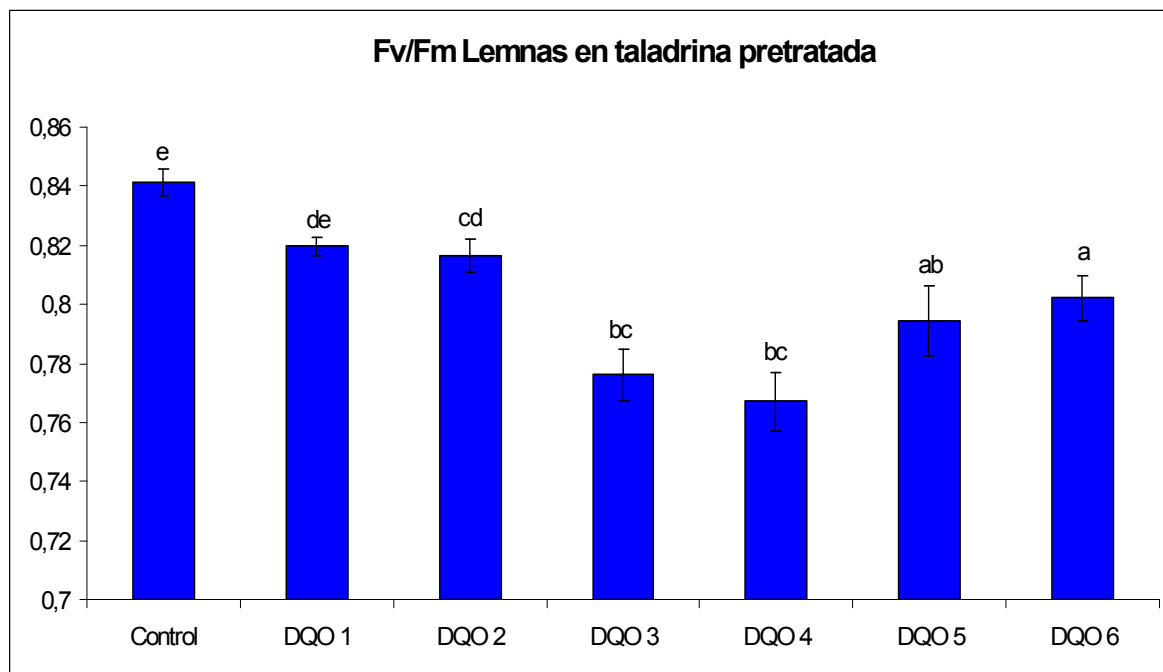


Figura 3.24. Variación de Fv/Fm en *Lemna minor* después de estar 5 días en taladrina pretratada con distintos valores de DQO (DQO 1 = 309,06 ppm, DQO 2 = 821,25 ppm, DQO 3 = 1.396,17 ppm, DQO 4 = 1.772,47 ppm, DQO 5 = 2.324,74 ppm y DQO 6 = 2.885,71 ppm). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.9.1.2.d. Variación de los pigmentos fotosintéticos de las plantas en agua de taladrina

En la tabla 3.3 se observa la concentración de cada pigmento según la DQO del agua de taladrina. En este caso se observa un descenso significativo en los valores de las clorofilas a y b al aumentar la DQO del agua de taladrina. La misma tendencia se encuentra con la relación entre clorofila a y b, la neoxantina y el β -caroteno. El δ -tocoferol, sin embargo, aumenta sus valores significativamente.

Los cromatogramas correspondientes a estos pigmentos se adjuntan en el Anexo 8.

Tabla 3.3. Concentración de pigmentos totales en plantas de *Lemna minor* expuestas 5 días a agua de taladrina de distintos valores de DQO (DQO 1 = 185,40 ppm, DQO 2 = 737,48 ppm, DQO 3 = 1.563,41 ppm, DQO 4 = 1.819,51 ppm y DQO 5 = 2.220,21 ppm). Para cada pigmento, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Contenido pigmentos totales	Control	DQO 1	DQO 2	DQO 3	DQO 4	DQO 5
Clorofila a (nmol/g)	787,3 ± 59 c	866,7 ± 23 c	783,3 ± 7 c	673,3 ± 30 b	620,5 ± 38 ab	528,3 ± 25 a
Clorofila b (nmol/g)	249,1 ± 20 bc	274,60 ± 7 c	251,6 ± 1 bc	231,7 ± 12 b	224,9 ± 14 ab	188,7 ± 7 a
Clorofila a + b (nmol/g)	1.036,4 ± 79 c	1.141,3 ± 29 c	1.034,9 ± 7 c	905 ± 41,79 b	845,4 ± 51 ab	717 ± 32 a
Clorofila a/b (pmol/g)	3,2 ± 0,03 c	3,16 ± 0,04 c	3,1 ± 0,03 c	2,9 ± 0,02 b	2,8 ± 0,04 a	2,8 ± 0,02 a
Neoxantina (nmol/g)	44,3 ± 4 bc	48,2 ± 1 c	44,5 ± 0,73 bc	40,8 ± 2 ab	41,4 ± 2,4 ab	34,7 ± 1 a
δ-tocoferol (nmol/g)	26,3 ± 1 a	49,9 ± 0,87 b	50,8 ± 2 b	49,26 ± 3 b	48,55 ± 2,7 b	49,5 ± 4 b
γ-tocoferol (nmol/g)	31,8 ± 4	32,4 ± 2	32,9 ± 0,23	35,51 ± 1	40,2 ± 2	36,7 ± 1
α-tocoferol (nmol/g)	44,8 ± 3	48,2 ± 3	45,8 ± 2	34,4 ± 2	26,8 ± 2	21,9 ± 1
Total tocoferol (nmol/g)	76,6 ± 7	80,6 ± 4	78,8 ± 2	69,9 ± 3	67 ± 4	58,6 ± 2
Luteína (nmol/g)	145,7 ± 11	160,6 ± 4	156,4 ± 2	151,5 ± 7,10	152,9 ± 8	134,1 ± 6
Luteína epóxido (LX) (nmol/g)	1,33 ± 0,05 ab	1,19 ± 0,06 a	1,4 ± 0,05 ab	1,7 ± 0,06 c	1,74 ± 0,07 c	1,5 ± 0,14 bc
LX / Clorofila (pmol/g)	0,001 ± 0,0001 a	0,001 ± 0,0001 a	0,001 ± 0,00004 a	0,002 ± 0,00003 b	0,002 ± 0,0001 b	0,002 ± 0,0001 b
Violaxantina (nmol/g)	86 ± 8	84,7 ± 2	80,4 ± 1,33	83,6 ± 3	84,6 ± 6	75,6 ± 3
Anteraxantina (nmol/g)	6,62 ± 0,72	6,8 ± 0,2	6,7 ± 0,17	6,3 ± 0,35	8,3 ± 0,44	6,9 ± 0,18
Zeaxantina (nmol/g)	14,1 ± 1,20 c	15,1 ± 0,96 c	12,9 ± 0,4 bc	11,3 ± 1,20 ab	11,6 ± 0,64 ab	10,1 ± 0,7 a

Tabla 3.3. Continuación.

Contenido pigmentos totales	Control	DQO 1	DQO 2	DQO 3	DQO 4	DQO 5
Conjunto VAZ (nmol/g)	106,7 ± 9	106,7 ± 3	100 ± 1,5	101,2 ± 5	104,5 ± 6	92,7 ± 4
a + z / VAZ (pmol/g)	0,19 ± 0,002 bc	0,21 ± 0,01 c	0,2 ± 0,004 bc	0,17 ± 0,01 a	0,19 ± 0,01 abc	0,18 ± 0,01 ab
β – Caroteno (nmol/g)	99,5 ± 7 cd	111,4 ± 3 d	97,7 ± 2,5 c	79,6 ± 4 b	72,1 ± 5 ab	60,5 ± 3 a
Total Carotenoides (nmol/g)	397,5 ± 32	428,1 ± 11	400 ± 6	374,9 ± 17	372,7 ± 21	323,5 ± 14

3.9.1.2.e. Variación de los pigmentos fotosintéticos de las plantas en taladrina pretratada

En la tabla 3.4 se puede ver como la mayoría de los parámetros medidos, mostraron diferencias significativas entre el control y alguno de los tratamientos, sobretodo con los que tenían un valor de DQO más alto. Los cromatogramas correspondientes a estos pigmentos se adjuntan en el Anexo 8.

Algunos de los resultados mas destacados son los obtenidos en el caso de la relación entre la clorofila a y b, en el cual se observaron disminuciones significativas a medida que aumentaba el valor de DQO. En el caso del total de tocoferol, VAZ (violaxantina + anteroxantina + zeaxantina) y total de carotenoides los valores tienden a aumentar significativamente.

Tabla 3.4. Concentración de pigmentos totales en plantas de *Lemna minor* expuestas 5 días a taladrina pretratada de distintos valores de DQO (DQO 1 = 309,06 ppm, DQO 2 = 821,25 ppm, DQO 3 = 1.396,17 ppm, DQO 4 = 1.772,47 ppm, DQO 5 = 2.324,74 ppm y DQO 6 = 2.885,71 ppm). Para cada pigmento, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Contenido pigmentos totales	Control	DQO 1	DQO 2	DQO 3	DQO 4	DQO 5	DQO 6
Clorofila a (nmol/g)	787,3 ± 59	674,1 ± 20	666,2 ± 7	700,4 ± 14	643,8 ± 29	704,9 ± 71	924,6 ± 65
Clorofila b (nmol/g)	249,1 ± 20	217,4 ± 6	227 ± 11	253,6 ± 10	238,1 ± 12	283 ± 43	368,15 ± 71
Clorofila a + b (nmol/g)	1.036,4 ± 79	891,6 ± 26	893,2 ± 37	954 ± 24	882 ± 41	1.066,5 ± 167	1.434,43 ± 265
Clorofila a/b (pmol/g)	3,2 ± 0,03 c	3,1 ± 0,03 c	2,94 ± 0,03 b	2,8 ± 0,06 a	2,7 ± 0,04 a	2,8 ± 0,03 a	2,91 ± 0,03 b
Neoxantina (nmol/g)	44,3 ± 4	37,5 ± 0,8	39,3 ± 2	43,7 ± 1,6	40,9 ± 2	49,2 ± 7	64,1 ± 12
δ-tocoferol (nmol/g)	26,3 ± 1	31,3 ± 1	27 ± 0,62	22,2 ± 1	20,9 ± 0,74	33,6 ± 6	35,1 ± 6
γ-tocoferol (nmol/g)	31,8 ± 4	25,1 ± 1	28,4 ± 2	29,6 ± 1,8	28,3 ± 2	38,2 ± 4	47 ± 11
α-tocoferol (nmol/g)	44,8 ± 3 ab	46,2 ± 3 ab	30,1 ± 3 a	67 ± 8 b	117,9 ± 10 c	76,07 ± 23 b	61,6 ± 13 ab
Total tocoferol (nmol/g)	76,6 ± 7 ab	71,4 ± 3 ab	58,5 ± 5 a	96,6 ± 8 ab	146,2 ± 11 c	114,29 ± 25 bc	108,6 ± 24 bc
Luteína (nmol/g)	145,7 ± 11 a	129,6 ± 3 a	138,3 ± 3 a	153,4 ± 5 a	144,6 ± 8 a	175,6 ± 23 ab	229,1 ± 42 b
LX (nmol/g)	1,3 ± 0,05 a	1,2 ± 0,11 a	1,18 ± 0,09 a	1,5 ± 0,07 ab	1,49 ± 0,09 ab	1,88 ± 0,23 bc	2,1 ± 0,4 c
LX / Clorofila (pmol/g)	0,001 ± 0,0001 ab	0,001 ± 0,0001 abc	0,001 ± 0,00005 a	0,002 ± 0,0001 bc	0,002 ± 0,00003 c	0,002 ± 0,0001 c	0,001 ± 0,0001 bc

Tabla 3.4. Continuación

Contenido pigmentos totales	Control	DQO 1	DQO 2	DQO 3	DQO 4	DQO 5	DQO 6
LX / Clorofila (pmol/g)	0,001 ± 0,0001 ab	0,001 ± 0,0001 abc	0,001 ± 0,00005 a	0,002 ± 0,0001 bc	0,002 ± 0,00003 c	0,002 ± 0,0001 c	0,001 ± 0,0001 bc
Violaxantina (nmol/g)	86 ± 8 a	72,7 ± 2 a	79,7 ± 2 a	90,5 ± 2,9 a	71,4 ± 9 a	94,3 ± 12 a	128 ± 22 b
Anteraxantina (nmol/g)	6,6 ± 0,72 ab	5 ± 0,26 a	4,6 ± 0,5 a	6 ± 7 a	9,3 ± 0,6 bc	10,32 ± 1 c	9,4 ± 2 c
Zeaxantina (nmol/g)	14,1 ± 1 abc	11,4 ± 0,41 ab	9,9 ± 0,52 a	14,4 ± 2 abc	19 ± 1 c	17,5 ± 3 bc	19,7 ± 4 c
Conjunto VAZ (nmol/g)	106,7 ± 9 a	89,1 ± 3 a	94,2 ± 3 a	111 ± 4 a	99,7 ± 8 a	122,1 ± 16 ab	157 ± 28 b
a + z / VAZ (pmol/g)	0,19 ± 0,002 ab	0,18 ± 0,001 ab	0,15 ± 0,01 a	0,18 ± 0,02 ab	0,29 ± 0,03 c	0,23 ± 0,02 b	0,18 ± 0,01 ab
β – Caroteno (nmol/g)	99,4 ± 7	87,3 ± 3	82,9 ± 3	85,3 ± 2	78,6 ± 3	95,3 ± 15	132,8 ± 25
Total Carotenoides (nmol/g)	397,5 ± 32 a	344,7 ± 10 a	355,9 ± 11 a	394,91 ± 12 a	365,2 ± 22 a	444 ± 61 ab	506,11 ± 35 b

3.9.2. Experimentos con *Cyperus alternifolius*, *Elodea canadensis* y *Myriophyllum*

Se observó que ambas especies eran capaces de reducir significativamente la DQO durante los 5 primeros días en contacto con el agua de taladrina, pero después este parámetro se incrementó. En la última medida de la DQO realizada (a los 7 días para *Elodea* y *Myriophyllum* y a los 10 días para *Cyperus*), se observó que este parámetro era incluso significativamente mayor que el valor inicial.

No se pudieron analizar los parámetros biométricos, ni ningún otro, debido al estado en el que se encontraban las plantas al final del experimento.

3.10. Determinación de la capacidad de biorremediación del maíz en dos periodos de 5 días

3.10.1. Variaciones de la DQO bajo el efecto de plantas de maíz

En la figura 3.25 se observa como tanto en el tratamiento sólo con esparto, en el que se estudió el efecto del soporte, como en el tratamiento de maíz con esparto, se redujo el valor de la DQO.

Esta reducción es, en ambos casos, estadísticamente significativa respecto al obtenido en el agua de taladrina sin ningún tratamiento (ni esparto ni planta). También se observa como la reducción es significativamente mayor en el caso del tratamiento de maíz con esparto como soporte frente al del soporte sin planta.

Aunque el valor de la DQO es ligeramente inferior a los 10 días frente al obtenido a los 5 días, no hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos para un mismo tratamiento ni tampoco entre ambos días.

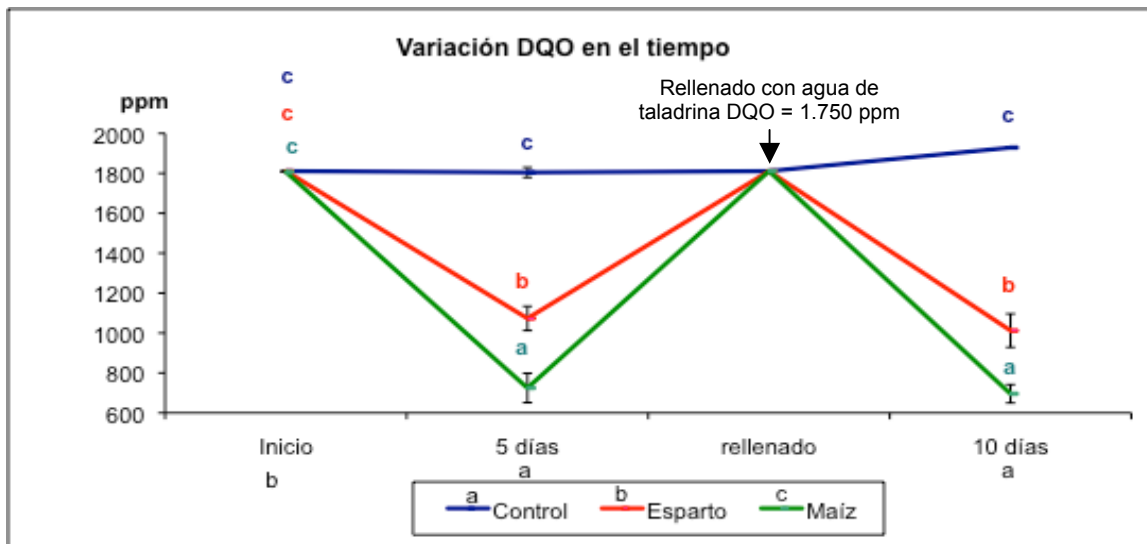


Figura 3.25. Representación de la variación de la DQO para los tratamientos de control (agua de taladrina, línea azul), agua de taladrina con esparto (línea roja) y agua de taladrina con maíz y esparto (línea verde). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.10.2. Efecto del agua de taladrina sobre los parámetros biométricos de las plantas de maíz

Se realizaron controles fisiológicos relativos al crecimiento de las plantas de maíz y su actividad fotosintética.

a) Altura: En la figura 3.26A se puede observar como el crecimiento de las plantas de maíz que crecieron en un medio sin agua de taladrina fue significativamente mayor al de las plantas que crecieron en el medio de agua de taladrina.

En la figura 3.26B se muestra una imagen de las plantas de maíz tras permanecer 5 días en agua de taladrina. Estas plantas presentan claros síntomas de clorosis en las hojas superiores y también signos de marchitez en las inferiores.

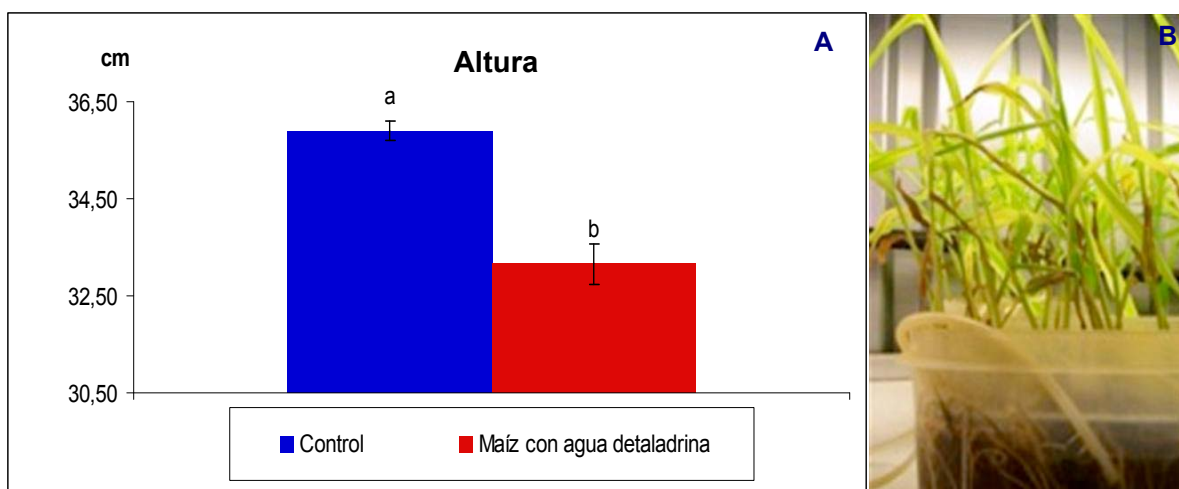


Figura 3.26. A - Representación de la altura de las plantas de maíz en función del tratamiento (sin agua de taladrina, color azul, o con agua de taladrina, color rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). B - Plantas de maíz tras 5 días en agua de taladrina.

b) Número de hojas: Este parámetro biométrico fue significativamente distinto entre ambos tratamientos de maíz (Figura 3.27).

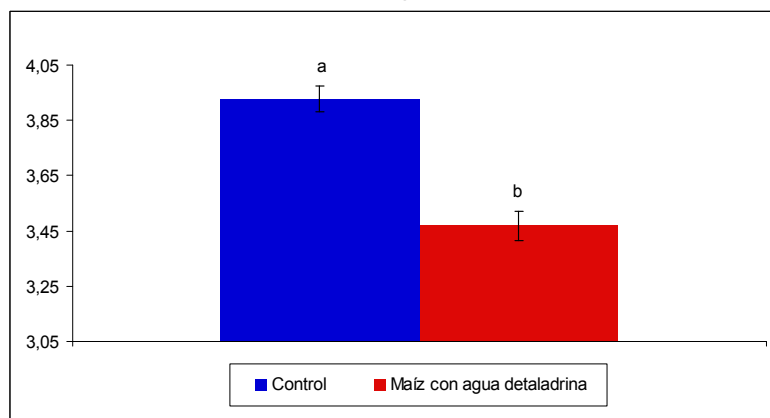


Figura 3.27. Representación del número de hojas de las plantas de maíz en función del tratamiento (sin agua de taladrina, color azul, o con agua de taladrina, color rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.10.3. Efecto del agua de taladrina sobre los parámetros fotosintéticos de las plantas de maíz

En la siguiente figura, se pueden observar los resultados de los diversos parámetros de la eficiencia fotosintética para ambos tratamientos. En los tratamientos con agua de taladrina se produjo una disminución no significativa del parámetro F_o respecto a las plantas controles (figura 3.28A).

En los parámetros F_v/F_m y $\phi PSII$ (eficiencia máxima del fotosistema II) se observan diferencias significativamente menores en las plantas tratadas que en los controles (Figuras 3.28B y 3.28C).

Al igual que se observó en el parámetro F_o , se produjo una reducción no significativa del parámetro qP (quenching fotoquímico de la variación de la fluorescencia de la clorofila) para el tratamiento de maíz con agua de taladrina frente al control (figura 3.28D).

Finalmente, en el parámetro ETR (Tasa relativa del transporte de electrones) se observan diferencias significativamente menores en las plantas tratadas que en los controles (Figura 3.28E). En la figura 3.28F se observa un incremento no significativo del parámetro NPQ en el tratamiento con agua de taladrina frente al control.

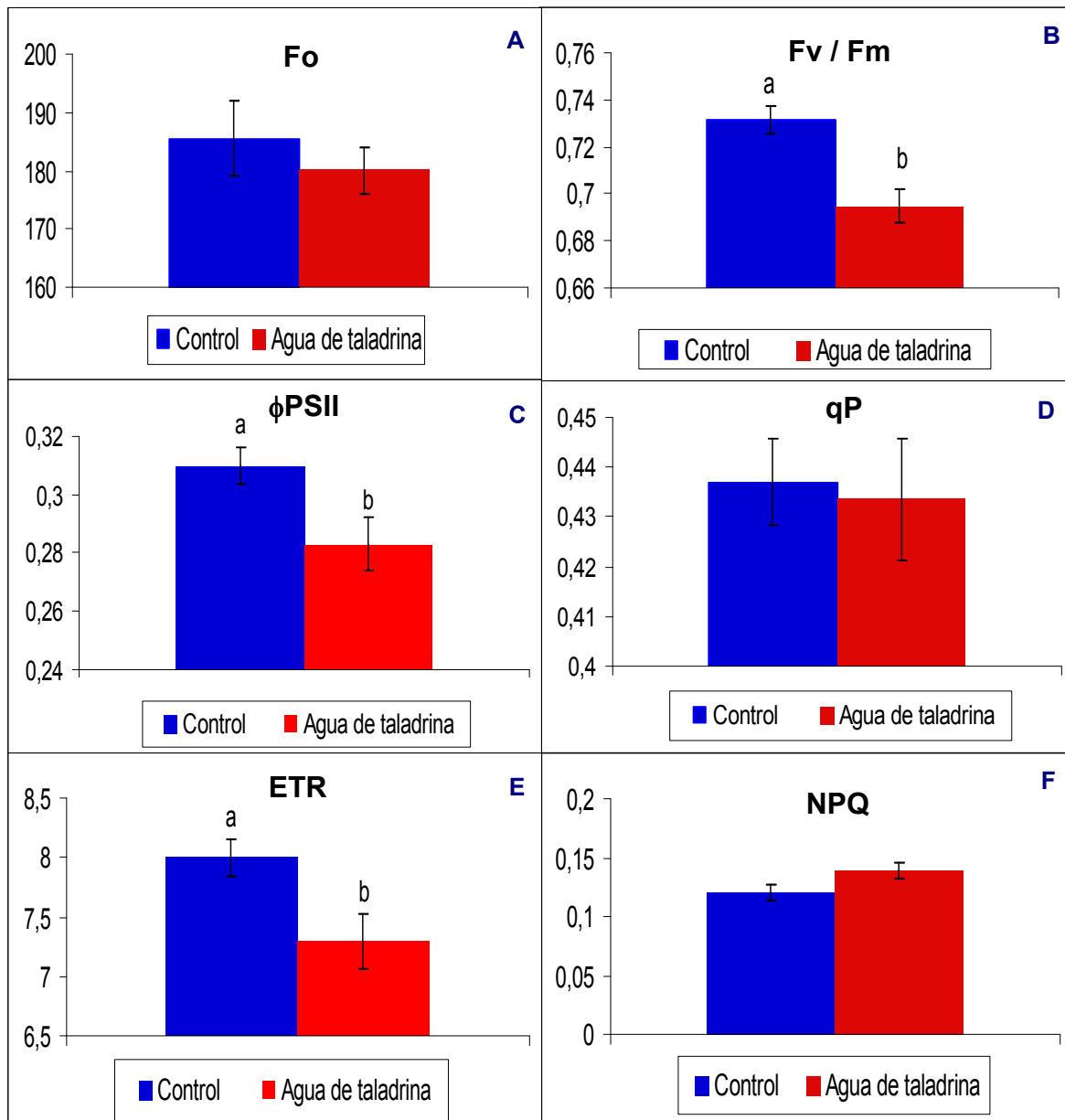


Figura 3.28. **A** - Representación del parámetro F_o en función del tratamiento. **B** - Representación del parámetro F_v/F_m en función del tratamiento. **C** - Representación del parámetro Φ_{PSII} (eficiencia máxima del fotosistema II) en función del tratamiento. **D** - Representación del parámetro qP (quenching fotoquímico de la variación de la fluorescencia de la clorofila) en función del tratamiento. **E** - Representación del parámetro ETR (tasa relativa del transporte de electrones) en función del tratamiento. **F** - Representación del parámetro NPQ (quenching no fotoquímico) en función del tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Tratamientos: color azul - sin agua de taladrina; color rojo - con agua de taladrina.

3.11. Determinación de la capacidad de biorremediación del maíz en un periodo de 9 días

Este experimento también tiene un doble objetivo: determinar la capacidad de biorremediación de las plantas de maíz sobre la DQO del agua de taladrina durante 9 días y conocer el efecto del medio a fitorremediar sobre la fisiología de las plantas.

3.11.1. Variación de la DQO bajo el efecto de las plantas de maíz

En este experimento se comprobó (figura 3.29) como los tratamientos de maíz con esparto estéril y no estéril como soporte son los que producen una mayor reducción de la DQO, llegando a ser de 624 ppm y 527 ppm respectivamente.

En la última medida de la DQO no se observaron diferencias estadísticamente significativas para dichos tratamientos, pero sí había diferencias entre ellos y los demás.

Cabe destacar que la disminución de la DQO en el tratamiento de esparto estéril como soporte es mucho más lenta que en el resto, pero en la última medida el valor de la DQO fue inferior al del tratamiento de esparto no estéril, aunque no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Por otra parte, se puede destacar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre todos los tratamientos, excepto entre los de esparto no estéril como soporte y maíz sin esparto como soporte. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los dos últimos días de medida de la DQO (días 7 y 9).

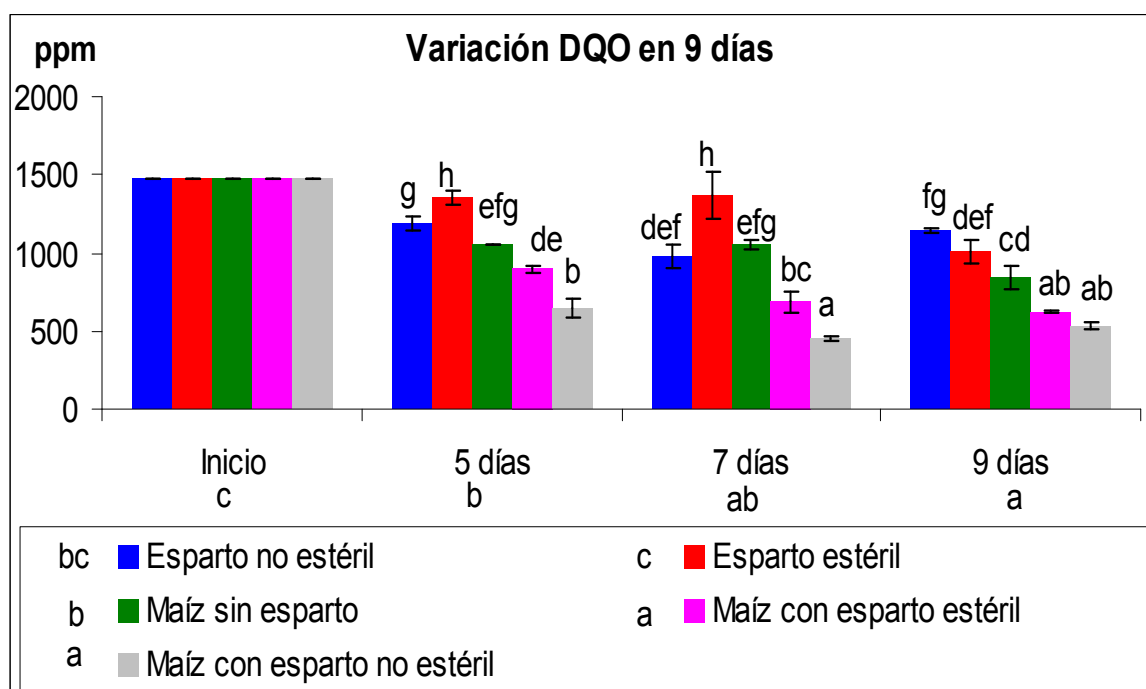


Figura 3.29. Representación de la variación de la DQO en el tiempo para los tratamientos de esparto no estéril (azul), esparto estéril (rojo), maíz sin esparto (verde), maíz con esparto estéril (rosa) y maíz con esparto no estéril (gris). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.11.2. Efecto del agua de taladrina sobre los parámetros biométricos de las plantas de maíz

a) Altura: En la figura 3.30A se muestra una representación de la variación de la altura a lo largo del tiempo. Por lo general, la altura de las plantas en todos los tratamientos aumenta significativamente entre el primer y el segundo muestreo, salvo en el tratamiento maíz sin esparto como soporte y con agua de taladrina. A los 9 días, se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos sin agua de taladrina; sin embargo entre los tratamientos con agua de taladrina si las hay, siendo mayor en el tratamiento en el que se utilizó esparto no estéril como soporte.

En la figura 3.30B se observa el efecto del agua de taladrina sobre las plantas de maíz tras 9 días en contacto. Las plantas tratadas con agua de taladrina (las que se encuentran dentro del círculo) presentan una gran marchitez.

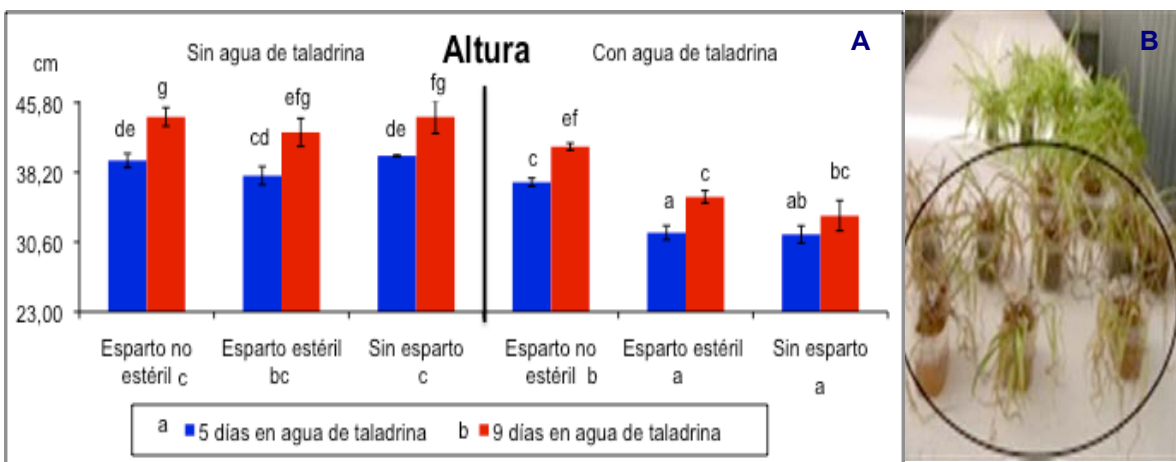


Figura 3.30. A - Representación de la variación de la altura de las plantas de maíz a los 5 días (azul) y 9 días (rojo) en agua de taladrina. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). **B** - Imagen de los distintos tratamientos. Dentro del círculo se encuentran los contenedores correspondientes al tratamiento de maíz con agua de taladrina.

b) Número de hojas: Como se ve en la figura 3.31, en esta medida biométrica destaca el incremento estadísticamente significativo del número de hojas en todos los tratamientos excepto en los de maíz con esparto estéril como soporte con agua de taladrina y el de maíz sin esparto como soporte y con agua de taladrina.

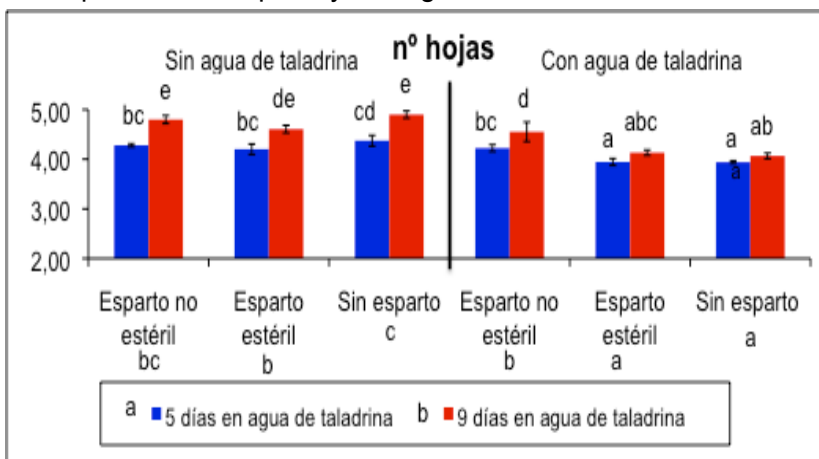


Figura 3.31. Representación de la variación del número de hojas de las plantas de maíz a los 5 días (azul) y 9 días (rojo) en agua de taladrina. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.11.3. Efecto del agua de taladrina sobre los parámetros fotosintéticos de las plantas de maíz

En primer lugar se estudió el parámetro F_o . Entre el 5º y el 9º día, se observa (figura 3.32A) un incremento significativo en los controles (sin agua de taladrina), salvo en el control sin esparto, donde no se ven diferencias significativas para ambos días. Sin embargo, el comportamiento observado en los tratamientos con agua de taladrina es distinto según el soporte empleado, así se obtiene una disminución significativa cuando el soporte es esparto no estéril y un incremento no significativo en los otros dos soportes utilizados.

Por otra parte, en el día 9, se observa una disminución significativa de este parámetro entre los controles y los tratamientos con agua de taladrina, salvo en los tratamientos sin esparto donde la disminución no es significativa.

Respecto a los soportes, se observan diferencias significativas entre el tratamiento esparto estéril con agua de taladrina frente al resto de los tratamientos que no llevan agua de taladrina.

Otro parámetro estudiado fue el F_v/F_m . En la figura 3.32B se observa como el valor de este parámetro entre los 5 y los 9 días tanto en agua de taladrina como sin agua de taladrina disminuye significativamente, independientemente del soporte y del tratamiento empleado. A los 9 días, no se observan diferencias significativas entre los distintos tratamientos y soportes.

Los únicos tratamientos entre los que se observan diferencias significativas son los de maíz con esparto no estéril con y sin agua de taladrina frente al tratamiento de maíz con esparto estéril y maíz sin esparto con agua de taladrina.

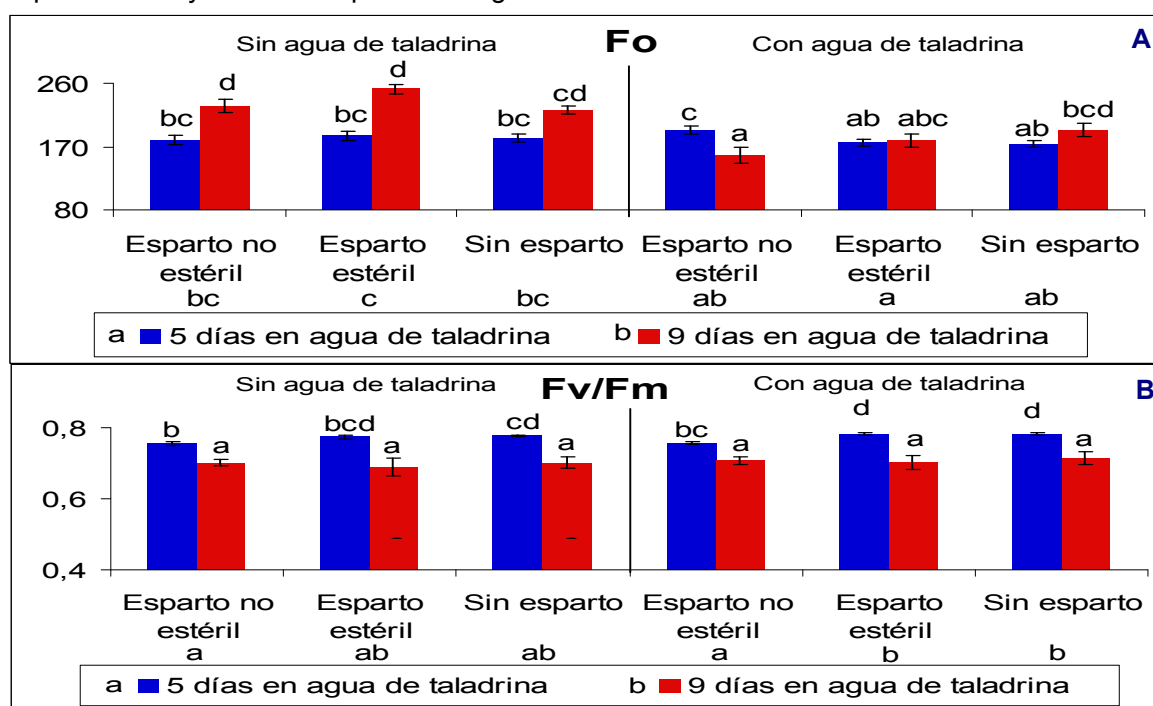


Figura 3.32. A - Representación de la variación del parámetro F_o a lo largo del tiempo. **B** - Representación de la variación del parámetro F_v/F_m a lo largo del tiempo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Tiempo: color azul - cinco días en agua de taladrina; color rojo - nueve días en agua de taladrina.

Otro parámetro estudiado fue el ϕ PSII. Se observa una tendencia al aumento de este parámetro entre los 5 y los 9 días que sólo resulta significativa en los tratamientos con esparto estéril como soporte sin agua de taladrina y con esparto no estéril y esparto estéril en agua de taladrina (Figura 3.33A). Entre los distintos tratamientos no se observan diferencias significativas.

Otro parámetro estudiado fue el qP (figura 3.33B). Se produce un incremento significativo en todos los tratamientos entre el día 5 y el día 9, salvo en el formado por agua de taladrina sin esparto. Si se comparan los controles frente a los tratamientos con agua de taladrina, sólo se observan diferencias significativas entre los tratamientos con esparto no estéril.

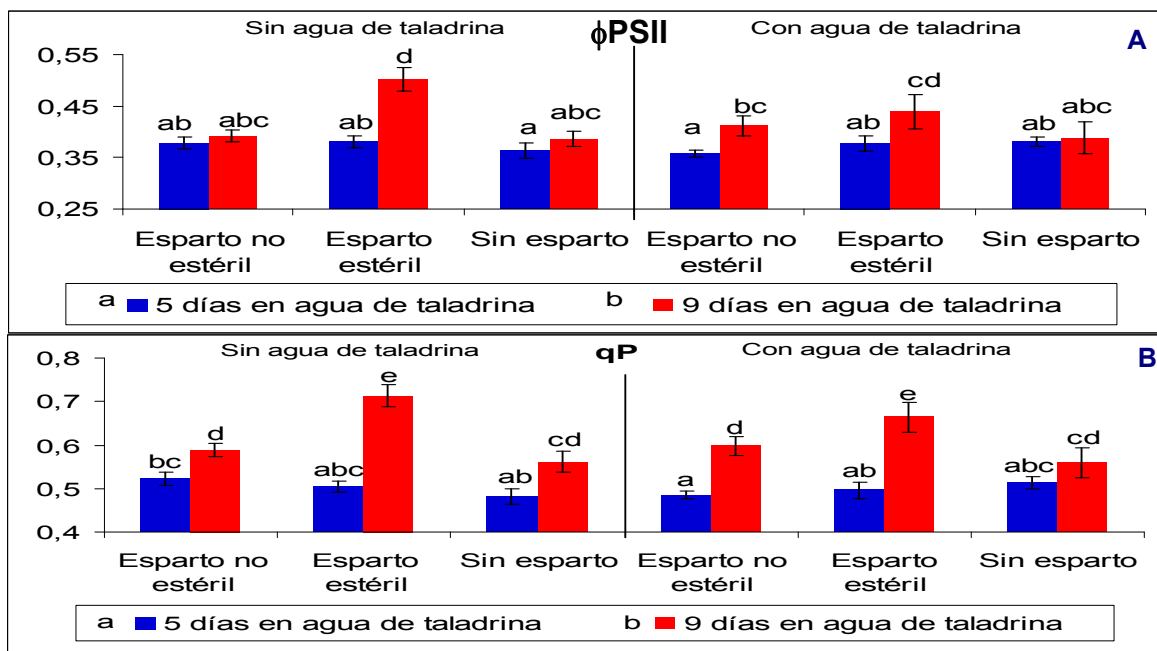


Figura 3.33. A - Representación de la variación del parámetro ϕ psII a lo largo del tiempo. **B** - Representación de la variación del parámetro qP a lo largo del tiempo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Tiempo: color azul – cinco días en agua de taladrina; color rojo – nueve días en agua de taladrina.

En el parámetro ETR (figura 3.34A) se observa el mismo comportamiento que para el ϕ PSII. Se produce una tendencia al aumento de este parámetro entre los 5 y los 9 días que sólo resulta significativa en los tratamientos con esparto estéril como soporte sin agua de taladrina y con esparto no estéril y esparto estéril en agua de taladrina. Entre los distintos tratamientos no se observan diferencias significativas.

Finalmente, se estudió el NPQ. En la figura 3.34B, se observa un incremento significativo en los tratamientos con esparto no estéril y en el tratamiento con esparto estéril y agua de taladrina. Sin embargo, en los tratamientos sin soporte y en el tratamiento con esparto estéril sin agua de taladrina, este parámetro disminuye. En ausencia de soporte (esparto) la presencia del agua de taladrina provoca un incremento significativo del NPQ en la medida realizada a los 5 días, respecto al resto de los tratamientos. Por otra parte, en el día 9, se observa un incremento de este parámetro entre los controles y los tratamientos con

agua de taladrina, siendo significativo cuando se utiliza esparto estéril. Entre los tratamientos, hay diferencias significativas entre el esparto estéril y el tratamiento sin esparto con agua de taladrina frente al resto de los tratamientos.

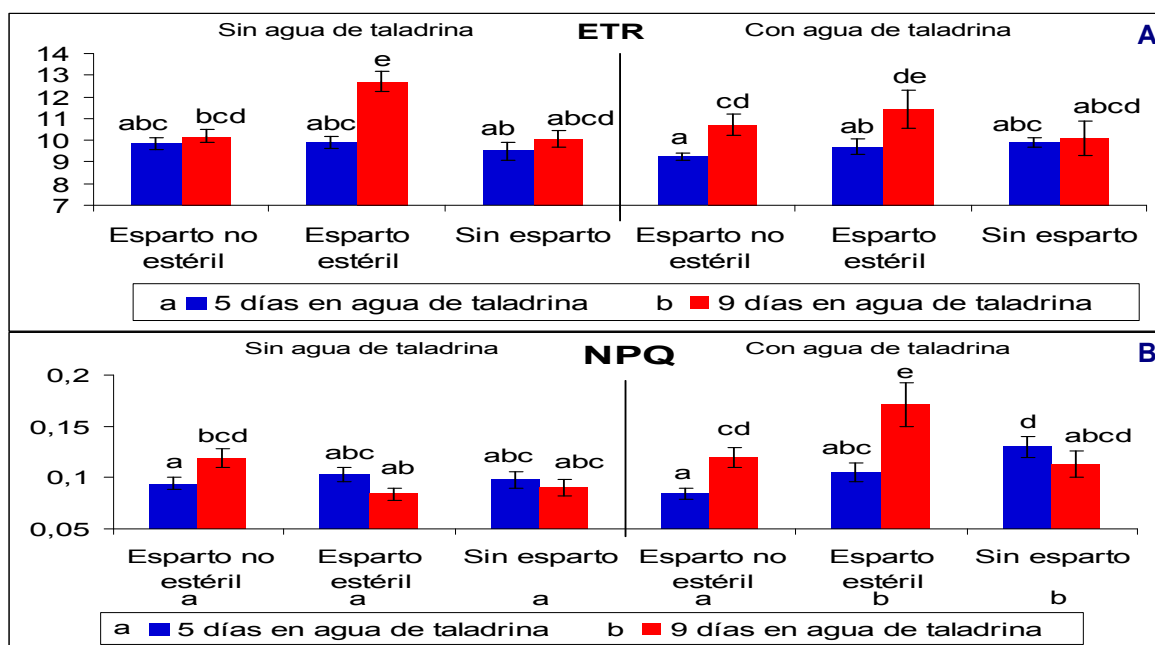


Figura 3.34. A - Representación de la variación del parámetro ETR a lo largo del tiempo. **B** - Representación de la variación del parámetro NPQ a lo largo del tiempo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Tiempo: color azul – cinco días en agua de taladrina; color rojo – nueve días en agua de taladrina.

3.12. Diseño de un sistema de rizorremediación planta-microorganismo

En el apartado 3.6 se vio que la población bacteriana (u. f. c.) del *Bacillus licheniformis* cepa TP9 se recuperaba después de 36 horas en contacto con el agua de taladrina. Por eso, se eligió esta cepa para realizar un sistema planta-microorganismo.

Por otra parte, en el experimento anterior (apartado 3.10), se vio que la reducción de la DQO realizada por el conjunto maíz esparto cuando éste era estéril es más lenta que cuando dicho soporte no era estéril. Se decidió utilizar el esparto no estéril pues este trabajo está enfocado a la aplicación industrial donde es más viable su utilización ya que requiere una menor mano de obra y no necesita tareas de esterilización.

3.12.1. Análisis del agua de taladrina fitorremediada

a) DQO: Se analizó la contribución de la cepa elegida en presencia de la planta durante un periodo de 5 días. Como puede verse en la figura 3.35A, la reducción de la DQO realizada es significativamente menor entre los dos días de medida y además esta reducción es significativamente mayor en los tratamientos donde no se inoculó la bacteria (DQO final de 527 ppm cuando no se inocula la cepa TP9 y de 634 ppm cuando se inocula dicha cepa).

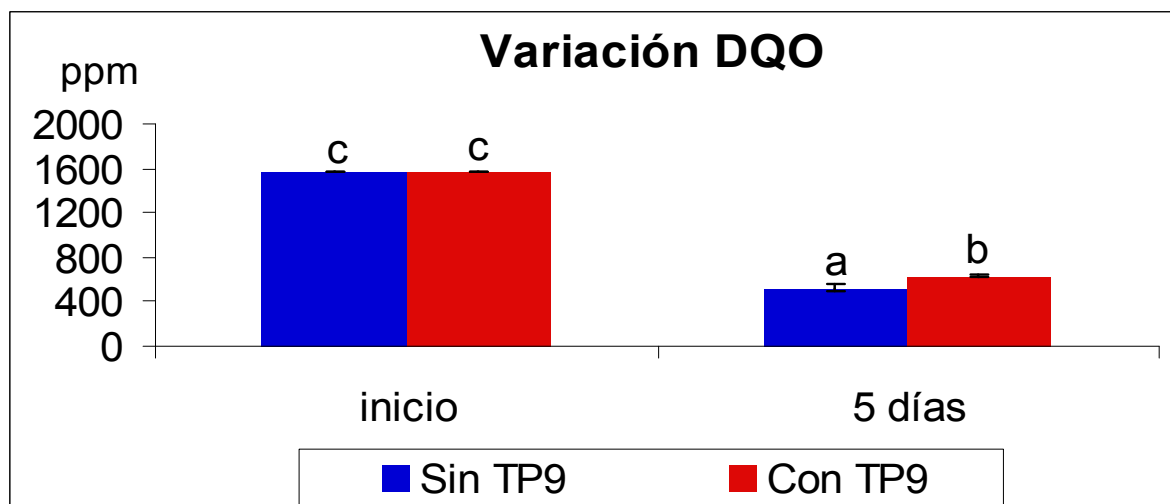


Figura 3.35. Representación de la reducción del valor de la DQO en función del tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Tratamientos: azul: sistema de fitorremediación sin inocular; rojo: sistema de fitorremediación inoculado.

b) pH: En la figura 3.36 se observa una disminución no significativa del valor del pH, siendo ésta disminución mayor cuando se inoculó la bacteria. El valor del pH está dentro del rango establecido por la ley 10/1993, de la Comunidad de Madrid, tanto en la muestra inicial como las muestras fitorremediadas.

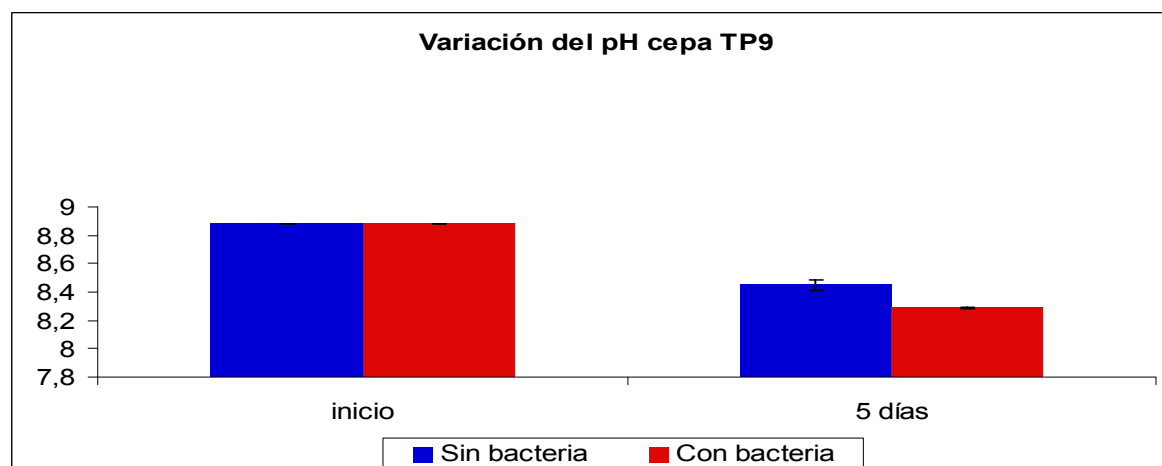


Figura 3.36. Representación de la reducción del pH en función del tratamiento. Tratamientos: azul: sistema de fitorremediación sin inocular; rojo: sistema de fitorremediación inoculado.

c) Análisis de hidrocarburos:

- Hidrocarburos presentes: En la figura 3.37 se observan los cromatogramas resultantes del análisis de hidrocarburos de la muestra inicial y de las muestras fitorremediadas. Sólo se analizaron los picos más característicos que aparecían en los cromatogramas.

Se puede ver como cuando no se inocula la bacteria el proceso de fitorremediación supone una desaparición de la mayoría de los picos característicos de la muestra inicial (sólo es recalcitrante el pico 7), pero genera nuevos picos (productos de degradación). Sin

embargo, cuando se añade la cepa TP9 se produce una menor degradación de los compuestos de la muestra inicial.

En el Anexo 9 se adjuntan los cromatogramas completos.

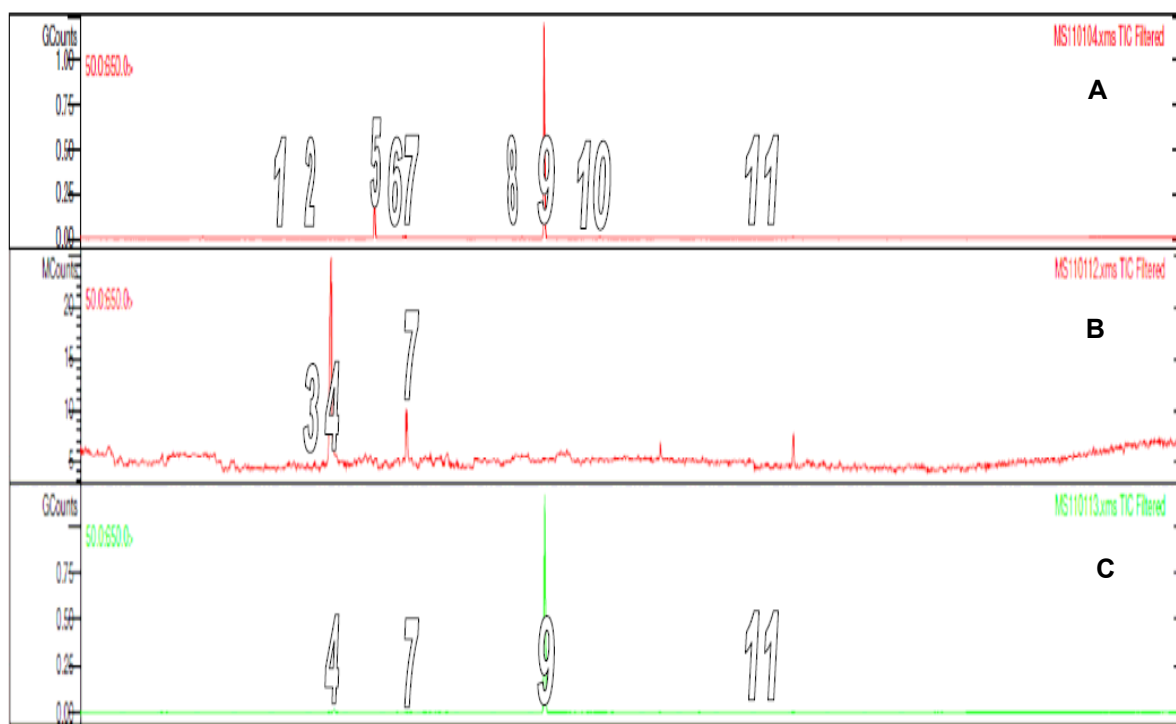


Figura 3.37. Cromatogramas correspondientes al análisis de hidrocarburos de la muestra inicial (A), sin TP9 (B) y con TP9 (C). 1: pico 6,80 min; 2: pico 7,30 min; 3: pico 7,32 min; 4: 8,54 min; 5: 9,17 min; 6: 9,55 min; 7: 9,59 min; 8: 11,19 min; 9: 11,49 min; 10: 12,25 min; 11: 14,92 min.






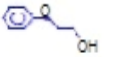





En la tabla 3.5 se puede observar como la mayoría de los compuestos presentes en la muestra de agua de taladrina inicial prácticamente han desaparecido tras el proceso de fitorremediación. Parece que la fitorremediación es más efectiva cuando no se inocula la bacteria porque es el proceso donde desaparecen todos los compuestos salvo la propanamida (pico número 7).

Los compuestos mostrados en la tabla 3.5 fueron seleccionados de la librería generada por los espectros de masas de cada compuesto. En cada caso se seleccionó el compuesto cuyo espectro de masas tenía una mayor probabilidad de semejanza con los compuestos mostrados en la librería.

En base a dicha tabla, se puede clasificar el compuesto número 7 como un hidrocarburo persistente porque tras el proceso de fitorremediación este compuesto no es eliminado. Este tipo de hidrocarburos son clasificados como sustancias tóxicas de acuerdo con la Directiva 2008/1/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de enero de 2008, relativa a la prevención y al control integrados de la contaminación. Además, los compuestos número 9 y 11 son recalcitrantes en el tratamiento con bacteria, donde su concentración apenas disminuye.

Por otra parte, tras el proceso de fitorremediación sin bacteria se producen dos compuestos de degradación secundarios, a diferencia del proceso donde se inocula la bacteria, en el que sólo aparece un compuesto. Cuando no se inocula la bacteria se forma un compuesto derivado del silicio (un silano o hidruro de silicio). Sin embargo, este compuesto no aparece cuando se inocula la cepa TP9.

Tabla 3.5. Picos presentes en la muestra de taladrina inicial y en las muestras fitorremediadas con y sin TP9. Los compuestos mostrados fueron seleccionados de la librería generada por los espectros de masas de cada compuesto. En cada caso se seleccionó la molécula que tenía una mayor probabilidad de semejanza con los espectros obtenidos en el análisis de las muestras.

Pico	Tiempo de retención (min)	Nombre compuesto	Fórmula	Molécula	Área Inicial	Área sin TP9	Área con TP9	Altura Inicial	Altura sin TP9	Altura con TP9
1	6,80	Fenol	C ₆ H ₆ O		3.077e ⁺⁶			3.869e ⁺⁶		
2	7,30	1,1'-oxybis-heptano	C ₁₄ H ₃₀ O		843618			578871		
3	7,32	Silano, (2 - metoxietil) trimetil	C ₉ H ₁₈ OSi				342065		240596	
4	8,54	Ácido hexanoico, 3,5,5 - trimetil	C ₉ H ₁₈ O ₂				1.578e ⁺⁷	1.085e ⁺⁷	7.807e ⁺⁶	6.064e ⁺⁶
5	9,17	Etanol, 1-(2-butoxi)etoxi	C ₈ H ₁₈ O ₃		1.105e ⁺⁸			8.544e ⁺⁷		
6	9,55	Etanol, 2 - fenoxi	C ₈ H ₁₀ O ₂		4.216e ⁺⁶			2.911e ⁺⁶		
7	9,59	Propanamida, N - (2,6 - dimetilfenil) - 3- (1 - piperidinilo)	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O		4.866e ⁺⁶	2.738e ⁺⁶	2.291e ⁺⁶	3.953e ⁺⁶	2.039e ⁺⁶	1.965e ⁺⁶
8	11,19	Ácido sulfúrico, butil dodecil éster	C ₁₆ H ₃₄ O ₃ S		1.513e ⁺⁶			1.144e ⁺⁶		
9	11,49	Ciclohexanamina N-ciclohexil-	C ₁₂ H ₂₃ N		5.169e ⁺⁶		5.048e ⁺⁶	4.478e ⁺⁶		4.230e ⁺⁶
10	12,25	Ciclohexanamina N-ciclohexil-N-metil-	C ₁₃ H ₂₅ N		2.029e ⁺⁶			1.510e ⁺⁶		
11	14,92	Ácido ftálico, butil undec - 2 - en - 1 - yl ester	C ₂₃ H ₃₄ O ₄		958730		612873	794272		476828

- Presencia de PAHs: No se observan este tipo de compuestos en ninguna de las muestras analizadas. Los cromatogramas se adjuntan en el Anexo 10.

- Hidrocarburos totales: Los dos tratamientos de fitorremediación ensayados (sin TP9 y con TP9) producen una disminución significativa de la concentración de los mismos respecto a la existente en la muestra inicial, reduciéndose desde 12,53 ± 0,35 ppm hasta 2,485 ± 0,004ppm en la muestra de agua de taladrina fitorremediada sin TP9 y 4,09 ± 1,13 ppm en la muestra con TP9. En definitiva, la disminución de la concentración de hidrocarburos totales en el tratamiento de fitorremediación sin TP9 es más efectiva que en el tratamiento donde se inoculó la bacteria, aunque no existen diferencias significativas entre ambos tratamientos.

3.12.2. Variación de los parámetros biométricos

En la figura 3.38 se observa el estado fisiológico de una planta de maíz de cada tratamiento. Se aprecia un proceso de clorosis en todas las plantas, incluidas los controles (figura 3.38A y 3.38B). En las plantas que estuvieron 5 días en contacto con el agua de taladrina (figura 3.38C y 3.38D) se observa un estado de marchitez, principalmente en las hojas inferiores, que parece más acusada en los tratamientos con TP9 (figura 3.38D).

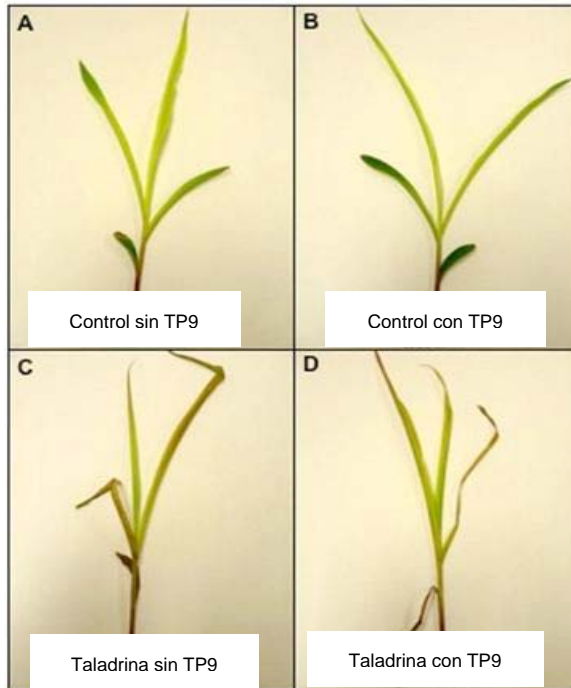


Figura 3.38. Plantas de maíz procedentes de los distintos tratamientos (**A** – control sin TP9, **B** – control con TP9, **C** – Agua de taladrina sin TP9, **D** – Agua de taladrina con TP9).

En la figura 3.39 se observan la parte radical de una planta de maíz de cada tratamiento. En los controles (figura 3.39A y 3.39B) las raíces están más ramificadas. En los tratamientos (figura 3.39C y 3.39D), las raíces adquieren una tonalidad más amarillenta y tenían una consistencia más quebradiza.

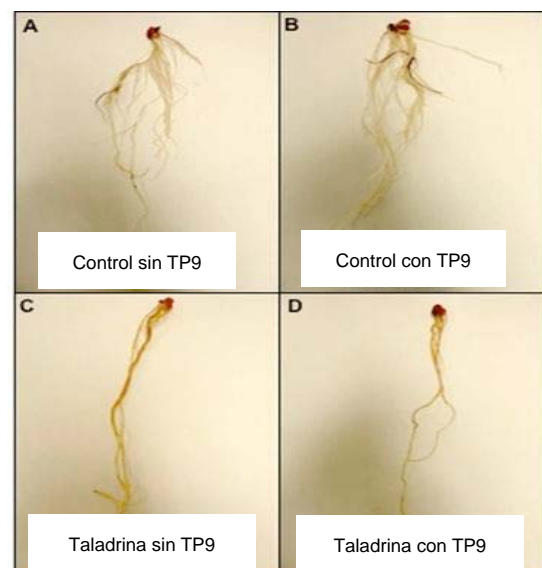


Figura 3.39. Raíces de planta de maíz procedente de los distintos tratamientos (**A** – Control sin TP9, **B** – Control con TP9, **C** – Agua de taladrina sin TP9, **D** – Agua de taladrina con TP9).

a) Altura: En la figura 3.40 se aprecia una disminución significativa de la altura entre las plantas controles y las que estuvieron 5 días en agua de taladrina. Esta disminución es menor cuando se inocula la bacteria. Entre los controles se observa una disminución no significativa de este parámetro cuando se inocula.

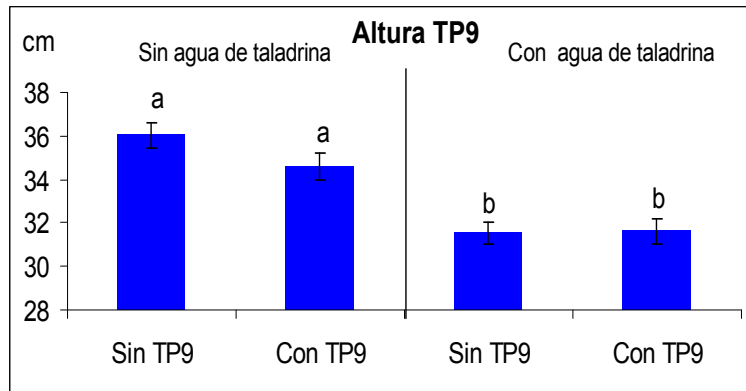


Figura 3.40. Representación de la influencia de la bacteria en la variación de la altura de las plantas de maíz a los cinco días de estar en contacto con agua de taladrina. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

b) Número de hojas: El número de hojas apenas disminuyó entre los controles y las plantas en contacto con agua de taladrina donde no se realizó la inoculación. En el caso de las plantas en agua de taladrina donde sí se inoculó la cepa TP9, el número de hojas es menor que en el resto de los tratamientos, pero tampoco presenta diferencias estadísticamente significativas.

c) Peso seco parte aérea y parte radical: En ninguno de estos parámetros se observan diferencias significativas, pero en ambos la tendencia observada es a incrementar el peso en los tratamientos con agua de taladrina frente a los controles.

3.12.3. Variación de los parámetros fotosintéticos

El primer parámetro analizado fue F_o . En la figura 3.41A se aprecia como este parámetro disminuye en los tratamientos con agua de taladrina, pero esta disminución sólo es significativa cuando se compara el valor de este parámetro en el control sin bacteria frente al valor en el tratamiento de agua de taladrina sin bacteria. Además, se observa un aumento significativo de F_o en los controles y en los tratamientos con agua de taladrina cuando se inocula la bacteria.

También resultó interesante el análisis del F_v/F_m . En la figura 3.41B se puede observar una disminución significativa de este parámetro en las plantas de maíz sin bacteria que han estado 5 días en contacto con el agua de taladrina respecto al resto de los tratamientos.

Otros parámetros estudiados fueron Φ_{psII} , qP y ETR . En las figuras 3.41C, 3.41D y 3.41E se puede ver una disminución significativa en los tratamientos con agua de taladrina frente a los controles.

Finalmente, se estudió el NPQ . Se observa un incremento no significativo en los tratamientos con agua de taladrinas frente a los controles (figura 3.41F).

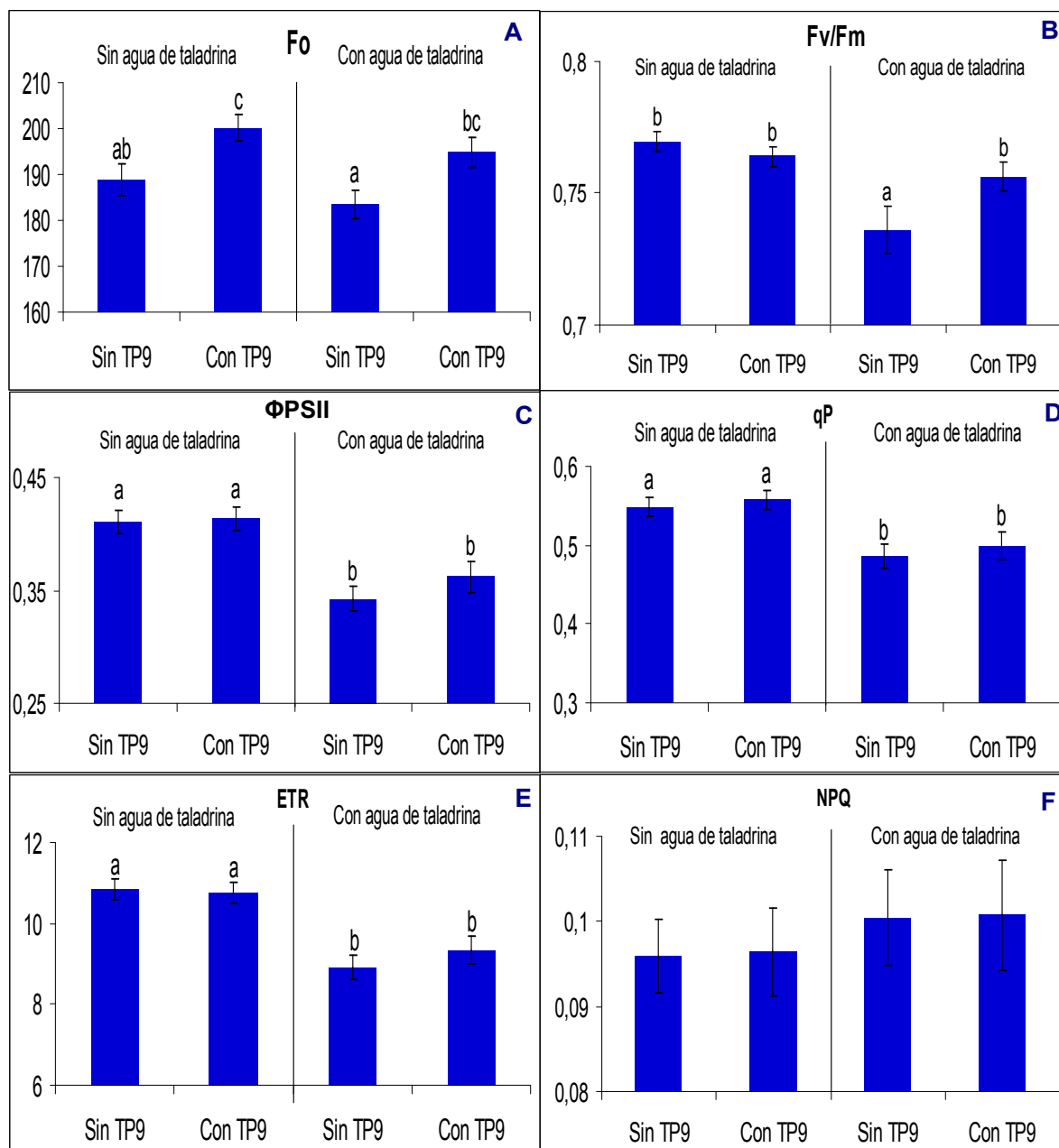


Figura 3.41. **A** - Representación de la variación de F_0 en función del tratamiento. **B** - Representación de la variación de F_v/F_m en función del tratamiento. **C** - Representación de la variación de Φ_{PSII} en función del tratamiento. **D** - Representación de la variación de q_P en función del tratamiento. **E** - Representación de la variación del ETR en función del tratamiento. **F** - Representación de la variación de NPQ en función del tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Tratamientos: control sin TP9, control con TP9, agua de taladrina sin TP9 y agua de taladrina con TP9.

3.13. Aportaciones a congresos

Los resultados obtenidos en los apartados 3.11 y 3.12 se presentaron en el XIII National Meeting of the Spanish Society of Nitrogen Fixation (SEFIN), II Portuguese-Spanish Congress on Nitrogen Fixation. El abstract y el póster se recoge en el Anexo 19.

4. DISCUSIÓN: PUESTA A PUNTO DE UN SISTEMA DE CULTIVO OPTIMIZADO PARA LA FITORRE- MEDIACIÓN DE AGUA DE TALADRINA

El objetivo fundamental del presente trabajo, que se ha especificado en la introducción y se irá perfilando a lo largo de los próximos capítulos de la presente memoria, es encontrar un sistema biológico formado por una planta y/o microorganismos, capaz de remediar una sustancia líquida procedente de un proceso industrial y que no cumple con algunas especificaciones marcadas por la ley de vertidos industriales al sistema integral de saneamiento (Ley 10/1993, de 26 de octubre, de la Comunidad de Madrid). La utilización de plantas en procesos de biorremediación recibe diferentes nombres dependiendo del tipo de material sobre el que crezcan las plantas aunque genéricamente se conoce como fitorremediación.

Como puede verse en los capítulos 2 y 3, en primer lugar, el trabajo se ha centrado en la búsqueda de plantas y microorganismos capaces de biorremediar el agua de taladrina. En segundo lugar se intentará estandarizar un procedimiento de trabajo escalable a nivel industrial. Estos dos hechos han marcado profundamente el diseño de los experimentos.

Es importante tener en cuenta que el agua de taladrina es un medio contaminado con sustancias de diverso tipo. La presencia de distintos contaminantes en un mismo medio no es una novedad, ya en la lista nacional prioritaria (NPL) de la Agencia Americana de Protección Ambiental (EPA) podemos encontrar que el 40% de los sitios contaminados con sustancias tóxicas presentan contaminación orgánica y también de metales pesados (Benin *et al.*, 1999; Sandrin y Maier, 2002; Cheng, 2003; Zhang *et al.*, 2009).

Todas las muestras de agua de taladrina utilizadas fueron suministradas por la empresa John Deere Ibérica S.A. (JDISA) y derivan de actividades industriales que se realizan de manera rutinaria en los procesos de fabricación. Como puede observarse en el apartado 3.1, salvo la demanda química de oxígeno (DQO), los distintos parámetros analizados cumplen con los límites establecidos por la Ley 10/1993, de la Comunidad de Madrid, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento. El sistema del Vacudest (apartado 2.1) utilizado en la empresa para tratar la taladrina pretratada es muy efectivo y consigue reducir este parámetro desde valores superiores a los 20.000 ppm hasta valores comprendidos entre 1.930 ppm y 6.200 ppm.

En el caso del pH (figura 3.3), los resultados obtenidos muestran que el agua de taladrina cumple los límites establecidos por la Ley 10/1993, de la Comunidad de Madrid, salvo en las muestras del 02/05/2009 (pH de 13,8) y en la muestra de 05/02/2009 (pH de 5,5). Estos valores son excepciones respecto al resto de los datos obtenidos y a los valores de pH que cabría obtener según indicaciones del fabricante y se deben a un fallo en el compresor del vacudest.

Los análisis de elementos químicos e hidrocarburos realizados dieron como resultado una gran variedad de compuestos (figuras 3.5, 3.6 y 3.7), muchos de los cuales no se corresponden con las especificaciones técnicas de dicho producto (aceite de corte cuyas fichas informativas se adjuntan en el Anexo 11). Esto puede deberse no sólo a la degradación que sufren durante su uso como agente de refrigeración, sino también a la adición de diversas sustancias como bactericidas, antiespumantes y agentes de limpieza. Además,

posiblemente el proceso del vacuest, donde se tratan las muestras a 87 °C y 500 mb, puede iniciar reacciones de degradación o de transformación de sustancias generando otras nuevas. Por otra parte, al sumergir las distintas piezas metálicas en la taladrina, pueden desprenderse pequeñas cantidades de metales que son el origen de los que encontramos en el análisis elemental. Algunos de estos elementos, como es el caso del Fe y el Ca, son nutrientes necesarios para la vida, aunque en estas muestras se encuentran en cantidades muy pequeñas.

Cabe destacar, que en la bibliografía prácticamente no existen trabajos con esta misma temática, ya que es muy difícil que las empresas intenten resolver este tipo de problemas de la forma que lo ha hecho JDISA, por lo que se convierte en un trabajo pionero, con derivadas científicas tanto desde una perspectiva aplicada como básica de enorme interés para posteriores aplicaciones.

Una de esas dificultades es que al llevar a cabo una revisión bibliográfica para centrar el tema e intentar establecer el material biológico de partida nos encontramos con que no existen trabajos en los que se utilicen sustancias líquidas provenientes de actividades industriales. La inmensa mayoría de los trabajos se centran en ecosistemas acuáticos o edáficos previamente contaminados por diferentes vertidos (Menéndez–Vega *et al.*, 2007; Zalesny y Bauer, 2007; Di Genaro *et al.*, 2008; Mellem *et al.*, 2009). Además, la mayoría de los trabajos en ecosistemas acuáticos en los que se utilizan técnicas de fitorremediación son sistemas contaminados con metales pesados y no con contaminantes orgánicos, tipo hidrocarburos, como los que están presentes en nuestras muestras, mientras que este tipo de contaminantes son más habituales en los sistemas edáficos (Kowlzan, 2008; Obayori *et al.*, 2008; Ghazanfari *et al.*, 2009; Rehman *et al.*, 2009).

Con el objeto de conseguir las bacterias mejor adaptadas al agua de taladrina se partió de una colección de cepas muy amplia que provenía de dos situaciones diferentes. Una parte de la colección procede de un muestreo realizado en una zona contaminada de la zona franca de Barcelona y otra parte provenía de aislamientos realizados de la propia taladrina. Todas ellas habían sido aisladas de medios con presencia de hidrocarburos, por lo que se suponía que tendrían la información necesaria para poder sintetizar la maquinaria enzimática que les permitiera degradar este tipo de compuestos.

Se diseñó un experimento en doble embudo. En el primero las bacterias crecían en agar para métodos estándar (PCA) conteniendo agua de taladrina a distintas concentraciones (apartado 2.6). En esta etapa se pretendía determinar la capacidad de las cepas para soportar la toxicidad de los agentes contaminantes del agua de taladrina. Las bacterias capaces de crecer con la máxima concentración de agua de taladrina se sembraron en un medio con agar-agar y agua de taladrina (apartados 2.7 y 3.4), con el objeto de comprobar qué cepas eran capaces de utilizar las fuentes carbonadas del medio a fitorremediar. En este segundo medio las bacterias capaces de crecer usan los hidrocarburos del agua de taladrina como fuente de energía. Tras esta doble criba, de unas 130 cepas que había al comienzo quedaron 28.

Todas las cepas capaces de crecer en agua de taladrina con o sin nutrientes (un total de 53) fueron sometidas a una secuenciación parcial del gen que codifica para el ARN 16s para determinar su posible afiliación taxonómica (apartado 2.8, figura 3.8 y Anexo 4). Estos estudios demostraron la escasa variabilidad genética, lo que indica la selección llevada a cabo como consecuencia de la fuerte presión selectiva ejercida por el medio utilizado.

La gran mayoría de las bacterias pertenecen al género *Bacillus* y *Microbacterium*, pero también se encontraron los géneros *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Arthobacter* y *Agromyces* entre otros. Tanto las *Pseudomonas* como los *Bacillus* son muy utilizados en procesos de biorremediación (principalmente en bioaumentación, como en el trabajo con *Pseudomonas* de Heinaru *et al.*, 2005; o en el trabajo con *Bacillus* de Silva *et al.*, 2009b),

En muchos estudios, el fallo en el uso del bioaumentación se debe a la pobre selección de cepas adecuadas y al bajo conocimiento de las poblaciones indígenas que de forma natural colonizan estos compuestos químicos y los fluidos tóxicos (Van der Gast, 2004). Por ello, la selección de las cepas utilizadas en el bioaumentación se realizó estudiando su comportamiento en el propio medio a fitorremediar. Las cepas deben ser capaces de degradar cada uno de los compuestos contaminantes de forma individual y también deben ser capaces de sobrevivir y ser activas en el medio contaminado, particularmente en presencia de los tóxicos contaminantes (Van der Gast, 2002).

Como se comentó en los resultados (apartado 3.6), con las secuencias del gen 16S del ARN ribosómico se realizó una representación de los géneros obtenidos (figura 3.8). Atendiendo a los géneros con mayor representatividad se seleccionaron 10 cepas para determinar su crecimiento en medio líquido de agua de taladrina. De estas cepas, 4 pertenecían a la colección del laboratorio (fueron aisladas de la zona franca de Barcelona) y las otras 6 fueron aisladas de la taladrina.

Hay que destacar que ninguna de las bacterias procedentes de la zona franca de Barcelona fue capaz de sobrevivir en medio líquido de agua de taladrina (figuras 3.9A, 3.9B y 3.9C). Esto puede deberse a que los hidrocarburos que componen la taladrina sean de naturaleza distinta al de los compuestos que constituían la zona de donde se aislaron estas cepas. Además, se debe tener en cuenta que todas estas cepas fueron aisladas del suelo, por lo que posiblemente necesiten un soporte físico donde poder desarrollarse. Esto podría explicar que las cepas hayan crecido en el agar con agua de taladrina, pero que sin embargo no crecieran en el medio líquido. También se debe tener en cuenta que la taladrina que constituía el agar fue previamente autoclavada, mientras que la que se utilizó en el medio líquido no se autoclavó. Posiblemente, la esterilización de estos compuestos modifique la composición de hidrocarburos.

Por otra parte, las cepas capaces de crecer en agua de taladrina fueron aisladas de la propia taladrina, dos de ellas se asocian en el Genbank con *Bacillus licheniformis* (TP5, figura 3.9D, y TP9, figura 3.9E), una con el género *Brevibacillus* (TP10, figura 3.9F) otra con *Bacillus thuringiensis* (TP11) y *Lysinibacillus* (TP18, figura 3.9G), y otra con el género *Paenibacillus* sp. (TP16, figura 3.9C). Los dos *Bacillus licheniformis* y el *Paenibacillus* sp. tienen un

comportamiento muy similar, sufren una fuerte disminución de las unidades formadoras de colonias (u. f. c.) entre las 36 y las 44 horas en el caso de los *Bacillus* y entre las 18 y las 32 horas en el caso del *Paenibacillus* pero a partir de aquí aumentan ligeramente hasta el conteo final (figuras 3.9D, 3.9E y 3.9C). Las otras tres cepas decaen progresivamente hasta el final, sin ningún síntoma de recuperación (figuras 3.9F y 3.9G). Dado que el género *Bacillus* es muy utilizado en procesos de fitorremediación, la cepa TP9 fue utilizada para realizar el primer ensayo planta-microorganismo.

La disminución inicial del número de unidades formadoras de colonia por mL de las cepas que crecieron en agua de taladrina y el posterior incremento de este parámetro en aquellas que se aislaron del propio medio objeto de la fitorremediación (figura 3.9C, 3.9D, 3.9E, 3.9F y 3.9G) puede deberse a que en un primer momento las cepas crecieron en caldo nutritivo y después de 24 horas se las pasó a un medio que presentaba condiciones muy diferentes (pH muy básico, las fuentes de carbono no eran fácilmente asimilables, la relación C/N era alta porque existían más fuentes carbonadas). Estas nuevas condiciones pudieron ser las responsables de la drástica bajada de los contingentes poblacionales. Pero posiblemente, en estas cepas, las u. f. c. que quedaron tenían las capacidades metabólicas necesarias para degradar los compuestos del agua de taladrina y pudieron incrementar estas poblaciones. Ramadan *et al.* (1990) estudiaron la influencia del inóculo durante la bioremediación del agua y sugirieron que la caída de la población en un primer momento podía resultar en el incremento de la concentración del inóculo, debido a que la población resultante era suficiente para sobrevivir.

Aunque la cepa TP9 no es capaz de crecer en agar con agua de taladrina sin ningún nutriente, esto contrasta con los resultados obtenidos en el apartado 3.6, donde se ve como a partir de las 36 horas se incrementa la densidad de población de dicha cepa. Existen trabajos que demuestran que la aportación de nutrientes durante el proceso de degradación de materia orgánica contaminante activan o complementan la ruta de degradación de sustancias recalcitrantes o menos biodegradables, como es el caso de los hidrocarburos (Beak y Kim, 2009; Nyssonen *et al.*, 2009).

La gran mayoría de las cepas aisladas de la taladrina son del género *Bacillus* (Anexo 4), en concreto, las cepas TP9 y TP5 que son dos de las cepas que han aumentado su número de u. f. c. después de 36 horas en contacto con el agua de taladrina (figuras 3.9D y 3.9E). Por este motivo, se decidió utilizar la cepa TP9 para los experimentos planta-microorganismo.

Una vez establecido el material microbiológico era necesario seleccionar la especie vegetal. La intención principal consistía en el desarrollo de un sistema planta-microorganismo. Se sabe que el uso de plantas en combinación con microorganismos tiene la ventaja de producir un incremento en la población microbiana y de la actividad metabólica de la rizosfera (Kuiper, 2003). Esto también supone un incremento del contacto entre los microorganismos asociados a las raíces con los contaminantes del suelo (Aprill y Sims, 1990; Kingsley *et al.*, 1994; Schwab *et al.*, 1995; Nichols *et al.*, 1997; Kuiper *et al.*, 2001).

Se debía tener en cuenta que el sistema fitorremediador tenía que ser fácil de obtener, fácil de cultivar y barato, ya que el objetivo final del trabajo es escalar los experimentos a nivel industrial, y debe ser un proceso rentable dentro de la estructura económica de la empresa. Todo ello hizo necesario un enorme esfuerzo inicial hasta definir la o las plantas con las que trabajar. Una vez elegidas, el segundo paso fue establecer su capacidad para soportar el efecto de los productos presentes en el agua de taladrina y el efecto sobre su fisiología, crecimiento y germinación.

La germinación es una etapa importante en el desarrollo posterior de las plantas y es particularmente sensible a los contaminantes (Maila y Cloete, 2002; Reynoso–cuevas *et al.*, 2008), por lo que lo primero que se hizo fue establecer la relación entre el agua de taladrina y la capacidad germinativa de las plantas elegidas.

Salvo en el caso del maíz, en el resto de plantas se apreció una disminución significativa en el porcentaje de germinación al ir aumentando la concentración de agua de taladrina, especialmente en los tratamientos al 50 y al 100% (apartado 3.7). Esta disminución en el porcentaje de germinación observado en la mayoría de las semillas suele deberse, según Adam y Duncan (2002), a que los hidrocarburos pueden generar una película de aceite alrededor de la semilla, película que actúa como una barrera física reduciendo el paso de agua y oxígeno a la semilla. Además, se ha visto que esta barrera física retrasa la emergencia de la semilla (Adam *et al.*, 2002). Por el contrario, parece que la resistencia de la semilla a las propiedades fitotóxicas de los aceites (como ocurre en el maíz) puede atribuirse a la estructura y composición de la pared celular (Terje, 1984; Besalatpour *et al.*, 2008), que de alguna forma minimiza los procesos mencionados.

De todas las especies vegetales estudiadas, la mostaza parda fue la semilla con menos porcentaje de germinación en presencia de agua de taladrina (figura 3.15A), seguida por la alfalfa (figura 3.10A), el girasol (figura 3.14A) y la espadaña (figura 3.13A). Sin embargo, la semilla con mayor porcentaje de germinación en presencia de agua de taladrina fue el maíz (figura 3.15A). A diferencia de nuestros resultados, en el trabajo realizado por Besalatpour *et al.* (2008), donde trabajaron con un suelo contaminado con fluoreno y pireno entre otros contaminantes, obtuvieron un porcentaje mayor de un 85% en la germinación del girasol, sin observar diferencias significativas con el control. En nuestro caso, el porcentaje de germinación del girasol fue de un 58% y de un 13% para los tratamientos con 50% y 100% de agua de taladrina, respectivamente. Estas diferencias pueden deberse a los diferentes soportes de germinación (agar y suelo respectivamente), así como a las diferencias en el pH (pasando de alrededor de 9 en nuestro caso, a 6-7 en el caso del trabajo comentado). Estos mismos autores, utilizando entre otras plantas girasol y maíz, encontraron una mayor capacidad germinativa en el girasol que en el maíz, al contrario que en nuestro caso. Adam y Duncan (2002) demostraron que la fracción volátil producida por los hidrocarburos juega un papel fundamental en el retraso y en la reducción del porcentaje de germinación. Dado que los tipos de hidrocarburos presentes en ambos trabajos pueden ser diferentes y que las fracciones volátiles, por tanto, también lo serán, es posible que las diferencias de

comportamiento observadas sean el resultado de un efecto multifactorial entre las condiciones fisicoquímicas y la composición orgánica.

En todos los casos se observa que el tamaño de la raíz disminuye con el incremento del porcentaje de agua de taladrina (apartado 3.7). Merkl *et al.* (2005b) también observaron una disminución significativa de la biomasa de la raíz de diferentes especies de gramíneas que crecían en un suelo contaminado con hidrocarburos. Esto se debe a que la capacidad de las semillas para humedecerse puede ser reducida por la hidrofobicidad de las propiedades del contaminante oleaginoso, produciendo una reducción en el desarrollo radical (Amakiri y Onofeghara, 1983), reduciendo la disponibilidad de agua y nutrientes para las plantas (Terje, 1984; Bossert y Bartha, 1985; Besalatpour *et al.*, 2008). Las alteraciones en la morfología y desarrollo del sistema radical están directamente relacionadas con el agua y los nutrientes absorbidos y esto afecta al crecimiento de la planta y a la capacidad de fitorremediación. Además, el trabajo realizado por Ren *et al.* (1996) muestra como la presencia de PAHs (hidrocarburos aromáticos policíclicos), entre los cuales se encuentran dos de los contaminantes de las aguas de taladrina, puede ser la causa de que la germinación de las semillas produzca raíces más pequeñas, como se ha observado. Cabe destacar que en los primeros estadios del desarrollo de la planta el crecimiento de la raíz se debe a la expansión celular y no a la división celular (Taiz y Zeiger, 1991). Pero la expansión celular puede estar impedida por los contaminantes, que generan por ejemplo la inhibición de la acción de las hormonas como las auxinas o interfieren con el metabolismo celular, por ejemplo en la función de las mitocondrias (Reynoso–cuevas *et al.*, 2008).

El hecho de que una especie germine bien en un medio contaminado no garantiza el posterior crecimiento de la misma en dicho medio. Esto sucedió con las semillas de girasol y altramuza estudiadas, que germinaban en el medio contaminado con agua de taladrina pero luego no eran capaces de crecer en agua de taladrina con la misma DQO, de unos 4.500 ppm (tabla 3.2). Este hecho ha sido citado por otros autores (Li *et al.*, 1997; Reynoso-Cuevas *et al.*, 2008). Como ya se ha mencionado anteriormente es muy probable que la inhibición del crecimiento se deba a que los contaminantes orgánicos depositados y adheridos sobre la superficie radical, impidieron el paso de agua y nutrientes, lo que puede incluso llegar a producir la muerte de la planta (Reynoso–cuevas *et al.* 2008).

Comprobado el efecto del agua de taladrina sobre la germinación, se pasó a establecer el efecto sobre el crecimiento en condiciones de hidroponía. En los primeros experimentos se demostró que ninguna de las plantas era capaz de desarrollar un buen sistema radical en dichas condiciones, ni siquiera en un medio hidropónico rico en nutrientes y sin presencia de agua de taladrina. En presencia de agua de taladrina, las raíces tendían a crecer por la superficie del recipiente sin profundizar en el medio, necrosándose rápidamente. Se decidió entonces procurarle a la planta un soporte en el que pudiese desarrollar su sistema radical de la forma más natural posible para que sus raíces penetraran en el medio, incrementando mucho la superficie de contacto y por lo tanto facilitando los procesos de degradación. De nuevo, el soporte debía ser lo mas inerte posible, fácil de obtener, barato y que no generase

residuos. Durante el desarrollo de esta tarea se probaron tres soportes diferentes: lana de coco, estopa y fibra de esparto. Con los tres se hicieron experimentos en presencia y ausencia de agua de taladrina. En los dos primeros casos las plantas no desarrollaban bien su aparato radical, incluso en la estopa las plantas morían aun sin presencia de agua de taladrina. La fibra de esparto resultó ser un soporte adecuado ya que las plantas desarrollaban un buen sistema radical, no mostraban signos evidentes de estrés y en presencia de agua de taladrina seguían desarrollándose sin excesivos problemas. La fibra de esparto tiene además la ventaja de ser un producto natural muy barato y biodegradable; actualmente en España está en exceso, por lo que su utilización en el sistema de fitorremediación puede ser una adecuada salida para él.

Una vez establecido el procedimiento de trabajo así como la infraestructura del mismo, se pasó a comprobar cuáles eran los valores de DQO en los que las plantas sobrevivían en mejores condiciones, requisito indispensable para cumplir con los objetivos propuestos. Se probaron varias concentraciones de DQO (tabla 3.2), una elevada (aproximadamente 4.500ppm, valor que tenían la mayoría de las muestras de agua de taladrina entregadas por la empresa), y una concentración de DQO cercana a la permitida por la Ley 10/1993, de la Comunidad de Madrid, pero un poco superior (1.930 ppm). Según Lin y Mendelssohn (1998), el éxito de la fitorremediación depende, en parte, de identificar la concentración que permite un mejor establecimiento de la planta en el medio contaminado. Estudios del crecimiento de la raíz de la planta muestran que éstas sólo pueden sobrevivir bajo unas concentraciones críticas de los tóxicos en el medio, lo que varía en función de la especie (Liste y Prutz, 2006). La pregunta que surge inmediatamente a este respecto es que si utilizáramos una concentración de DQO cercana a la permitida por la Ley 10/1993 de la Comunidad de Madrid, ¿por qué iba a querer la empresa remediarlo si podría conducirlo hasta el sistema integral de saneamiento cumpliendo con la normativa? La respuesta es que el ayuntamiento en el que se ubica la empresa posee una normativa mucho más restrictiva que dicha ley, no permitiendo el vertido de residuos con una DQO mayor a 500 ppm.

Como las especies terrestres requieren un mayor manipulación para su empleo (esterilización, germinación, cosecha), se estudió la posibilidad de utilizar especies de hábitat acuático (apartado 3.9) que podían constituir un sistema de fitorremediación eficaz para ser aplicado a nivel industrial, consiguiendo un coste menor para la empresa.

El primer inconveniente que se encontró para utilizar las especies acuáticas fueron sus estrictas condiciones ambientales, a diferencia de las plantas terrestres que fueron capaces de crecer a un pH mayor de 9, en las plantas acuáticas desde un primer momento se tuvo que ajustar este parámetro, acidificando las muestras hasta valores entorno a 6,5, lo que supone la utilización de compuestos químicos, con un coste económico y un deterioro ambiental. Además, se observó que las especies acuáticas son mucho más sensibles, necesitando unas condiciones óptimas en el medio de cultivo.

Entre la distintas especies acuáticas ensayadas, se observó que *Lemna minor* era la que presentaba una mayor supervivencia. Era capaz de crecer tanto en agua de taladrina

como en taladrina pretratada. Se decidió trabajar con ambos tipos de residuos para conocer la capacidad de crecimiento de la *Lemna*, determinar si la presencia de aceites en la taladrina pretratada podía dificultar el desarrollo de las plantas y en el caso de que no dificultase su crecimiento estudiar la posibilidad de eliminar el tratamiento del Vacudest.

Todas estas especies fueron capaces de reducir significativamente la DQO entre 200 y 400 ppm durante los 5 primeros días (apartado 3.9), esta reducción es muy baja porque tras el proceso de fitorremediación este parámetro tiene valores superiores a 1.000 ppm y por lo tanto está lejos de cumplir los requisitos legales impuestos por el ayuntamiento donde se encuentra la empresa. Después de 5 días de fitorremediación, la DQO se incrementaba alcanzando valores incluso superiores a la DQO de partida (como pudo observarse en los experimentos realizados con las plantas acuáticas *Cyperus*, *Elodea* y *Myriophyllum*, en el apartado 3.9.2). Esto parece indicar que si se mantiene el proceso durante un tiempo superior se produce un efecto negativo. Este incremento de la DQO puede deberse a que las alteraciones fisiológicas producidas en las plantas por los componentes del agua de taladrina producen un daño en los tejidos que genera la descomposición de los mismos, liberando estas partículas de descomposición al medio y por lo tanto incrementando la DQO. Posiblemente, los daños producidos en las plantas por los compuestos tóxicos tengan un efecto negativo sobre los exudados radicales, de manera que la planta libere al medio exudados distintos que alteren la DQO de las muestras fitorremediadas. Walton *et al.* (1994a) especuló que cuando un estrés químico está presente en el suelo una planta puede responder mediante el incremento o el cambio de la exudación en la rizosfera que modifica la composición de la microflora o su actividad. Como resultado, la comunidad microbiana puede incrementar el rango de transformación del contaminante. Por este motivo, para el resto de los experimentos se decidió cambiar el agua de taladrina después de 5 días de fitorremediación.

En el estudio de los parámetros biométricos se observó, por lo general, una disminución del porcentaje del peso fresco en agua de taladrina (figuras 3.20 y 3.21), lo que se debe a una reducción en el número de organismos viables de la especie *Lemna minor*.

La fotosíntesis es uno de los procesos metabólicos más investigado, representa una ruta central en las plantas conllevando la producción de los compuestos orgánicos ricos en energía necesarios para el crecimiento (Kummerová *et al.*, 2006 y 2008). Además, se sabe que los parámetros fotosintéticos, como la fijación de carbono, el transporte de electrones o la disminución del contenido en clorofila, son indicadores de muchos estreses bióticos (Huang *et al.*, 1997; Mallakin *et al.* 2002)

Debido al estado en el que se encontraban las plantas, los parámetros de fluorescencia sólo se pudieron estudiar en la especie *Lemna minor* (apartado 3.9.1.2.b), donde se determinaron la fluorescencia emitida en condiciones de luz suave por plantas que provienen de oscuridad (F_0 , figuras 3.22A y 3.23A), la máxima fluorescencia en el estado de adaptación a la oscuridad (F_m , figuras 3.22B y 3.23B) y la eficiencia potencial máxima del fotosistema II (F_v/F_m , figuras 3.22C y 3.24).

En el parámetro F_o se observa como, en todos los tratamientos, se obtienen valores superiores a la fluorescencia emitida por las plantas controles. Se sabe que un incremento en este parámetro es indicador de un daño en los fotosistemas de las plantas (Bradbury y Baker, 1986; Osmond, 1994; Baker, 2008), en este caso derivado del estrés al que han estado sometidas.

Los valores F_m , F_v (fluorescencia variable de la oscuridad) y el ratio F_v/F_m caracterizan el estado funcional del PSII de las hojas adaptadas a la oscuridad. El ratio F_v/F_m se considera la medida de la efectividad del PSII en las reacciones fotoquímicas primarias (Buttler, 1977). Este parámetro es muy utilizado como un indicador de respuestas de estrés en plantas (Ren *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1997 y otros). Tanto en las plantas de *Lemna minor* que crecieron en agua de taladrina (figura 3.22C) como en las que crecieron en taladrina pretratada (3.24) se obtuvieron valores más bajos en las plantas de los tratamientos que en las controles, al igual que ocurrió en otros trabajos en los que sometían a las plantas a distintos contaminantes ambientales, como en Kummerová *et al.* (2006) donde trataron plantas de guisante con fluoranteno o en Marwood *et al.* (2003) quienes trataron las plantas de *Myriophyllum spicatum* con creosota.

Los cloroplastos son los primeros objetivos de diferentes factores de estrés abiótico (Alscher *et al.*, 1998). Los cambios en el contenido de los pigmentos fotosintéticos pueden estar relacionados con las afecciones producidas por la extracción, distribución y utilización de los nutrientes debidos a los daños en las raíces (Kummerová *et al.*, 2001).

En las plantas tratadas con agua de taladrina (tabla 3.3) se observó una disminución del contenido de la clorofila a y b; en las plantas tratadas con taladrina pretratada (tabla 3.4) también se observó una disminución de estos pigmentos, salvo en la DQO 6 (para la clorofila a) y en las DQO 3, 5 y 6 (para la clorofila b). Otros trabajos también demostraron la reducción de estos pigmentos bajo condiciones de estrés (Bromilow y Chamberlain, 1995; Huang *et al.*, 1996; Kummerová *et al.*, 2001 y 2006).

La fotosíntesis es la principal fuente de estrés oxidativo en los tejidos vegetales (Mittler, 2002). Para contrarrestar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), los cloroplastos poseen una alta eficiencia en el sistema de defensa fotoprotectivo que opera bajo dos principales mecanismos:

1. La mejora de la disipación de la energía del exceso de la excitación. Este proceso depende de la presencia de zeaxantina, que se forma por epoxidación de la violaxantina producida por la inducción de la luz utilizando la anteraxantina como intermediario, en el llamado ciclo de la violaxantina o ciclo de las xantofilas (Demmig-Adams y Adams, 1992a, b).

2. Utilizando otros mecanismos antioxidantes, que incluyen la superóxido dismutasa (SOD) como la primera barrera protectora encimática y/o mediante un sistema de pequeñas moléculas como el α -tocoferol (Munné-Bosch, 2005), que se ocupa de los ROS producidos en las membranas fotosintéticas, el ácido ascórbico y el glutatión retirando esas moléculas altamente reactivas (Foyer *et al.*, 1994).

Todos estos mecanismos pueden ser activados en respuesta a la generación de ROS causado por un estrés ambiental. En nuestro caso, se observó un incremento del contenido en α -tocoferol y en zeaxantina en las plantas tratadas con taladrina pretratada (tabla 3.4) que puede indicar una activación de estos mecanismos de respuesta. Sin embargo esto no se observó en las plantas tratadas con agua de taladrina (tabla 3.3), donde se produjo una disminución del contenido en zeaxantina en todos los valores de DQO y una disminución del contenido en el α -tocoferol en las DQO 5 y DQO 6.

Posiblemente, la activación de estos mecanismos de defensa está relacionada con una mejora del sistema fotosintético de la planta, en la figura 3.22C se observa como el parámetro Fv/Fm disminuye progresivamente en todas los tratamientos con agua de taladrina, mientras que en la figura 3.24 parece que este parámetro se empieza a recuperar en los tratamientos con taladrina pretratada con la DQO 5 y la DQO 6.

El incremento de la concentración de Zeaxantina en las plantas tratadas con taladrina pretratada (tabla 3.4) supone a su vez un incremento en el contenido VAZ (Violaxantina, Anteraxantina y Zeaxantina). Por otra parte puede observarse una disminución del contenido de β -caroteno, que puede deberse a la hidroxilación de este último para formar la zeaxantina, hecho demostrado bajo condiciones de estrés (Demmig *et al.*, 1988; Schindler y Lichtenthaler, 1996) que contribuye a mantener el contenido VAZ. Esta disminución del β -caroteno también se observó en las plantas tratadas con agua de taladrina (tabla 3.3), pero sin embargo no supuso un incremento del contenido de la Zeaxantina.

Esta evolución del contenido del ciclo VAZ, β -caroteno y el α -tocoferol parece indicar una inactivación de los sistemas de defensa en las plantas que crecieron en agua de taladrina. Este hecho junto a los resultados obtenidos en el % de peso fresco, donde se observa un mayor peso en los distintos tratamientos en taladrina pretratada (figura 3.21) frente al peso obtenido en los tratamientos con agua de taladrina (figura 3.20), parece indicar que el agua de taladrina tiene una mayor toxicidad para las plantas.

Como ya se ha comentado, entre las plantas terrestres, se observó que el maíz era la única especie con una germinación del 100% en todos los tratamientos (figura 3.15A) y era capaz de resistir una concentración de 1.930 ppm (tabla 3.2). Los tres experimentos de fitorremediación (apartado 3.10, 3.11 y 3.12) que se presentan en esta memoria fueron diseñados de forma secuencial y coordinados intentando ampliar los objetivos en cada uno de ellos en base a los resultados encontrados. Sólo en el último se estableció el sistema remediador planta (maíz)-microorganismo (cepa TP9). En todos los experimentos se añadió solución nutritiva de Hoagland (en concentración menor a la recomendada por el fabricante) para que las plantas dispongan de nutrientes fácilmente asimilables que les permitan activar las rutas de degradación de compuestos. También se añadió caldo nutritivo porque es el soporte nutritivo que se añade en los experimentos con bacteria.

En el primer experimento (apartado 3.10) los objetivos que se plantearon fueron: a) conocer si en el agua de taladrina, sin planta, sin bacteria y sin soporte de esparto, se produce una modificación de la DQO a lo largo del tiempo, b) comprobar el efecto del esparto

como soporte vegetal sin la presencia de la planta, y c) comprobar la capacidad remediadora del maíz creciendo con el esparto. En todos los casos, se diseñó un experimento a corto plazo (5 días) tras los cuales se rellenaban los contenedores con agua de taladrina con la misma DQO que la que se usó de partida para comprobar, después del periodo establecido, si se producía una nueva disminución de este parámetro.

En ambos tratamientos (con esparto como soporte y sin maíz y con esparto como soporte más la planta) la DQO disminuyó significativamente con respecto al control. Además la disminución en el caso del empleo de maíz y esparto como soporte fue mayor (figura 3.25). No se han encontrado trabajos en los que se utilicen residuos vegetales o fibras naturales como agentes remediadores en medios acuáticos o edáficos para adsorber hidrocarburos. Sin embargo, si existen en la bibliografía ejemplos de remediación con materiales inertes por ejemplo zeolita, titanosilicatos o fibras naturales como lino para adsorber metales pesados (Ferrerira *et al.*, 2009; Marshall *et al.*, 2009; Panuccio *et al.*, 2009). El efecto remediador del esparto podría deberse a un fenómeno de adsorción de hidrocarburos sobre las paredes celulares de las células vegetales que forman la fibra de esparto. Reynoso-Cuevas *et al.* (2008) ha comprobado como muchos contaminantes se adsorben sobre la raíz, sin ser trasladados.

Por otro lado, los datos del experimento demuestran que las plantas de maíz tienen un efecto acumulativo y significativo sobre el esparto. El sistema resultante de la interacción maíz-esparto puede considerarse una rizosfera artificial, debido a que en esta interacción las fibras del esparto y las raíces del maíz actúan como un hábitat donde viven los microorganismos, los cuales son beneficiados por los exudados radicales y a su vez interactúan con la planta. Se sabe que la capacidad de las bacterias para degradar moléculas recalcitrantes aumenta considerablemente en el sistema rizosférico (Aprill y Sims, 1990; Anderson *et al.*, 1993b; Walton *et al.*, 1994b; Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2003). Los primeros estudios sobre la degradación de los compuestos en la rizosfera estuvieron enfocados principalmente en herbicidas y pesticidas (Hoagland *et al.*, 1994; Zablutowicz *et al.*, 1994; Jacobsen, 1997). Estos estudios sugieren que las plantas están protegidas frente a estos compuestos mediante la degradación bacteriana, que a su vez se ve favorecida por el aporte de sustratos orgánicos a través de los exudados radicales.

Las plantas pueden estar disminuyendo la DQO a través de dos mecanismos. Por una parte, pueden estar absorbiendo algunos compuestos, acumulándolos en el interior de las células de la raíz, hecho ya demostrado por otros autores (Gao y Zhu, 2004). Por otra, suministrando nutrientes a través de los exudados radicales para los microorganismos que viven cerca de sus raíces. Dichos exudados aceleran los procesos degradativos llevados a cabo por las bacterias, incrementando el proceso hasta 100 veces con respecto a bacterias no asociadas a las raíces (Parrish *et al.*, 2005). Uno de los beneficios fundamentales de la rizosfera se encuentra en los exudados radicales y es muy importante en sistemas de rizadorremediación como los desarrollados en este trabajo. Algunos compuestos orgánicos de los exudados radicales (fenoles, ácidos orgánicos, alcoholes, proteínas) pueden servir como

fuentes de carbono y nitrógeno para el crecimiento y la supervivencia a largo plazo de los microorganismos capaces de degradar los contaminantes orgánicos. Los microorganismos rizosféricos pueden acelerar la remediación mediante procesos de volatilización de compuestos orgánicos como los PAHs o incrementando la producción de sustancias húmicas de los contaminantes orgánicos (Dec y Bollag, 1994; Cunningham *et al.*, 1996). Además, se sabe que muchos microorganismos aislados de la rizosfera tienen la capacidad para incrementar el desarrollo radical así como propiedades para inhibir el crecimiento (Campbell y Greaves, 1990; Glick *et al.*, 1994; Gutiérrez Mañero *et al.*, 1996; Okon *et al.*, 1998; Patten y Glick, 2002; Glick *et al.*, 2007). A pesar de que no se introdujeron bacterias en este experimento, es posible que el esparto llevase asociados microorganismos que han actuado en este sentido. En el experimento siguiente (apartado 3.11) se tuvo en cuenta este hecho, diseñándolo con el objeto de comprobarlo.

Las medidas de la fluorescencia de la clorofila son muy utilizadas en estudios fisiológicos y ecofisiológicos para determinar el efecto de un supuesto estrés sobre la capacidad fotosintética de las plantas (Baker, 2008). En los distintos experimentos realizados para conocer la capacidad de biorremediación del maíz en distintas circunstancias, se utilizaron diferentes parámetros fotosintéticos para determinar la influencia de los contaminantes en la vigorosidad de las plantas. Concretamente se utilizó el valor de F_o , la eficiencia fotosintética potencial (F_v/F_m), la eficiencia operativa del fotosistema II (Φ_{psII}), el quenching fotoquímico de la variación de la fluorescencia (qP), la tasa relativa del transporte de electrones (ETR) y el quenching no fotoquímico (NPQ). Se ha demostrado que estos parámetros pueden ser utilizados para detectar alteraciones de la capacidad fotosintética de las plantas derivadas de estreses bióticos y abióticos (Pérez-Bueno *et al.*, 2006; Baker, 2008; Rodríguez-Moreno *et al.*, 2008).

Los parámetros biométricos medidos (altura y número de hojas), se redujeron significativamente con respecto al control en las plantas que crecieron sobre el agua de taladrina (figuras 3.26A y 3.27A), así como la eficacia potencial máxima del fotosistema II (F_v/F_m), parámetro este último que da una idea del estado de salud de dicho fotosistema (figura 3.28B). Este dato está indicando que el agua de taladrina actúa como un agente de estrés que afecta al proceso fotosintético. Sin embargo, este hecho contrasta con los datos de F_o (figura 3.28A), un parámetro que también se usa como indicador de salud del fotosistema II. En este caso, una disminución de dicho parámetro indica una menor pérdida de energía por el fotosistema II en forma de fluorescencia, lo que puede ser por dos razones, mayor capacidad del fotosistema para absorber energía (mayor eficacia del fotosistema) o menor número de cloroplastos y por lo tanto de fotosistemas.

Los resultados biométricos y fotosintéticos discutidos y obtenidos en este primer experimento presentan variaciones con respecto a los encontrados en los experimentos siguientes. En este sentido hay que tener en cuenta que el tamaño que tenían las plantas en el momento en el que se añadió la taladrina era ligeramente menor que en experimentos

posteriores (15 días de crecimiento en vez de 17 días). Al discutir los siguientes experimentos, se volverá a retomar este aspecto.

Una vez observado el importante papel que jugaba el esparto en el proceso de remediación del agua de taladrina, se diseñó un experimento para comprobar si las bacterias presentes en su superficie también participaban en el proceso o si la reducción observada se debía sólo a procesos de adsorción (apartado 3.11). Para ello, en uno de los tratamientos se esterilizó el esparto, duplicando los tratamientos con planta y sin planta. Además, se introdujo un tratamiento con maíz pero sin esparto, a pesar de las dificultades que encontramos al principio para que las plantas creciesen en cultivo hidropónico.

En este segundo experimento (apartado 3.11) se introdujo una variable más, que fue la de rellenar los contenedores con agua de taladrina que tuviesen la misma DQO que la alcanzada por cada tratamiento después de 5 días de fitorremediación y volver a medir las variables (DQO, biometría y fotosíntesis) 4 días más tarde.

En este experimento se volvió a comprobar una significativa disminución del valor de la DQO en todos los tratamientos, siendo ésta muy importante en presencia de la planta y principalmente en el tratamiento en el que el esparto no se esterilizó (figura 3.29). Los resultados demuestran que, aunque el esparto y las bacterias asociadas a él juegan un papel importante, el maíz es decisivo en el proceso de remediación, consolidando así la importancia de los procesos de fitorremediación.

Las plantas pueden contribuir a disipar los contaminantes orgánicos mediante absorción de los mismos hacia el interior de los tejidos de la planta, mediante adsorción en las paredes de las células de la raíz o incrementando el número de microorganismos en el sistema rizosférico, aumentando las capacidades metabólicas implicadas en la biorremediación. El impacto de estos procesos no está todavía claramente establecido (Ling y Gao, 2004).

El maíz ya ha demostrado en otros trabajos su capacidad fitorremediadora. Zhang *et al.* (2009), observaron una significativa reducción en la concentración de pireno (uno de los contaminantes del agua de taladrina) en los suelos donde había crecido maíz en comparación con los suelos sin maíz. También, en otros experimentos se encontró como este compuesto desaparecía rápidamente en las 4 primeras semanas con plantas de *Festuca arundinacea* y alfalfa (Schwab y Banks, 1994; Joner y Leyval, 2003; Tao *et al.*, 2004). Es importante destacar la presencia de fluoreno y pireno en las muestras de agua de taladrina (figura 3.5), éstos son dos PAHs que, entre otros, han sido el foco de atención de la comunidad científica dedicada a este tema, debido a sus implicaciones en la salud pública y en su impacto en el medio ambiente. Muchos experimentos de laboratorio han demostrado que algunas plantas pueden incrementar la desaparición de los PAHs cuando se comparan con los tratamientos control (Banks *et al.*, 1999; Yoshitomi y Shann, 2001; Joner y Leyval, 2003; Xu *et al.*, 2009). Por lo tanto, alguno de los compuestos extraídos de las aguas por las plantas pudieron ser el fluoreno y el pireno. Zhang *et al.* (2009), vieron como las plantas de maíz eran capaces de extraer pireno del suelo y acumularlo en la raíz de forma mayoritaria, aunque existía cierta

translocación a los tallos. Éste es un aspecto muy importante en el que profundizaremos en posteriores experimentos.

Podemos ver como la altura de las plantas y el número de hojas es significativamente mayor en los tratamientos sin agua de taladrina frente a los tratamientos con agua de taladrina en los distintos experimentos realizados (figuras 3.30A y 3.31). En el primero las plantas sólo ralentizan su crecimiento, pero siguen teniendo capacidad para aumentar su tamaño. Posiblemente el agua de taladrina está causando un estrés en la planta que provoca una reorganización de sus sumideros energéticos redireccionando sus recursos a otros procesos diferentes al crecimiento, como puede ser la exudación radical, la translocación de los contaminantes, etcétera. En el trabajo realizado por Cheema *et al.* (2009), sobre la degradación de fenantreno y pireno en la rizosfera de *Festuca arundinacea*, se encontró también una disminución en la biomasa de las plantas. Además, en las muestras tenemos dos PAHs que según sugirió Reilley *et al.* (1996) pueden reducir la habilidad de los suelos contaminados (en nuestro caso de las aguas) para suministrar agua y nutrientes a las plantas, generando una disminución en la producción de la biomasa. Por otro lado, cabe destacar que las plantas son sensibles a los hidrocarburos volátiles de bajo peso molecular ya que éstos son solubles en materiales hidrofóbicos de las plantas y pueden penetrar en las membranas celulares (Chauneau *et al.*, 1997; Salanitro *et al.*, 1997; Cheema *et al.*, 2009). En las muestras de agua de taladrina tenemos hidrocarburos volátiles de bajo peso molecular como el fenol y el pireno que por lo tanto pueden producir daños al acumularse en distintas zonas de las plantas y penetrar en las células.

También se puede ver como los tratamientos donde se emplea esparto no estéril la altura de la planta y el número de hojas es mayor que en el resto de tratamientos de un mismo bloque (plantas tratadas con agua de taladrina). En futuros experimentos se realizarán estudios de las bacterias presentes en el esparto no estéril, pensamos que entre estas bacterias podría haber cepas PGPRs (bacterias promotoras del crecimiento vegetal) que entre otras capacidades, protegen a las plantas frente a situaciones de estrés y pueden producir hormonas u otras sustancias que incrementan el desarrollo de la planta. Además, en estudios realizados con metales pesados, la presencia de PGPRs parece tener una gran efectividad en la protección de las plantas frente a la inhibición del crecimiento producida por dichos contaminantes (Wu *et al.*, 2005). No podemos descartar que el esparto actúe como un adsorbente que facilite la acción microbiana al aumentar la superficie de contacto o que simplemente retire hidrocarburos del medio.

Junto a los parámetros biométricos, se midieron parámetros relacionados con la eficiencia fotosintética a través de la detección de la fluorescencia emitida por el PSII (figuras 3.32, 3.33 y 3.34).

Algunos autores han demostrado una disminución del parámetro F_v/F_m producido tanto por estreses bióticos como abióticos (Soukupová *et al.*, 2003; Pérez-Bueno *et al.*, 2004; Berger *et al.*, 2004; Sajnani *et al.*, 2007; Baker *et al.*, 2008). A pesar de que en el primer experimento ya discutido sí se observó una disminución de este parámetro, en este segundo

experimento dicha disminución no se observó (figura 3.32B). Esto puede estar indicando que el agua de taladrina, a pesar de estar disminuyendo los parámetros biométricos, no causa daño en los fotosistemas y que simplemente lo que ocurre es una reorganización de los recursos energéticos como ya se ha comentado antes.

Otro parámetro muy utilizado para valorar la eficacia fotosintética de las plantas es el NPQ. El NPQ refleja la cantidad de energía liberada por el fotosistema II en forma de calor y que por lo tanto no contribuye al proceso fotosintético (Baker, 2008). Son muchos los autores que han demostrado la eficiencia de este parámetro en la detección de daños en el aparato fotosintético derivado de un estrés (Pérez-Bueno *et al.*, 2006; Osmond *et al.*, 1998; Lohaus *et al.*, 2000). Algunos de estos autores han detectado modificaciones de este parámetro sin desajustes en otros como la Fv/Fm. En nuestro caso, el parámetro NPQ tampoco se ve afectado por el agua de taladrina (figura 3.34B), corroborando la hipótesis de que, al menos en el tiempo en el que se desarrolla el experimento, el medio a fitorremediar no afecta a los fotosistemas.

Otro parámetro estudiado fue Fo. Algunos autores proponen a este parámetro como un excelente valor para detectar posibles alteraciones del fotosistema II, las cuales producen un incremento del valor de Fo (Bradbury y Baker, 1986; Osmond, 1994; Baker, 2008). Sin embargo, nosotros apreciamos un efecto muy marcado del agua de taladrina en un sentido diferente, de manera que en ausencia del medio a fitorremediar se aprecia en todos los casos un aumento de Fo a lo largo del experimento (figura 3.32A), efecto que se revierte con mayor o menor intensidad en presencia de agua de taladrina. La forma de crecer de las plantas y su estado general de salud en presencia de agua de taladrina no indican que el valor de Fo sea un buen indicador en el sentido indicado. Desde luego la emisión de fluorescencia de la planta procedente de oscuridad en condiciones de luz suave disminuye apreciablemente en plantas creciendo en presencia de agua de taladrina, al mismo tiempo que se aprecia una clara situación fisiológica general desfavorable.

En el tercer experimento presentado en esta memoria (apartado 3.12), y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los experimentos sobre la evolución de la población de las cepas bacterianas en el agua de taladrina (3.6), se introdujo una variable más: se incorporó al sistema la cepa TP9, una de las tres que fueron capaces de aumentar sus contingentes poblacionales en agua de taladrina, y que por lo tanto, mostraba una mayor capacidad de supervivencia en este medio. Es de sobra conocido que la interacción planta-microorganismo es beneficiosa en los procesos de biorremediación. Ésto se debe a que las plantas, a través de sus exudados, aportan abundante energía que permite a las bacterias realizar los procesos de transformación de compuestos orgánicos. Ésto a su vez beneficia a las plantas que tienen mayor disponibilidad de nutrientes y una mayor resistencia a la posible toxicidad de los contaminantes (Wang y Oyaizu, 2009).

En los dos experimentos anteriores se vio claramente que la acción conjunta del esparto y de las raíces de las plantas en el proceso de biorremediación era fundamental y garantizaba una alta disminución de la DQO, mayor que si utilizáramos esparto solo o las

plantas de maíz sin ningún soporte (figura 3.29). Por esta razón, en este último experimento no se introdujeron los tratamientos sólo con esparto, ni el tratamiento con planta pero sin soporte de crecimiento. Tampoco se mantuvo la esterilización o no del esparto, ya que se observó que la disminución producida por el esparto estéril junto con la planta era menor que la ejercida por el sistema no estéril. La empresa busca un sistema que tenga una aplicación sencilla y la esterilización del esparto supone una mayor mano de obra y un mayor consumo de recursos energéticos, por lo que su aplicación es más costosa.

El esparto actúa como soporte apropiado donde se enraízan las plantas, creando un sistema radical denso, que como estableció Adam *et al.* (2002) garantiza ideales condiciones para la fitorremediación. En este sentido, existen datos que indican la optimización del desarrollo del sistema radical cuando las raíces encuentran un medio que opone resistencia física a su crecimiento. Este aspecto es especialmente importante cuando la planta crece en un medio con agua de taladrina, es decir, cuando las condiciones de crecimiento son más restrictivas. Por lo tanto, el empleo del soporte adecuado se muestra como un factor decisivo en un proceso de fitorremediación en el que se requiere un sistema radical bien estructurado que permita una buena función del sistema rizosférico en condiciones de estrés.

Se observó una reducción de la DQO significativamente mayor en el tratamiento donde no se inoculó la bacteria (figura 3.35). Esto parece indicar que la bacteria añadida no ha sido capaz de mejorar el efecto de las propias bacterias del esparto. Puede deberse a una competencia con las bacterias existentes en el medio que reduzca la capacidad de estos organismos para degradar los contaminantes. Se sabe que las interacciones originadas en la competencia entre organismos indígenas y exógenos por los limitados recursos de carbono disminuyen potencialmente el número de células introducidas (England *et al.*, 1993; Sørensen *et al.*, 1999). La competencia entre los organismos ha podido reducir no sólo la concentración de la bacteria inoculada sino también la comunidad indígena del esparto, disminuyendo por lo tanto su capacidad para descontaminar. Además, como la bacteria inoculada no ha sido aislada de un medio rizosférico sino de la taladrina (medio líquido) puede haberse perdido cuando se cambió el agua de los contenedores por el agua de taladrina y posiblemente cuando se realizó la segunda inoculación los contingentes poblacionales de esta cepa se redujeron considerablemente (como se observó en el apartado 3.6) y los pocos organismos que quedaron estuvieron involucrados en actividades de competencia en vez de realizar la degradación.

Otro parámetro analizado fue el pH (figura 3.36), aunque no se produjeron diferencias significativas, se observó que la reducción de este parámetro realizada en el tratamiento con bacteria fue mayor que en el tratamiento donde no se inoculó. Esto puede explicarse porque la bacteria inoculada fue aislada de la propia taladrina y tiene una mayor capacidad para reducir este parámetro. Se sabe que las bacterias son las primeras colonizadoras de la taladrina y sus actividades producen unas condiciones, como la bajada del pH por los procesos de degradación, que permiten la invasión de los hongos (Rossmore y Holtzman, 1974; Von Holy, 1989).

El parámetro de la DQO puede explicarse también atendiendo al análisis de hidrocarburos (tabla 3.5 y apartado 3.12.1.c, estudio de los hidrocarburos totales). En este análisis, lo primero que llama la atención es la ausencia de PAHs en la muestra inicial de agua de taladrina, posiblemente no signifique que estos compuestos no se encuentren en la muestra sino que como ésta está mucho más diluida que las muestras de los análisis iniciales (apartado 3.2) no se hayan detectado.

Como se ha comentado, la disminución de la DQO fue significativamente menor en el tratamiento con bacteria. Esto coincide con los resultados observados para los hidrocarburos totales, donde se observa como el contenido total de estos compuestos es mayor en los tratamientos con bacteria (apartado 3.12.1). Como la DQO mide la materia orgánica total que puede oxidarse a CO_2 y H_2O , cuanto mayor sea el contenido de materia orgánica mayor será la DQO.

Además, el análisis cualitativo de hidrocarburos (tabla 3.5) indicó que en el tratamiento con bacteria se biorremediaron menos compuestos que en el tratamiento sin bacteria, encontrando en este último sólo uno de los compuestos que caracterizaban la muestra original. Como resultado, en las muestras del tratamiento sin bacteria sólo se detectaron 3 compuestos, mientras que en las muestras del tratamiento con la bacteria se detectaron 4.

En este análisis de hidrocarburos resulta llamativa la aparición de un compuesto derivado del silicio. Como se observó en el análisis elemental (apartado 3.5, figura 3.8) este elemento químico es el más abundante en la muestra de agua de taladrina, lo que explicaría la aparición del compuesto. La ausencia de éste en los tratamientos con bacteria puede indicar que la cepa aislada de la propia taladrina (TP9) necesita el silicio para su desarrollo, lo que resultaría en una disminución de este elemento que no permite la formación del compuesto.

Los resultados obtenidos en los parámetros biométricos indican un fuerte efecto del agua de taladrina sobre el crecimiento de las plantas. En la altura se aprecia una fuerte inhibición del crecimiento bajo el efecto del agua de taladrina (figura 3.40).

Parece que la bacteria inoculada realiza una cierta protección de la planta en las condiciones de estrés generadas por el agua de taladrina. De esta manera, si se comparan los dos tratamientos, se observa un ligero incremento de la altura en los tratamientos con agua de taladrina y con bacteria (figura 3.40) y un valor del parámetro F_o y F_v/F_m significativamente mayor en el tratamiento con bacteria (figuras 3.41A y 3.41B). Se sabe que bacterias no patógenas mediante la producción de algunas moléculas o moléculas presentes en su pared celular pueden disparar rutas metabólicas de respuestas defensivas asociadas a diferentes situaciones de estrés. Este aspecto ha sido particularmente estudiado en situaciones de estrés biótico, de tal forma que si la planta es atacada por un patógeno sus mecanismos de defensa se disparan mucho más rápidamente y de forma mas potente sólo en el caso de que previamente hayan sido estimuladas por dicha bacteria no patógena (en nuestro caso, esta estimulación pudo realizarse en la primera inoculación de la bacteria, que se realizó cuando la planta crecía en agua del grifo con Hoagland). A este fenómeno se le

conoce como “priming” (Conrath *et al.* 2002). Estas moléculas reciben el nombre de elicitores. Por esta razón plantas que estén inducidas de forma adecuada mediante agentes biológicos pueden mejorar su capacidad para adaptarse a situaciones de estrés salino (Timmusk y Wagner, 1999).

Otro parámetro fotosintético estudiado en todos los experimentos maíz-esparto fue el qP, donde por lo general se observó una disminución del mismo en los tratamientos con taladrina (figuras 3.28D, 3.33B y 3.41D). La disminución del qP está relacionada con la energía fotoquímica de conversión por la separación de carga en los centros de reacción del PSII. Este parámetro indica la capacidad fotoquímica del PSII en el estado de adaptación a la luz y cuantifica la fracción de los centros de reacción del PSII que están abiertos, con la Q_A reoxidada (Duysens y Sweers, 1963; Krause *et al.*, 1982).

También se estudió el parámetro NPQ, en todos los experimentos se observó un incremento de este parámetro (figuras 3.28F, 3.34B y 3.41F). Este parámetro es habitualmente usado como un indicador del exceso de la energía de radiación disipada en calor por los complejos antena del PSII (Bilger y Björkman, 1990; Demmig-Adams *et al.*, 1996; Gilmore, 1997).

A partir de los resultados obtenidos queda claro que la combinación maíz-esparto no estéril tiene un potencial remediador muy importante. Por otra parte, se cree necesario estudiar y caracterizar las bacterias presentes en el esparto, ya que existen claras diferencias entre los tratamientos con esparto estéril y no estéril, esto se desarrollará en los capítulos 5, 6 y 7.

5. MATERIALES Y MÉTODOS: DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE SISTEMAS PLANTA- MICROORGANISMO PARA FITO- RREMEDIAR AGUA DE TALADRINA

Una vez seleccionado el sistema fitorremediador, se quiso mejorar la reducción de la DQO ejercida por el mismo, por lo que se seleccionaron nuevos microorganismos con los que realizar ensayos de bioaumento. También se quiso demostrar que la fitorremediación reducía la toxicidad de las muestras y conocer el daño causado por el residuo contaminante sobre la ultraestructura de la zona aérea y radical. Finalmente, se quiso reducir el daño causado en las plantas desarrollando un sistema en fases.

5.1. Cepas bacterianas utilizadas en los sistemas optimizados de fitorremediación

5.1.1. Cepas bacterianas procedentes del esparto

Durante los experimentos desarrollados en la primera parte de la tesis (capítulos 2, 3 y 4), se ha comprobado que el esparto no estéril en contacto con agua de taladrina disminuye la demanda química de oxígeno (DQO) en mayor proporción que el esparto estéril en contacto con este residuo, lo que sugiere la presencia en dicho soporte de microorganismos capaces de degradar los compuestos existentes en el medio objeto de estudio. Por este motivo, se procedió a aislar los microorganismos presentes.

Se pesaron 10 g de esparto y se cortaron en trozos de aproximadamente 1 cm de longitud. Esto se diluyó en 1 L de agua y se agitó durante 5 minutos. A continuación, se sonicó durante 7 minutos (Ruiz Palomino, 2003).

Con el líquido obtenido, se realizaron una serie de suspensiones-diluciones y se sembraron 200 μ L en placas de PCA (agar para métodos estándar). A las 24 horas, las colonias se seleccionaron de la mayor dilución que produjo crecimiento (10^5 y 10^6), ya que según Baecker *et al.* (1989) puede considerarse que en esta dilución es donde se encuentran los microorganismos más comunes en la muestra original (Figura 5.1).

Con las cepas aisladas, se realizaron ensayos para conocer su capacidad para crecer en agua de taladrina y para utilizar este residuo como única fuente de carbono y nitrógeno. Para ello, se siguió el esquema explicado en los apartados 2.6 y 2.7.

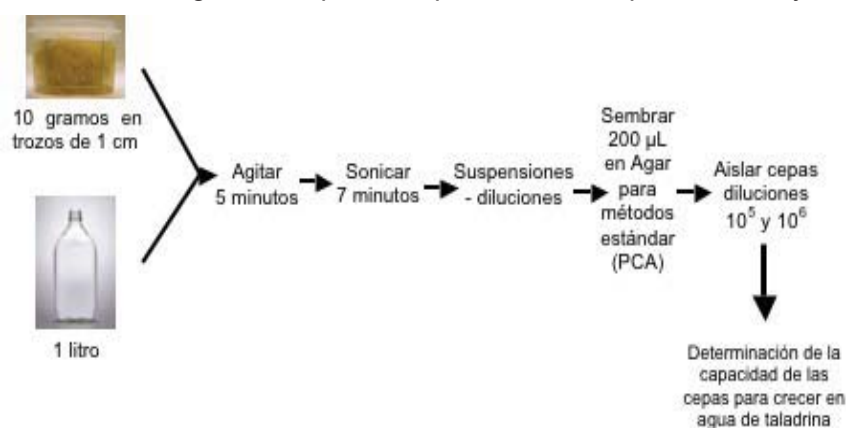


Figura 5.1. Esquema del método empleado para aislar microorganismos del esparto.

5.1.2. Cepas bacterianas procedentes de sistemas rizosféricos

Se utilizaron cepas PGPRs (plant growth promoting rhizobacteria) de la colección del Grupo de Investigación de Biotecnología de la Rizosfera de la Universidad San Pablo-CEU. Dichas cepas fueron: Aur 6 (*Pseudomonas fluorescens*, aislada de la rizosfera del altramuza, nº Genbank HM486749), Aur 9 (*Chryseobacterium sp.*, aislada de la rizosfera del altramuza, nº Genbank AY751083), M 12 (*Burkholderia sp.*, aislada de la rizosfera del pino, nº Genbank AY307365) y N 21.4 (*Pseudomonas sp.*, aislada de la rizosfera de *Nicotiana glauca*, nº Genbank AY748893).

5.2. Clasificación taxonómica de las bacterias aisladas del esparto

Se extrajo el ADN genómico de cada bacteria con el kit Ultraclean™ Microbial DNA isolation kit (MoBio, CA, EE.UU.), según las indicaciones del fabricante.

Se amplificaron mediante PCR los 1.500 pb correspondientes a esta región con los siguientes cebadores: directo 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' y reverso 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3' (Devereux y Willis, 1995) en una concentración 0,5 µM cada uno, en una reacción de 25 µL, 1X de 10X PCR Buffer con Mg (Roche), 1,5% de 100% de DMSO, 1 mM de cada dNTP, 1,4 unidades de ADN polimerasa (UltraTools DNA Polymerase de Biotools), 100 ng de ADN bacteriano y completado con agua.

La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp 2700 (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 94 °C 2 minutos, seguido de 10 ciclos de 94 °C 30 seg, 50 °C 30 seg y 72 °C 1 minuto, seguido de 20 ciclos de 94 °C 30 seg, 50 °C 30 seg y 72 °C 1 minuto (incrementando 5 segundos en cada ciclo) y finalizando con 7 minutos a 72 °C.

Los productos de PCR se redisolviaron en gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE 1×) con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) y se visualizaron en un analizador de imagen GelDoc 2000™ 170-8126 (BioRad, CA, EE.UU.).

Una vez comprobada la amplificación, se cortaron las bandas correspondientes a los fragmentos de PCR y se purificaron con el kit Qiaquick^R Gel Extraction kit de Qiagen.

Una vez purificadas, se enviaron para su secuenciación al Centro de Genómica y Proteómica, Unidad de Genómica, Facultad de Ciencias Biológicas del Servicio de Secuenciación de la Universidad Complutense de Madrid. La secuenciación se llevó a cabo en un equipo ABI PRISM[®] 3730 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Se utilizaron los mismos cebadores empleados en la amplificación.

Las secuencias se compararon en el Genbank por BLASTN 2.2.6 (Altschul *et al.*, 1997) en la base de datos del GenBank (NCBI BLAST^R Home page. Basic Local Alignment Search Tool) estableciendo el grado de homología de las cepas con las presentes en la base de datos. El ensamblaje y alineamiento de las secuencias se realizó con el programa Clustal X 1.81.

5.3. Optimización de los sistemas de fitorremediación mediante un sistema planta-microorganismo

En todos los casos, la planta utilizada fue el maíz que, como se indicó en la primera parte de la tesis (capítulos 2, 3 y 4), fue la especie con hábito terrestre más resistente al agua de taladrina. El soporte de crecimiento y los contenedores utilizados son los descritos en el apartado 2.12, y en todos los casos el esparto no se esterilizó.

El diseño experimental se ha esquematizado en la figura 5.2.

Las semillas se esterilizaron como se describió en el apartado 2.12 y se pregerminaron durante 2 días a 28 °C. Se pusieron 20 semillas por contenedor y se rellenó con una solución de agua del grifo con 1 g/L de solución nutritiva de Hoagland. La cantidad de esparto en cada contenedor fue de 11,50 g.

Los contenedores se regaron 3 días a la semana con un volumen tal que permitiese cubrir las semillas del maíz.

Después de 12 días, los contenedores se inocularon con una solución bacteriana de entre 10^8 u. f. c./mL y 10^9 u. f. c./mL, de manera que la concentración final de bacterias en el contenedor fue de entre 10^6 y 10^7 u. f. c./mL. Para ello, se rellenó el contenedor con 890 mL de agua del grifo con Hoagland (1 g/L), 10 mL de caldo nutritivo (8 g/L) y se realizó el inóculo correspondiente.

Las bacterias utilizadas fueron una cepa del género *Enterobacter* (Esp1) aislada del esparto, una cepa rizosférica procedente de la colección de bacterias PGPR del grupo CEU: *Pseudomonas fluorescens* (Aur 6), y la levadura *Rhodotorula dairenensis*, aislada del esparto (Esp14). Se eligieron las cepas atendiendo a su capacidad para crecer en agar con agua de taladrina como única fuente de carbono. En el tratamiento sin bacterias, se añadió caldo nutritivo en lugar de la solución bacteriana en la misma cantidad que el inóculo.

Quince días después de que se pusieran las semillas en los contenedores (3 días después del primer inóculo), cuando las plantas tenían una altura de unos 32 cm, se cambió el agua del grifo por 890 mL de agua de taladrina con una DQO de entre 1.678 y 1.800 ppm con 1 g/L de solución nutritiva de Hoagland y 10 mL/L de caldo nutritivo (8 g/L). Una hora después de cambiar el agua se realizó una segunda inoculación de la misma forma descrita anteriormente.

Este sistema estuvo en aireación con una bomba de membrana M2K3 de Schego, que produce 350 L/h, creando un sistema conectado mediante T's de manera que a cada tratamiento le llegase la misma cantidad de aire. La temperatura fue de entre 27 y 30 °C. El periodo de fotoluminiscencia fue de 8 horas con una intensidad de luz de 42 micromoles/(m²*s).

A los 5 días de poner las plantas en agua de taladrina se realizaron las siguientes medidas: altura, número de hojas, peso seco de la zona aérea y radical (después de secar 5 días a una temperatura de 70 °C). Además, se estudió la eficiencia fotosintética de las plantas midiendo la emisión de fluorescencia del PSII (como se explicó en el apartado 2.14), se

estudió el flujo de electrones a través de los fotosistemas mediante la reacción de Hill y se determinó la cantidad de clorofilas (apartado 5.4).

Respecto al agua de taladrina, se tomaron muestras antes y después de pasar por el sistema fitorremediador y se midieron: la DQO (según apartado 2.2.2), el pH (según apartado 2.2.3), los hidrocarburos presentes, la presencia de PAHs y los hidrocarburos totales (según apartado 2.3) y se estudió la biotoxicidad según se explica en el apartado 5.6.

Este experimento constó de los siguientes tratamientos:

- a) Maíz sin bacteria y sin agua de taladrina: 3 contenedores.
- b) Maíz sin bacteria y con agua de taladrina: 3 contenedores.
- c) Maíz con bacteria y sin agua de taladrina: 3 contenedores.
- d) Maíz con bacteria y con agua de taladrina: 3 contenedores.

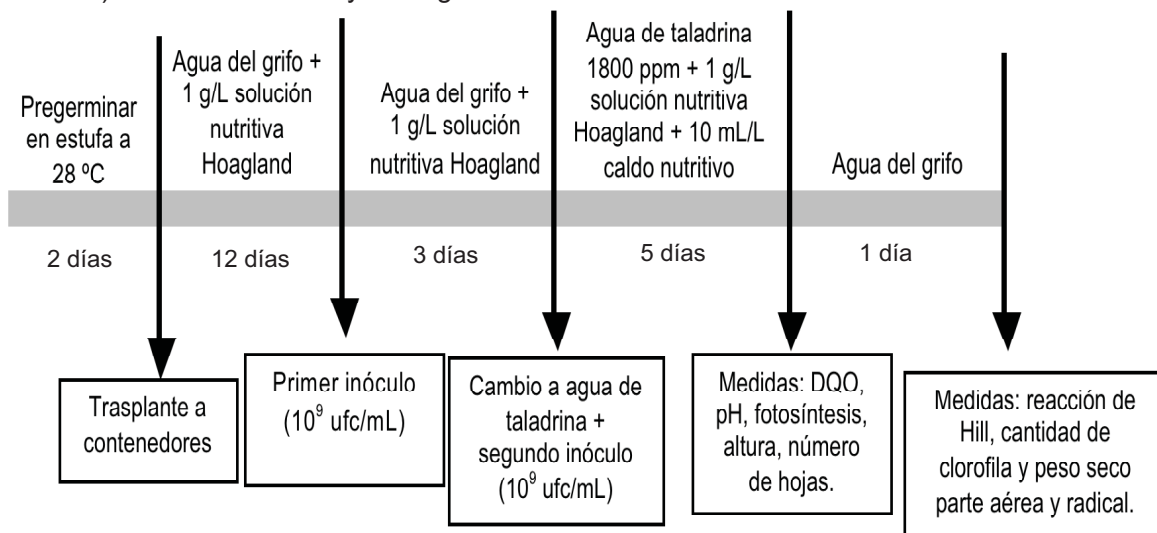


Figura 5.2. Esquema de los sistemas de fitorremediación planta-microorganismo desarrollados.

5.4. Determinación de la velocidad del flujo de electrones a través de los fotosistemas mediante la reacción de Hill y determinación de la cantidad de clorofila

Se pesó 1 g de hoja de maíz, tomando al azar fragmentos de hojas de las distintas plantas de cada contenedor, y se maceró con 10 mL de tampón fosfato 75 mM pH 6.9 hasta que quedó una masa más o menos homogénea. El macerado se filtró por 6 capas de gasa obteniendo un líquido formado por las lamelas cloroplásticas (FLC). El diseño experimental se ha esquematizado en la figura 5.3.

La reacción de Hill está formada por 2 tratamientos:

- 4,5 mL de tampón fosfato 75 mM pH 6.9 + 0,5 mL del FLC + 0,5 mL de DCPIP (Diclorofenol-indofenol).

- 4,5 mL de tampón fosfato 75 mM pH 6.9 + 0,5 mL de FLC hervido (el filtrado se puso a hervir durante 2 minutos, produciendo la disgregación y desnaturalización de los componentes de las lamelas) + 0,5 mL de DCPIP.

En el espectrofotómetro Thermo Electron Corporation de Biomate se midió a 600 nm cada uno de los tratamientos (medida a tiempo cero), utilizando como blanco 4,5 mL de tampón fosfato 75 mM pH 6.9 y 0,5 mL del filtrado.

Para acelerar el proceso fotosintético y favorecer la reducción del DCPIP, los tratamientos se colocaron bajo una intensidad de luz de 174 micromoles/(m²*s) durante 3 minutos, momento en el cual se repitió la medida a 600 nm. Para confirmar la reducción de la absorbancia, se dejaron durante otros 3 minutos ambos tratamientos bajo una intensidad de luz de 174 micromoles/(m²*s) y se repitió la medida a 600 nm.

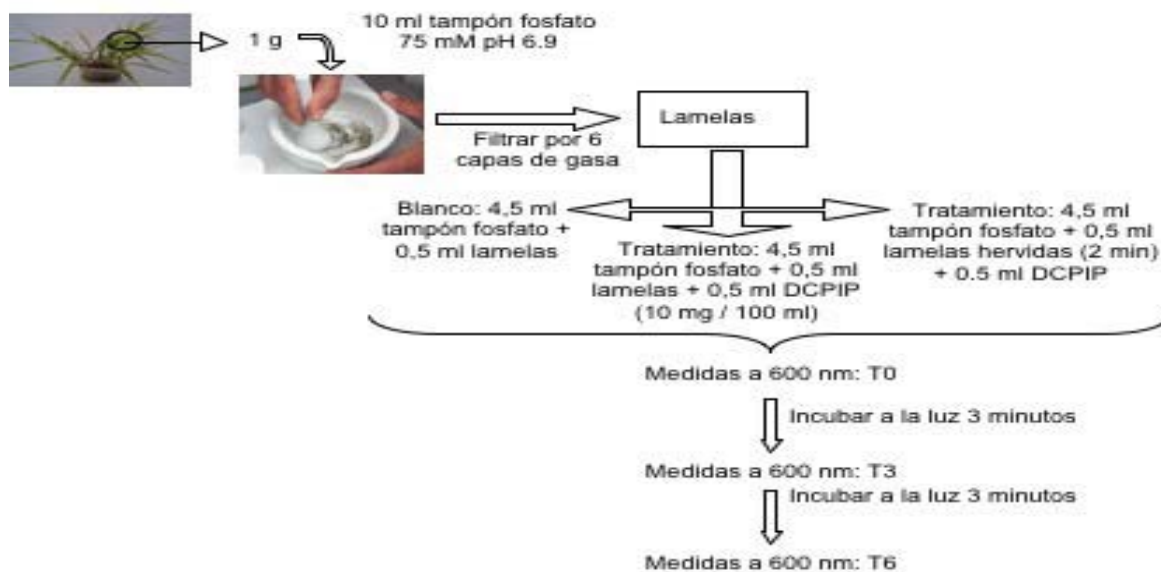


Figura 5.3. Esquema reacción de Hill.

Como puede verse en la figura 5.4, el DCPIP se comporta como un aceptor no fisiológico cuyo potencial rédox le permite captar los electrones a nivel de la plastoquinona.

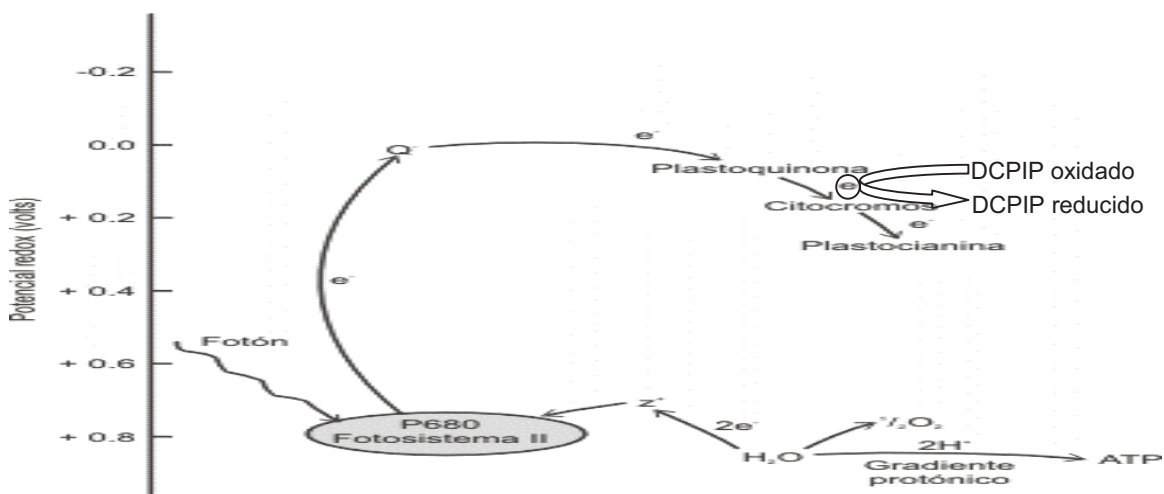


Figura 5.4. Reducción del DCPIP (Diclorofenol-indofenol).

Por otra parte, para determinar la cantidad de clorofila (Strain *et al.*, 1971; Kaufman *et al.*, 1975) se utilizó 1 mL del FLC y 4 mL de acetona. Esta mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 4.000 r. p. m. y se midió la absorbancia del sobrenadante a 649 nm y a 665 nm. Como blanco se utilizó 1 mL de tampón fosfato y 4 mL de acetona (figura 5.5).

La cantidad de clorofila se calcula:

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g/mL}) = 11,63 * \text{Abs. (665 nm)} - 2,39 * \text{Abs. (649 nm)}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g/mL}) = 20,11 * \text{Abs. (649 nm)} - 5,18 * \text{Abs. (665 nm)}$$

Con los resultados obtenidos, las unidades utilizadas para representar la reacción de Hill fueron μg de DCPIP reducido/(min* μg clorofila)

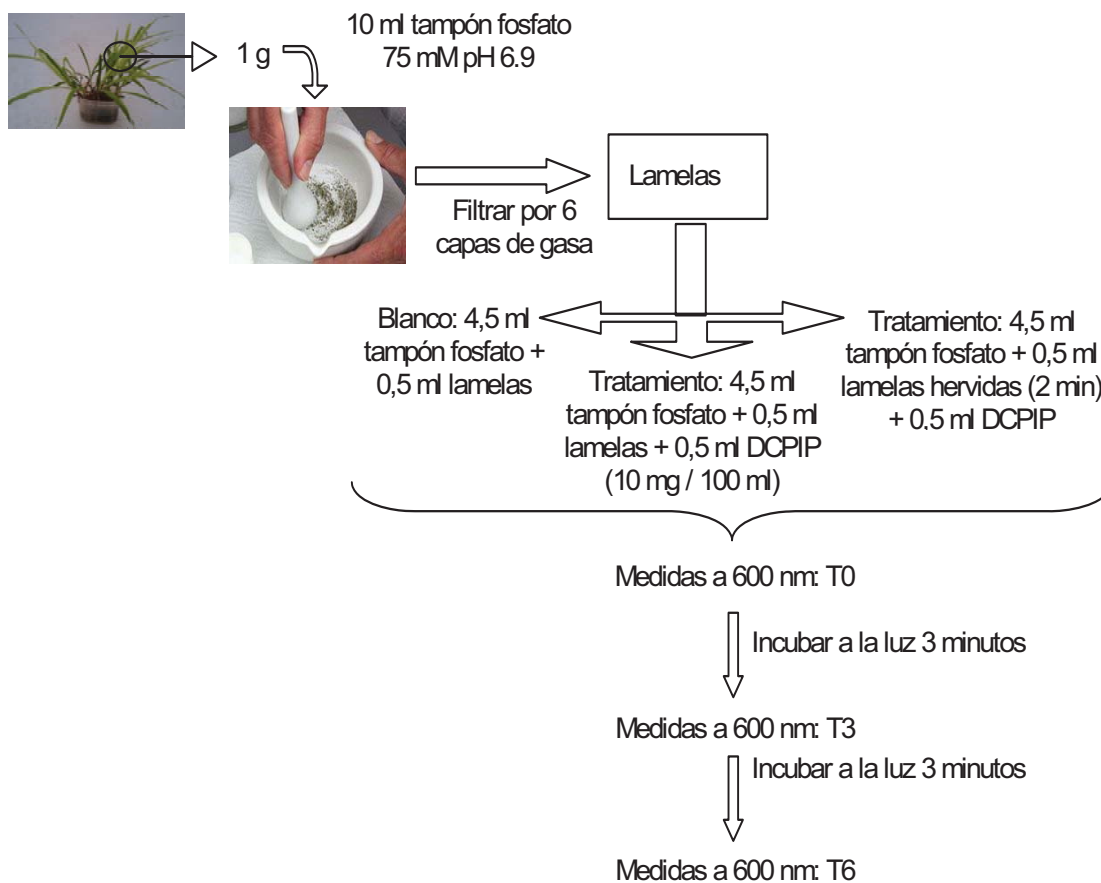


Figura 5.5. Esquema extracción de clorofilas.

5.5. Escalado de los experimentos a nivel industrial

Se diseñó un experimento en fases en el que las plantas sólo estaban dos días en contacto con el agua de taladrina, para después mantenerlas en agua con nutrientes durante 7 días antes de someterlas a un nuevo crecimiento en agua de taladrina.

Este experimento constó de los siguientes tratamientos (figura 5.6):

- 4 contenedores que permanecieron todo el tiempo en agua del grifo con nutrientes: controles.

- 32 contenedores que estaban sólo 2 días en contacto con el agua de taladrina: tratamiento en fases.

- 4 contenedores que estaban 8 días en agua de taladrina de forma continua.

Al igual que en experimentos anteriores, se esterilizaron las semillas según lo explicado en el punto 2.12 y se pregerminaron durante 2 días a 28 °C.

5.5.1. Fase primera de biorremediación: Fase de ida

En esta fase se trata de determinar la reducción de la DQO ejercida por las plantas. A diferencia de los experimentos anteriores, se pretende que las plantas estén sólo 2 días en contacto con el agua de taladrina. El objetivo es que el daño ejercido por el agua de taladrina en las plantas sea tal que permita su recuperación para poder repetir el ciclo con las mismas.

Se pusieron 11,50 g de esparto y 20 semillas en cada contenedor. Éstos se rellenaron con una solución de agua del grifo con Nitrofoska[®] en una cantidad tal que resulte un 10,1% de N en cada litro de agua.

Los contenedores se regaron 3 días a la semana con un volumen que permitiese cubrir las semillas del maíz.

Después de 15 días, cuando las plantas tenían una altura de unos 30 cm se cambió el agua de 8 contenedores, rellenando con 900 mL de agua de taladrina con una DQO de 2.062 ppm y Nitrofoska[®] (10,1% de N por litro de agua).

Se realizaron dos experimentos en paralelo:

a) Tratamiento en continuo: Formado por 4 contenedores en los que las plantas están 8 días en contacto con el agua de taladrina. Se pretende conocer la reducción de la DQO realizada por estas plantas así como determinar el efecto del agua de taladrina en las mismas. Después de 8 días se realizaron las medidas de DQO (apartado 2.2.2), pH (apartado 2.2.3), fotosíntesis (según apartado 2.14), reacción de Hill (según apartado 5.4) y biometría (altura y número de hojas). Se tomó una muestra de agua para realizar bioensayos de ecotoxicidad (apartado 5.7) y otra para determinar los hidrocarburos presentes, la presencia de PAHs y los hidrocarburos totales (según apartado 2.3).

b) Tratamiento en fases: Formado por 4 contenedores en los que las plantas sólo están 2 días en contacto con el agua de taladrina. Después de este tiempo, el agua de taladrina fitorremediada se pasó a 4 nuevos contenedores dejándolo de nuevo durante 2 días. Esto se repitió 4 veces.

5.5.2. Fase de recuperación

La intención de esta fase es determinar si las plantas son capaces de recuperarse después de estar 2 días en contacto con el agua de taladrina (fitorremediada o no).

Cada vez que se pasaba el agua de taladrina a nuevos contenedores, las plantas que habían realizado la fitorremediación se pusieron de nuevo en agua del grifo con Nitrofoska[®] (10,1% de N por litro de agua) y en dos de los cuatro contenedores se realizaron las medidas de DQO, pH, fotosíntesis, reacción de Hill y biometría (altura y número de hojas). Se tomó una muestra de agua para realizar análisis de bioluminiscencia (apartado 5.7) y los hidrocarburos presentes, la presencia de PAHs y los hidrocarburos totales (según apartado 2.3).

Después de una semana se repitieron las medidas biométricas para conocer el estado de recuperación de las plantas.

5.5.3. Fase segunda de biorremediación: Fase de vuelta

En esta fase se pretende conocer si las plantas son capaces de realizar una nueva biorremediación y determinar el estado fisiológico final de las mismas. Para ello, se comienza por las plantas que estuvieron en último lugar en contacto con el agua de taladrina (plantas de la 4ª tanda). Los contenedores se rellenaron de nuevo con 900 mL de agua de taladrina con DQO 1.742 ppm y Nitrofoska[®] (10,1% de N por litro de agua).

Se repitió el mismo proceso que en el apartado 5.5.1 pero en sentido contrario, de manera que cuando el agua de taladrina estuvo 2 días en contacto con las plantas de la 4ª tanda, ésta se pasó a los contenedores que tenían las plantas de la 3ª tanda (las que estuvieron en penúltimo lugar en contacto con el agua de taladrina). Esto se repitió 4 veces.

De nuevo, dos días después de que las plantas estuviesen en contacto con el agua de taladrina, se realizaron las medidas enumeradas en los apartados anteriores para conocer el estado fisiológico de las plantas en el proceso de vuelta. Se tomó una muestra de agua para realizar análisis de bioluminiscencia (apartado 5.6) y los hidrocarburos presentes, la presencia de PAHs y determinar los hidrocarburos totales (según apartado 2.3). También se realizaron las medidas de DQO (según el apartado 2.2.2) y pH (según el apartado 2.2.3).

Este sistema estuvo en aireación continua con la bomba de membrana M2K3 de Schego, que produce 350 L/h, a una temperatura de entre 27 y 30 °C. El periodo de fotoluminiscencia fue de 8 horas, con una intensidad de luz de 42 micromoles/(m²*s).

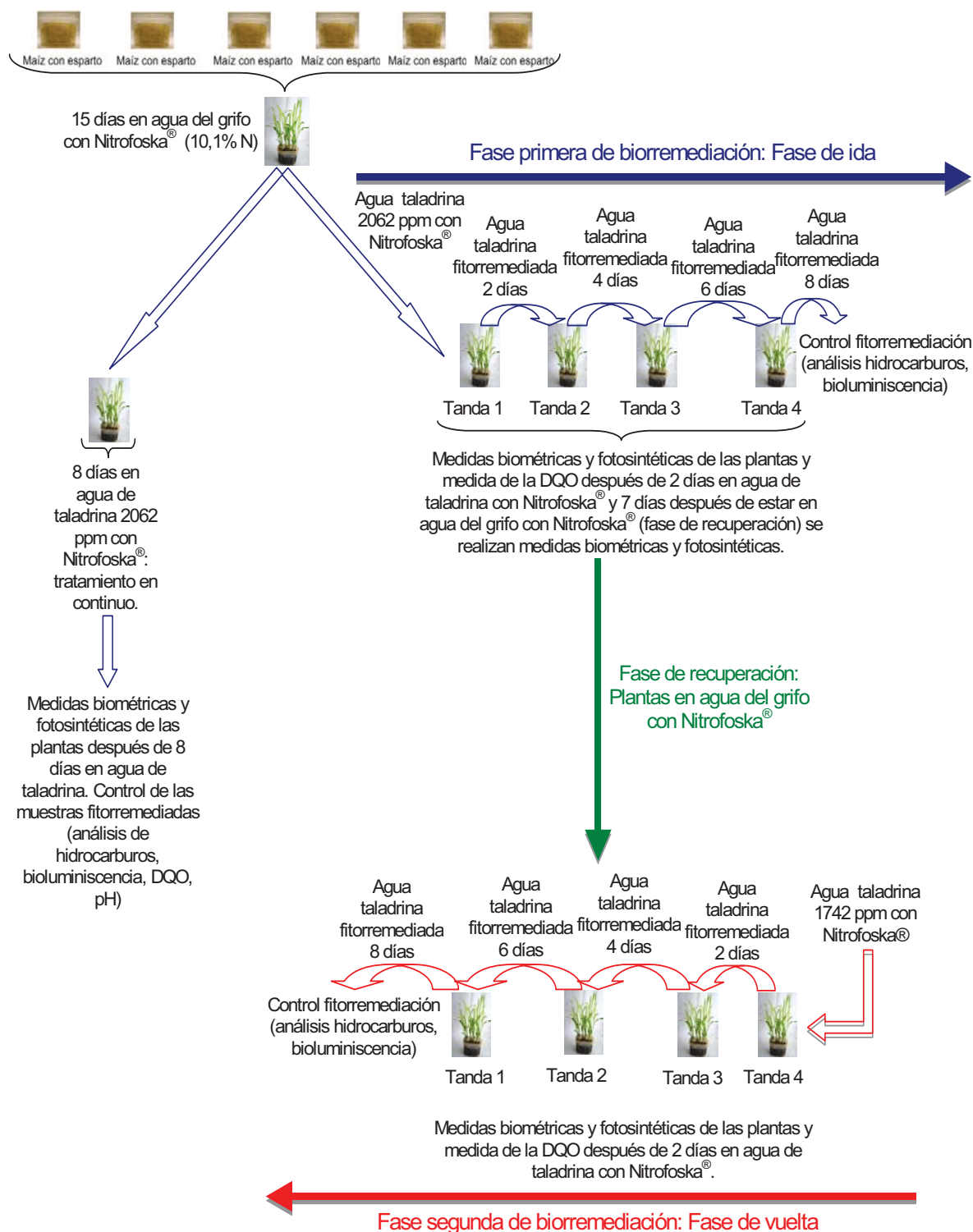


Figura 5.6. Esquema del proceso de fitoremediación en fases. En cada fase, las plantas estuvieron entre 2 y 3 días en contacto con el agua de taladrina. En la fase de ida (azul), las plantas de la tanda 1 estuvieron en contacto con el agua de taladrina de mayor demanda química de oxígeno (DQO), mientras que las plantas de la tanda 4 estuvieron en contacto con el agua de taladrina que había pasado por 3 procesos de fitorremediación. Después de la fase de ida, las plantas estuvieron en agua de grifo con Nitrofoska® (fase de recuperación, verde). Finalmente, en la fase de vuelta (rojo) las plantas de la tanda 4 fueron las que estuvieron en contacto con el agua de taladrina de mayor DQO y las de la tanda 1 estuvieron en contacto con el agua de taladrina que había pasado por 3 procesos de fitorremediación. Las plantas del tratamiento en continuo (azul) estuvieron 8 días en contacto con el agua de taladrina.

5.6. Análisis de toxicidad del agua de taladrina fitorremediada mediante bioluminiscencia

5.6.1. Toxicidad sobre *Anabaena* sp.

Estos análisis se realizaron en colaboración con el equipo de investigación de la Dra. Francisca Fernández Piñas (Universidad Autónoma de Madrid). El agua de taladrina utilizado en estos ensayos procedía de las muestras que habían sido fitorremediadas por plantas de maíz durante 5 días según se explica en los apartados 2.16, 5.3, 5.5 y 8.9.2.

Para realizar estos análisis, primero se seleccionó el medio con el que se hacían las diluciones de las muestras. Esto es fundamental para obtener resultados válidos en bioluminiscencia ya que el medio puede interferir y enmascarar los resultados.

Se ajustaron todas las muestras a un pH de 8,3 porque las cianobacterias utilizadas en los ensayos de bioluminiscencia se desarrollan de forma óptima a dicho valor de pH.

El objetivo del ensayo es determinar la DL_{50} , es decir, la dilución que causa un 50% de mortalidad. Para ello se realizaron 5 diluciones: 1, 1/4, 1/8, 1/16, 1/64. Por cada tratamiento, se realizaron 3 ensayos con al menos 2 réplicas por muestra.

La cianobacteria utilizada en estos ensayos es *Anabaena* CPB4337, desarrollada por el equipo de investigación de la Dra. Francisca Fernández Piñas. El ensayo de toxicidad utilizando esta cianobacteria se basa en la inhibición de la luminiscencia constitutiva causada por la presencia de una sustancia tóxica (Rodea-Palomares *et al.*, 2009; Rosal *et al.*, 2009).

La cianobacteria *Anabaena* CPB4337 se creció en un agitador orbital a 28 °C, en condiciones de luz, con una intensidad de 65 $\mu\text{mol fotones}/(\text{m}^2\text{s})$, en 50 mL de medio AA/8 (Allen and Arnon, 1955) suplementado con nitrato (5 mM) en erlenmeyer de 125 mL y con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de neomicina sulfato (Nm).

Para retirar el medio de cultivo de las cianobacterias se realizan 5 lavados en agua destilada, centrifugando a 9.500 r. p. m. durante 7 minutos a 28 °C.

El ensayo de bioluminiscencia (figura 5.6) se realiza en microplacas opacas de 96 pocillos. Cada pocillo se rellena con 160 μL de cada dilución junto con un control (agua del grifo con 1 g/L de Hoagland y 10 mL/L de caldo nutritivo (8 g/L), el mismo medio con el que se realizan las diluciones). En cada pocillo se añaden 40 μL de células, crecidas como se describe anteriormente, con una densidad óptica a 750 nm de 0,5.

Se utilizó como tóxico de referencia una serie de diluciones de sulfato de cobre (CuSO_4) para realizar el calibrado en todos los ensayos. Esta calibración permite calcular la media de la $IC_{50-1 \text{ hora}}$ para así aceptar o rechazar el experimento, en función de si los valores de IC_{50} están dentro o fuera del 95% de los límites de confianza fijados previamente para este contaminante de referencia (USEPA 1994, 2002). Para garantizar esto, se probaron 5 diluciones de cobre en los pocillos control de cada ensayo.

La microplaca se tapa con parafilm transparente y se pone bajo una intensidad luminosa de $30 \mu\text{mol fotones}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ y a temperatura ambiente ($28 \text{ }^\circ\text{C}$). Se realizan medidas de luminiscencia a las 24 horas de cultivar las placas. Esta medida se realiza con el luminómetro LB960, recogiendo medidas cada 5 minutos.

La respuesta a la toxicidad presentada por la cianobacteria fue estimada con los valores de la IC_{50} , que es la media de la concentración efectiva de un tóxico que causa una inhibición de un 50% de la bioluminiscencia respecto al control no tratado. El valor de la IC_{50} y los parámetros estadísticos relacionados como la desviación estándar, el coeficiente de variación y los intervalos de confianza (IC) fueron estimados con el programa ICP (A Linear Interpolation Method for Sublethal Toxicity: The Inhibition Concentration (ICp) Approach - Version 2.0), utilizando el método de interpolación lineal (Norberg-King, 1993; USEPA 1994, 2002).

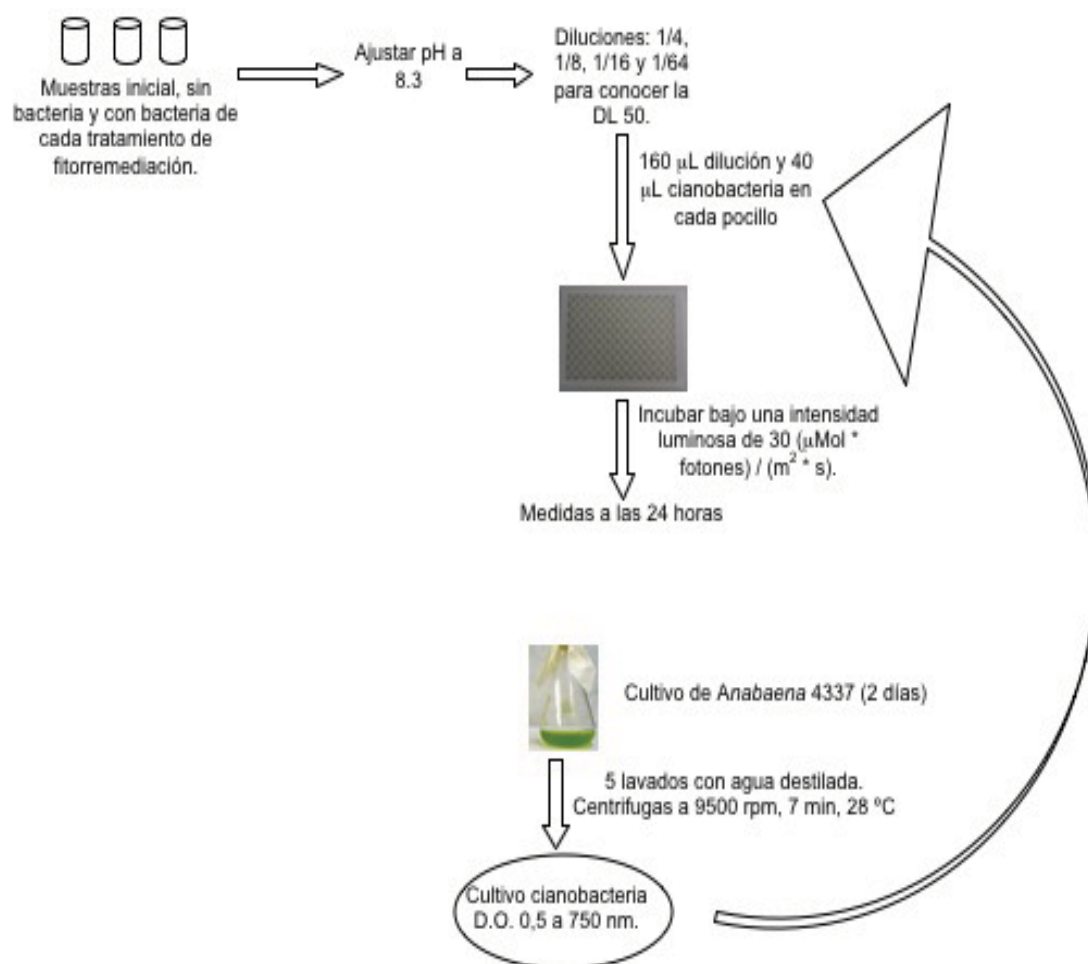


Figura 5.7. Experimento para determinar la toxicidad de las muestras mediante ensayos de bioluminiscencia.

5.6.2. Análisis de la toxicidad sobre plantas de maíz: Sistema fitorremediador

Paralelamente, se realizó un nuevo experimento con el sistema maíz-esparto según lo explicado en el apartado 5.3. El objetivo era conocer el efecto del agua de taladrina fitorremediada sobre el sistema fotosintético del maíz para así compararlo con el efecto de dicho agua de taladrina sobre la bioluminiscencia de la cianobacteria.

Para ello, se dispusieron dos lotes de plantas de maíz desfasados 5 días (figura 5.8), de manera que en ambos casos pasaron 15 días hasta que las plantas estuvieron en contacto con el agua de taladrina. El segundo lote recibía el agua de taladrina fitorremediada por el primer lote de plantas. El efecto que ese agua de taladrina tuviese sobre las plantas (observados mediante el análisis de la eficiencia fotosintética) podría ser comparado con el efecto sobre las cianobacterias.

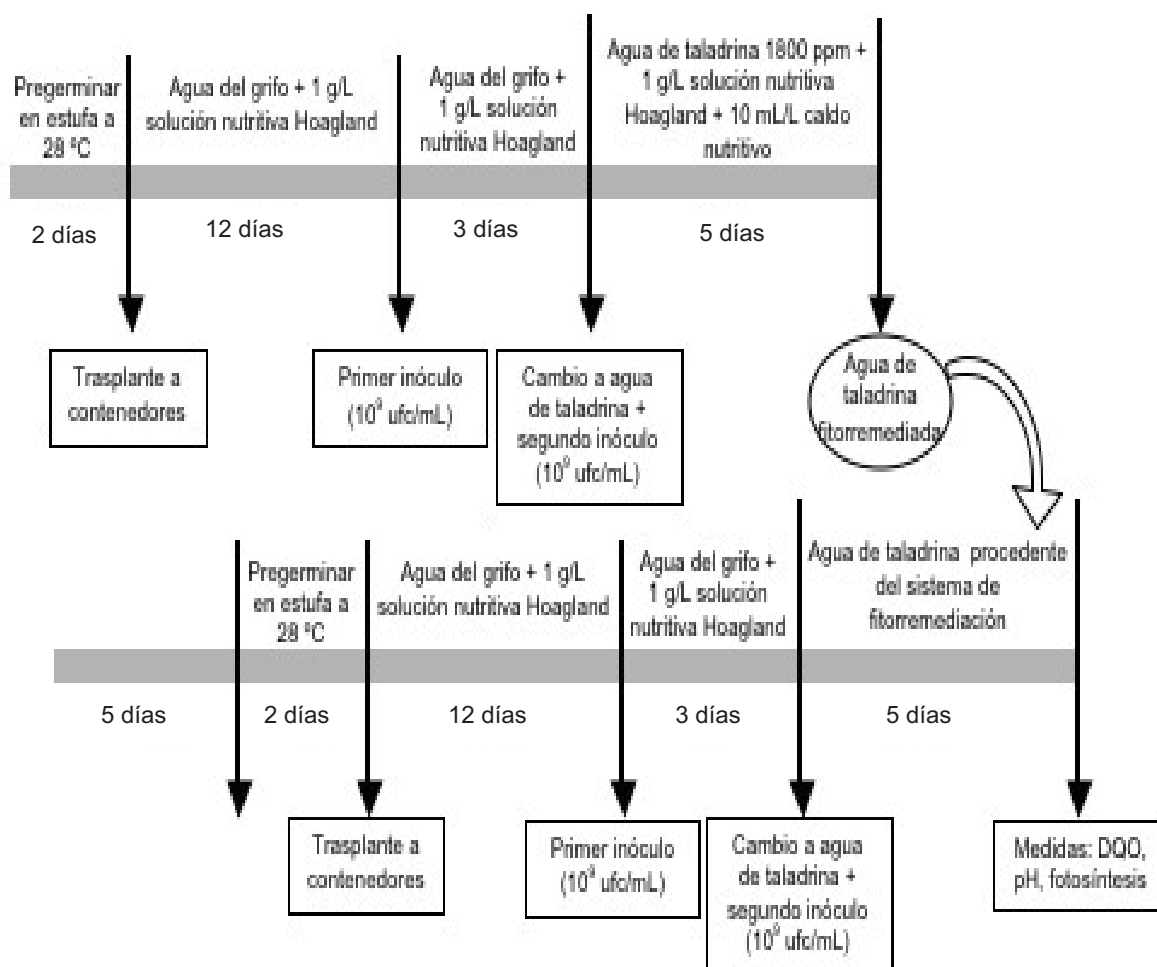


Figura 5.8. Experimento para conocer el efecto del agua de taladrina fitorremediada sobre la fotosíntesis de las plantas de maíz.

5.7. Análisis ultraestructural de hojas y raíces de maíz tras fitorremediar el agua de taladrina

Con el objeto de visualizar el efecto del agua de taladrina sobre la estructura y ultraestructura celular de hojas y raíces de plantas de maíz, se repitió el experimento llevado a cabo con la cepa Aur 6, utilizando 890 mL de agua de taladrina de DQO 1.739 ppm con 1 g/L de Hoagland y 10 mL de caldo nutritivo (8 g/L) y se procesaron muestras de hoja y de raíz con las siguientes técnicas microscópicas.

5.7.1. Microscopía electrónica de transmisión

5.7.1.1. Inclusión de las muestras en LR White

Antes de realizar el proceso de inclusión, se preparó el fijador según instrucciones mostradas en el Anexo 12.

Cuando las plantas llevaban 5 días en contacto con agua de taladrina se tomaron muestras de la 3ª hoja más joven y de las raíces más jóvenes de cada tratamiento, seleccionando al azar entre las distintas plantas del mismo contenedor.

Se cortaron fragmentos de alrededor de 1 mm de tamaño y se operó de acuerdo al siguiente esquema de inclusión en LR White, desarrollado por Elena Fedorova (Fedorova *et al.*, 2005):

Día 1: Todo el proceso se realiza dejando las muestras en la nevera (4 °C).

- Se dejan las muestras 2 horas en 1 mL de fijador (Anexo 12). Con objeto de favorecer la penetración del fijador, se desgasifican en una campana de vacío en sesiones de 1 minuto.
 - Se cambia el fijador y se deja durante 1,5 horas en 1 mL de nuevo fijador.
 - Se realizan 3 lavados con cacosacarosa (Fedorova *et al.*, 2005), de 30 minutos cada lavado.
 - Se realiza una postfijación con 600 µL de tetraóxido de osmio al 1% en cacosacarosa.
- Se dejan a 4 °C en nevera durante toda la noche.

Día 2: En este día se realiza la deshidratación y la tinción con uranilo.

- Se realizan dos lavados de 5 minutos con 1 mL de cacosacarosa.
- Después se procede a la deshidratación en una serie de etanoles durante 10 minutos al 30%, 50% y 70%.
- Se deja toda la noche en la nevera, a 4 °C, en 600 µL de acetato de uranilo al 1% con etanol al 70%.

Día 3:

- Se continua la deshidratación con 2 lavados en etanol, primero al 90% durante 10 minutos y después al 96% durante media hora. A continuación, se realizan 2 lavados de 1 hora cada uno en etanol al 100%. En todo momento se dejan las muestras en la nevera, a 4°C.

- Comienza la inclusión en LR White (Sigma). Para ello, se dejan las muestras en 600 µL de una solución 1:3 de LRW y etanol al 100%. Se dejan las muestras en agitación durante 3 horas en la cámara fría.

- Después de las 3 horas se quitan 200 µL de la solución anterior y se añade el mismo volumen de LRW puro, de manera que quede una concentración 1:1. Esto se deja en agitación toda la noche en la cámara fría.

Día 4: Se continúa con la infiltración en LRW a 60 °C.

- Se quitan otros 300 µL de la solución 1:1 LRW : etanol 100% y se añaden de LRW. De esta manera, se consigue una concentración 3:1 LRW en etanol 100%. Se deja 3 horas en agitación a 4 °C en la cámara fría.

- Se cambia toda la solución y se añaden 600 µL de LRW puro. Se deja toda la noche en agitación a 4 °C en la cámara fría.

Día 5: Se continúa con la infiltración en LRW a 60 °C.

- Se cambia de nuevo toda la solución y se añaden otros 600 µL de LRW puro. Se deja en agitación todo el fin de semana a 4 °C en la cámara fría.

Día 6: Inclusión final en LRW en cápsulas de gelatina a 60 °C (de Lorenzo *et al.*, 1998)

- Cada cápsula se carga con LRW pura (60 °C) y se introduce 1 muestra.

- Se polimerizan las muestras en la estufa a 60 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo se apaga la estufa y no se abre hasta el día siguiente, momento en el cual se sacan las muestras y se etiquetan.

5.7.1.2. Visualización al microscopio óptico de campo claro

Las bloques de LRW se cortaron con el ultramicrotomo Reichert Ultracut S (Leica), provisto con cuchillas de diamante de 45°.

Las observaciones de cortes semifinos (1 µm) se realizaron en un microscopio óptico Zeiss Axiophot con sistema fotográfico integrado. Los cortes fueron montados con unas gotas de agua bidestilada sobre portaobjetos de vidrio y se fijaron dejando la muestra durante 15 minutos a 57 °C. Fueron teñidos con azul de toluidina al 1% conteniendo borato sódico (1:1) dejando la muestra durante 1 minuto a 57 °C. Se lavaron con agua bidestilada.

5.7.1.3. Visualización al microscopio electrónico de transmisión

Se realizaron secciones ultrafinas (70 nm) de las muestras con el ultramicrotomo Reichert Ultracut S (Leica).

Estas secciones se recogieron sobre rejillas de cobre, de 150-200 ventanas y se tiñeron con citrato de plomo al 0,4% durante 1 minuto, después se lavaron abundantemente con agua bidestilada (Reynolds, 1963). Las secciones fueron observadas en un microscopio electrónico STEM LEO 910 con una cámara digital integrada Gatan Bioscan (modelo 792).

5.7.2. Microscopía electrónica de barrido

Las hojas y las raíces, enteras, fueron pegadas con Gurr[®] (Compuesto oct; BDH) en un portamuestras de aluminio para microscopio de barrido en el que se había practicado un orificio de 3 mm de diámetro. Inmediatamente se introdujeron en una cámara de nitrógeno Slush a -196 °C para su inmediata fijación en congelación y se trasladó en vacío al sistema de criofractura.

La muestra se fracturó dentro de la cámara a -180 °C con la ayuda de una sonda con punta de acero. A continuación se deshidrató, para ello se introdujo en la cámara de observación para sublimar el agua superficial a -90 °C en vacío. Después se sacó a la cámara de fractura donde se sombreó con oro para hacerla conductora a los electrones (Guasch *et al.*, 2001).

Finalmente se transfirió a la cámara de observación del microscopio electrónico de barrido Digital Scanning Microscope DSM 960 de Zeiss utilizándose los detectores de electrones secundarios y retrodispersados (B. S. E. Back Scattered Electrons) para la observación directa de la muestra.

5.8. Tratamiento estadístico: Análisis de la varianza (ANOVA)

En los experimentos explicados en los apartados 5.3, 5.4 y 5.5 se realizaron ANOVA unidireccionales, a partir de los valores de las réplicas. Cuando el valor de P era menor a 0,05 (95% de confianza) se consideró que existían diferencias significativas entre las variables analizadas. En ese caso, se compararon los valores medios mediante el estadístico LSD (Least Significant Difference) de Fisher (Sokal y Rohlf, 1979). El programa utilizado fue el Statgraphics Plus 5.1.

6. RESULTADOS: DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE SISTEMAS PLANTA-MICROORGANISMO PARA FITORREMIAR AGUA DE TALADRINA

6.1. Capacidad de las colonias ensayadas para crecer en agar con agua de taladrina con o sin nutrientes

Siguiendo las especificaciones del apartado 5.1 se aislaron 16 microorganismos del esparto (15 bacterias y 1 levadura). Con estas colonias y las provenientes de la colección del laboratorio (Aur 6, Aur 9, N 21.4 y M 12), se determinó la capacidad para crecer en agar para métodos estándar (PCA) con agua de taladrina y en agar-agar con dicho medio contaminante.

Todas las colonias ensayadas fueron capaces de crecer en PCA con agua de taladrina salvo la cepa Esp16, pero sin embargo sólo dos cepas (Esp14 y Esp15) fueron capaces de utilizar los propios compuestos del agua de taladrina como fuente de carbono, creciendo en el agar-agar con dicho medio contaminante.

6.2. Clasificación taxonómica de las bacterias aisladas

Tras la amplificación y secuenciación del gen 16S del ARN ribosómico, las secuencias fueron introducidas en la base de datos del Genbank para ser comparadas mediante el algoritmo blast con las depositadas en dicha base de secuencias. En la tabla 6.1 se muestra la clasificación taxonómica según el Genbank y el porcentaje de dicha afiliación.

Tabla 6.1. Clasificación taxonómica de las bacterias aisladas del esparto.

Nombre de la cepa	Clasificación taxonómica según Genbank	Número de acceso	% de afiliación (Query coverage)	% de afiliación (máxima Identidad)
Esp1	<i>Enterobacter sp.</i>	JF690924	100%	100%
Esp2	<i>Enterobacter sp.</i>	JF431253	99%	100%
Esp3	<i>Enterobacter sp.</i>	JF968609	100%	100%
Esp4	<i>Enterobacter sp.</i>	JF431253	99%	100%
Esp5	<i>Enterobacter sp.</i>	JF690924	100%	100%
Esp6	<i>Pseudomonas sp.</i>	JF900038	100%	100%
Esp7	<i>Enterobacter sp.</i>	JF690924	100%	100%
Esp8	<i>Enterobacter sp.</i>	JF690924	100%	100%
Esp9	<i>Chryseobacterium sp.</i>	DQ530070	100%	99%

Tabla 6.1. Continuación.

Nombre de la cepa	Clasificación taxonómica según Gen Bank	Nº acceso	% de afiliación (Query coverage)	% de afiliación (máxima Identidad)
Esp10	<i>Enterobacter sp.</i>	JF690924	100%	100%
Esp11	<i>Pseudomonas sp.</i>	JF900038	100%	100%
Esp12	<i>Enterobacter sp.</i>	JF431253	99%	100%
Esp13	<i>Enterobacter sp.</i>	JF322980	100%	99%
Esp14	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	AF444501	100%	100%
Esp15	<i>Curtobacterium sp.</i>	FR775010	100%	100%

En la tabla 6.1 se observa como la mayoría de las cepas pertenecen al género *Enterobacter sp.* También cabe destacar la presencia de una levadura (Esp14). En base a esta tabla, se seleccionaron las cepas Esp1 y Esp14 para realizar los experimentos planta-microorganismo.

6.3. Diseño de los sistemas de fitorremediación mediante un sistema planta-microorganismo: Inoculación de la bacteria Esp1

6.3.1. Análisis del agua de taladrina fitorremediada

a) Demanda química de oxígeno (DQO): En las figuras 6.1 se observa una disminución significativa de este parámetro en las muestras de agua fitorremediada frente al control, esta disminución es de aproximadamente 1.100 ppm. Además, en esta figura se puede ver como se produce una mayor reducción en el tratamiento donde no se inoculó la bacteria (633 ppm frente a los 684 ppm del tratamiento donde se inoculó la cepa), aunque las diferencias no son significativas.

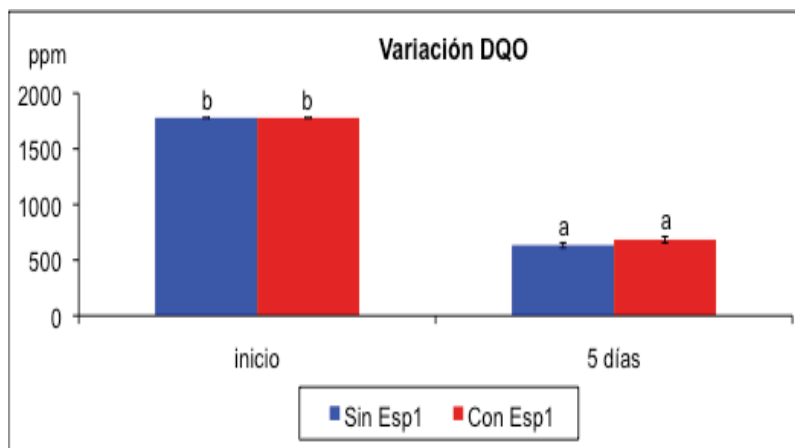


Figura 6.1. Variación de la demanda química de oxígeno (DQO) del agua de taladrina tras un proceso de fitorremediación de 5 días, sin la bacteria Esp1 (azul) o con ella (rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

b) pH: Al igual que en el parámetro anterior, en la figura 6.2 se observa una disminución significativa del pH entre las muestras iniciales y las muestras resultantes del proceso de fitorremediación, esta disminución es de más de un punto. En dicha figura se observa también como el tratamiento de fitorremediación con bacteria fue más efectivo en la reducción del pH (8.56 frente a 8.63) sin presentar diferencias significativas entre la inoculación o la ausencia de inoculación de la cepa Esp1.

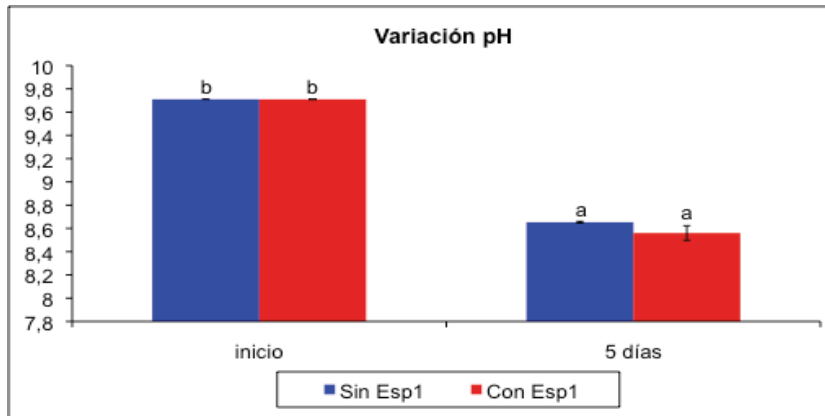


Figura 6.2. Variación del pH entre las muestras de agua de taladrina inicial y las muestras resultantes del proceso de fitorremediación sin la bacteria Esp1 (azul) o con ella (rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

c) Análisis de hidrocarburos:

- Análisis cualitativo de los hidrocarburos presentes: En la figura 6.3 se observan los cromatogramas resultantes del análisis de hidrocarburos de la muestra inicial y de las muestras fitorremediadas, en los que se ven los picos con mayor señal.

Se puede apreciar como, el proceso de fitorremediación supone la desaparición de los picos característicos de la muestra inicial, pero genera nuevos picos o productos de degradación (tabla 6.2).

En el Anexo 9 se adjuntan los cromatogramas completos.

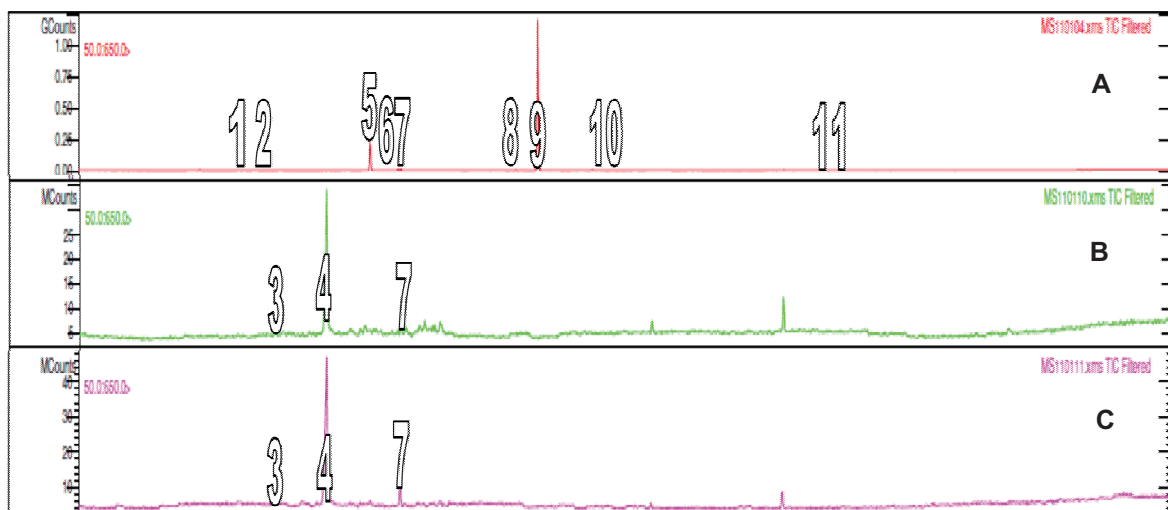













Figura 6.3. Cromatogramas correspondientes al análisis de hidrocarburos de la muestra inicial (A), sin Esp1 (B) y con Esp1 (C). 1: pico 6,80 min; 2: pico 7,30 min; 3: pico 7,32 min; 4: 8,54 min; 5: 9,17 min; 6: 9,55 min; 7: 9,59 min; 8: 11,19 min; 9: 11,49 min; 10: 12,25 min; 11: 14,92 min.

En la tabla 6.2 se puede ver como la mayoría de los compuestos presentes en la muestra de agua de taladrina inicial desaparecen tras el proceso de fitorremediación. El único compuesto que no desaparece es el número 7 que es el más recalcitrante cuando se inocula la bacteria Esp1. Como este producto no desaparece tras la fitorremediación puede clasificarse como sustancia tóxica de acuerdo con la Directiva 2008/1/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de enero de 2008, relativa a la prevención y al control integrados de la contaminación. Además, se observa como, aunque en ambos procesos de fitorremediación se forman los mismos productos secundarios, la cantidad de producto generado es mayor en el tratamiento con inoculación.

Tabla 6.2. Picos presentes en la muestra de agua de taladrina inicial y en las muestras fitorremediadas con y sin Esp1. Los compuestos mostrados fueron seleccionados de la librería generada por los espectros de masas de cada compuesto. En cada caso se seleccionó la molécula que tenía una mayor probabilidad de semejanza con los espectros obtenidos en el análisis de las muestras.

Pico	Tiempo de retención (min)	Nombre compuesto	Fórmula	Molécula	Área Inicial	Área sin Esp1	Área con Esp1	Altura Inicial	Altura sin Esp1	Altura con Esp1
1	6,80	Fenol	C ₆ H ₆ O		3.077e ⁺⁶			3.869e ⁺⁶		
2	7,30	1,1'-oxybis-heptano	C ₁₄ H ₃₀ O		843618			578871		
3	7,32	Silano, (2-metoxietil) trimetil	C ₁₀ H ₁₈ OSi			377649	790693		262185	643375
4	8,54	Ácido hexanoico, 3,5,5-trimetil	C ₉ H ₁₈ O ₂			2.344e ⁺⁷	3.395e ⁺⁷		1.142e ⁺⁷	1.512e ⁺⁷
5	9,17	Etanol, 1-(2-butoxi)etoxi	C ₁₀ H ₁₈ O ₃		1.105e ⁺⁸			8.544e ⁺⁷		
6	9,55	Etanol, 2-fenoxi	C ₈ H ₁₀ O ₂		4.216e ⁺⁶			2.911e ⁺⁶		
7	9,59	Propanamida, N-(2,6-dimetilfenil)-3-(1-piperidinilo)	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O		4.866e ⁺⁶	1.336e ⁺⁶	2.752e ⁺⁶	3.953e ⁺⁶	1.157e ⁺⁶	2.270e ⁺⁶
8	11,19	Ácido sulfúrico, butil dodecil éster	C ₁₈ H ₃₄ O ₃ S		1.513e ⁺⁶			1.144e ⁺⁶		
9	11,49	Ciclohexanamina N-ciclohexil-	C ₁₂ H ₂₃ N		5.169e ⁺⁶			4.478e ⁺⁶		
10	12,25	Ciclohexanamina N-ciclohexil-N-metil-	C ₁₃ H ₂₅ N		2.029e ⁺⁶			1.510e ⁺⁶		
11	14,92	Ácido ftálico, butil undec-2-en-1-yl éster	C ₂₃ H ₃₄ O ₄		958730			794272		

- Presencia de PAHs (hidrocarburos aromáticos policíclicos): En el análisis realizado mediante la técnica de SPME (microextracción en fase sólida) no se observaron diferencias entre la muestra de agua de taladrina inicial y la final. Además, cabe destacar la ausencia de PAHs en la muestra inicial de agua de taladrina diluida hasta una DQO de unos 1.800 ppm y pH de alrededor de 9. Los cromatogramas se adjuntan en el Anexo 10.

- Hidrocarburos totales: En ambos casos, el sistema de fitorremediación empleado, con y sin bacteria, ha disminuido significativamente la concentración de estos compuestos, sin presentar diferencias significativas entre ellos. De esta manera, la concentración de hidrocarburos totales se redujo desde los $12,53 \pm 0,35$ ppm existentes en la muestra inicial hasta los $2,365 \pm 0,12$ ppm de la muestra del tratamiento de fitorremediación sin Esp1 o los $3,18 \pm 0,02$ ppm de la muestra del tratamiento de fitorremediación con Esp1.

6.3.2. Variación de los parámetros biométricos

En la figura 6.4 se muestra la parte aérea de una planta de maíz de cada tratamiento. Se observa un proceso de clorosis en todas las plantas, incluidas los controles. Además, en las plantas que estuvieron 5 días en contacto con el agua de taladrina se observa un estado de marchitez (figura 6.4C y 6.4D), principalmente en las hojas inferiores.

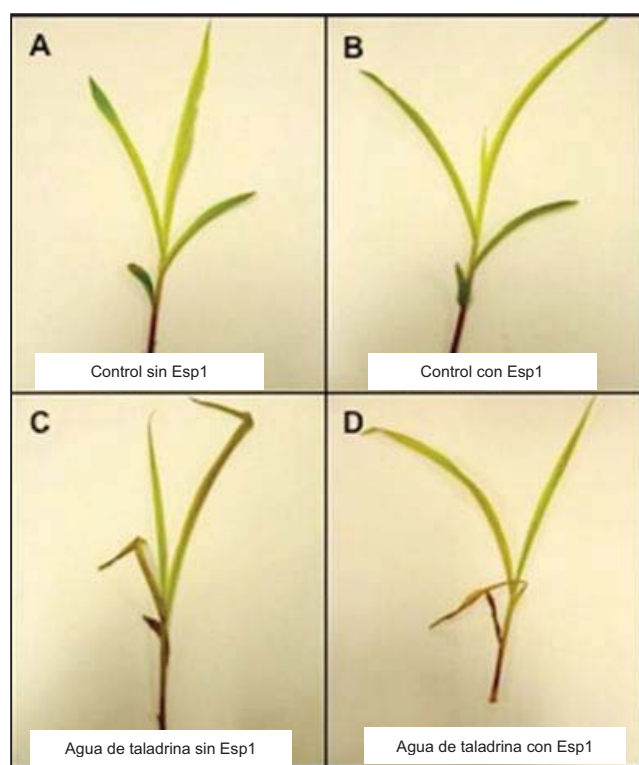


Figura 6.4. Plantas de maíz procedentes de los distintos tratamientos (**A** – control sin Esp1, **B** – control con Esp1, **C** – agua de taladrina sin Esp1, **D** – agua de taladrina con Esp1).

En la figura 6.5 se muestra la parte radical de una planta de maíz de cada tratamiento. Se observa como en los controles (figura 6.5A y 6.5B) las raíces están más ramificadas que en las plantas tratadas con agua de taladrina (figura 6.5C y 6.5D). En los tratamientos con agua de taladrina las raíces adquieren una tonalidad más amarillenta y tienen una consistencia más quebradiza.

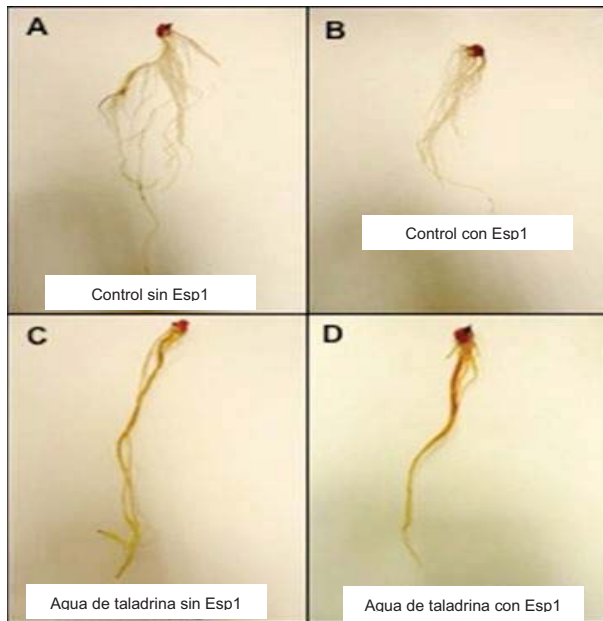


Figura 6.5. Raíces de plantas de maíz de cada tratamiento (A – control sin Esp1, B – control con Esp1, C – agua de taladrina sin Esp1, D – agua de taladrina con Esp1).

a) **Altura:** En la figura 6.6 se aprecia una disminución significativa de este parámetro biométrico en las plantas de maíz tratadas con agua de taladrina, sin presentar diferencias entre los tratamientos con y sin bacteria.

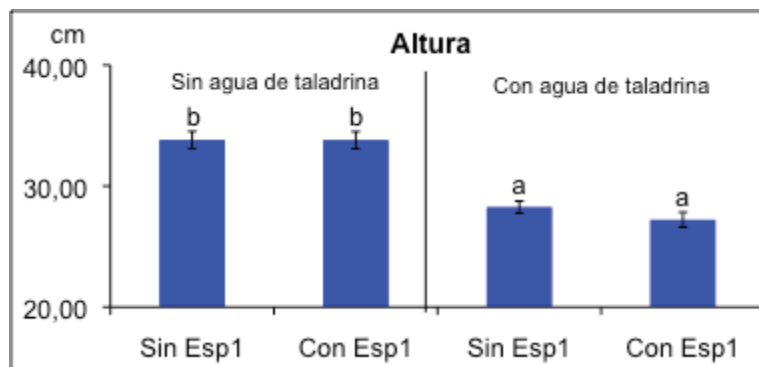


Figura 6.6. Variación de la altura de las plantas de maíz en función del tratamiento (control sin Esp1, control con Esp1, con agua de taladrina sin Esp1 y con agua de taladrina con Esp1). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

b) **Número de hojas:** En la figura 6.7 se produce el mismo comportamiento que en el parámetro de la altura. En este caso, tampoco se observan diferencias entre los tratamientos con y sin bacteria, pero sí se observa un incremento no significativo del número de hojas en los controles cuando se inocula la bacteria.

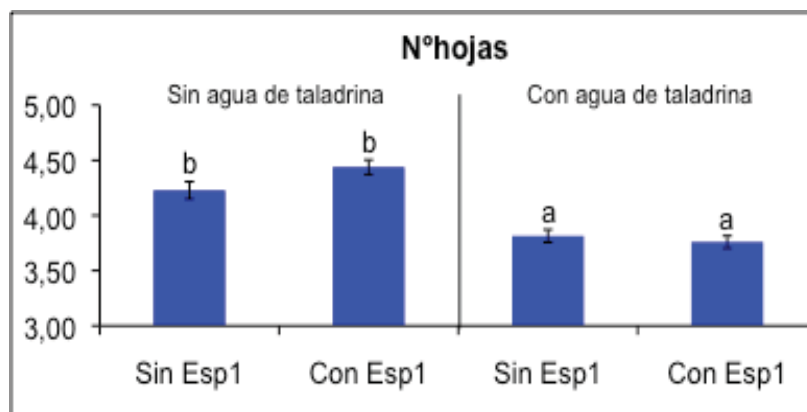


Figura 6.7. Variación del número de hojas de las plantas de maíz en función del tratamiento (control sin Esp1, control con Esp1, con agua de taladrina sin Esp1 y con agua de taladrina con Esp1). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

c) Peso seco raíz y parte aérea: En ninguna de las dos medidas relativas al peso se observaron diferencias significativas.

El peso radical aumenta en los controles al inocular la bacteria. En el tratamiento con agua de taladrina sin bacteria el peso obtenido es mayor que en los controles, sin embargo, este parámetro disminuye en el tratamiento con agua de taladrina y con bacteria, donde se obtiene el mismo valor que en el control sin bacteria.

Por su parte, en el parámetro peso seco de la parte aérea se observa una reducción del mismo al inocular la bacteria, siendo esta reducción menor en las plantas que han crecido en agua de taladrina. De nuevo se obtiene un valor más alto en los tratamientos con agua de taladrina.

6.3.3. Variación de los parámetros fotosintéticos, reacción de Hill y concentración de clorofilas

a) Parámetros fotosintéticos: En primer lugar, se estudió el parámetro F_o (fluorescencia emitida en condiciones de luz suave por plantas que proceden de oscuridad). En la figura 6.8A se observa un incremento significativo de este parámetro en los controles, cuando se inocula la bacteria Esp1. También se observa un ligero incremento, no significativo, en los tratamientos con agua de taladrina cuando se inocula la bacteria. Cuando se comparan los tratamientos controles respecto a los tratamientos con agua de taladrina, se observa una disminución significativa de este parámetro cuando se añade el contaminante.

Otro parámetro estudiado fue el F_v/F_m (eficiencia potencial máxima del fotosistema II). El tratamiento agua de taladrina con bacteria es el único que presenta diferencias significativas con los tratamientos sin bacteria, observándose una disminución del parámetro de estudio (figura 6.8B).

También se estudió el parámetro ϕ_{PSII} (eficiencia máxima del fotosistema II). En la figura 6.8C se observa una disminución no significativa en los controles cuando se inocula la bacteria, mientras que en los tratamientos con agua de taladrina este parámetro aumenta tras la inoculación. Se produjo también una disminución significativa en el tratamiento agua de taladrina sin bacteria frente al control sin bacteria. En el tratamiento agua de taladrina con bacteria este parámetro disminuye respecto al control sin bacteria, pero no lo hace significativamente.

Un cuarto parámetro analizado fue el qP (quenching fotoquímico de la variación de la fluorescencia de la clorofila). En la figura 6.8D se observa un incremento no significativo de este parámetro al inocular la bacteria en los controles y en los tratamientos con agua de taladrina. Si se estudia el comportamiento de los controles frente a los tratamientos con agua de taladrina se observa una disminución de estos últimos.

Además, se estudió el parámetro ETR (tasa relativa del transporte de electrones). Al igual que en el parámetro ϕ_{PSII} en la figura 6.8E se observa una disminución no significativa

en los controles cuando se inocula la bacteria. En los tratamientos con agua de taladrina se produjo un aumento no significativo tras la inoculación. Se produjo también una disminución significativa en el tratamiento agua de taladrina sin bacteria frente al control sin bacteria. En el tratamiento agua de taladrina con bacteria este parámetro disminuye respecto al control sin bacteria, pero no lo hace significativamente.

Finalmente, se estudió el parámetro NPQ (quenching no fotoquímico). No se observan diferencias significativas en este parámetro, pero sí se puede destacar un incremento al inocular la bacteria tanto en los controles como en el agua de taladrina y un incremento en los tratamientos con agua de taladrina frente a los controles cuando no se inocula la bacteria (figura 6.8F).

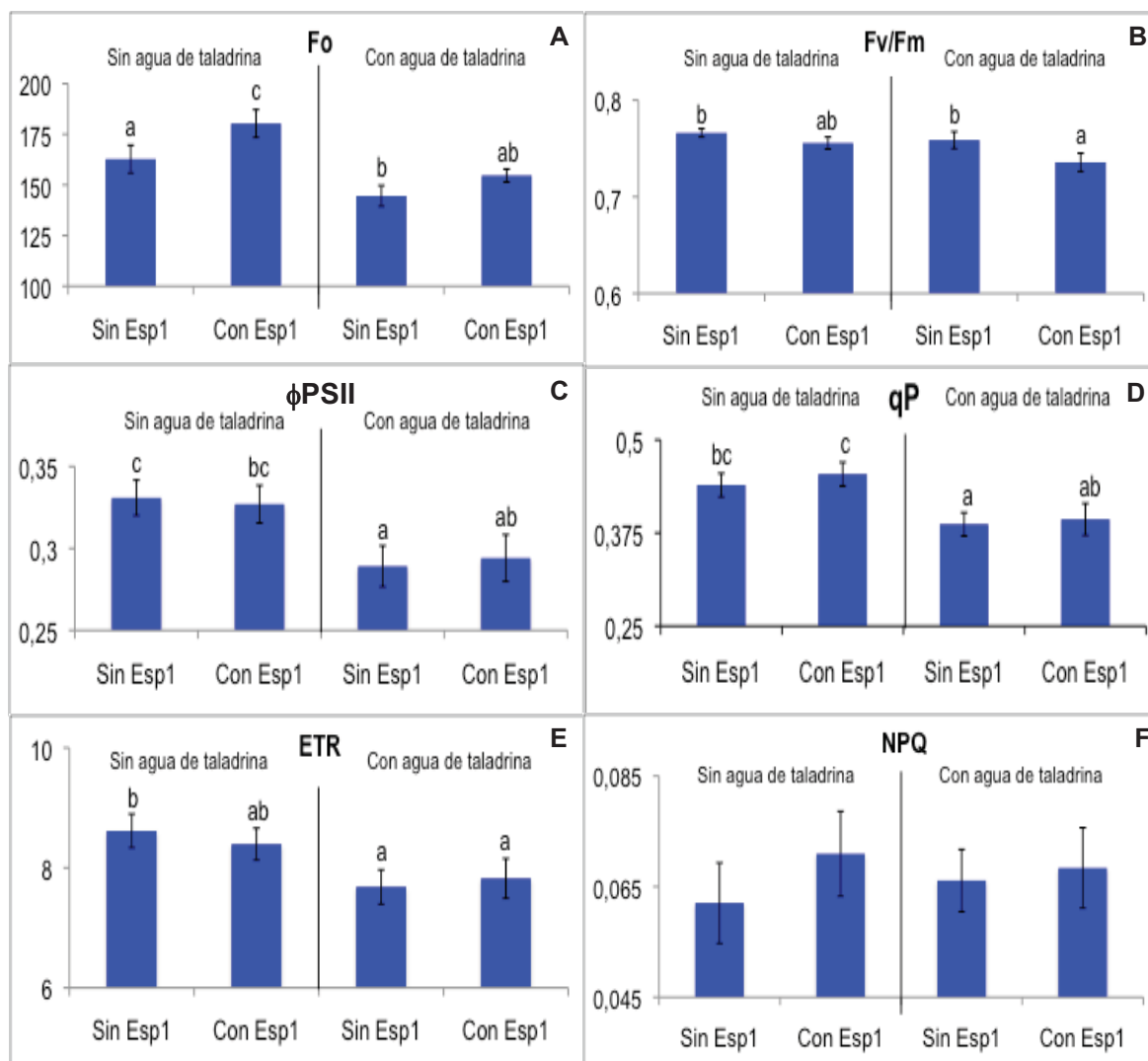


Figura 6.8. A - Variación de la fluorescencia emitida en condiciones de luz suave por plantas que proceden de oscuridad (F_o) en función del tratamiento. B - Variación de la eficiencia potencial máxima del fotosistema II (F_v/F_m) en función del tratamiento. C - Variación de la eficiencia máxima del fotosistema II (ϕ_{PSII}) en función del tratamiento. D - Quenching fotoquímico de la variación de la fluorescencia de la clorofila (qP) en función del tratamiento. E - Variación de la tasa relativa del transporte de electrones (ETR) en función del tratamiento. F - Variación del quenching no fotoquímico (NPQ) en función del tratamiento. Tratamientos: control sin Esp1, control con Esp1, agua de taladrina sin Esp1 y agua de taladrina con Esp1. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

b) Reacción de Hill: En la figura 6.9 se observa un incremento significativo de este parámetro en los controles cuando se inocula la bacteria, sin embargo, en los tratamientos con agua de taladrina se observa una disminución significativa al inocular el Esp1.

Si se comparan los controles frente a los tratamientos con agua de taladrina se observa, en ambos casos (con y sin bacteria), una reducción significativa de la reacción de Hill en las plantas que estuvieron en contacto con el agua de taladrina durante 5 días.

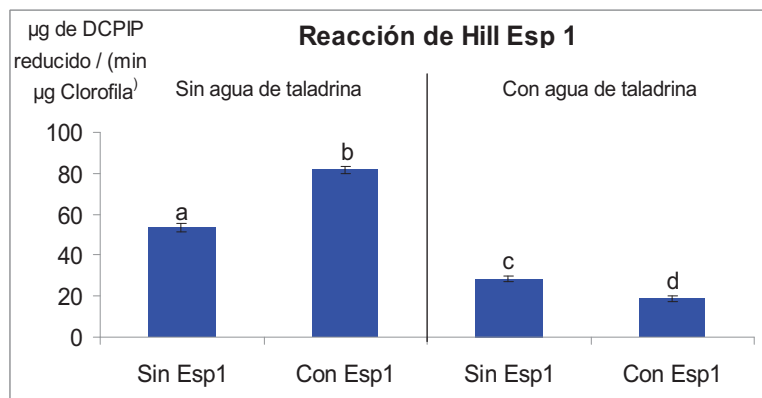


Figura 6.9. Variación de la velocidad de la reacción de Hill en función del tratamiento (control sin Esp1, control con Esp1, agua de taladrina sin Esp1 y agua de taladrina con Esp1). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

c) Concentración de clorofilas: En la figura 6.10A se muestra la variación de las clorofilas totales en función del tratamiento. La concentración aumenta significativamente al inocular la bacteria en los controles pero, sin embargo, disminuye significativamente al inocular la cepa Esp1 en los tratamientos con agua de taladrina. Si se comparan entre sí los controles con los tratamientos se observa un incremento significativo cuando las plantas están en contacto con el medio contaminado y no se inocula la bacteria; sin embargo, se observa una disminución significativa en las plantas en contacto con el agua de taladrina cuando se realiza la inoculación.

En la figura 6.10B se observa un incremento significativo de la relación chl a / chl b (clorofila a / clorofila b) tanto en los controles como en los tratamientos con agua de taladrina al inocular la bacteria. Además, se observa un incremento (significativo cuando se inocula la bacteria) al comparar los controles con los tratamientos con agua de taladrina.

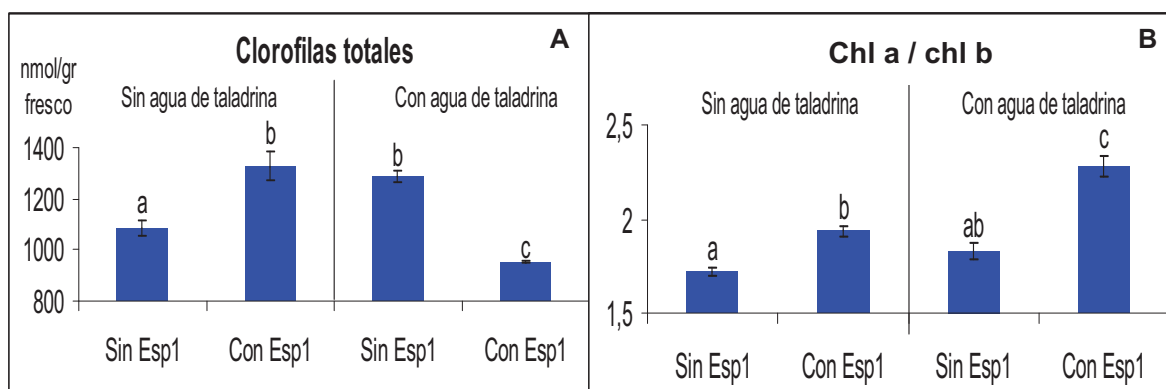


Figura 6.10. A - Evolución de las clorofilas totales en función del tratamiento. **B** - Evolución de la relación chl a / chl b (clorofila a / clorofila b) en función del tratamiento. Tratamiento: Control sin Esp1, control con Esp1, agua de taladrina sin Esp1 y agua de taladrina con Esp1. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Si se estudia por separado cada una de las clorofilas se observa que la clorofila a se incrementa significativamente en los controles al inocular la bacteria ($684,51 \pm 21,87$ nmol/gr fresco en el control sin bacteria y $875,62 \pm 35,34$ nmol/gr fresco en el control con bacteria). Sin embargo, en los tratamientos con agua de taladrina se observa el proceso contrario, de manera que se produce una disminución significativa al inocular ($833,24 \pm 10$ nmol/gr fresco en el tratamiento con agua de taladrina sin bacteria y $662,17 \pm 5,73$ nmol/gr fresco en el tratamiento con agua de taladrina con bacteria). Si se comparan los controles frente a los tratamientos con agua de taladrina se observa un incremento significativo en este último cuando no se inoculó la bacteria, mientras que cuando se inoculó se produjo una disminución significativa en los tratamientos con agua de taladrina.

El mismo comportamiento se produce en la clorofila b, pero en este caso no existen diferencias significativas ($397,42 \pm 8,51$ nmol/gr fresco en controles sin bacteria, $452,8 \pm 20$ nmol/gr en controles con bacteria, $456,30 \pm 13,9$ nmol/gr fresco en el tratamiento con agua de taladrina sin bacteria y $291,21 \pm 4,52$ nmol/gr fresco en el tratamiento con agua de taladrina con bacteria).

6.4. Diseño de los sistemas de fitorremediación mediante un sistema planta-microorganismo: Inoculación de la levadura Esp14

6.4.1. Análisis del agua de taladrina fitorremediada

a) DQO: Al igual que en los experimentos de fitorremediación realizados anteriormente, en la figura 6.11 se observa una reducción significativa del parámetro de la DQO entre el agua de taladrina inicial y el obtenido tras el proceso de fitorremediación. En dicha figura se observa como la inoculación de la levadura no mejora el proceso de fitorremediación, sin presentar diferencias significativas entre el agua de taladrina resultante de este tratamiento y el resultante del proceso sin inoculación (921,7 ppm frente a 902 ppm).

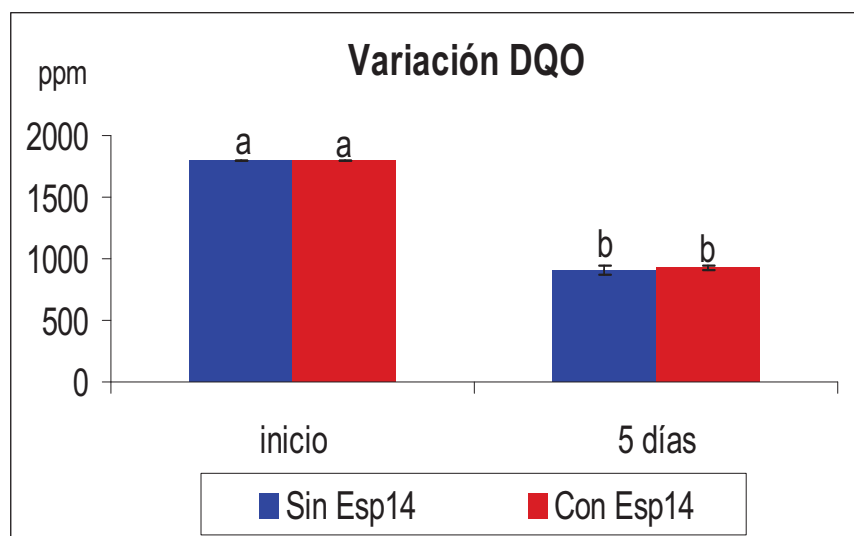


Figura 6.11. Variación de la DQO del agua de taladrina tras un proceso de fitorremediación de 5 días sin la levadura (azul) o con ella (rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

b) pH: En la figura 6.12 se observa una disminución significativa de este parámetro tras el proceso de fitorremediación. Además, en esta figura se puede ver como la disminución producida en el proceso de fitorremediación donde se inoculó la levadura es significativamente menor que la obtenida en el proceso de fitorremediación donde no se inoculó (8,62 frente a 8,54).

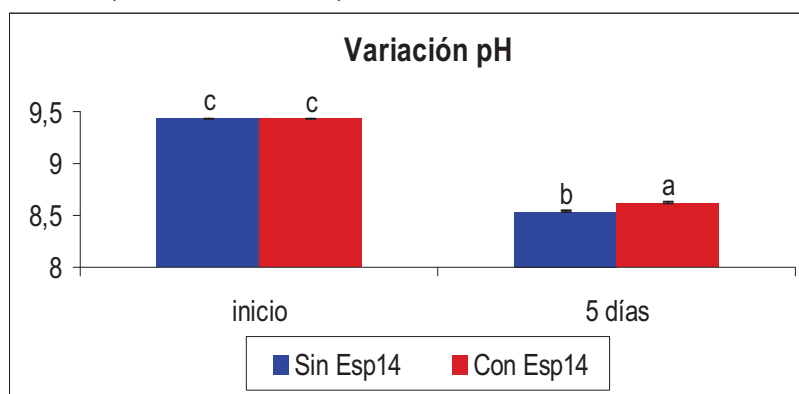


Figura 6.12. Variación del pH entre las muestras de agua de taladrina inicial y las muestras resultantes del proceso de fitorremediación sin la levadura (azul) o con ella (rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

c) Análisis cualitativo de los hidrocarburos presentes: En la figura 6.13 se muestra el resultado del análisis de hidrocarburos mediante la técnica de cromatografía de gases / masas.

Se puede ver como la mayoría de los compuestos que caracterizan el agua de taladrina inicial desaparecen tras el proceso de fitorremediación, pero se originan compuestos secundarios o de degradación (tabla 6.3).

En el Anexo 9 se adjuntan los cromatogramas completos.

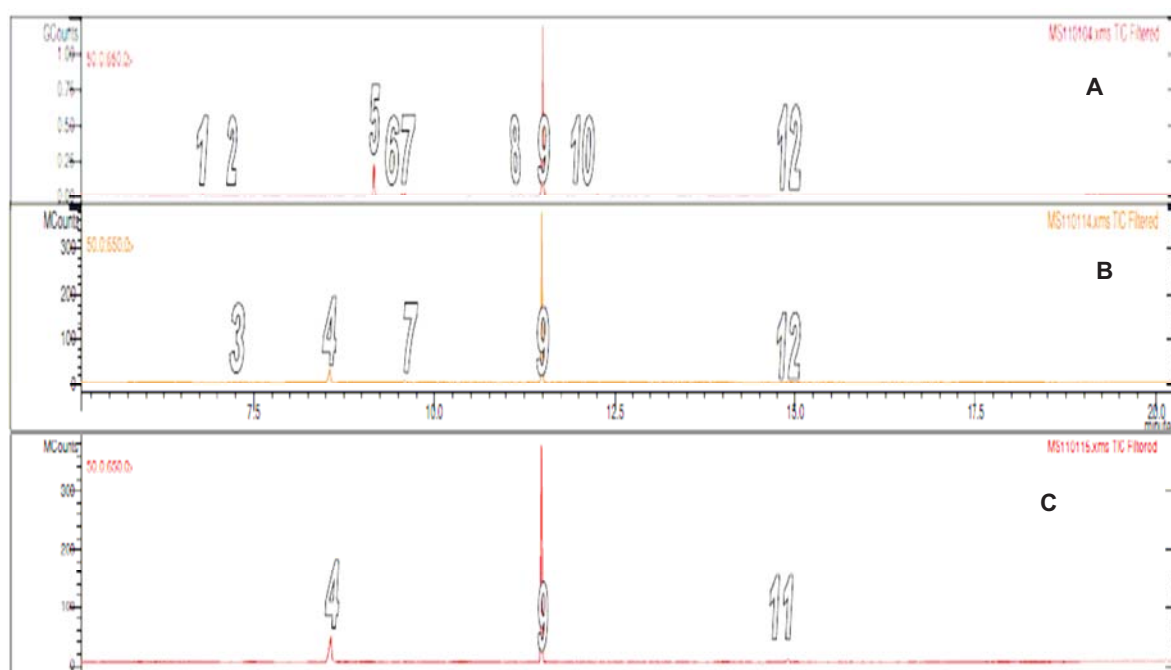





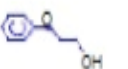
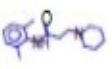

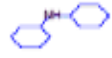
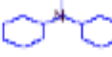
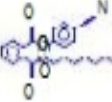
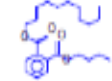


Figura 6.13. Cromatogramas correspondientes al análisis de hidrocarburos de la muestra inicial (A), sin Esp14 (B) y con Esp14 (C). 1: pico 6,80 min; 2: pico 7,30 min; 3: pico 7,32 min; 4: 8,54 min; 5: 9,17 min; 6: 9,55 min; 7: 9,59 min; 8: 11,19 min; 9: 11,49 min; 10: 12,25 min; 11: 14,90 min; 12: 14,92 min.

En la tabla 6.3 se puede ver como la mayoría de los compuestos presentes en la muestra de agua de taladrina inicial desaparecen tras el proceso de fitorremediación. El compuesto 9 es el más recalcitrante cuando se inocula la levadura Esp14, sin embargo, los compuestos 7 y 12 son más recalcitrantes en el proceso de fitorremediación sin inoculación. Estos productos que no desaparecen tras la fitorremediación pueden clasificarse como sustancias tóxicas de acuerdo con la Directiva 2008/1/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. Además, se observa como, en el proceso de fitorremediación sin inoculación se generan productos secundarios en mayor proporción que en el proceso donde no se inocula.

Tabla 6.3. Picos presentes en la muestra de agua de taladrina inicial y en las muestras fitorremediadas con y sin Esp14. Los compuestos mostrados fueron seleccionados de la librería generada por los espectros de masas de cada compuesto. En cada caso se seleccionó la molécula que tenía una mayor probabilidad de semejanza con los espectros obtenidos en el análisis de las muestras.

Pico	Tiempo de retención (min)	Nombre compuesto	Fórmula	Molécula	Área Inicial	Área sin Esp14	Área con Esp14	Altura Inicial	Altura sin Esp14	Altura con Esp14
1	6,80	Fenol	C ₆ H ₆ O		3.077e ⁺⁶			3.869e ⁺⁶		
2	7,30	1,1'-oxybis-heptano	C ₁₄ H ₃₀ O		843618			578871		
3	7,32	Silano, (2-metoxietil) trimetil	C ₈ H ₁₈ OSi			284051			272065	
4	8,54	Ácido hexanoico, 3,5,5-trimetil	C ₉ H ₁₈ O ₂			2.193e ⁺⁷	4.064e ⁺⁷		1.081e ⁺⁷	1.679e ⁺⁷
5	9,17	Etanol, 1-(2-butoxi)etoxi	C ₈ H ₁₈ O ₃		1.105e ⁺⁸			8.544e ⁺⁷		
6	9,55	Etanol, 2-fenoxi	C ₈ H ₁₀ O ₂		4.216e ⁺⁶			2.911e ⁺⁶		
7	9,59	Propanamida, N-(2,6-dimetilfenil)-3-(1-piperidinilo)	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O		4.866e ⁺⁶	1.866e ⁺⁶		3.953e ⁺⁶	1.592e ⁺⁶	
8	11,19	Ácido sulfúrico, butil dodecil éster	C ₁₆ H ₃₄ O ₃ S		1.513e ⁺⁶			1.144e ⁺⁶		
9	11,49	Ciclohexanamina N-ciclohexil-	C ₁₂ H ₂₃ N		5.169e ⁺⁶	1.320e ⁺⁶	1.597e ⁺⁶	4.478e ⁺⁶	1.221e ⁺⁶	1.264e ⁺⁶
10	12,25	Ciclohexanamina N-ciclohexil-N-metil-	C ₁₃ H ₂₅ N		2.029e ⁺⁶			1.510e ⁺⁶		
11	14,90	Ácido ftálico, 4-cyanophenyl heptyl ester	C ₂₂ H ₂₃ NO ₄				917272			740274
12	14,92	Ácido ftálico, butil undec-2-en-1-yl ester	C ₂₃ H ₃₄ O ₄		958730	400624		794272	313261	

- Presencia de PAHs: En el análisis realizado mediante la técnica de SPME no se observaron diferencias entre la muestra de agua de taladrina inicial y la final. Además, cabe destacar la ausencia de PAHs en la muestra inicial de agua de taladrina diluida hasta una DQO de unos 1.800 ppm y pH de alrededor de 9. Los cromatogramas se adjuntan en el Anexo 10.

- Hidrocarburos totales: Los tratamientos de fitorremediación, con y sin levadura, disminuyen significativamente la concentración de estos compuestos sin presentar diferencias significativas entre ellos, pasando de una concentración inicial de hidrocarburos totales de $12,53 \pm 0,35$ ppm a una concentración de $8,405 \pm 0,17$ ppm en el tratamiento de fitorremediación sin levadura y $8,275 \pm 0,48$ ppm en el tratamiento de fitorremediación con levadura.

6.4.2. Variación de los parámetros biométricos

En la figura 6.14 se observa la parte aérea de una planta de maíz de cada tratamiento. En todos los casos, se observan síntomas de clorosis y en las plantas que estuvieron 5 días en contacto con el agua de taladrina (figura 6.14C y 6.14D) se observan síntomas de marchitez, principalmente en las hojas inferiores.

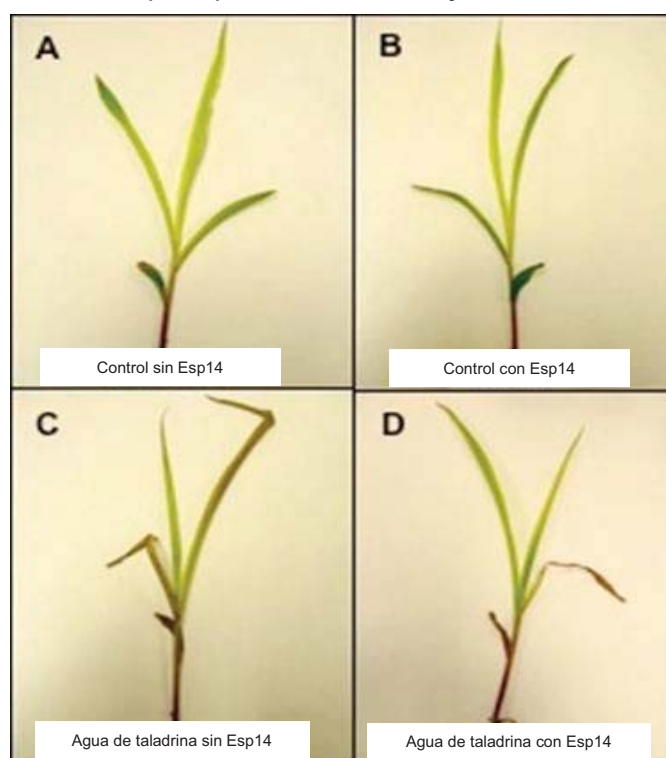


Figura 6.14. Plantas de maíz procedentes de los distintos tratamientos (**A** – control sin Esp14, **B** – control con Esp14, **C** – agua de taladrina sin Esp14, **D** – agua de taladrina con Esp14).

En la figura 6.15 se observa la parte radical de una planta de maíz de cada tratamiento. Las raíces de los controles (figura 6.15A y 6.15B) presentan una mayor densidad. Además, las plantas que estuvieron 5 días en contacto con agua de taladrina (figura 6.15C y 6.15D) presentan un color más amarillento. En estas últimas, se apreció una mayor flacidez cuando se cortaron.

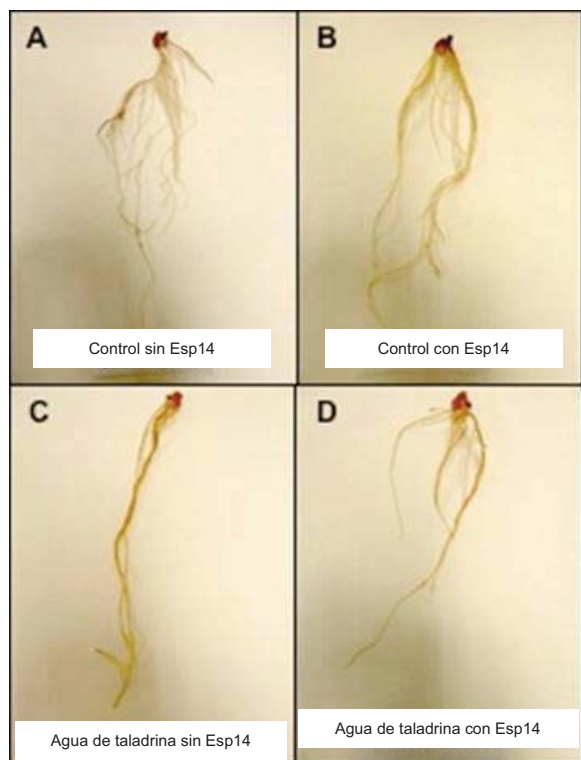


Figura 6.15. Raíces de plantas de maíz de cada tratamiento (A – control sin Esp14, B – control con Esp14, C – agua de taladrina sin Esp14, D – agua de taladrina con Esp14).

a) **Altura:** En la figura 6.16 se puede observar una disminución significativa de este parámetro biométrico en los tratamientos con agua de taladrina frente a los controles. Además, se observa una disminución significativa en los controles al inocular la levadura. En los tratamientos con agua de taladrina la cepa Esp14 produce un ligero incremento no significativo respecto al tratamiento con agua de taladrina sin inoculación.

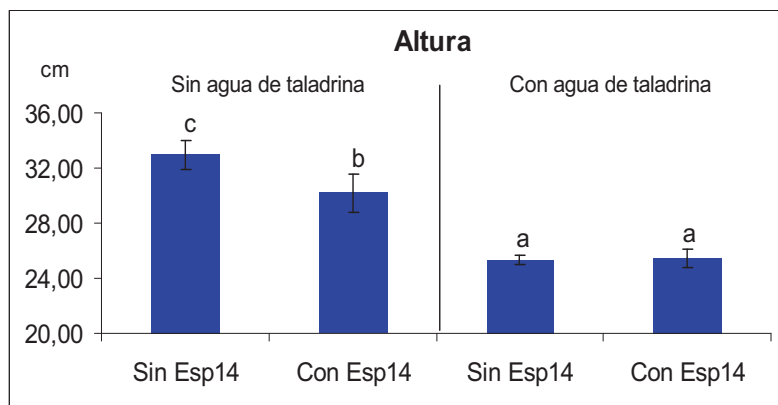


Figura 6.16. Variación de la altura de las plantas de maíz en función del tratamiento (control sin Esp14, control con Esp14, con agua de taladrina sin Esp14 y con agua de taladrina con Esp14). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

b) **Número de hojas:** En el tratamiento de agua de taladrina sin levadura se observa una disminución significativa de este parámetro con respecto al control sin levadura (figura 6.17); sin embargo, la disminución observada en el tratamiento con agua de taladrina y levadura frente al control con levadura no es significativa. Por otra parte, se observa un incremento significativo del número de hojas cuando se inocula la levadura en los tratamientos con agua de taladrina, mientras que se observa una disminución no significativa cuando se inocula en los controles.

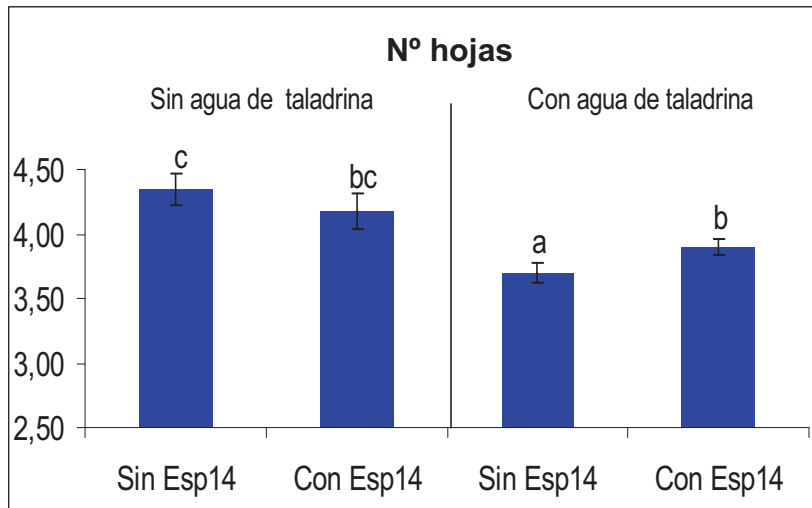


Figura 6.17. Variación del número de hojas de las plantas de maíz en función del tratamiento (control sin Esp14, control con Esp14, con agua de taladrina sin Esp14 y con agua de taladrina con Esp14). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

c) Peso seco raíz y parte aérea: En la figura 6.18 se puede observar un incremento significativo en el peso seco de la parte radical por unidad de planta de los controles inoculados con la levadura frente al resto de los tratamientos. Entre el resto de los tratamientos no hay diferencias significativas, aunque sí se puede observar un aumento de este parámetro en el tratamiento con agua de taladrina sin levadura frente al control sin levadura y un aumento del peso del agua de taladrina con levadura frente al tratamiento con agua de taladrina pero sin levadura.



Figura 6.18. Variación del peso seco de la parte radical de las plantas de maíz enraizadas en esparto en los distintos tratamientos (control sin Esp14, control con Esp14, agua de taladrina sin Esp14 y agua de taladrina con Esp14). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Por otra parte, se produjo una disminución no significativa del peso seco de la parte aérea por unidad de planta en el tratamiento con agua de taladrina y con levadura frente al resto de los tratamientos. Además, se observa un ligero aumento de este parámetro en los tratamientos con agua de taladrina sin levadura y control con levadura frente al control sin levadura.

6.4.3. Variación de los parámetros fotosintéticos, reacción de Hill y cantidad de clorofilas

a) Parámetros fotosintéticos: En primer lugar, se determinó la F_o . En la figura 6.19A se observa una disminución significativa de este parámetro fotosintético en las plantas que estuvieron 5 días en contacto con el agua de taladrina. Además, se observa un incremento significativo del mismo en los tratamientos con agua de taladrina donde se inoculó la levadura.

Otro parámetro interesante es F_v/F_m . En la figura 6.19B se observa una tendencia ascendente de este parámetro en los controles cuando se inocula la levadura; sin embargo, en los tratamientos con agua de taladrina se observa una tendencia descendente cuando se realiza la inoculación.

En tercer lugar se determinó el comportamiento del $\phi PSII$. En la figura 6.19C se observa como la inoculación de la levadura produce una disminución significativa del $\phi PSII$ en los controles, pero sin embargo se observa una tendencia ascendente en las plantas tratadas con agua de taladrina cuando se inocula. Si se comparan los controles frente a los tratamientos con agua de taladrina se aprecia una disminución significativa en estos últimos.

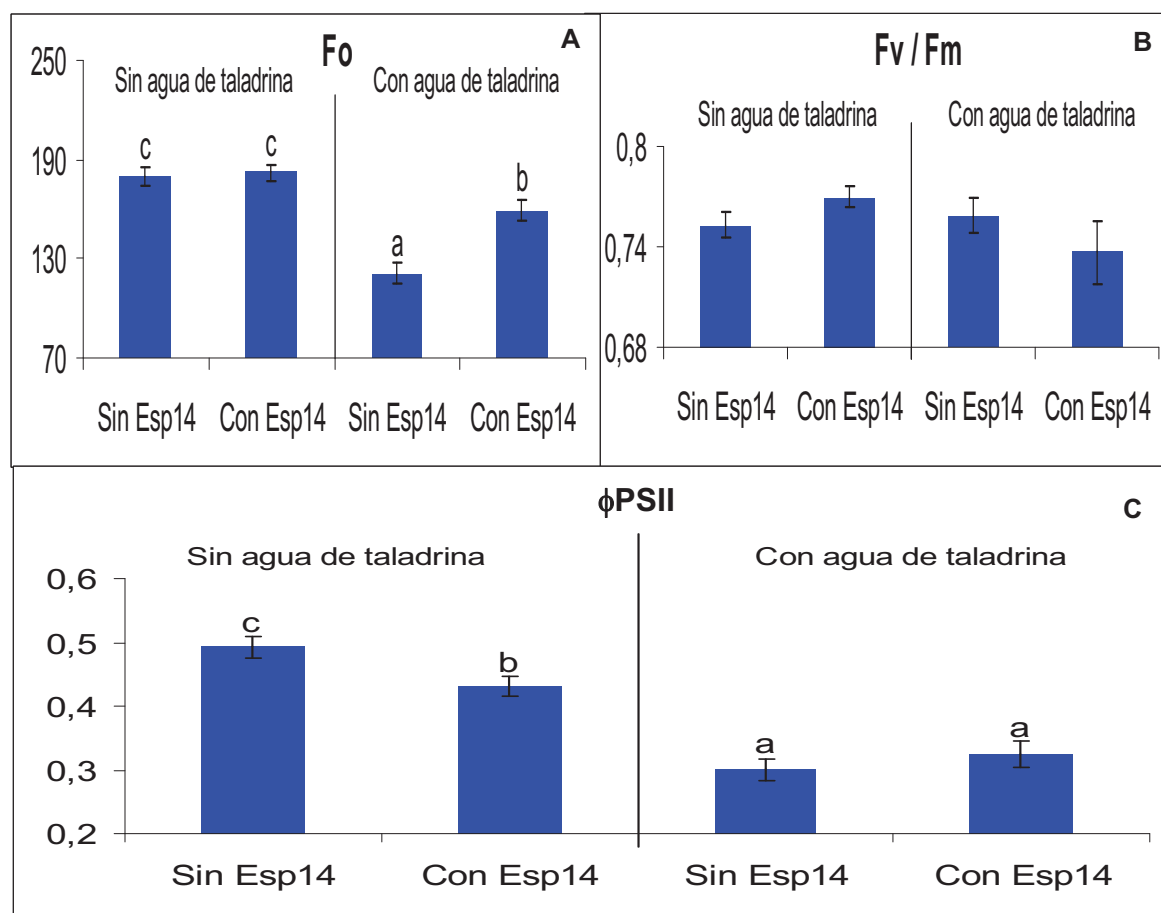


Figura 6.19. **A** - Variación del parámetro F_o en función del tratamiento. **B** - Variación del parámetro F_v/F_m en función del tratamiento. **C** - Variación de parámetro $\phi PSII$ en función del tratamiento. Tratamiento: control sin Esp14, control con Esp14, agua de taladrina sin Esp14 y agua de taladrina con Esp14. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Otro parámetro estudiado fue el qP. En la figura 6.20A se observa una disminución significativa de este parámetro en los tratamientos con agua de taladrina frente a los controles. Además, se observa una tendencia descendente, tanto en los controles como en los tratamientos con agua de taladrina, cuando se inocula la levadura.

Se estudió también el ETR. Como puede verse en la figura 6.20B su comportamiento fue el mismo que el descrito para el parámetro ϕ PSII. La inoculación de la levadura produce una disminución significativa en los controles, pero sin embargo se observa una tendencia ascendente en las plantas tratadas con agua de taladrina cuando se realiza la inoculación. Si se comparan los controles frente a los tratamientos con agua de taladrina se muestra una disminución significativa en estos últimos.

Finalmente, se determinó el NPQ. Este parámetro aumenta significativamente en el tratamiento con agua de taladrina sin levadura respecto al resto de los tratamientos. Además, se observa una tendencia ascendente en el tratamiento con agua de taladrina inoculada con la levadura respecto a los controles (figura 6.20C).

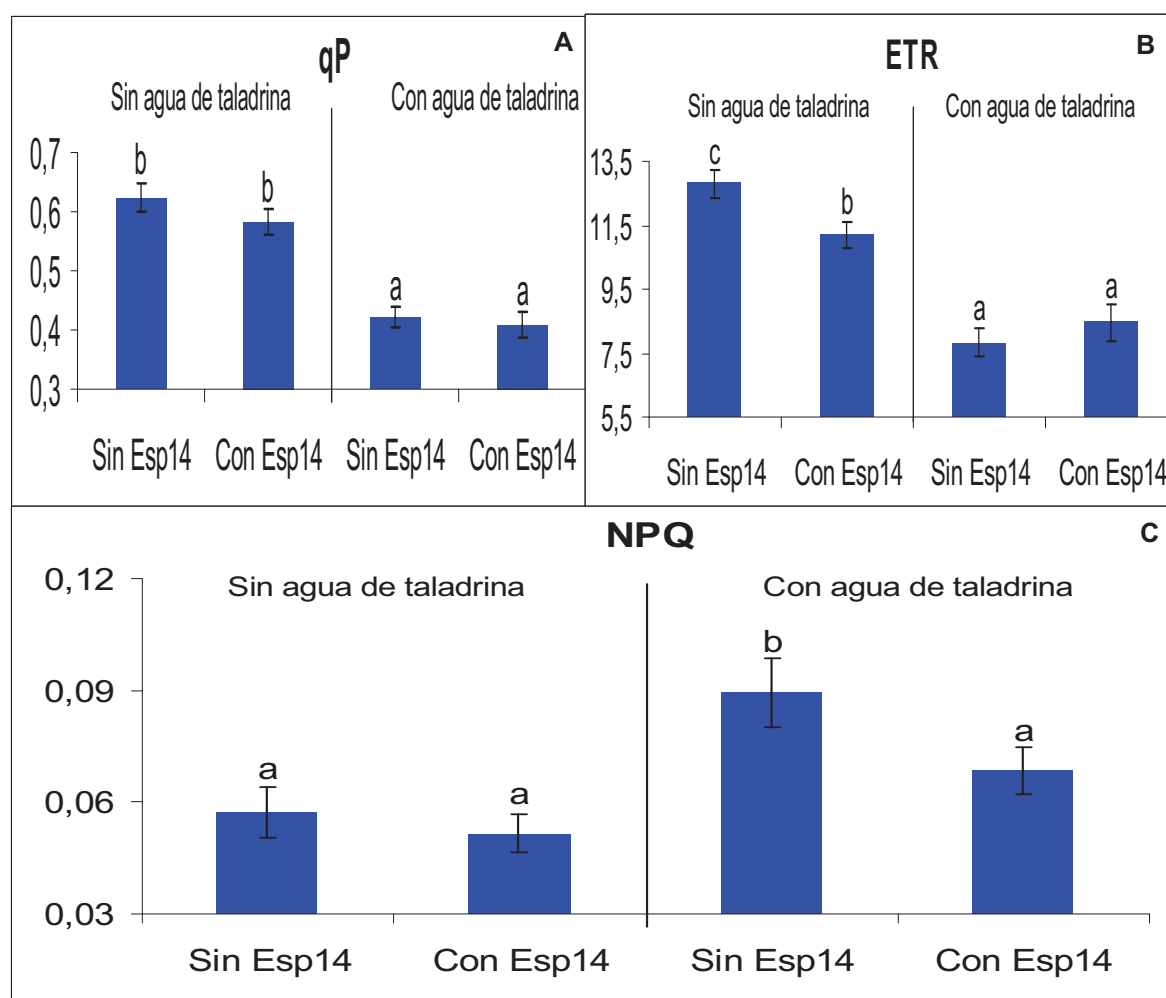


Figura 6.20. A - Quenching fotoquímico del parámetro qP en función del tratamiento. **B** - Variación del parámetro ETR en función del tratamiento. **C** - Variación del parámetro NPQ en función del tratamiento. Tratamientos: Control sin Esp14, control con Esp14, agua de taladrina sin Esp14 y agua de taladrina con Esp14. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

b) Reacción de Hill: En la figura 6.21 se observa un incremento significativo en los controles cuando se inocula la levadura; sin embargo, en los tratamientos con agua de taladrina se observa una disminución significativa cuando se realiza la inoculación. Si se comparan los controles frente a los tratamientos con agua de taladrina se observa una tendencia ascendente en estos últimos cuando no se realiza la inoculación y una disminución significativa cuando se inocula la levadura.

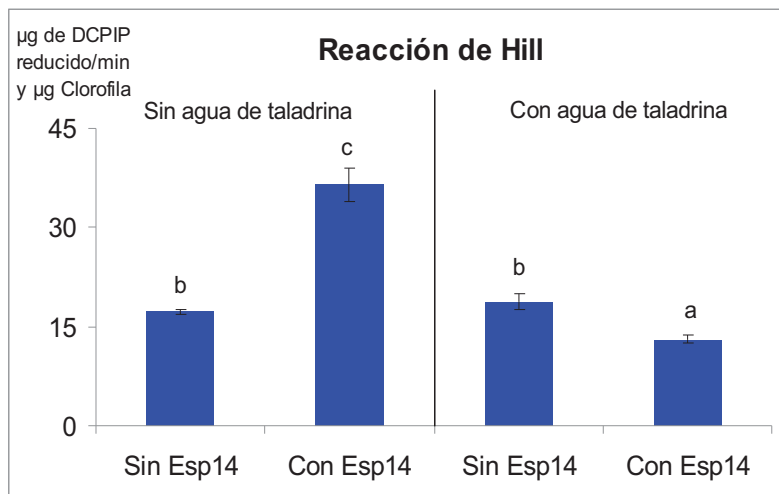


Figura 6.21. Variación de la velocidad de la reacción de Hill en función del tratamiento (control sin Esp14, control con Esp14, agua de taladrina sin Esp14 y agua de taladrina con Esp14). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

c) Cantidad de clorofilas: En la figura 6.22A se puede ver un incremento significativo del número de clorofilas totales en los controles cuando se inocula la levadura; sin embargo, en los tratamientos con agua de taladrina se observa una disminución significativa cuando se realiza la inoculación. Si se comparan los controles frente a los tratamientos con agua de taladrina se observa una tendencia descendente en estos últimos cuando no se inocula, mientras que se observa una disminución significativa cuando se realiza la inoculación.

En la figura 6.22B se muestra la relación chl a / chl b en función del tratamiento. En los controles y en los tratamientos con agua de taladrina se observa un incremento significativo de dicha relación cuando se inocula la levadura. Si se comparan los controles frente a los tratamientos con el contaminante se observa una tendencia descendente cuando no se inocula y un incremento significativo cuando sí se hace.

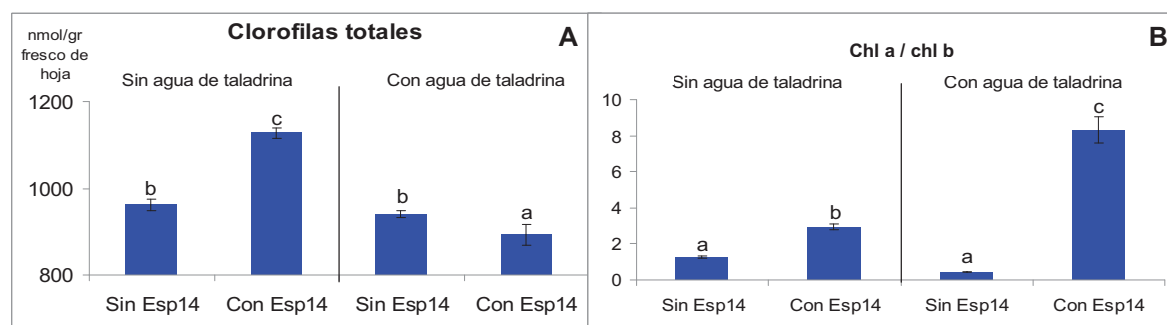


Figura 6.22. A - Evolución de las clorofilas totales en función del tratamiento. **B** - Evolución de la relación chl a / chl b en función del tratamiento. Tratamientos: Control sin Esp14, control con Esp14, agua de taladrina sin Esp14 y agua de taladrina con Esp14. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

El estudio de la clorofila a muestra un incremento significativo en los controles cuando se inocula la levadura ($538,77 \pm 19,71$ nmol/gr fresco de hoja en el control sin levadura y $839,34 \pm 4,09$ nmol/gr fresco de hoja en el control con levadura). Sin embargo, se produjo una disminución significativa en el tratamiento con agua de taladrina al inocular ($289,96 \pm 8,31$ nmol/gr fresco de hoja en el tratamiento con agua de taladrina sin levadura y $796 \pm 16,5$ nmol/gr fresco de hoja en el tratamiento con agua de taladrina con levadura). Si se comparan los tratamientos sin taladrina frente a los controles se observa una disminución al añadir el medio a fitorremediar, ésta es significativa cuando no se inocula la levadura.

El estudio de la clorofila b muestra una disminución significativa en los controles al inocular la levadura ($422,74 \pm 11,74$ nmol/gr fresco de hoja en el control sin levadura y $288,45 \pm 15,78$ nmol/gr fresco de hoja) y también ocurre lo mismo en los tratamientos con agua de taladrina ($650,1 \pm 4,92$ nmol/gr fresco de hoja en el tratamiento de taladrina sin levadura y $97,33$ nmol/gr fresco de hoja en el tratamiento de taladrina con levadura). Si se comparan los tratamientos controles frente a los que tenían agua de taladrina se observa un incremento significativo cuando no se inocula la levadura y una disminución significativa cuando se inocula.

6.5. Diseño de los sistemas de fitorremediación mediante un sistema planta-microorganismo: Inoculación de la cepa Aur 6

6.5.1. Análisis del agua de taladrina fitorremediada

a) DQO: En la figura 6.23 se muestra la variación de la DQO tras un periodo de 5 días en contacto con el sistema fitorremediador. Se observa como en ambos tratamientos (con y sin bacteria) se produce una reducción significativa de este parámetro respecto a la DQO inicial, obteniendo valores de 784,33 ppm en el tratamiento sin bacteria y de 817,5 ppm en el tratamiento con bacteria. No se observan diferencias significativas entre ambos.

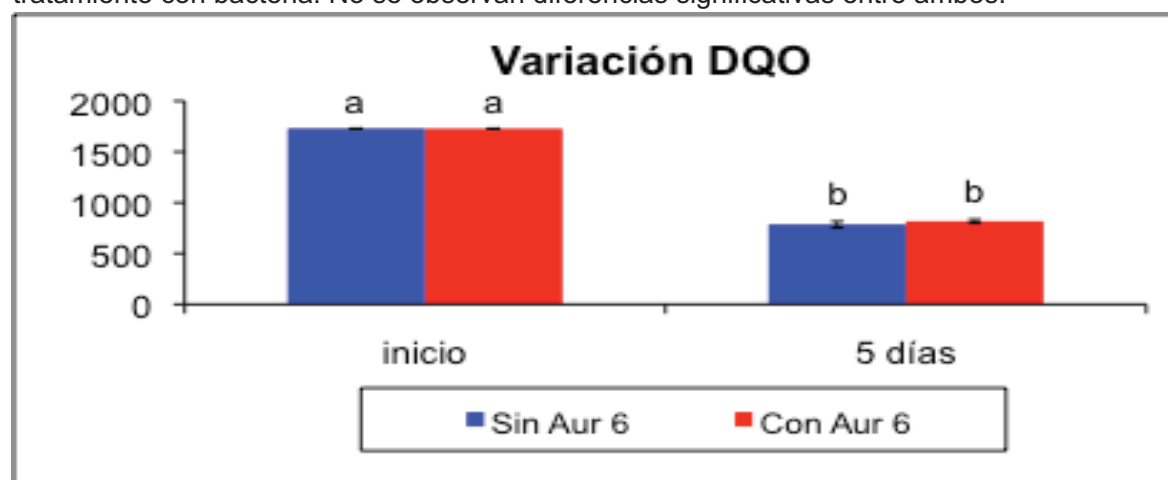


Figura 6.23. Variación de la DQO del agua de taladrina tras un proceso de fitorremediación de 5 días sin la bacteria Aur 6 (azul) o con ella (rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

b) pH: En la figura 6.24 se muestra la variación del pH durante el proceso de fitorremediación. En ambos tratamientos, se produce una disminución significativa de este parámetro tras 5 días en contacto con el esparto y las plantas de maíz, alcanzando valores de 8,66 en el tratamiento con bacteria y de 8,53 en el tratamiento sin bacteria. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con y sin bacteria.

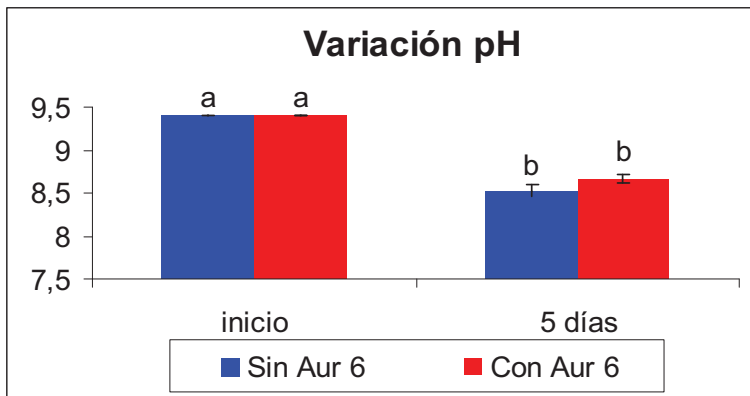


Figura 6.24. Variación del pH entre las muestras de agua de taladrina inicial y las muestras resultantes del proceso de fitorremediación sin la bacteria Aur 6 (azul) o con ella (rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

c) Análisis cualitativo de los hidrocarburos presentes: En la figura 6.25 se muestra el resultado del análisis de hidrocarburos mediante la técnica de cromatografía de gases / masas.

Se puede ver como la mayoría de los compuestos que caracterizan el agua de taladrina inicial desaparecen tras el proceso de fitorremediación, pero se originan compuestos secundarios o de degradación (tabla 6.4)

En el Anexo 9 se adjuntan los cromatogramas completos.

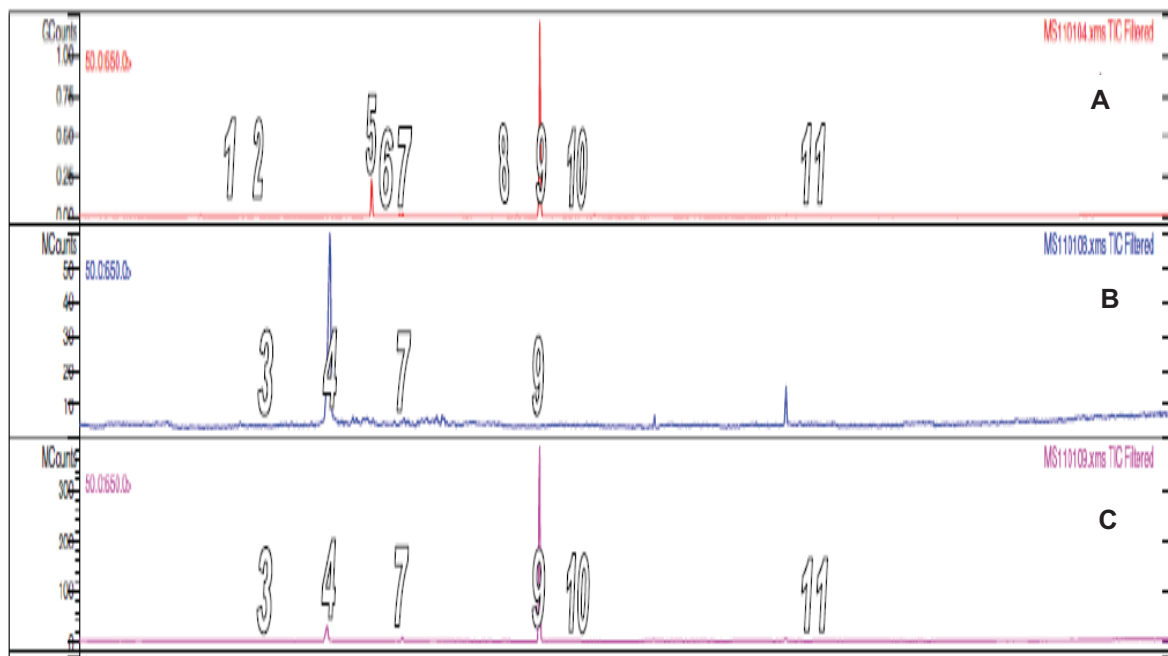





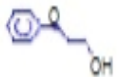

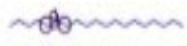





Figura 6.25. Cromatogramas correspondientes al análisis de hidrocarburos de la muestra inicial (A), sin Aur 6 (B) y con Aur 6 (C). 1: pico 6,80 min; 2: pico 7,30 min; 3: pico 7,32 min; 4: 8,54 min; 5: 9,17 min; 6: 9,55 min; 7: 9,59 min; 8: 11,19 min; 9: 11,49 min; 10: 12,25 min; 11: 14,92 min.

En la tabla 6.4 se puede ver como la mayoría de los compuestos presentes en la muestra de agua de taladrina inicial desaparecen tras el proceso de fitorremediación. Los compuestos 7 y 9 son los más recalcitrantes en ambos tratamientos, pero en el proceso de fitorremediación sin inoculación también los compuestos 10 y 11 son recalcitrantes. Estos productos, que no desaparecen tras la fitorremediación pueden clasificarse como sustancias tóxicas de acuerdo con la Directiva 2008/1/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. Además, se observa como, en el proceso de fitorremediación sin inoculación se generan productos secundarios en mayor cantidad que en el proceso donde no se inocula.

Tabla 6.4. Picos presentes en la muestra de agua de taladrina inicial y en las muestras fitorremediadas con y sin Aur 6. Los compuestos mostrados fueron seleccionados de la librería generada por los espectros de masas de cada compuesto. En cada caso se seleccionó la molécula que tenía una mayor probabilidad de semejanza con los espectros obtenidos en el análisis de las muestras.

Pico	Tiempo de retención (min)	Nombre compuesto	Fórmula	Molécula	Área Inicial	Área sin Aur 6	Área con Aur 6	Altura Inicial	Altura sin Aur 6	Altura con Aur 6
1	6,80	Fenol	C ₆ H ₆ O		3.077e ⁺⁶			3.869e ⁺⁶		
2	7,30	1,1'-oxybis-heptano	C ₁₄ H ₃₀ O		843618			578871		
3	7,32	Silano, (2-metoxietil) trimetil	C ₆ H ₁₆ OSi			416667	119116		256263	112780
4	8,54	Ácido hexanoico, 3,5,5-trimetil	C ₉ H ₁₈ O ₂			4.996e ⁺⁷	2.202e ⁺⁷		1.836e ⁺⁷	9.566e ⁺⁶
5	9,17	Etanol, 1-(2-butoxi)etoxi	C ₉ H ₁₈ O ₃		1.105e ⁺⁸			8.544e ⁺⁷		
6	9,55	Etanol, 2-fenoxi	C ₉ H ₁₀ O ₂		4.216e ⁺⁶			2.911e ⁺⁶		
7	9,59	Propanamida, N-(2,6-dimetilfenil)-3-(1-piperidinilo)	C ₁₆ H ₂₄ N ₂ O		4.866e ⁺⁶	1.512e ⁺⁶	2.494e ⁺⁶	3.953e ⁺⁶	1.233e ⁺⁶	1.984e ⁺⁶
8	11,19	Ácido sulfúrico, butil dodecil éster	C ₁₆ H ₃₄ O ₃ S		1.513e ⁺⁶			1.144e ⁺⁶		
9	11,49	Ciclohexanamina N-ciclohexil-	C ₁₂ H ₂₃ N		5.169e ⁺⁸	113400	1.588e ⁺⁸	4.478e ⁺⁸	78860	1.253e ⁺⁸
10	12,25	Ciclohexanamina N-ciclohexil-N-metil-	C ₁₃ H ₂₅ N		2.029e ⁺⁶		127733	1.510e ⁺⁶		94001
11	14,92	Ácido ftálico, butil undec-2-en-1-yl éster	C ₂₃ H ₃₄ O ₄		958730		1.384e ⁺⁶	794272		923772

- Presencia de PAHs: En el análisis realizado mediante la técnica de SPME no se observaron diferencias entre la muestra de agua de taladrina inicial y la final. Además, cabe destacar la ausencia de PAHs en la muestra inicial de agua de taladrina diluida hasta una DQO de unos 1.800 ppm y pH de alrededor de 9. Los cromatogramas se adjuntan en el Anexo 10.

- Hidrocarburos totales: Los tratamientos de fitorremediación, con y sin Aur6, disminuyen significativamente la cantidad de estos compuestos respecto a la muestra inicial ($12,53 \pm 0,35$ ppm), sin presentar diferencias significativas entre ambos ($2 \pm 0,05$ ppm en la muestra de agua de taladrina fitorremediada sin bacteria y $3,015 \pm 0,13$ ppm en la muestra de agua de taladrina fitorremediada con bacteria).

6.5.2. Variación de los parámetros biométricos

En la figura 6.26 se observa la parte aérea de una planta de maíz de cada tratamiento. En todos los casos, se observan síntomas de clorosis y en las plantas que estuvieron 5 días en contacto con el agua de taladrina se observan síntomas de marchitez (figura 6.26C y 6.26D), principalmente en las hojas inferiores.

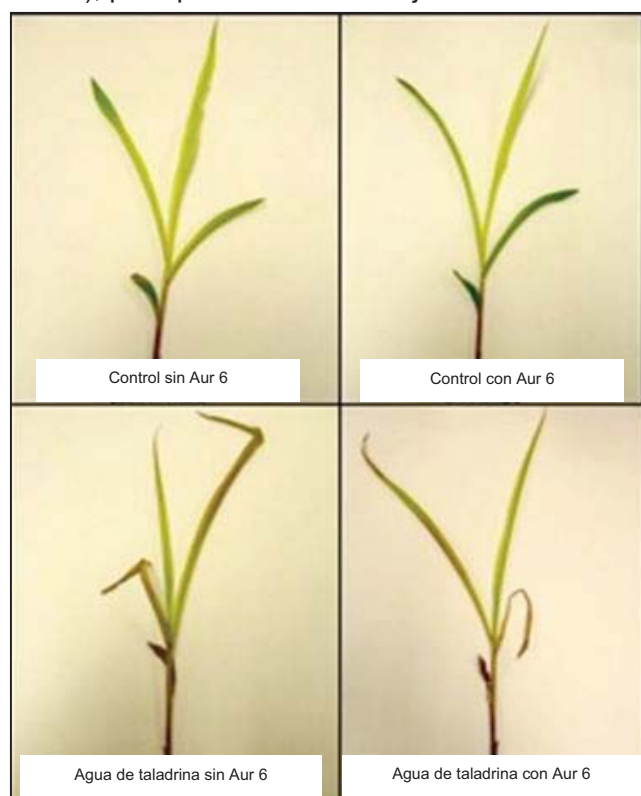


Figura 6.26. Plantas de maíz procedentes de los distintos tratamientos (A – control sin Aur 6, B – control con Aur 6, C – agua de taladrina sin Aur 6, D – agua de taladrina con Aur 6).

En la figura 6.27 se observa la parte radical de una planta de maíz de cada tratamiento. Las raíces de los controles (figura 6.27A y 6.27B) presentan una mayor densidad. En las plantas que estuvieron 5 días en contacto con agua de taladrina (figura 6.27C y 6.27D) la raíz presenta un color más amarillento y, además, se apreció una mayor flacidez cuando se cortó.

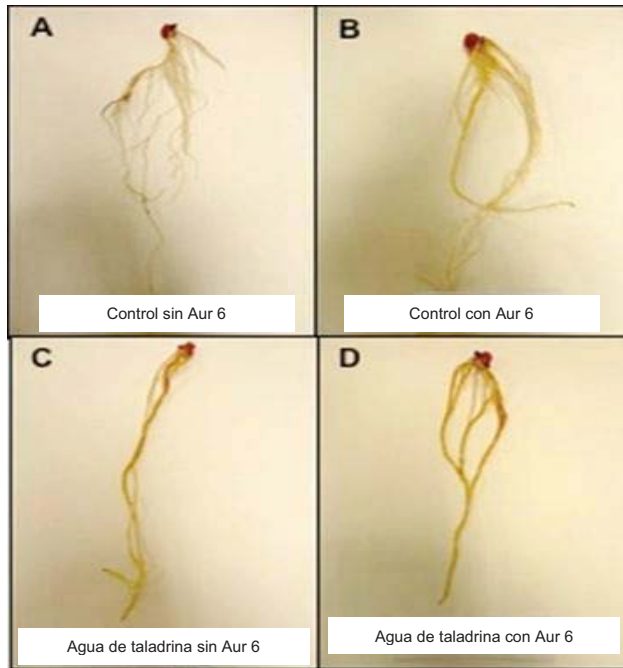


Figura 6.27. Raíces de plantas de maíz de cada tratamiento (**A** – control sin Aur 6, **B** – control con Aur 6, **C** – agua de taladrina sin Aur 6, **D** – agua de taladrina con Aur 6).

a) Altura: En la figura 6.28 se observa una disminución significativa de la altura en las plantas que estuvieron 5 días en contacto con agua de taladrina. La inoculación de Aur 6 supone una disminución no significativa de este parámetro.

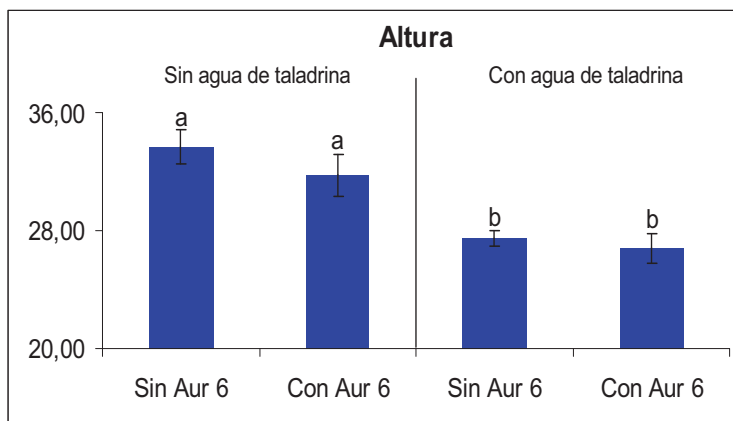


Figura 6.28. Variación de la altura de las plantas de maíz en función del tratamiento (control sin Aur 6, control con Aur 6, con agua de taladrina sin Aur 6 y con agua de taladrina Aur 6). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

b) Número de hojas: En la figura 6.29 se muestra la evolución de este parámetro. Se observa un comportamiento similar al obtenido para la altura.

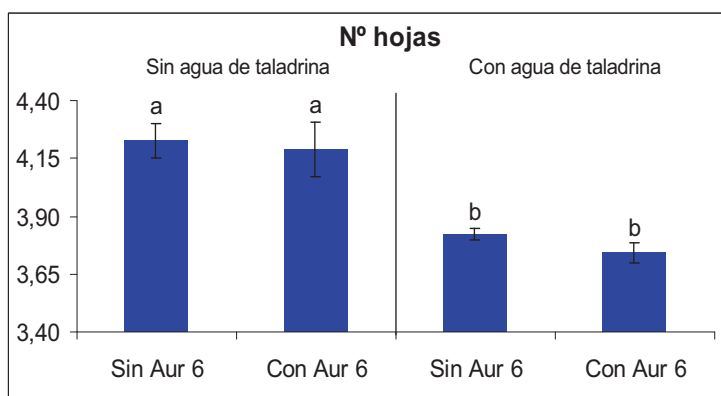


Figura 6.29. Variación del número de hojas de las plantas de maíz en función del tratamiento (control sin Aur 6, control con Aur 6, con agua de taladrina sin Aur 6 y con agua de taladrina con Aur 6). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

c) Peso seco raíz y parte aérea: No existen diferencias significativas, pero sí se observa una tendencia ascendente cuando se inocula la bacteria en los controles mientras que en los tratamientos con agua de taladrina se observa una tendencia descendente. Por otra parte, si se comparan las plantas con agua de taladrina frente a los controles, se observa una tendencia creciente en los tratamientos con agua de taladrina cuando no se inocula la bacteria.

En el caso del peso seco de la parte aérea por unidad de planta, tampoco se observan diferencias significativas, pero sí se produce una tendencia descendente en los controles al inocular la bacteria. Si se comparan los controles frente a los tratamientos con agua de taladrina se observa una tendencia ascendente en estos últimos cuando se inocula la bacteria.

6.5.3. Variación de los parámetros fotosintéticos, reacción de Hill y cantidad de clorofilas

a) Parámetros fotosintéticos: En primer lugar se determinó el F_o . En la figura 6.30A se muestra el comportamiento de dicho parámetro en función del tratamiento. Se puede observar una disminución no significativa de los valores de este parámetro en los controles y en los tratamientos con agua de taladrina al añadir la bacteria. Además, se observa una disminución significativa en los tratamientos con agua de taladrina frente a los controles.

A continuación, se determinó el F_v/F_m . En la figura 6.30B se puede observar un incremento no significativo de este parámetro al inocular la bacteria en los controles, mientras que se produce un descenso del valor del mismo cuando se inocula en los tratamientos. Por otra parte, se observa un incremento significativo en el tratamiento con agua de taladrina sin bacteria frente al control sin bacteria y también se produce un incremento (pero no significativo) en el tratamiento con agua de taladrina con bacteria frente al control con bacteria.

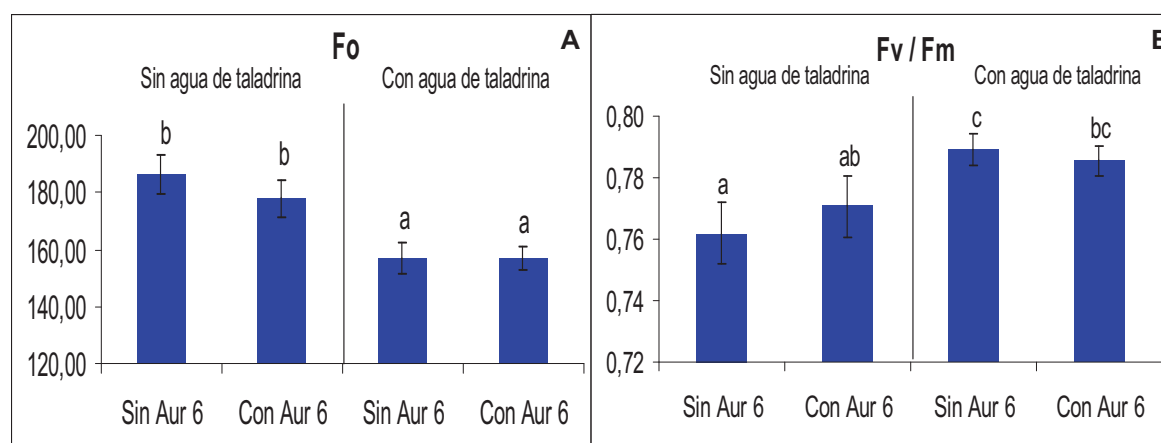


Figura 6.30. A - Variación del parámetro F_o en función del tratamiento. **B** - Variación del parámetro F_v/F_m en función del tratamiento. Tratamientos: control sin Aur 6, control con Aur 6, agua de taladrina sin Aur 6 y agua de taladrina con Aur 6. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Finalmente, se determinaron los parámetros ϕ PSII, qP, ETR y NPQ. En las figuras 6.31A, 6.31B, 6.31C y 6.31D se observa una disminución significativa de estos parámetros en los tratamientos con agua de taladrina frente a los controles. Además, se observa un incremento (no significativo) en los tratamientos con agua de taladrina cuando se inocula la bacteria.

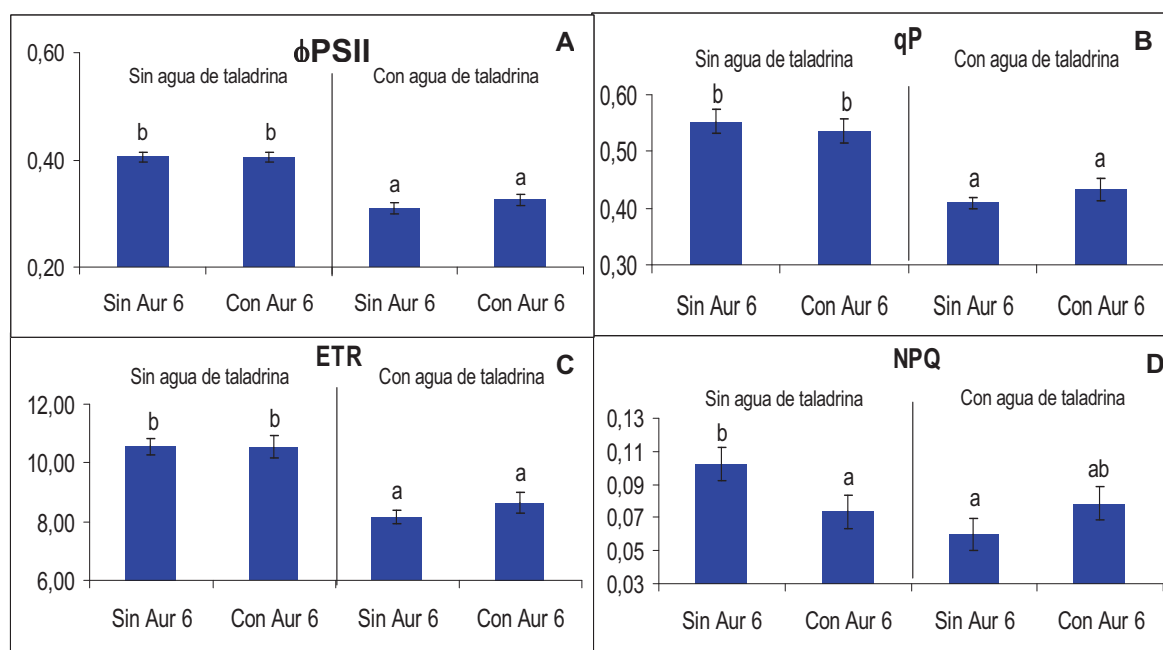


Figura 6.31. A - Variación del parámetro ϕ PSII en función del tratamiento. B - Variación de qP en función del tratamiento. C - Variación del parámetro ETR en función del tratamiento. D - Variación de NPQ en función del tratamiento. Tratamientos: Control sin Aur 6, control con Aur 6, agua de taladrina sin Aur 6 y agua de taladrina con Aur 6). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

b) Reacción de Hill: En la figura 6.32 se puede ver un incremento significativo de la velocidad del transporte de electrones al inocular la bacteria, tanto en los tratamientos con agua de taladrina como en los controles. Por otra parte, se puede decir que el agua de taladrina produce una disminución significativa de este parámetro.

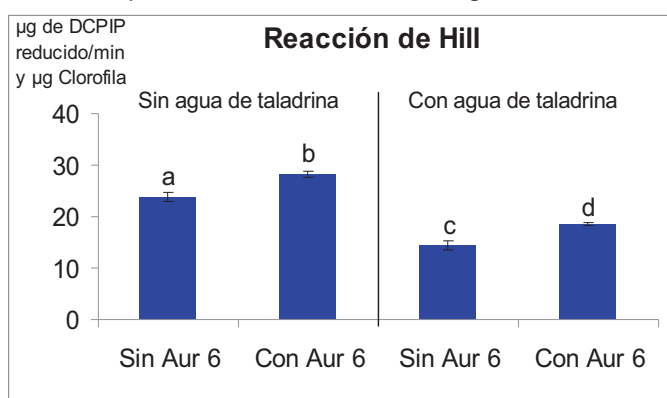


Figura 6.32. Variación de la velocidad de la reacción de Hill en función del tratamiento (control sin Aur 6, control con Aur 6, agua de taladrina sin Aur 6 y agua de taladrina con Aur 6). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

c) Cantidad de clorofilas: En la figura 6.33A se muestra la concentración total de clorofilas en cada uno de los tratamientos. Al igual que en la reacción de Hill, se observa un incremento significativo tanto en los controles como en los tratamientos con agua de taladrina cuando se inocula la bacteria. Por otra parte, si se comparan los tratamientos con agua de

taladrina frente a los controles se observa un incremento (significativo en el caso de las plantas inoculadas) en los sistemas tratados con el contaminante.

En la figura 6.33B se muestra la relación chl a / chl b en función del tratamiento. En los controles se observa un incremento significativo de esta relación al inocular la bacteria; sin embargo, en los tratamientos con agua de taladrina esta relación disminuye significativamente cuando se inocula. Por otra parte, si se comparan los controles frente a los tratamientos con agua de taladrina se observa un incremento significativo en estos últimos.

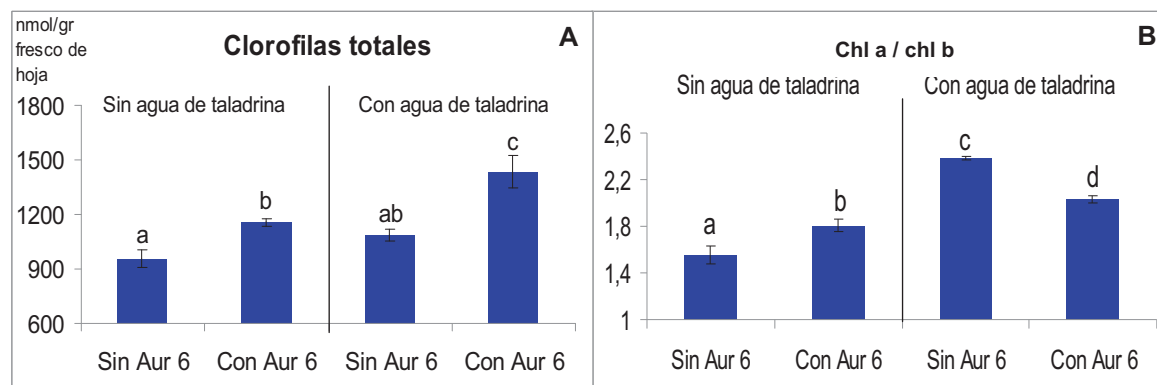


Figura 6.33. A - Evolución de las clorofilas totales en función del tratamiento. **B** - Evolución de la relación chl a / chl b en función del tratamiento. Tratamientos: Control sin Aur 6, control con Aur 6, agua de taladrina sin Aur 6 y agua de taladrina con Aur 6. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

El estudio individual de las clorofilas reveló que la clorofila a aumenta significativamente en controles y en tratamientos con agua de taladrina al inocular la bacteria ($583,47 \pm 35,45$ nmol/gr fresco hoja en controles sin bacteria, $744,33 \pm 21,31$ nmol/gr fresco hoja en controles con bacteria, $763,44 \pm 23,45$ nmol/gr fresco hoja en agua de taladrina sin bacteria y $960,39 \pm 65,38$ nmol/gr fresco hoja en agua de taladrina con bacteria). Si se comparan los controles frente a los tratamientos con taladrina se produce un incremento significativo en estos últimos.

Por su parte, en la clorofila b se observó también un incremento en controles y tratamientos con agua de taladrina cuando se inocula pero sin diferencias significativas ($376,46 \pm 19,11$ nmol/gr fresco hoja en control sin bacteria, $412,61 \pm 4,90$ nmol/gr fresco hoja en control con bacteria, $320,41 \pm 8,91$ nmol/gr fresco hoja en agua de taladrina sin bacteria y $472,97 \pm 25,74$ nmol/gr fresco hoja en agua de taladrina con bacteria). Sin embargo, si se comparan los controles frente a los tratamientos con agua de taladrina se observó un descenso no significativo en estos últimos cuando no se inoculó y un incremento no significativo cuando sí se hizo.

6.6. Patente

Como consecuencia de todos los resultados del sistema maíz-esparto mostrados hasta ahora se obtuvo la patente número 2 350 433 que se adjunta en el Anexo 13.

6.7. Resultados de los experimentos de fitorremediación por fases

En los experimentos desarrollados hasta el momento se ha comprobado como las plantas sufrían un gran deterioro después de estar 5 días en contacto con el agua de taladrina, deterioro que conducía a una situación irreversible. Con el objeto de desarrollar un sistema sostenible en una situación real, se desarrollaron los experimentos descritos en el apartado 5.5 de material y métodos, según el siguiente esquema.

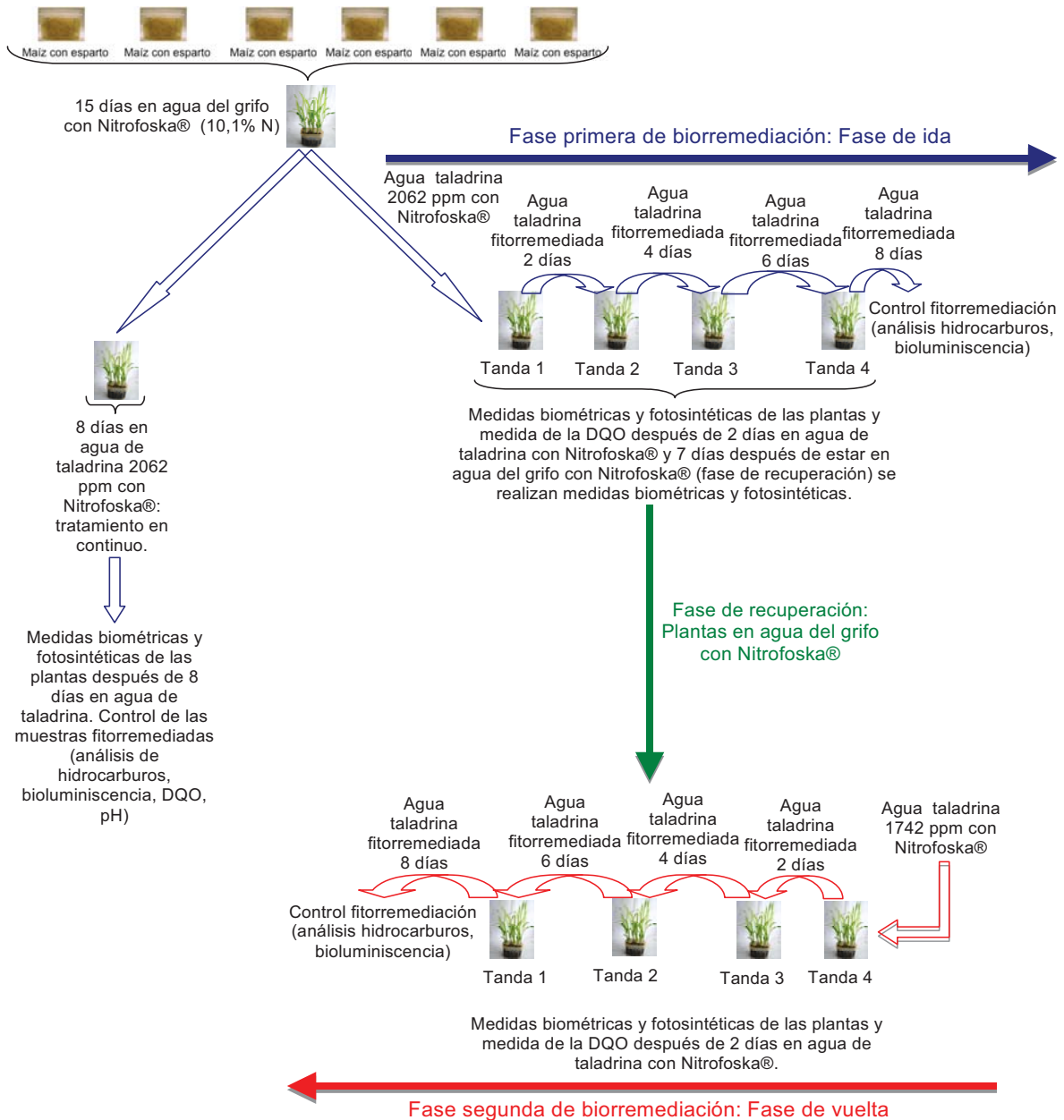


Figura 6.34. Esquema del proceso de fitorremediación en fases. En cada fase, las plantas estuvieron entre 2 y 3 días en contacto con agua de taladrina. En la fase de ida (azul), las plantas de la tanda 1 estuvieron en contacto con el agua de taladrina de mayor DQO, mientras que las plantas de la tanda 4 estuvieron en contacto con agua de taladrina que había pasado por 3 procesos de fitorremediación. Después de la fase de ida, las plantas estuvieron en agua del grifo con Nitrofoska® (fase de recuperación, verde). Finalmente, fase de vuelta (rojo) las plantas de la tanda 4 fueron las que estuvieron en contacto con agua de taladrina de mayor DQO y las de la tanda 1 estuvieron en contacto con agua de taladrina que había pasado por 3 procesos de fitorremediación. Las plantas tratamiento continuo (azul) estuvieron 8 días en agua de taladrina.

6.7.1. Análisis del agua de taladrina fitorremediada

a) DQO: En las figuras 6.35 y 6.36 se muestra la variación de este parámetro. Si se estudian los resultados obtenidos para las distintas fases del experimento, se observa una disminución significativa en todas las etapas con respecto al valor inicial de la DQO, siendo esta disminución significativamente mayor en las etapas de la fase segunda de biorremediación (fase de vuelta). Además, se observa un incremento significativo en la última etapa de vuelta (vuelta 9 días), donde el valor de la DQO vuelve a ser el mismo que el obtenido en la segunda etapa de vuelta (vuelta 5 días). Este incremento no se observa en las etapas de la fase primera de biorremediación (ida).

Cabe destacar que la reducción de la DQO ejercida por el sistema de fitorremediación de forma continua es significativamente menor que la reducción ejercida por este sistema en fases, obteniéndose una reducción similar a la obtenida en la tercera etapa de esta primera fase (ida 7 días).

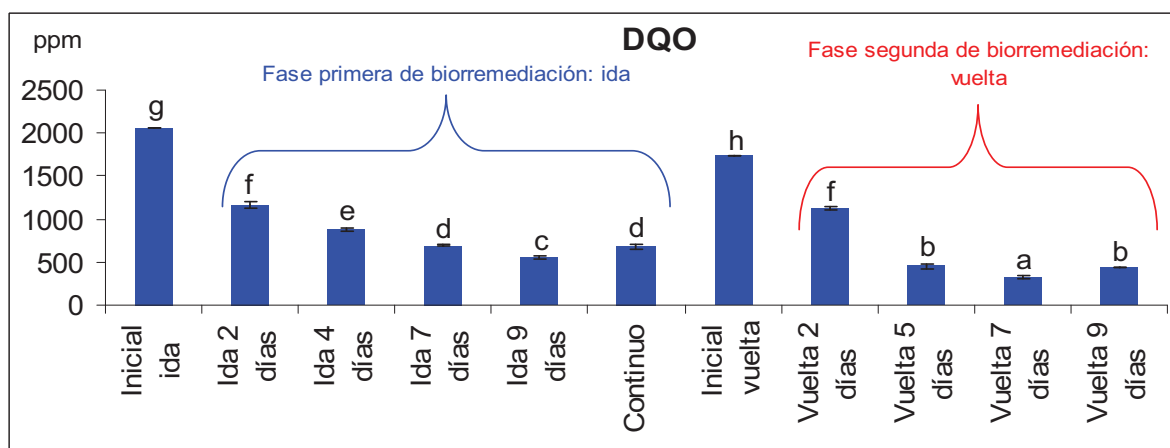


Figura 6.35. Variación de la DQO en las distintas etapas del experimento en fases. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En la figura 6.36 también se observa que el valor de la DQO obtenido en la etapa final de la fase de vuelta es significativamente mayor que el obtenida en la fase final del experimento de ida y ambas a su vez son significativamente menores que la obtenida en el sistema en continuo.

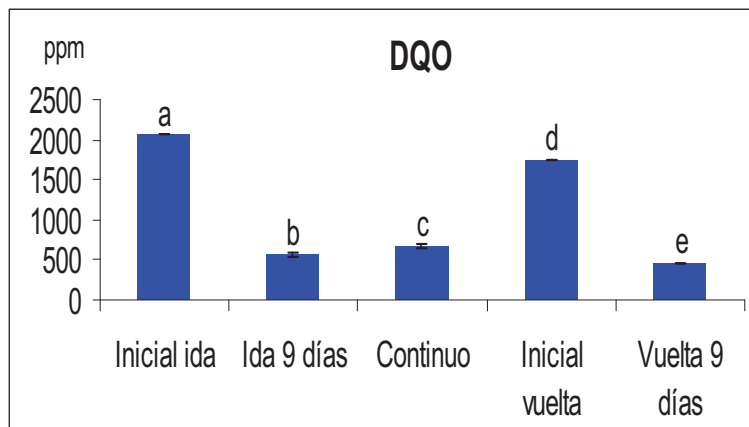


Figura 6.36. Variación de la DQO del agua de taladrina tras un proceso de fitorremediación en fases. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

b) pH: Prácticamente, no se observaron diferencias entre el valor de este parámetro en las distintas etapas de una misma fase de este experimento (siendo en todos los casos de un valor alrededor de 8), por eso los datos mostrados corresponden sólo a la etapa final de cada fase. En la figura 6.37 se observa una disminución significativa del pH entre los valores obtenidos antes del sistema de fitorremediación y después del mismo. Además, se observa como en el sistema de fitorremediación en continuo y en la etapa de vuelta el valor del pH es significativamente mayor que el obtenido en la etapa de ida. En todos los casos el pH se encuentra dentro de los límites establecidos por la Ley 10/1993 de la Comunidad de Madrid.

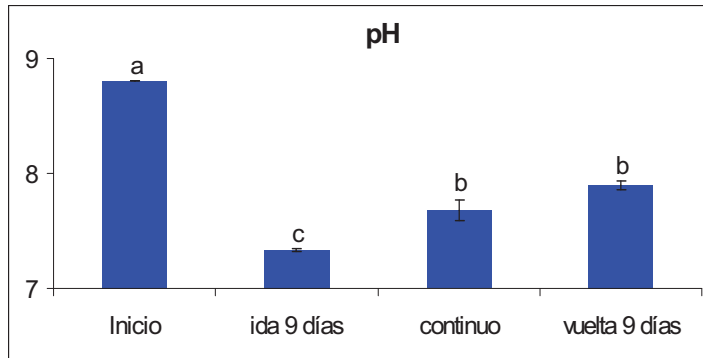


Figura 6.37. Variación del pH en las etapas finales de cada fase del sistema de fitorremediación. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

c) Análisis cualitativo de los hidrocarburos presentes: En la figura 6.38 se muestra el resultado del análisis de hidrocarburos mediante la técnica de cromatografía de gases / masas. Se puede ver como la mayoría de los compuestos que caracterizan el agua de taladrina inicial desaparecen tras el proceso de fitorremediación, pero se originan compuestos secundarios o de degradación (tabla 6.5). En el Anexo 9 se adjuntan los cromatogramas completos.

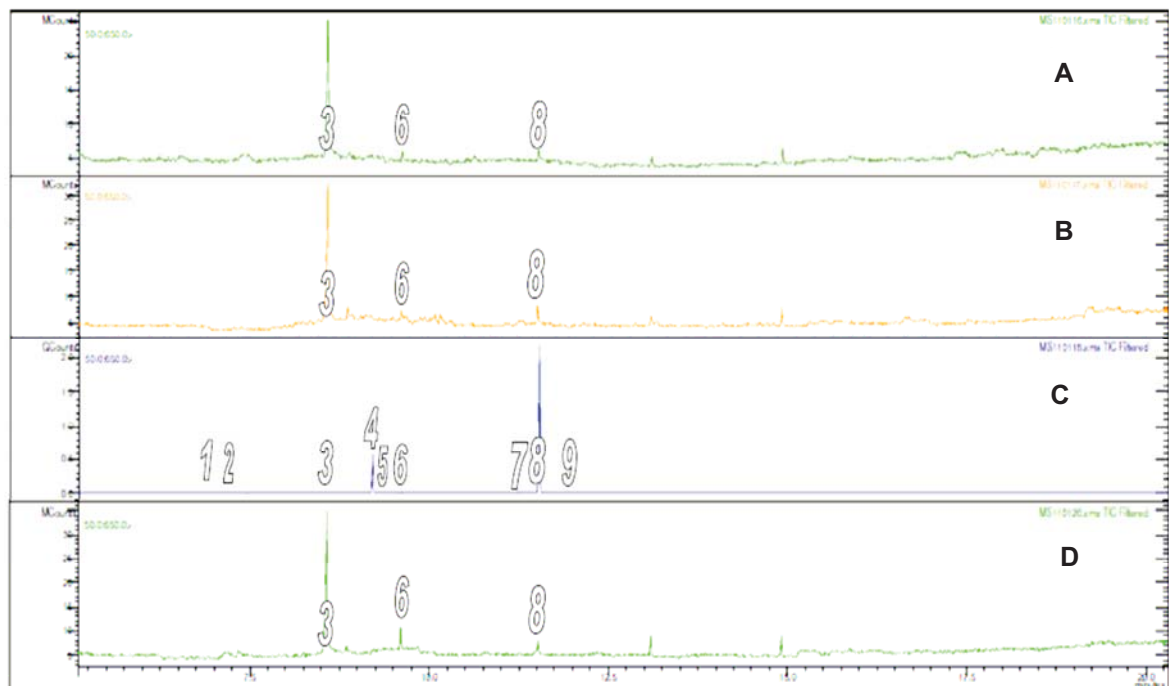


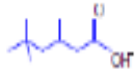

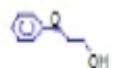
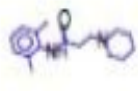
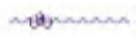
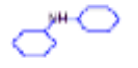



Figura 6.38. Cromatogramas correspondientes al análisis de hidrocarburos de la muestra inicial (A), etapa ida 9 días (B), continuo (C) y etapa vuelta 9 días (D). 1: pico 6,80 min; 2: pico 7,30 min; 3: pico 8,54 min; 4: 9,17 min; 5: 9,55 min; 6: 9,59 min; 7: 11,19 min; 8: 11,49 min; 9: 12,25 min.

En la tabla 6.5 se puede ver como la mayoría de los compuestos presentes en la muestra de agua de taladrina inicial desaparecen tras el proceso de fitorremediación. Los compuestos 3 y 6 son más recalcitrantes en las etapas del proceso de vuelta, mientras que el compuesto 8 es más recalcitrante en el proceso en continuo. Estos productos, que no desaparecen tras la fitorremediación, pueden clasificarse como sustancias tóxicas de acuerdo con la Directiva 2008/1/CE del Parlamento Europeo y del Consejo.

En ninguna de las etapas se observa la producción de compuestos de degradación. Cabe destacar que el compuesto 3, presente en la composición inicial de la muestra de agua de taladrina, incrementa su concentración en las distintas etapas del proceso de fitorremediación, alcanzando los valores mayores en la etapa de vuelta.

Tabla 6.5. Picos presentes en la muestra de agua de taladrina inicial y en las muestras fitorremediadas en el experimento en fases. Los compuestos mostrados fueron seleccionados de librería generada por los espectros de masas de cada compuesto. En cada caso se seleccionó la molécula que tenía una mayor probabilidad de semejanza con los espectros obtenidos en el análisis de las muestras.

Pico	Tiempo de retención (min)	Nombre compuesto	Fórmula	Molécula	Altura Inicial	Altura ida 9 días	Altura continuo	Altura vuelta 9 días
1	6,80	Fenol	C ₆ H ₆ O		3.010e ⁺⁵			
2	7,30	1,1'-oxybis-heptano	C ₁₄ H ₃₀ O		1.144e ⁺⁵			
3	8,54	Ácido hexanoico, 3,5,5 - trimetil	C ₉ H ₁₈ O ₂		1.984e ⁺⁵	7.483e ⁺⁵	9.716e ⁺⁵	1.013e ⁺⁷
4	9,17	Etanol, 1-(2-butoxi)etoxi	C ₈ H ₁₈ O ₃		2.336e ⁺⁵			
5	9,55	Etanol, 2 - fenoxi	C ₈ H ₁₀ O ₂		4.199e ⁺⁵			
6	9,59	Propanamida, N - (2,6 - dimetilfenil) - 3- (1 - piperidinilo)	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O		4.636e ⁺⁵	639646	655251	1.459e ⁺⁶
7	11,19	Ácido sulfúrico, butil dodecil éster	C ₁₆ H ₃₄ O ₃ S		1.514e ⁺⁵			
8	11,49	Ciclohexanamina N-ciclohexil-	C ₁₂ H ₂₃ N		7.881e ⁺⁵	490397	1.146e ⁺⁵	668748
9	12,25	Ciclohexanamina N-ciclohexil-N-metil-	C ₁₃ H ₂₅ N		491352			

- Presencia de PAHs: En el análisis realizado mediante la técnica de SPME no se observaron diferencias entre la muestra de agua de taladrina inicial y la final. Además, cabe destacar la ausencia de PAHs en la muestra inicial de agua de taladrina diluida hasta una DQO de unos 1.902 ppm y pH de 8,81. Los cromatogramas se adjuntan en el Anexo 10.

- Hidrocarburos totales: Todos los procesos de fitorremediación disminuyen significativamente la cantidad de estos compuestos, sin presentar diferencias significativas entre ellos. De esta manera, la concentración de hidrocarburos totales disminuyó significativamente desde los $14,38 \pm 0,39$ ppm de la muestra inicial hasta los $2,53 \pm 0,04$ ppm de la muestra fitorremediada en el proceso de ida a los 9 días; $2,34 \pm 0,06$ ppm de la muestra fitorremediada en el proceso en continuo y $3,05 \pm 0,03$ ppm de la muestra fitorremediada en el proceso de vuelta a los 9 días.

6.7.2. Variación de los parámetros biométricos

a) Altura: En la figura 6.39 se muestra la evolución de la altura de las plantas en las distintas fases del experimento. Si se estudia cada etapa por separado se aprecia como se produce un incremento de la altura en todas las fases, siendo significativo entre las fases de ida y recuperación de las tandas 2, 3 y 4. Sin embargo, no se observan diferencias entre las fases de recuperación y vuelta.

Por otra parte, si se compara cada fase entre sí se observa un incremento significativo en las plantas de la tanda 2 y 4 respecto al resto de las tandas y al tratamiento en continuo. En la fase de recuperación, se observa un incremento significativo en todas las tandas en comparación con la tanda 1. Finalmente, en la fase de vuelta no se observan diferencias significativas entre las distintas tandas.

Debido al estado de las plantas, en el tratamiento en continuo no se pudieron realizar medidas en las fases de recuperación y vuelta del tratamiento en continuo ni en la fase de vuelta de la tanda 1.

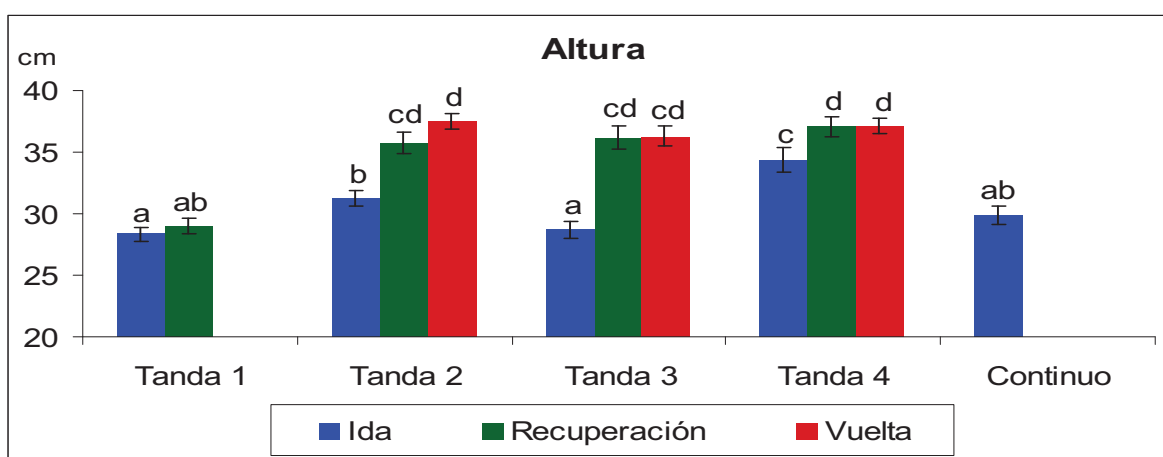


Figura 6.39. Variación de la altura de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento (ida en azul, recuperación en verde y vuelta en rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

b) Número de hojas: En la figura 6.40 se muestra la variación de este parámetro biométrico en las distintas fases del experimento. Si se estudia cada etapa por separado se observa como se produce un incremento del número de hojas en todas las fases, siendo significativo entre la fase de ida y la de recuperación de las tandas 1, 3 y 4; y entre la fase de recuperación y la de vuelta en las tandas 2 y 3. Resulta llamativa la disminución de este parámetro entre la fase de recuperación y la fase de vuelta de la tanda 4.

Si se compara cada fase entre sí, se observa, en la fase de ida, un incremento significativo del número de hojas en la tanda 2, 3 y 4 respecto a la tanda 1 y al tratamiento en continuo (salvo con la tanda 2), produciéndose también un incremento significativo en la tanda 4 respecto a la tanda 2. En la fase de recuperación se observa un incremento significativo de la tanda 4 respecto al resto de las tandas y de la tanda 2 y 3 respecto a la tanda 1. Finalmente, en la fase de vuelta no se observan diferencias significativas.

Debido al estado en el que se encontraban las plantas, no se pudieron realizar medidas en la tanda 1 durante la fase de vuelta ni en el tratamiento en continuo en la fase de recuperación ni en la fase de vuelta.

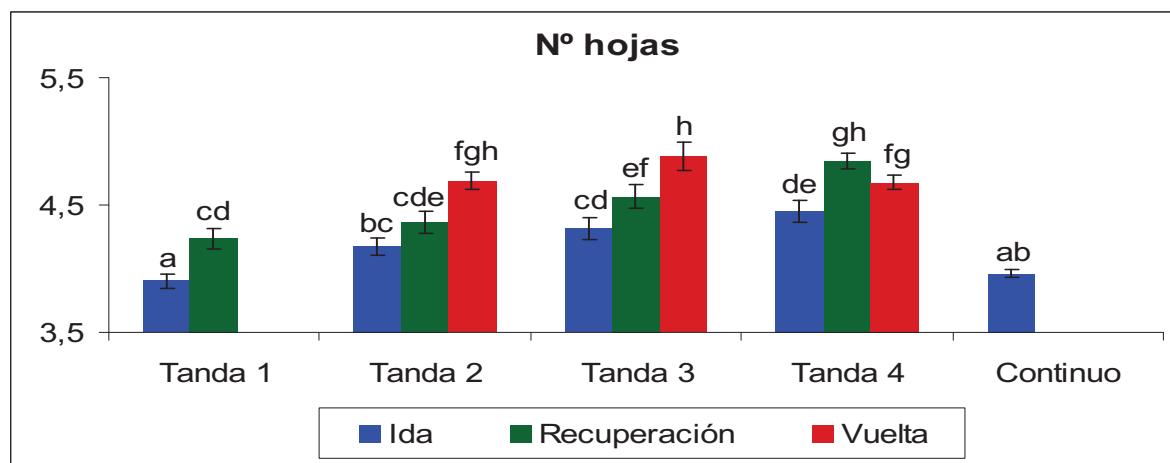


Figura 6.40. Variación del número de hojas de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento (ida en azul, recuperación en verde y vuelta en rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

6.7.3. Variación de los parámetros fotosintéticos, reacción de Hill y cantidad de clorofilas

a) Parámetros fotosintéticos: En primer lugar, se estudió F_0 , cuya evolución se muestra en la figura 6.41. Si se estudia cada etapa por separado el comportamiento entre la fase de ida y recuperación depende de la tanda de estudio. De esta manera, se observa un incremento significativo en la tanda 1 y no significativo en la tanda 3 y 4; pero sin embargo se observa una disminución significativa en la tanda 2. Por su parte, el estudio del comportamiento entre la fase de recuperación y la fase de vuelta muestra una disminución en todas las tandas, siendo significativo en la 3 y la 4.

Si se compara cada tanda entre sí se observa un incremento significativo en las tandas 2, 3 y 4 frente a la tanda 1 y el tratamiento continuo en el caso de la fase de ida. En el caso de la fase de recuperación, se observa una disminución significativa de este parámetro en la tanda 2. Finalmente, no se observan diferencias significativas entre las distintas tandas en la fase de vuelta.

Debido al estado en el que se encontraban las plantas, no se pudieron realizar medidas en la tanda 1 durante la fase de vuelta ni en el tratamiento en continuo en la fase de recuperación ni en la fase de vuelta.

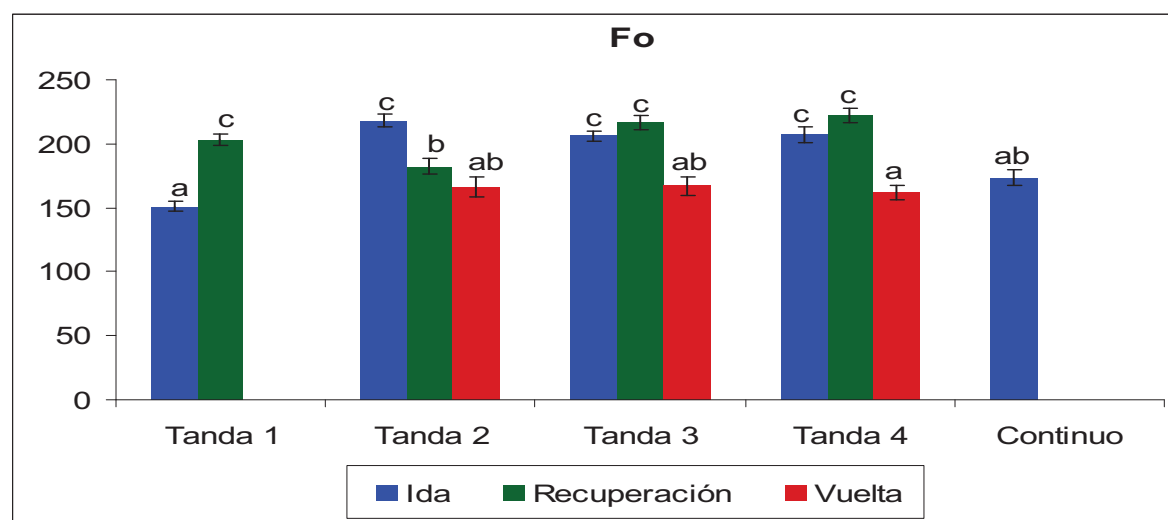


Figura 6.41. Variación del parámetro Fo de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento (ida en azul, recuperación en verde y vuelta en rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

A continuación, se analizó el parámetro Fv/Fm. En la figura 6.42 se muestra la evolución de este parámetro en función del tiempo en las distintas tandas del experimento.

Si se estudia cada etapa por separado la evolución de cada fase depende, de nuevo, de la tanda de estudio. De esta manera, entre la fase de ida y la fase de recuperación no se observan diferencias en la tanda 1. Sin embargo, se observa una disminución tanto en la tanda 2 como en la 3, siendo significativa en esta última, mientras que en la tanda 4 se observa un ligero incremento. Por otra parte, entre la fase de recuperación y la fase de vuelta, se observa una disminución significativa en las tandas 2 y 4, mientras que se produce un incremento no significativo en la tanda 3.

Si se comparan las tandas entre sí no se observan diferencias entre las distintas tandas en la fase de ida. En la fase de recuperación se observa una disminución en las tandas 2 y 3, siendo significativa en la tanda 2 respecto a las tandas 1 y 4. Finalmente, en la fase de vuelta se observa un valor significativamente mayor de este parámetro en la tanda 3, seguido de la tanda 4 para encontrar finalmente el valor de la tanda 2.

Debido al estado en el que se encontraban las plantas, no se pudieron realizar medidas en la tanda 1 durante la fase de vuelta ni en el tratamiento en continuo en la fase de recuperación ni en la fase de vuelta.

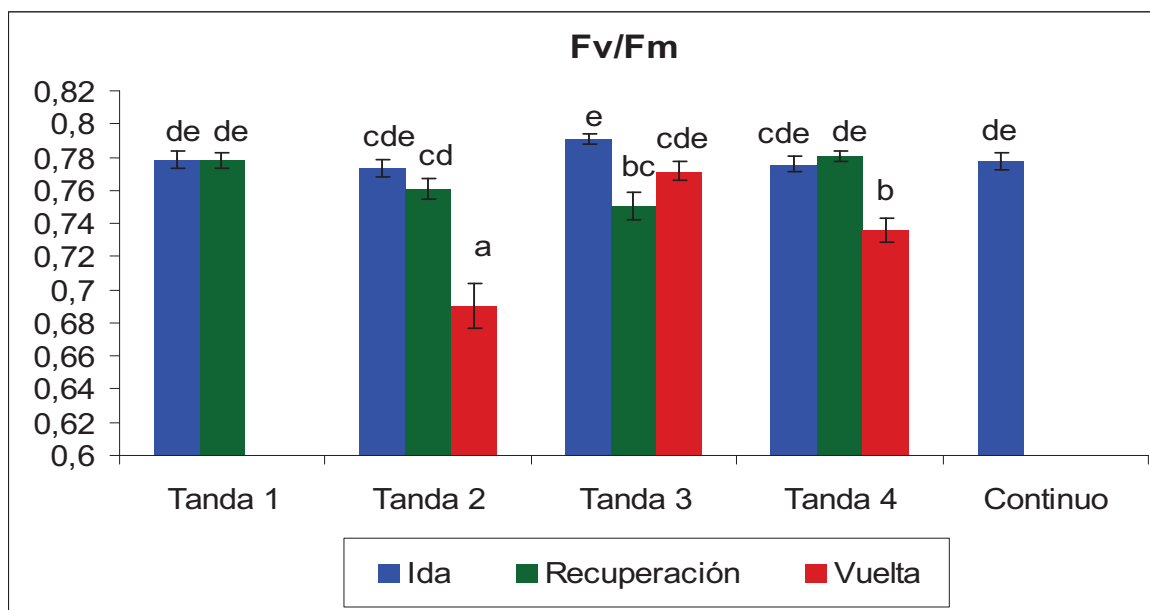


Figura 6.42. Variación del parámetro Fv/Fm de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento (ida – color azul, recuperación – color verde y vuelta – color rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se observó un comportamiento similar para los parámetros ϕ PSII, qP y ETR, como puede observarse en la figura 6.43.

Si se estudia cada etapa por separado. En primer lugar, se observó un ligero incremento entre la fase de recuperación y la fase de ida en la tanda 1 y la 4, pero sin embargo, en las otras tandas (2 y 3) se produjo un descenso significativo. Entre la fase de vuelta y la de recuperación se observó una disminución significativa en todas las tandas.

El comportamiento entre las tandas depende del parámetro que se estudie. Así, en el parámetro ϕ PSII y ETR (figura 6.43A y 6.43C) se observó una tendencia significativamente ascendente en la fase de ida entre las tandas 1 a 3, para luego disminuir significativamente entre las tandas 2 y 3 y las tandas 4 y el tratamiento continuo. Si se estudia la fase de recuperación, sólo se observan diferencias entre la tanda 2 y la 4 donde se produce un aumento significativo en esta última. Finalmente, en la fase de vuelta, el valor obtenido en la tanda 3 es significativamente mayor al que se obtiene en las tandas 2 y 4, sin presentar diferencias entre éstas.

Debido al estado en el que se encontraban las plantas, no se pudieron realizar medidas en la tanda 1 durante la fase de vuelta ni en el tratamiento en continuo en la fase de recuperación ni en la fase de vuelta.

A diferencia de los parámetros ϕ PSII y ETR, en el parámetro qP se observó un valor significativamente mayor en la tanda 3 respecto al resto de las tandas en la fase de ida (figura 6.43B). En la fase de vuelta se observó una disminución significativa en la tanda 4 respecto al resto de las tandas.

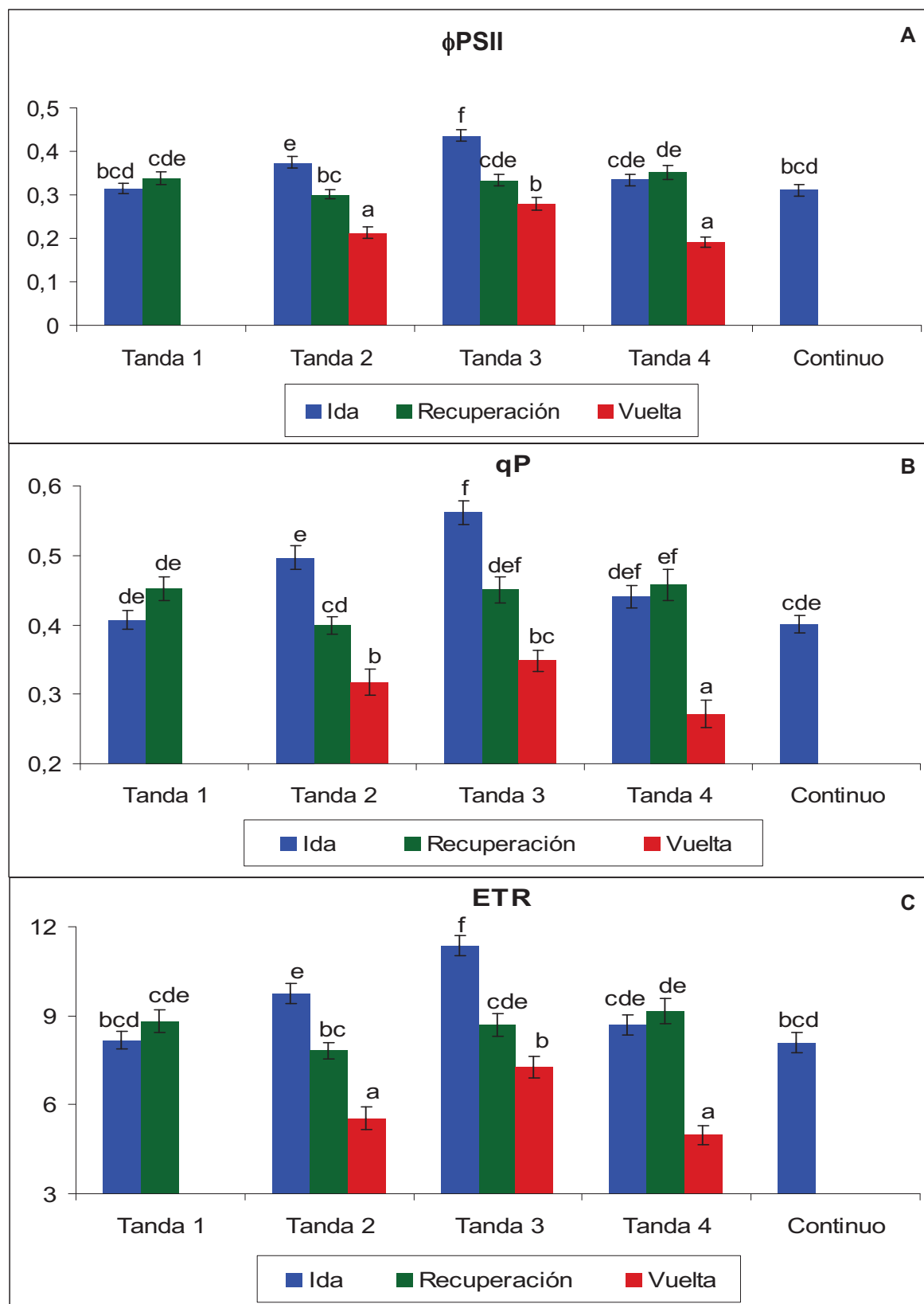


Figura 6.43. **A** - Variación del parámetro ϕ PSII de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento. **B** - Variación del parámetro qP de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento. **C** - Variación del parámetro ETR de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento. Fases: Ida (azul), recuperación (verde) y vuelta (rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Finalmente, se estudió el parámetro NPQ. En la figura 6.44 se muestra la evolución de este parámetro fotosintético. Si se estudia cada etapa por separado la evolución de cada fase depende de la tanda de estudio. Así, si se estudia el comportamiento de la fase de recuperación frente a la fase de ida se observa un incremento significativo en la tanda 1, pero una disminución en el resto de las tandas, siendo ésta no significativa en la tanda 4. En el caso de la evolución de la fase de vuelta frente a la fase de recuperación se observa un incremento significativo en todas las tandas.

Si se comparan las tandas entre sí se observa una oscilación de este parámetro en la fase de ida, de manera que se produce un incremento significativo del mismo entre la tanda 1 y el resto de las tandas. Además, este parámetro aumenta significativamente en la fase de ida entre el tratamiento continuo y las tandas 1 y 3. Por otra parte, en la fase de recuperación se observan los valores más bajos en la tanda 2, presentando diferencias significativas respecto a la tanda 4. Finalmente, en la fase de vuelta apenas se observan diferencias.

Debido al estado en el que se encontraban las plantas, no se pudieron realizar medidas en la tanda 1 durante la fase de vuelta ni en el tratamiento en continuo en la fase de recuperación ni en la fase de vuelta.

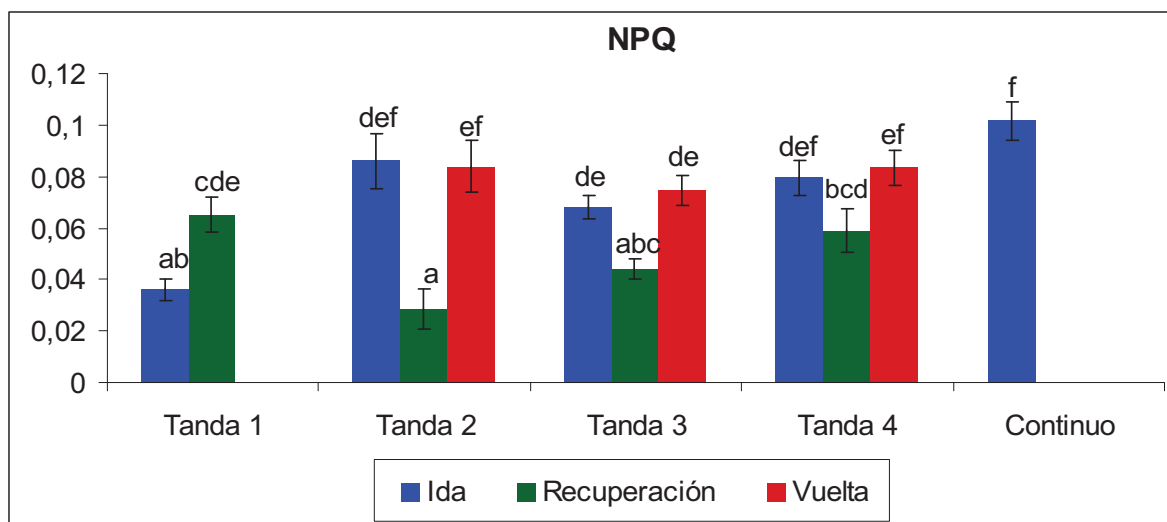


Figura 6.44. Variación del parámetro NPQ de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento (ida – color azul, recuperación – color verde y vuelta – color rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

b) Reacción de Hill: En la figura 6.45 se muestra la evolución de la reacción de Hill en el experimento de fases. Si se estudia cada etapa por separado en todas se observó una disminución significativa de esta reacción tanto si se estudia el comportamiento entre la fase de ida y la de recuperación como si se estudia el comportamiento entre la fase de vuelta y la de recuperación.

Si se comparan las distintas fases se observa como la tanda 2 de la fase de ida es donde se obtiene el valor significativamente mayor, seguido de las tandas 3 y 4, alcanzándose el valor significativamente más bajo en el tratamiento en continuo. En la fase de

recuperación, la tanda 1 es la que presenta el valor significativamente más bajo. Finalmente, en la fase de vuelta no se observan diferencias significativas entre las distintas tandas.

Debido al estado en el que se encontraban las plantas, no se pudieron realizar medidas en la tanda 1 durante la fase de vuelta ni en el tratamiento en continuo en la fase de recuperación ni en la fase de vuelta.

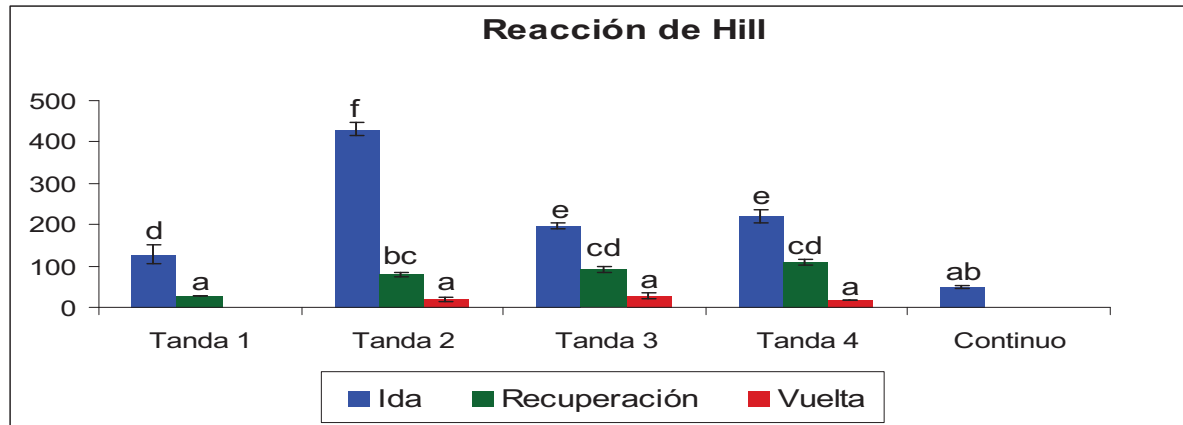


Figura 6.45. Variación de la reacción de Hill de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento (ida – color azul, recuperación – color verde y vuelta – color rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

c) Cantidad de clorofilas: En último lugar se estudió la evolución en la cantidad de clorofilas. En la figura 6.50 se muestra la variación del contenido total de las mismas. En todas las tandas se observó una disminución significativa entre las distintas fases. En la tanda 2 de la fase de ida esta concentración fue significativamente más alta que en el resto de las tandas, obteniéndose el valor significativamente más bajo para el tratamiento en continuo. En la fase de recuperación, el valor significativamente menor se obtuvo en la tanda 1, sin presentar diferencias significativas entre el resto de las tandas. Finalmente, no se observaron diferencias en la fase de vuelta.

Debido al estado en el que se encontraban las plantas, no se pudieron realizar medidas en la tanda 1 durante la fase de vuelta ni en el tratamiento en continuo en la fase de recuperación ni en la fase de vuelta.

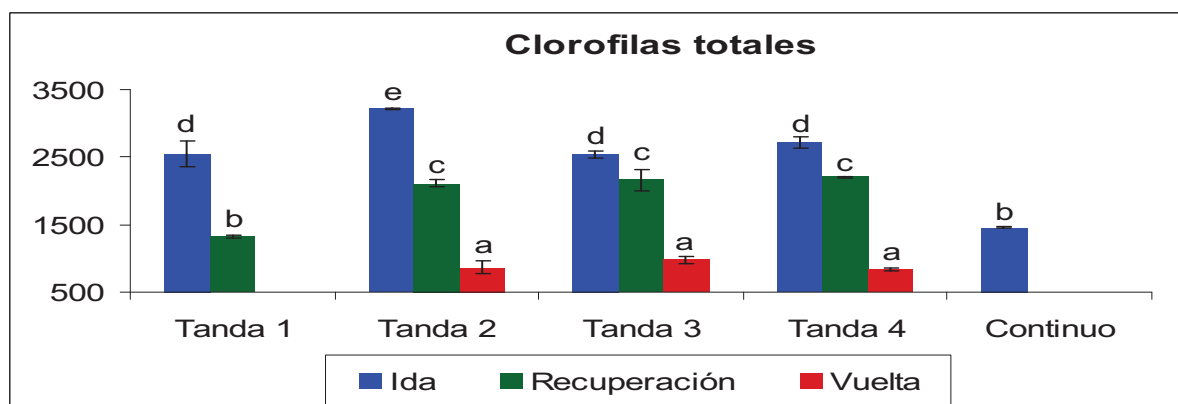


Figura 6.46. Variación de la concentración de clorofilas totales de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento (ida – color azul, recuperación – color verde y vuelta – color rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

También, se estudió la relación chl a / chl b (figura 6.47). El comportamiento entre la fase de ida y la de recuperación depende de la tanda que se estudie. Así, se observa una disminución en la tanda 1 y 4, siendo significativa en esta última. Sin embargo, en las tandas 2 y 3 se observa un incremento, significativo en el caso de la tanda 3. Entre la fase de recuperación y la fase de vuelta se observa un aumento en todas las tandas, siendo significativo en la tanda 4.

Si se comparan las tandas entre sí el valor significativamente menor se obtiene en la tanda 3 de la fase de ida, produciéndose un incremento significativo entre la tanda 2 y el tratamiento continuo, sin presentar diferencias entre el resto de las tandas. En la fase de recuperación se observa una disminución significativa entre la tanda 4 con el resto de las tandas, salvo con la tanda 1 donde esta disminución no es significativa. Finalmente, en la fase de vuelta no se observan diferencias significativas entre las tandas.

Debido al estado en el que se encontraban las plantas, no se pudieron realizar medidas en la tanda 1 durante la fase de vuelta ni en el tratamiento en continuo en la fase de recuperación ni en la fase de vuelta.

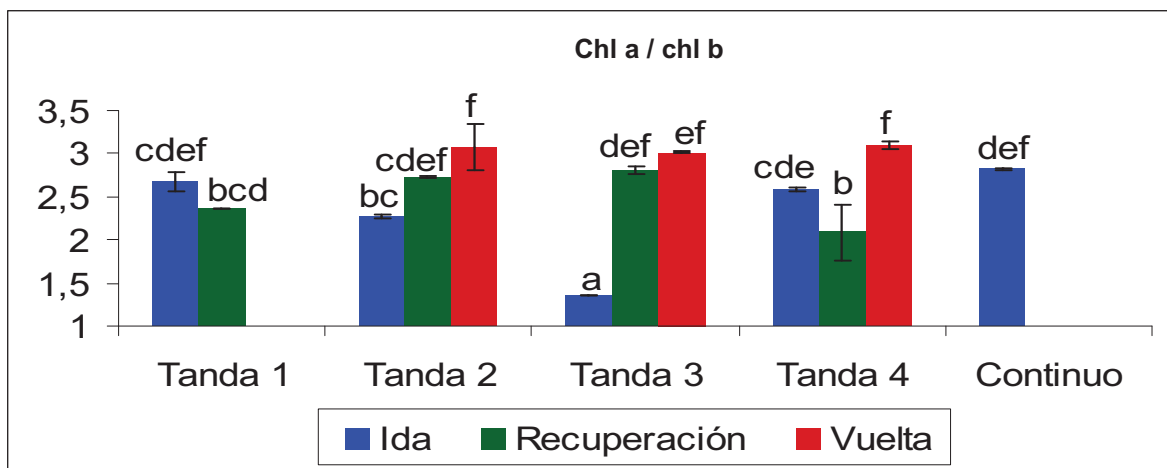


Figura 6.47. Variación de la relación chl a / chl b de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento (ida – color azul, recuperación – color verde y vuelta – color rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Finalmente, se estudió la variación de cada una de las clorofilas de forma independiente. Así, en la figura 6.48 se puede observar como, salvo en la tanda 3, el contenido en clorofila a disminuye significativamente entre la fase de ida y la fase de recuperación. También se produce una disminución significativa en todas las tandas entre la fase de recuperación y la fase de vuelta.

Si se comparan las tandas entre sí el valor significativamente más alto se obtiene en la tanda 2 de la fase de ida y el valor significativamente más bajo en el tratamiento en continuo. En la fase de recuperación, el valor significativamente más bajo se obtiene en la tanda 1. Sin embargo, en la fase de vuelta no hay diferencias significativas entre las distintas tandas.

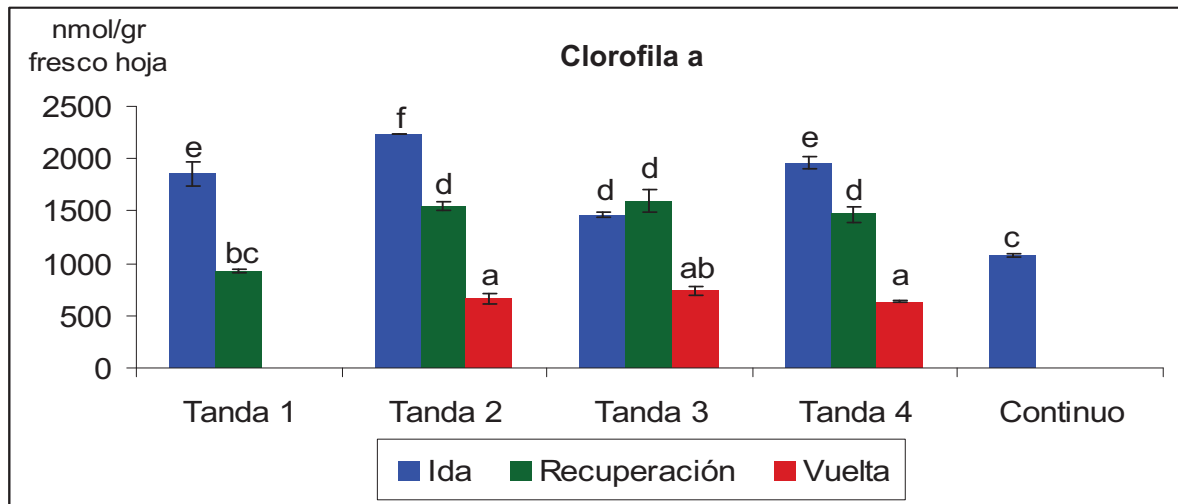


Figura 6.48. Variación de la concentración de la clorofila a de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento (ida – color azul, recuperación – color verde y vuelta – color rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En la figura 6.49 se muestra la variación de la concentración de la clorofila b. El contenido disminuye significativamente entre la fase de ida y la de recuperación y entre ésta y la fase de vuelta, salvo en la tanda 4 entre la fase de ida y la de recuperación.

Si se comparan las distintas tandas entre sí se observa como en la fase de ida el contenido de clorofila b es significativamente mayor en las tandas 2 y 3, mientras que es significativamente menor en el tratamiento en continuo. En la fase de recuperación, el contenido de las clorofilas fue significativamente mayor en la tanda 4 y significativamente menor en la tanda 1. En la fase de vuelta no se observan diferencias significativas entre las tandas.

Debido al estado en el que se encontraban las plantas, no se pudo determinar el contenido en clorofilas en la tanda 1 durante la fase de vuelta ni en el tratamiento en continuo en la fase de recuperación ni en la fase de vuelta.

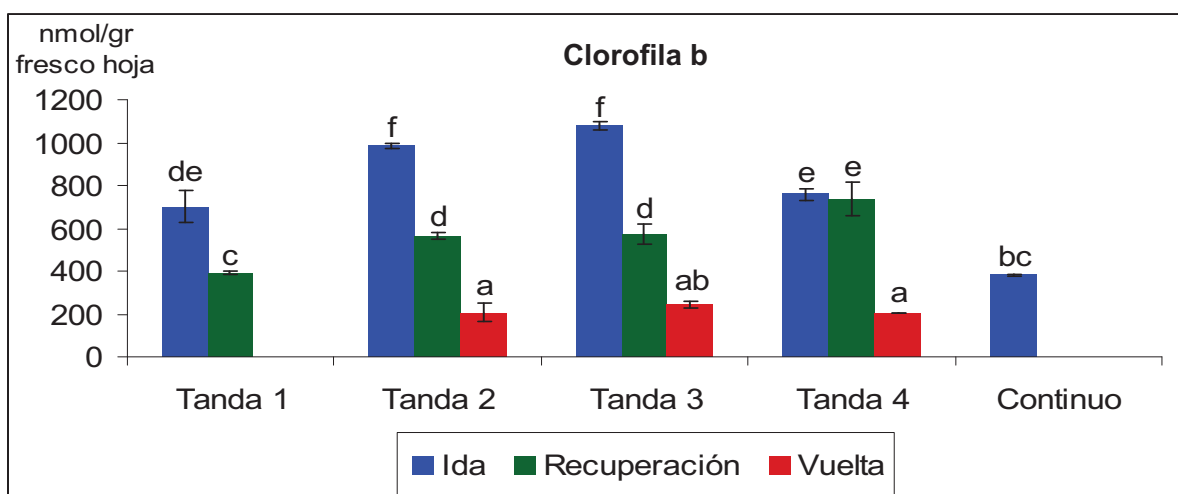


Figura 6.49. Variación de la concentración de la clorofila b de las plantas de maíz en las diferentes fases del experimento (ida – color azul, recuperación – color verde y vuelta – color rojo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

6.8. Análisis de bioluminiscencia

6.8.1. Toxicidad sobre *Anabaena sp*

En las tablas 6.6 y 6.7 se muestran los resultados del examen de toxicidad (apartado 5.6) realizado con la cianobacteria *Anabaena sp.* PCC7120, denominada “CPB4337”, en las distintas muestras de agua de taladrina tanto iniciales como fitorremediadas (con y sin bacteria y también en el experimento en fases). Estas muestras proceden de los experimentos estudiados hasta el momento y también del experimento realizado con el consorcio de las bacterias aisladas del biorreactor que se estudia en el apartado 8.9.2.

En dichas tablas los valores de toxicidad están expresados como:

- % de inhibición (%Inh¹): Porcentaje de inhibición de luminiscencia que produce la muestra sin ninguna dilución. En todos los casos el número de repeticiones fue, de al menos, 9 (3 experimentos independientes de 3 réplicas).

- IC₅₀²: Concentración efectiva de un tóxico que causa una inhibición de un 50% de la bioluminiscencia respecto al control no tratado. Datos mostrados en la tabla 6.6.

- IC₁₀²: Es la dilución de un tóxico que causa una inhibición de la luminiscencia del sensor en un 10%. Datos mostrados en la tabla 6.7.

Los valores de IC₅₀² y IC₁₀² fueron calculados mediante ICp (“A Linear Interpolation Method for Sublethal Toxicity: The Inhibition Concentration (ICp) Approach”. (Version 2.0). Linear Interpolation Method según USEPA (EPA/600/4-89-001 y 001A).

Se realizaron ensayos crónicos en los que el sensor es expuesto a las muestras durante 24h.

Otros datos que aparecen en la tabla:

- CV%: Coeficiente de variación.

- SD: Desviación estándar.

- IC_{Lower} 95% y IC_{Upper} 95%: Intervalos de confianza al 95%, inferior y superior respectivamente.

Como se observa en las tablas, las muestras tenían pHs muy básicos. Para realizar el ensayo se ajustaron a un pH de 8,3.

Los datos referentes al %Inh son una medida de la toxicidad directa de las muestras, cuanto mayor es este porcentaje, mayor es la toxicidad. Todas las muestras pueden ser catalogadas como muy tóxicas desde éste punto de vista pues producen una inhibición de más de un 85% a las 24 horas (tabla 6.6). Este % se reduce significativamente después del proceso de fitorremediación y lo hace en mayor medida cuando no se inocula ninguna cepa, salvo en los tratamientos con Aur 6 y Esp1, aunque no existen diferencias significativas entre los tratamientos con y sin bacteria.

La muestra de agua de taladrina de la tanda 4 (experimento en fases, fase de ida) es la que produce una reducción significativamente mayor de la toxicidad de la muestra, disminuyendo el porcentaje de inhibición hasta un 75%. La reducción producida por la muestra vuelta 1 (experimento en fases, fase de vuelta) es también significativamente menor a la obtenida por el resto de tratamientos y por la inicial, salvo con el tratamiento de la tanda 4 con el que tiene un valor significativamente mayor.

Por otro lado, los valores de la IC_{50}^2 son importantes pues nos dan una indicación de cuán potente es la toxicidad de una muestra, es decir, cuanto más bajo sea este parámetro más “concentrada” es la toxicidad y por tanto habría que diluirla muchas veces o reducir la contaminación responsable de su toxicidad en un alto porcentaje para que llegara a ser inocua para este organismo o ecosistema acuático. Tomamos la medida del sensor como una aproximación de la toxicidad de las muestras para un ecosistema acuático en general. Se observa como, por lo general, las muestras iniciales necesitan una dilución significativamente mucho mayor (de un orden de magnitud más) que las muestras tratadas, lo que indica que el sistema biorremediador no sólo consigue una reducción de la DQO sino que esta reducción lleva asociada una disminución de la toxicidad de la muestra. Esto no se cumple para el experimento del consorcio (tratamiento con bacterias) y el experimento de fases (tratamiento en continuo y vuelta 1), donde no existen diferencias significativas.

En los experimentos realizados con las cepas Aur 6 y Esp1, se observa una mayor disminución de la DQO cuando no se inoculan estos microorganismos, aunque no se producen diferencias significativas. Esto se corrobora con una mayor disminución de la toxicidad del medio en ausencia de inoculación. Sin embargo, ocurre lo contrario cuando se inoculan las cepas TP9 y Esp14 donde se puede ver como, a pesar de que la reducción de la DQO fue mayor en los sistemas sin inoculación, la toxicidad del agua resultante era más baja en los tratamientos con bacteria. Cuando se inocula el consorcio se produce una mayor reducción de la DQO por el sistema fitorremediador con las bacterias que, sin embargo, no está asociada con una mayor disminución de la toxicidad del medio resultante.

Finalmente, en el experimento en fases, se ve como la toxicidad de la muestra es significativamente menor cuando el agua de taladrina pasa por primera vez por 4 grupos distintos de plantas (con los que está 2 días en contacto). Pero sin embargo, estos resultados no coinciden con la disminución de la DQO, donde se ve que la mayor reducción se produce cuando el sistema está por segunda vez en contacto con el agua de taladrina, momento en el que la toxicidad es significativamente mayor que la obtenida en los tratamientos inicial y continuo.

Tabla 6.6. Valores de la IC_{50}^2 de las muestras de agua de taladrina iniciales y fitorremediadas en los distintos sistemas de fitorremediación ensayados (ensayo con la levadura Esp14, ensayo con la bacteria Aur 6, ensayo con la bacteria Esp1, ensayo con la bacteria TP9, ensayo con el consorcio bacteriano y ensayo con el planteamiento en fases). En rojo se muestra el tratamiento de cada ensayo que presentó una menor biotoxicidad. Para cada ensayo, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

24 h	pH inicial	pH ensayo	DQO (ppm)	%lnh ¹	CV	CV%	IC ₅₀	Dilución necesaria	SD	IC _{Lower}	IC _{Upper}	CV	CV%
Inicial Esp14	9,43	8,3	1800	a 99,62	0,0047	0,4718	a 0,0718	13,92	0,0073	0,0589	0,0844	0,1017	10,1671
Sin Esp14	8,54	8,3	902	b 98,27	0,0122	1,2168	b 0,1513	6,60	0,0263	0,1074	0,2007	0,1738	17,3827
Con Esp14	8,62	8,3	922	b 99,72	0,0023	0,2344	b 0,2191	4,56	0,0191	0,1829	0,2449	0,0872	8,7175
Inicial Aur 6	9,41	8,3	1726	a 98,34	0,0134	1,3358	a 0,0605	16,52	0,0055	0,0542	0,0767	0,0909	9,0909
Sin Aur 6	8,52	8,3	784	b 90,95	0,0368	3,6820	b 0,5513	1,81	0,0385	0,4343	0,5748	0,0698	6,9835
Con Aur 6	8,66	8,3	819	b 88,46	0,0685	6,8475	b 0,4052	2,47	0,0455	0,2984	0,4713	0,1123	11,2290
Inicial Esp1	9,71	8,3	1779	a 99,52	0,0078	0,7765	a 0,0784	12,75	0,0041	0,0686	0,0849	0,0523	5,2296
Sin Esp1	8,61	8,3	633	b 98,74	0,0068	0,6770	b 0,2368	4,22	0,0137	0,2140	0,2716	0,0579	5,7855
Con Esp1	8,56	8,3	684	b 91,90	0,0101	1,0142	b 0,2289	4,36	0,0099	0,2025	0,2428	0,0433	4,3250
Inicial TP9	8,88	8,3	1555	a 99,39	0,0084	0,8443	a 0,0748	13,36	0,0105	0,0564	0,0925	0,1404	14,0374
Sin TP9	8,29	8,3	535	b 89,30	0,0654	6,5414	b 0,5481	1,82	0,0784	0,3600	0,6558	0,1430	14,3040
Con TP9	8,45	8,3	619	b 94,59	0,0208	2,0788	b 0,5696	1,76	0,0404	0,4837	0,6370	0,0709	7,0927
Inicial Consorcio	9,01	8,3	1685	a 97,94	0,0062	0,621	a 0,2052	4,873	0,0063	0,1941	0,2186	0,031	3,07
Sin Consorcio	7,99	8,3	836	b 93,05	0,0177	1,766	b 0,3925	2,55	0,0966	0,2341	0,5656	0,246	24,61
Con Consorcio	8,02	8,3	754	ab 95,43	0,0157	1,57	ab 0,2303	4,34	0,0334	0,1993	0,3364	0,145	14,503
Inicial Fases	8,97	8,3	1742	a 99,22	0,0036	0,3591	a 0,1814	5,52	0,0053	0,1696	0,1898	0,0292	2,9217
Tanda 4 Fases	7,85	8,3	602	b 75,73	0,0174	1,738	b 0,5143	1,94	0,096	0,2989	0,668	0,187	18,67
Continuo Fases	7,68	8,3	680	a 97,32	0,0057	0,5704	a 0,2123	4,71	0,021	0,1782	0,2627	0,0989	9,892
Vuelta 1 Fases	7,62	8,3	447	d 92,26	0,0116	1,1561	a 0,145	6,89	0,0026	0,1392	0,1494	0,0179	1,793

El comportamiento descrito coincide para el parámetro EC_{10}^2 (tabla 6.7) salvo en el experimento donde se inocula la cepa Esp1, en el que se observa como el tratamiento con menor toxicidad es cuando se realiza la inoculación y para el experimento con consorcio donde no se producen diferencias significativas entre tratamientos.

En el experimento en fases, los resultados obtenidos coinciden con lo observado en la DQO. El tratamiento con un valor de EC_{10}^2 significativamente más bajos es el de la fase de vuelta.

Se puede concluir que, a pesar de la reducción significativa de la DQO ejercida por el sistema fitorremediador, la toxicidad de las muestras es muy elevada y requerirían una gran dilución o una alta descontaminación para llegar a ser inocua para los organismos acuáticos.

Tabla 6.7. Valores de IC_{10}^2 de las muestras de agua de taladrina inicial y fitorremediada de los distintos ensayos de fitorremediación ensayados. En rojo se muestra el tratamiento de cada ensayo que presentó una menor biotoxicidad. Para cada ensayo, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

24 h	pH inicial	pH ensayo	DQO (ppm)	IC_{10}	Dilución necesaria	SD	IC_{Lower}	IC_{Upper}	CV	CV%
Inicial Esp14	9,43	8,3	1800	a 0,0258	38,75	0,0017	0,0217	0,0292	0,0659	6,5891
Sin Esp14	8,54	8,3	902	ab 0,0505	19,81	0,0177	0,0287	0,0814	0,3505	35,0495
Con Esp14	8,62	8,3	922	b 0,0964	10,37	0,0183	0,0793	0,1427	0,1898	18,9834
Inicial Aur 6	9,41	8,3	1726	a 0,0244	40,98	0,0006	0,0234	0,0260	0,0246	2,4590
Sin Aur 6	8,52	8,3	784	b 0,1687	5,92	0,0103	0,1460	0,1896	0,0611	6,1055
Con Aur 6	8,66	8,3	819	b 0,1357	7,36	0,0147	0,1033	0,1601	0,1083	10,8327
Inicial Esp1	9,71	8,3	1779	a 0,0254	39,37	0,0035	0,0154	0,0301	0,1378	13,7795
Sin Esp1	8,61	8,3	633	b 0,1454	6,88	0,0187	0,0904	0,1506	0,1286	12,8611
Con Esp1	8,56	8,3	684	b 0,1458	6,85	0,0201	0,0868	0,1484	0,1379	13,7860
Inicial TP9	8,88	8,3	1555	a 0,0286	34,96	0,0051	0,0235	0,0421	0,1783	17,8322
Sin TP9	8,29	8,3	535	b 0,1782	5,61	0,0452	0,1109	0,3065	0,2536	25,3648
Con TP9	8,45	8,3	619	b 0,1859	5,38	0,0295	0,1644	0,2814	0,1587	15,8687
Inicial Consorcio	9,01	8,3	1685	0,141	7,09	0,0078	0,1039	0,1433	0,055	5,532
Sin Consorcio	7,99	8,3	836	0,1553	6,43	0,0162	0,0995	0,1744	0,104	10,43
Con Consorcio	8,02	8,3	754	0,092	10,87	0,0103	0,0813	0,1195	0,112	11,196
Inicial Fases	8,97	8,3	1742	a 0,1091	9,16	0,015	0,0877	0,1341	0,137	13,749
Tanda 4 Fases	7,85	8,3	602	a 0,1053	9,50	0,0152	0,0877	0,14	0,144	14,435
Continuo Fases	7,68	8,3	680	a 0,0899	11,12	0,016	0,0538	0,129	0,178	17,798
Vuelta 1 Fases	7,62	8,3	447	c 0,0396	25,25	0,0099	0,0252	0,0645	0,25	25

En la figura 6.50 se observa el estado de la cianobacteria después de 24 horas en contacto con el agua de taladrina inicial o fitorremediada.

Las cadenas de la *Anabaena sp.* en contacto con el agua de taladrina inicial son cortas y no emiten luminiscencia en toda su longitud (figura 6.50A y B).

Cuando la *Anabaena sp.* estuvo en contacto con el agua de taladrina fitorremediada se observaron síntomas de estrés, apareciendo agrupadas (figura 6.50C y E). Se observa que en estas muestras la luminiscencia emitida es baja (figura 6.50D y F).

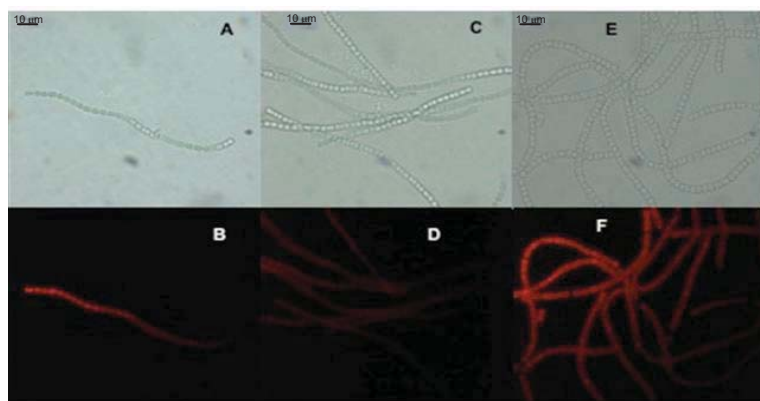


Figura 6.50. Fotografías de *Anabaena sp.* PCC7120 en el agua de taladrina inicial (**A** y **B**) y en el agua de taladrina fitorremediada (**C**, **D**, **E** y **F**) realizadas con un aumento 40 X en un microscopio olympus BH-2 y con una cámara Leica DCF300 FX.

6.8.2. Análisis de la toxicidad sobre plantas de maíz: Sistema fitorremediador

En segundo lugar se realizó un estudio de la toxicidad utilizando un nuevo sistema de fitorremediación que llevaba 15 días creciendo en agua del grifo con Hoagland y que en ningún momento había estado en contacto con el agua de taladrina. Este estudio se realizó sólo con los experimentos en los que se inoculó la bacteria y se dejaron las plantas durante 5 días en contacto con el agua de taladrina fitorremediada (apartado 5.6.2).

El primer parámetro estudiado fue el F_o . El comportamiento de este parámetro fue común para todos los sistemas de fitorremediación y en él no se observaron diferencias significativas, pero sí se observa una tendencia ascendente en los tratamientos con agua de taladrina sin bacteria y descendente en dichos tratamientos cuando se inocula.

También se estudió la variación del parámetro F_v/F_m . El comportamiento observado en este parámetro dependió del tipo de cepa inoculada. Así, cuando se inoculó la levadura, la cepa TP9 o el consorcio no se observaron diferencias significativas (figura 6.51A).

Sin embargo, cuando se inocularon las cepas Aur 6 y Esp1 se observó una disminución significativa de este parámetro al inocular la bacteria en los controles, pero en las plantas tratadas con agua de taladrina tampoco se observaron diferencias significativas (figura 6.51B), obteniéndose una tendencia ascendente cuando se inocularon las plantas.

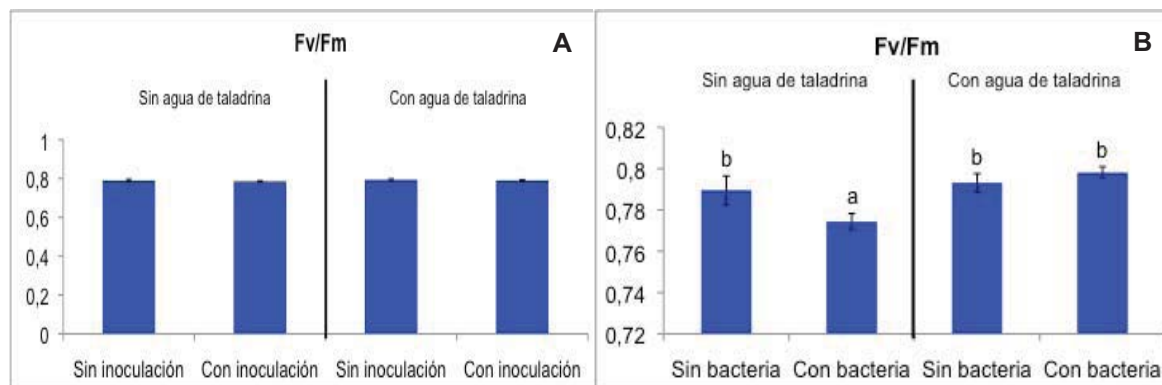


Figura 6.51. A - Efecto del agua de taladrina fitorremediada durante 5 días en el parámetro F_v/F_m del sistema fotosintético de las plantas de maíz inoculadas con la bacteria TP9, con la levadura Esp14 y con el consorcio bacteriano. **B** - Efecto del agua de taladrina fitorremediada durante 5 días en el parámetro F_v/F_m del sistema fotosintético de las plantas de maíz inoculadas con las bacterias Aur 6 y Esp1. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Un tercer parámetro estudiado fue el ϕ PSII. En la figura 6.52A se muestra el comportamiento de este parámetro con la cepa TP9. Se produce una disminución del mismo en presencia del agua de taladrina, siendo significativa cuando se inocula la bacteria. Además, se observa un incremento significativo del mismo en los controles cuando se inocula.

En la figura 6.52B se muestra el comportamiento del parámetro ϕ PSII cuando se inoculan las cepas Aur 6, Esp14 y consorcio. No se observan diferencias significativas entre los tratamientos, pero sí se produce una ligera disminución en los tratamientos con agua de taladrina sin bacteria frente a los controles, mientras que se observa un ligero aumento en los tratamientos con agua de taladrina y bacteria.

Sin embargo, cuando se inoculó la cepa Esp1 se observó un incremento significativo de este parámetro en los tratamientos con agua de taladrina y bacteria (figura 6.52C) y también una tendencia descendente entre los tratamientos con agua de taladrina sin bacteria frente a los controles sin bacteria.

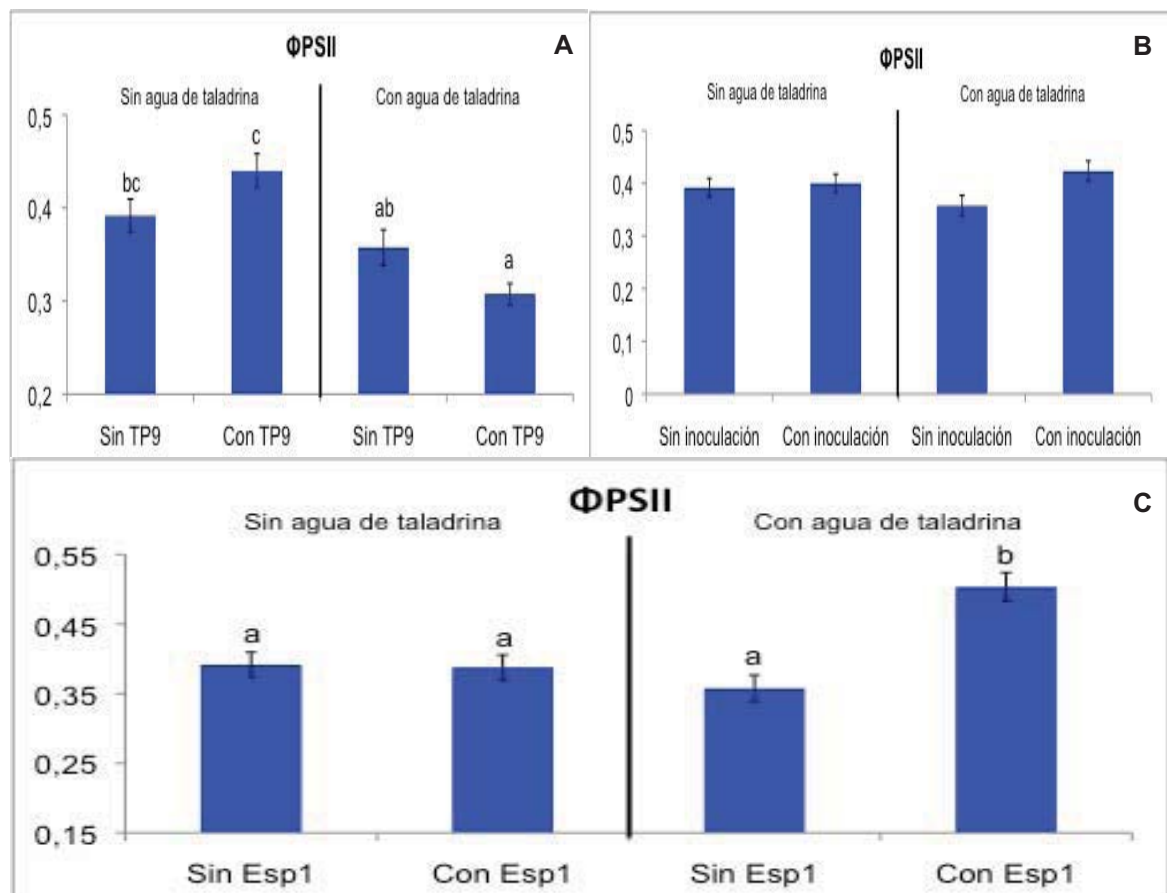


Figura 6.52. **A** - Efecto del agua de taladrina fitorremediada durante 5 días en el parámetro ϕ PSII del sistema fotosintético de las plantas de maíz inoculadas con la cepa TP9. **B** - Efecto del agua de taladrina fitorremediada durante 5 días en el parámetro ϕ PSII del sistema fotosintético de las plantas de maíz inoculadas con las cepas Aur 6, Esp14 y consorcio. **C** - Efecto del agua de taladrina fitorremediada durante 5 días en el parámetro ϕ PSII del sistema fotosintético de las plantas de maíz inoculadas con la cepa Esp1. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Finalmente, se estudió el NPQ. En la figura 6.53A se observa como este parámetro sufre un incremento no significativo en los controles cuando se inocula la cepa TP9, pero sin embargo se produce un descenso significativo en los tratamientos con agua de taladrina cuando se realiza la inoculación. Además, se observa un ligero descenso en el tratamiento con agua de taladrina sin bacteria frente al control sin bacteria.

En la figura 6.53B se muestra el comportamiento de este parámetro con la cepa Esp1. No se observan diferencias significativas, pero sí se produce un incremento al inocular la bacteria, tanto en los controles como en las muestras con agua de taladrina.

Cuando se realizó la inoculación de las cepas Aur 6 y Esp14 tampoco se observaron diferencias significativas, pero sí se produjo una disminución del valor del mismo cuando se inoculó en los controles y un aumento cuando se inoculó en las muestras de agua de taladrina (figura 6.53C).

Finalmente, cuando se inoculó el consorcio se produjo un incremento significativo del valor de NPQ tanto en los controles como en los tratamientos con agua de taladrina (figura 6.53D).

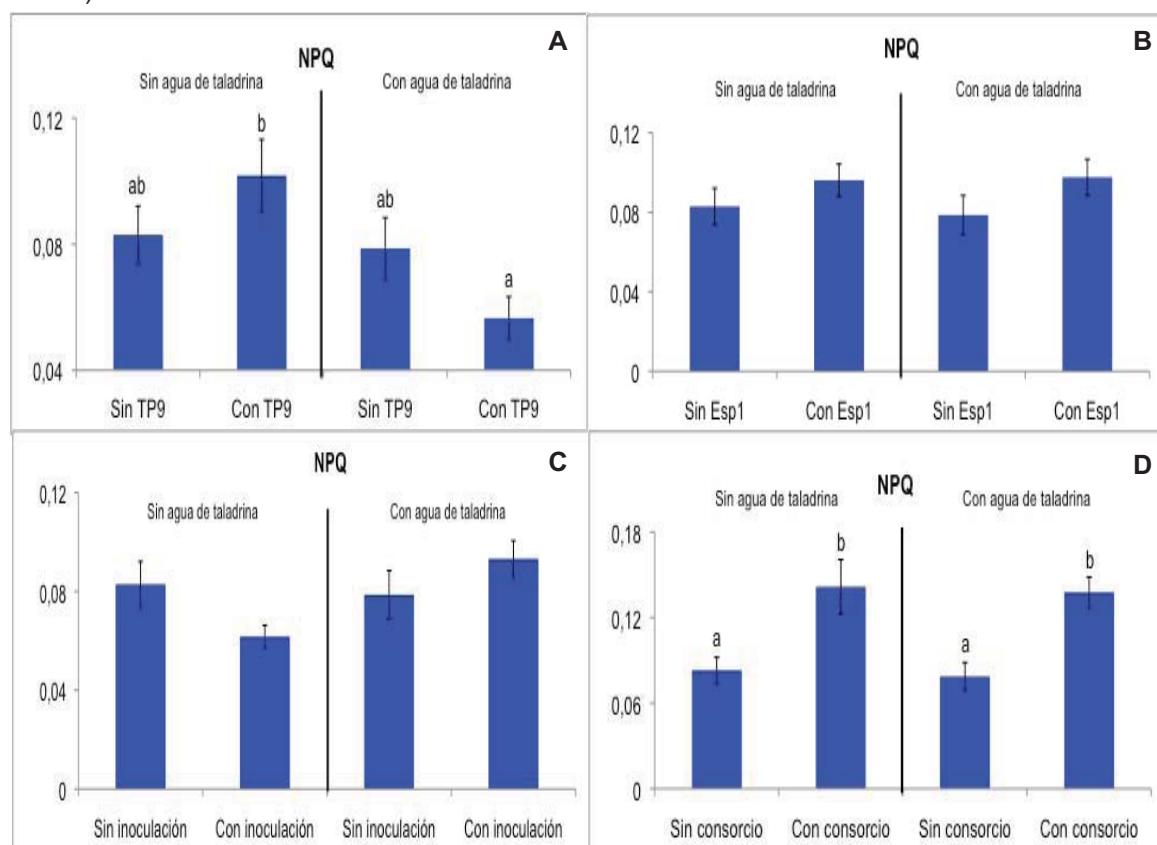


Figura 6.53. A - Efecto del agua de taladrina fitorremediada durante 5 días en el parámetro NPQ del sistema fotosintético de las plantas de maíz inoculadas con la cepa TP9. B - Efecto del agua de taladrina fitorremediada durante 5 días en el parámetro NPQ del sistema fotosintético de las plantas de maíz inoculadas con la cepa Esp1. C - Efecto del agua de taladrina fitorremediada durante 5 días en el parámetro NPQ del sistema fotosintético de las plantas de maíz inoculadas con las cepas Aur 6 y Esp14. D - Efecto del agua de taladrina fitorremediada durante 5 días en el parámetro NPQ del sistema fotosintético de las plantas de maíz inoculadas con el consorcio. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

6.9. Análisis ultraestructural de hojas y raíces de maíz tras fitorremediar el agua de taladrina

6.9.1. Visualización de hojas

6.9.1.1. Microscopía óptica de campo claro

En la figura 6.54 se muestran las fotografías obtenidas con el microscopio óptico de las secciones de hojas de maíz procedentes de los distintos tratamientos.

En los controles (figura 6.54A y 6.54C) se observa la estructura normal de la hoja donde los haces vasculares y el mesófilo se disponen alternativamente. Los haces vasculares aparecen rodeados de las denominadas células acompañantes de los haces vasculares (Puertas-Mejía *et al.*, 2010) con numerosos cloroplastos. En las células de la epidermis se aprecian numerosos estomas.

En dicha figura parece observarse una disminución en el número de cloroplastos de las muestras tratadas con agua de taladrina (6.54B y 6.54D). En el tratamiento sin bacteria (6.54B) parece que la reducción se da tanto en las células del mesófilo como en las células acompañantes de los haces vasculares. Sin embargo, en el tratamiento con bacteria (6.54D) parece que la disminución de los cloroplastos se produce fundamentalmente en las células del mesófilo, pudiendo distinguir estos orgánulos en las células acompañantes de los haces vasculares.

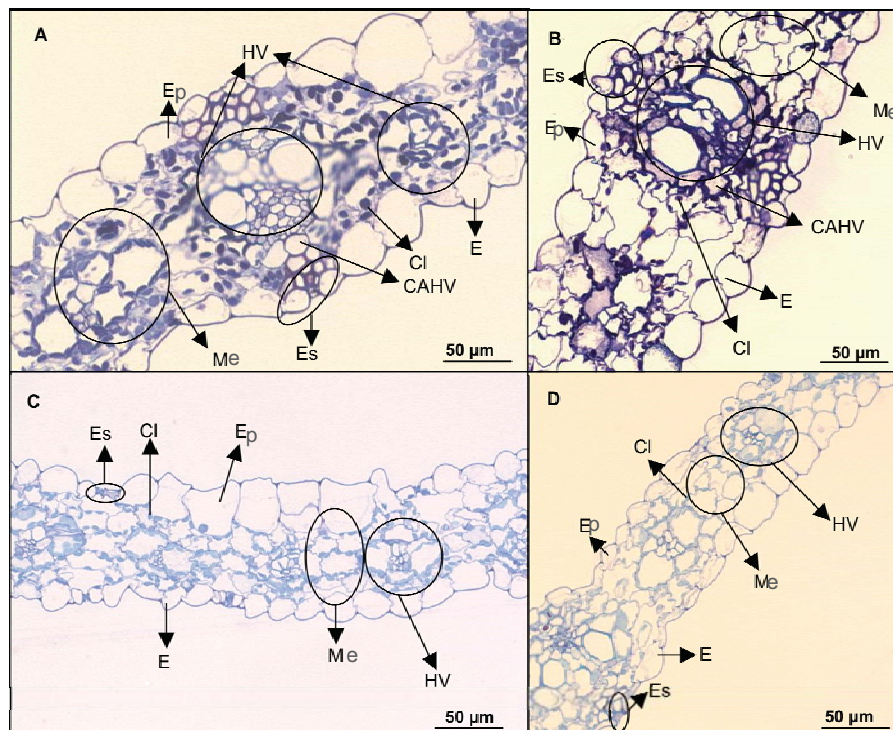


Figura 6.54. Imágenes realizadas al microscopio óptico de la hoja de plantas de maíz. **A** - Control sin Aur 6, **B** - agua de taladrina sin Aur 6, **C** - control con Aur 6, **D** - agua de taladrina con Aur 6. Células Acompañantes de los Haces Vasculares (CAHV), Cloroplastos (Cl), Epidermis (Ep), Estoma (Es), Haces Vasculares (HV) y Mesófilo (Me).

La figura 6.55 muestra con un mayor detalle las preparaciones de la hoja de maíz. Como se comentó en la figura anterior, parece que el agua de taladrina disminuye el número de cloroplastos de las células del mesófilo y de las células acompañantes de los haces vasculares (6.55C, 6.55D, 6.55G y 6.55H).

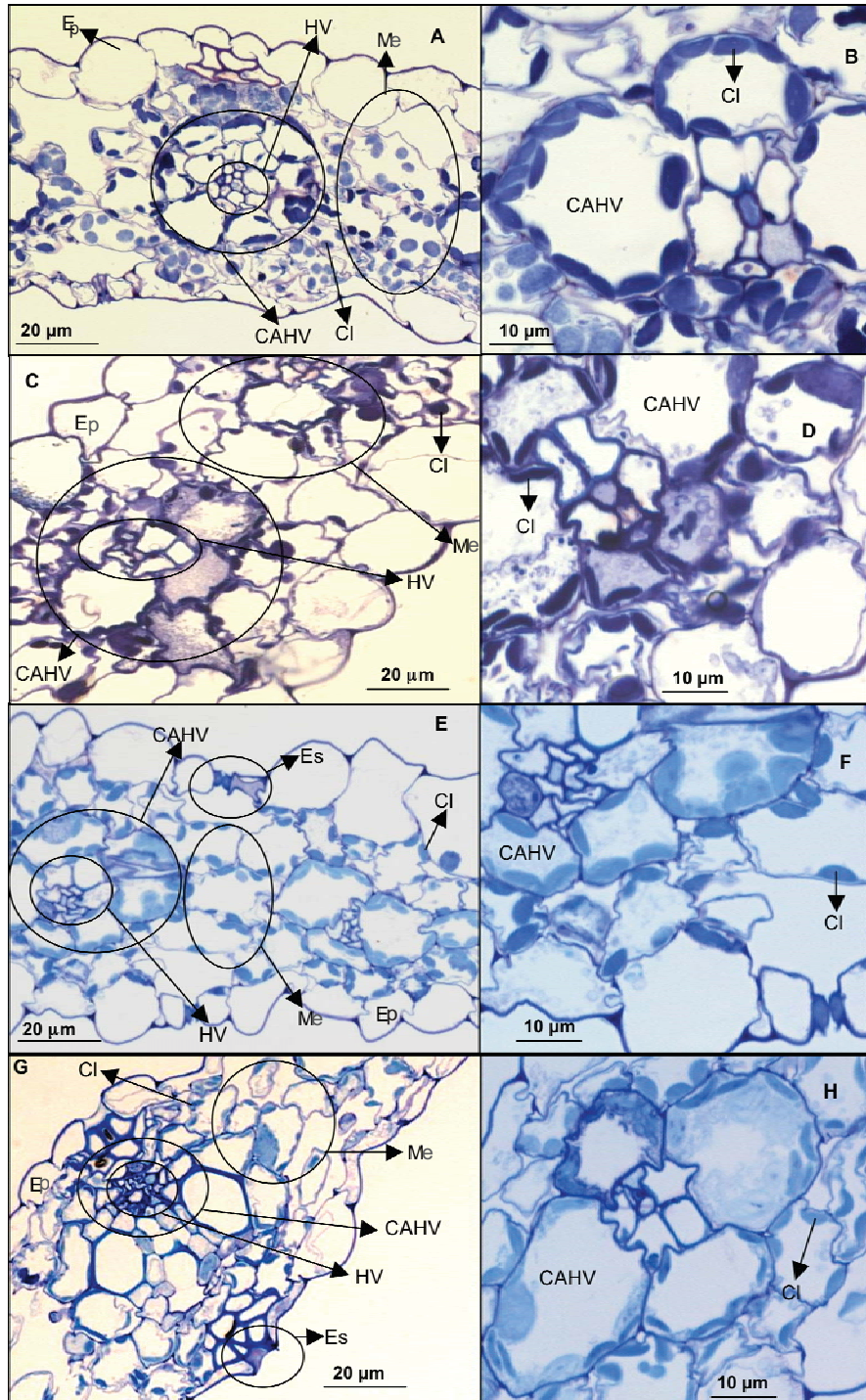


Figura 6.55. Imágenes realizadas al microscopio óptico de la hoja de plantas de maíz control sin Aur 6 (A, B), con agua de taladrina y sin Aur 6 (C, D), control con Aur 6 (E, F) y con agua de taladrina y con Aur 6 (G, H). Células Acompañantes de los Hazes Vasculares (CAHV), Cloroplasto (Cl), Epidermis (Ep), Estoma (Es), Haz Vascular (HV) y Mesófilo (Me).

6.9.1.2. Microscopía electrónica de transmisión

La figura 6.56 muestra el estado de algunos orgánulos celulares y del núcleo en los tratamientos sin agua de taladrina y con agua de taladrina, en ambos casos sin bacteria. La figura 6.57 muestra el estado de los tratamientos sin agua de taladrina y con agua de taladrina, en ambos casos con bacteria. La estructura celular se mantiene en el caso de la pared celular, la membrana plasmática y los plasmodesmos, independientemente del tratamiento.

En el caso de los controles (tanto con bacteria como sin ella) se observan dos tipos de cloroplastos: uno donde se ven lamelas alargadas que ocupan toda la extensión del cloroplasto (figuras 6.56A y 6.57A) y otro cloroplasto con apilamientos de grana e intergrana como los observados en el rábano por Meier y Lichtenthaler, 1981 (figuras 6.56B y 6.57B). Los cloroplastos del control sin bacteria no presentan síntomas de senescencia (figura 6.56A y 6.56B), mientras que en el cloroplasto del control con bacteria se pueden observar plastoglóbulos y gránulos lipídicos (figura 6.57B).

En los tratamientos con agua de taladrina no se aprecian diferencias entre las muestras sin bacteria y las muestras con bacteria. En todas ellas se observan síntomas de senescencia precoz: se produce un hinchamiento de los tilacoides y una separación de las lamelas, dejando espacios entre ellas (figura 6.56C y 6.56D, figura 6.57C y 6.57E). También se observa la aparición de plastoglóbulos (figura 6.56F y figura 6.57E), los cloroplastos comienzan a degradarse por los extremos apareciendo muy alargados, lo cual es un síntoma de degeneración cloroplástica (figura 6.56C y 6.56E, figura 6.57C y 6.57E) e incluso se produce una degradación de la membrana del cloroplasto (figura 6.56F, figura 6.57F).

A diferencia de los controles (figura 6.56A y figura 6.57A), las mitocondrias observadas en los tratamientos con agua de taladrina también presentan signos de degradación (figura 6.56F y figura 6.57C, 6.57D y 6.57E). Otro síntoma de senescencia presente en los tratamientos con agua de taladrina sin bacteria (figura 6.56F) son las vesículas.

En todos los tratamientos se observa como los cloroplastos presentan pocos gránulos de almidón (figuras 6.56A y figura 6.57A, 6.57D, 6.57E y 6.57F).

Finalmente, si se observa el núcleo en los tratamientos sin bacteria no parece que haya degradación del mismo, presentando un nucleolo activo tanto en el control sin bacteria (figura 6.56B) como en el tratamiento con agua de taladrina sin bacteria (figura 6.57C).

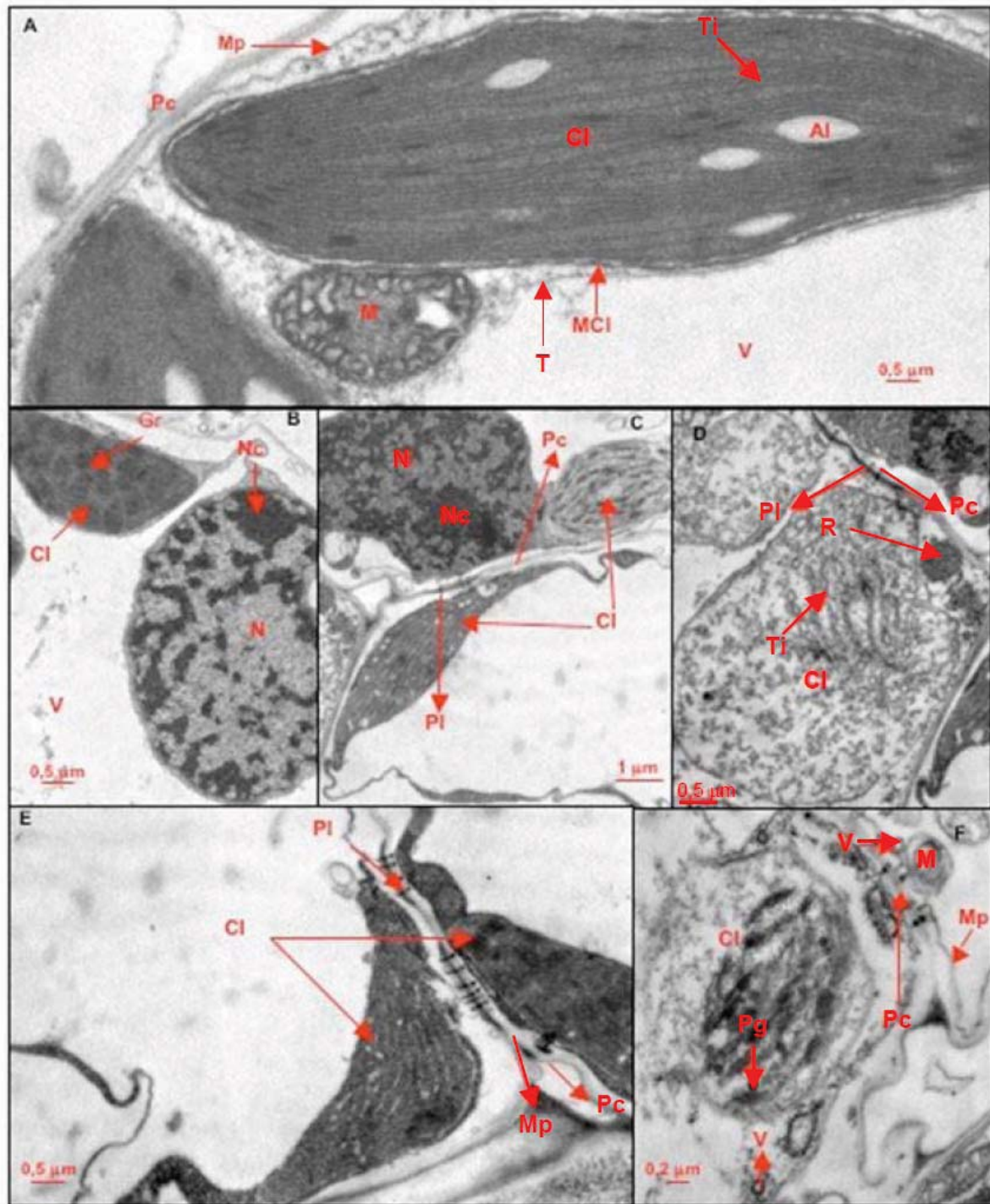


Figura 6.56. Imágenes realizadas al microscopio electrónico de transmisión de la hoja de plantas de maíz controles sin Aur 6 (A y B) y con agua de taladrina y sin Aur 6 (C, D, E y F). Almidón (AI), Cloroplasto (CI), Grana (Gr), Membrana plasmática (Mp), Membrana del Cloroplasto (MCI), Mitocondria (M), Núcleo (N), Nucleolo (Nc), Pared celular (Pc), Plasmodesmos (PI), Plastoglóbulos (Pg), Ribosomas (R), Tonoplasto (T), Tilacoides (Ti), Vacuola (V) y Vesículas (Ve).

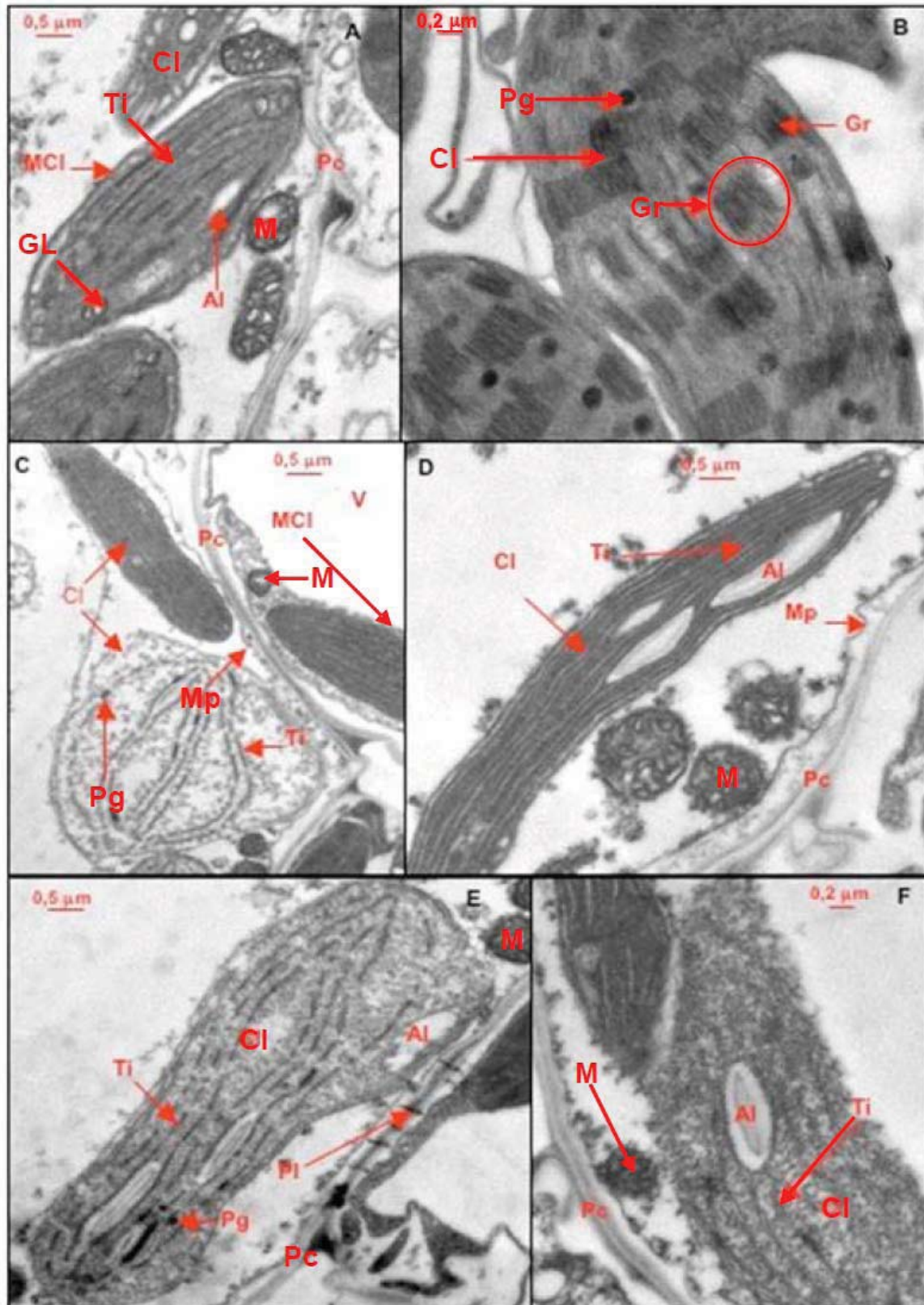


Figura 6.57. Imágenes realizadas al microscopio electrónico de transmisión de la hoja de plantas de maíz controles con Aur 6 (A y B) y con agua de taladrina y con Aur 6 (C, D, E y F). Almidón (Al), Cloroplasto (CI), Grana (Gr), Gránulos lipídicos (GL), Membrana del Cloroplasto (MCI), Membrana plasmática (MP), Mitochondria (M), Pared celular (Pc), Plasmodesmos (PI), Plastoglóbulos (Pg), Tilacoides (Ti) y Vacuola (V).

6.9.1.3. Microscopía electrónica de barrido

En la figura 6.58 se observa una muestra de hoja de maíz procedente de los distintos tratamientos.

En ella se puede ver como el agua de taladrina produce cambios en el contenido hídrico de las hojas (6.58B y 6.58D). Parece que el agua de taladrina disminuye el contenido vacuolar, reduciendo el turgor celular, dando un aspecto más denso en los tratamientos con agua de taladrina (6.58B y 6.58D) frente a los controles (6.58A y 6.58C).

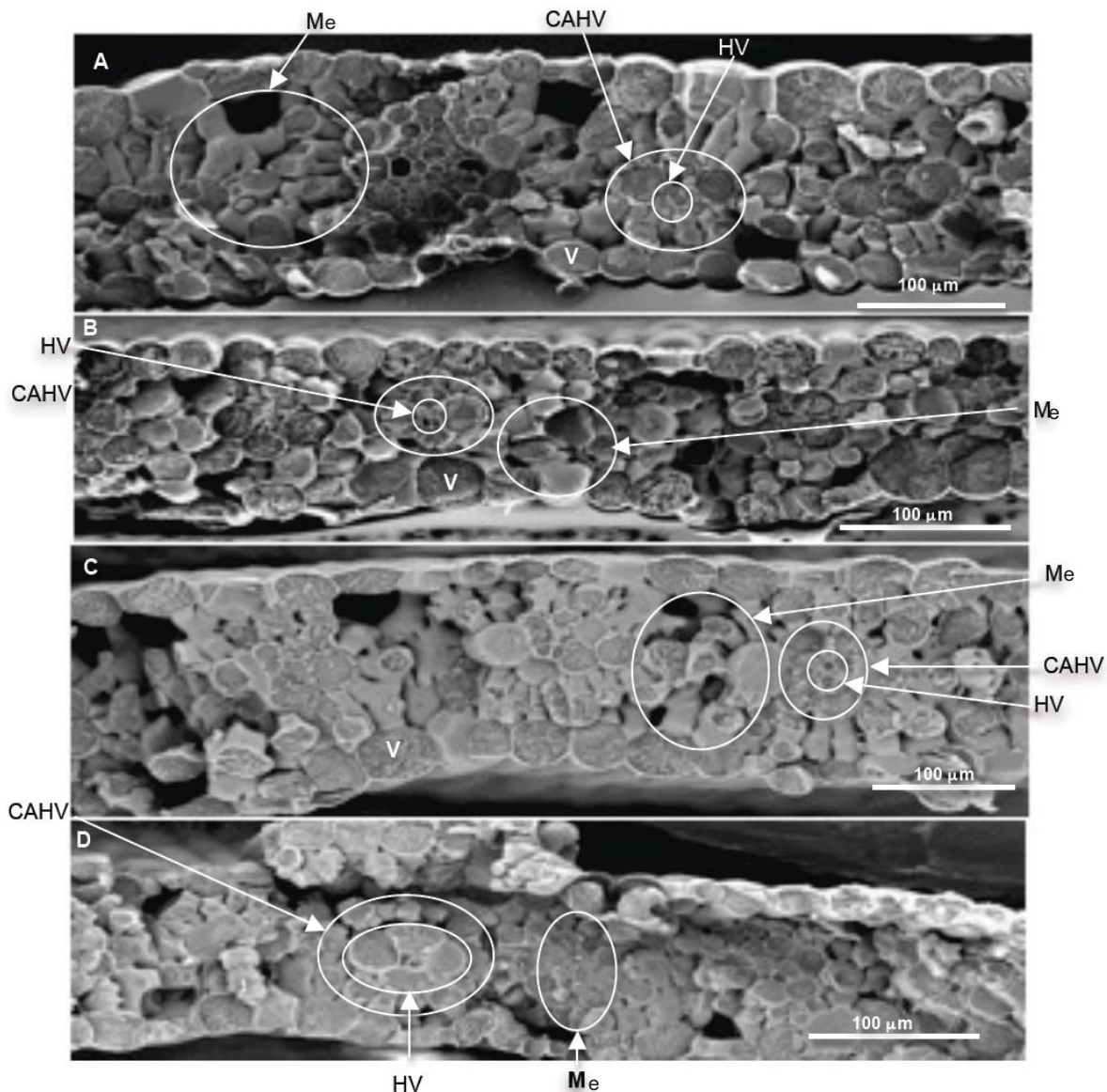


Figura 6.58. Imágenes realizadas al microscopio electrónico de barrido de la hoja de plantas de maíz control sin Aur 6 (A), con agua de taladrina y sin Aur 6 (B), control con Aur 6 (C), y con agua de taladrina y con Aur 6 (D). Células acompañantes de los haces vasculares (CAHV), Haces Vasculares (HV), Mesófilo (Me) y Vacuola (V).

En la figura 6.59 se presentan las mismas muestras de hojas de maíz pero con más detalle. Parece que, como ya se había observado por microscopía óptica, el número de cloroplastos disminuye significativamente en los tratamientos con agua de taladrina (6.59C, 6.59D, 6.59G y 6.59H) frente a los controles (6.59A, 6.59B, 6.59E y 6.59F), también parece que la bacteria Aur 6 protege a la planta porque en las muestras con contaminante donde se ha inoculado esta bacteria (6.59G y 6.59H) se puede observar un mayor número de cloroplastos que en las muestras con contaminante donde no se ha inoculado (6.59C y 6.59D).

Como se comentó en la figura anterior, parece que el contenido vacuolar es más denso en las hojas de las plantas tratadas con agua de taladrina (6.59C, 6.59D, 6.59G y 6.59H) frente a los controles (6.59A, 6.59B, 6.59E y 6.59F). Principalmente en los tratamientos con contaminante sin bacteria (figura 6.59D), se puede observar como los cloroplastos quedan confinados entre el tonoplasto y la pared celular, reduciéndose al mínimo el espacio citoplasmático. A su vez, se observa una acumulación de residuos en el citoplasma de los tratamientos con contaminante, principalmente cuando se inocula la bacteria (6.59H), posiblemente estos restos procedan de la degradación de los orgánulos.

Por otra parte, se puede observar un cambio en el contenido vacuolar en todos los tratamientos frente al control sin bacteria (6.59A y 6.59B). De esta manera, en dicho control (6.59A y 6.59B) se aprecia una organización laminar del contenido de la vacuola con un cierto espaciado entre las láminas, mientras que en el resto de los tratamientos algunas células presentan un contenido vacuolar cristalizado (6.59D y 6.59F) y también aparece un contenido laminado pero sin espacio entre láminas (6.59D y 6.59H).

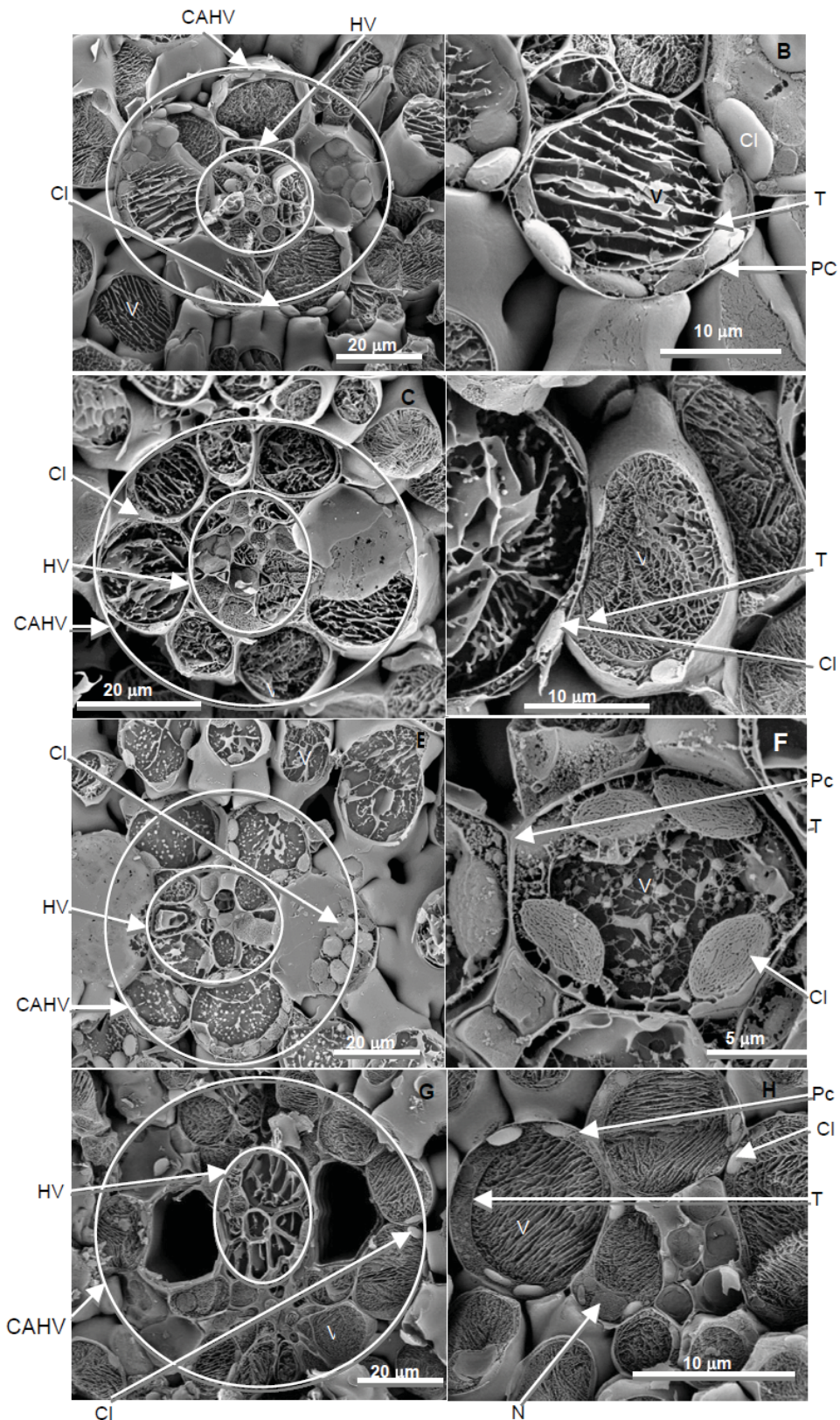


Figura 6.59. Imágenes realizadas al microscopio electrónico de barrido de la hoja de plantas de maíz control sin Aur 6 (A y B), con agua de taladrina y sin Aur 6 (C y D), control con Aur 6 (E y F) y con agua de taladrina y con Aur 6 (G y H). Células Acompañantes de los Haces Vasculares (CAHV), Cloroplasto (CI), Haces Vasculares (HV), Núcleo (N), Pared Celular (PC), Tonoplasto (T) y Vacuola (V).

6.9.2. Visualización de raíces

6.9.2.1. Microscopía óptica de campo claro

En la figura 6.60 se muestran distintas imágenes de la raíz del maíz tratadas con agua de taladrina. En los controles (6.60A, 6.60B, 6.60C, 6.60G, 6.60H, 6.60I) se observa la estructura radicular en la que se distinguen el parénquima cortical formado por varias capas de células turgentes y grandes espacios intercelulares. En el cilindro central se encuentran los haces vasculares.

El tratamiento con agua de taladrina (6.60D, 6.60E, 6.60F, 6.60J, 6.60K, 6.60L) produce una pérdida de turgor del parénquima cortical que da lugar a una degeneración de las células corticales. Se observa una deformación de las paredes celulares de las células del parénquima, las cuales muestran una estructura sinuosa. Además disminuye el tamaño de los espacios intercelulares del parénquima dando a este tejido un aspecto más compactado. Sin embargo, parece que el contaminante no afecta demasiado a la estructura de los haces vasculares, porque no se aprecian diferencias entre la estructura de los controles (6.60A y 6.60G) respecto a la estructura de los tratamientos con agua de taladrina (6.60D y 6.60J).

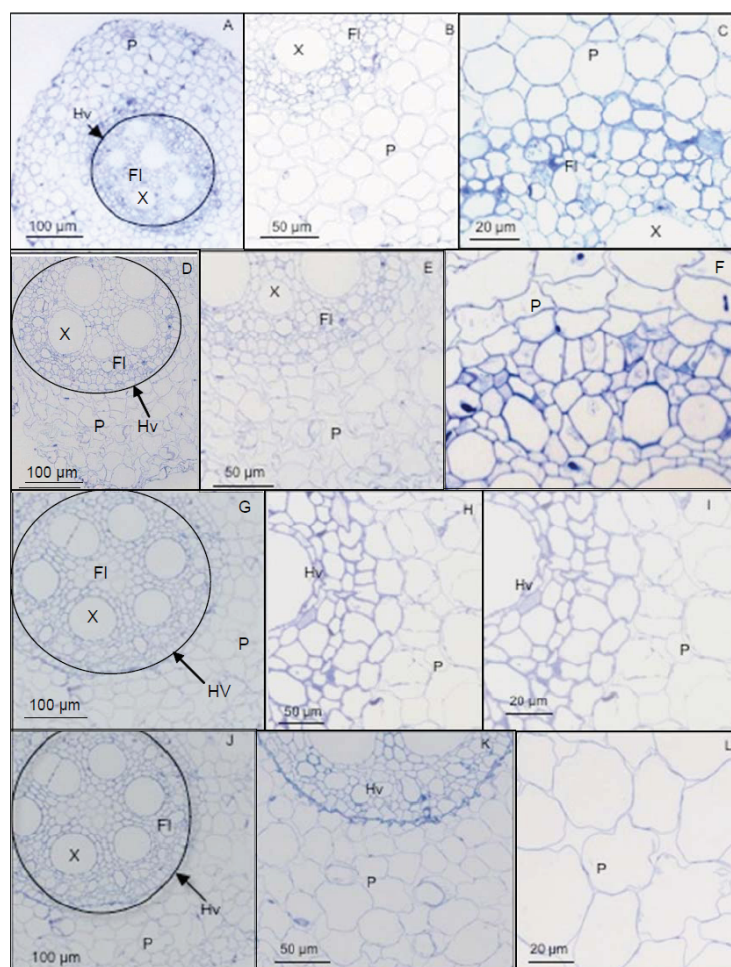


Figura 6.60. Imágenes realizadas al microscopio óptico de raíces de maíz en distintos tratamientos: control sin Aur 6 (A, B, C), agua de taladrina sin Aur 6 (D, E, F), control con Aur 6 (G, H, I) y agua de taladrina con Aur 6 (J, K, L). Floema (FI), Haces Vasculares (HV), Parénquima (P) y Xilema (X).

6.9.2.2. Microscopía electrónica de transmisión

En las figuras 6.61 y 6.62 se muestra la ultraestructura de las células de la raíz en los distintos tratamientos.

Se observa que los controles están muy activos mostrando la típica estructura celular, donde se pueden distinguir diferentes orgánulos vegetales (figura 6.61A y 6.62A) y un núcleo donde se puede diferenciar el nucleolo (figura 6.61B y 6.62B). En el control sin bacteria se observa una vacuola muy grande que desplaza hacia la pared celular todo el contenido (figura 6.62A).

Sin embargo, en los tratamientos con agua de taladrina (figuras 6.61C y 6.61D; figura 6.62C, 6.62D, 6.62E y 6.62F) las células están muy deterioradas, sin apenas poder diferenciar los distintos orgánulos celulares. Además, aparecen vesículas degenerativas (figura 6.61C; figura 6.62C, 6.62E y 6.62F).

Parece que la inoculación de la bacteria en los tratamientos con agua de taladrina disminuye en parte los daños causados por el contaminante, observándose una menor degeneración de los orgánulos (figura 6.61C y 6.61D).

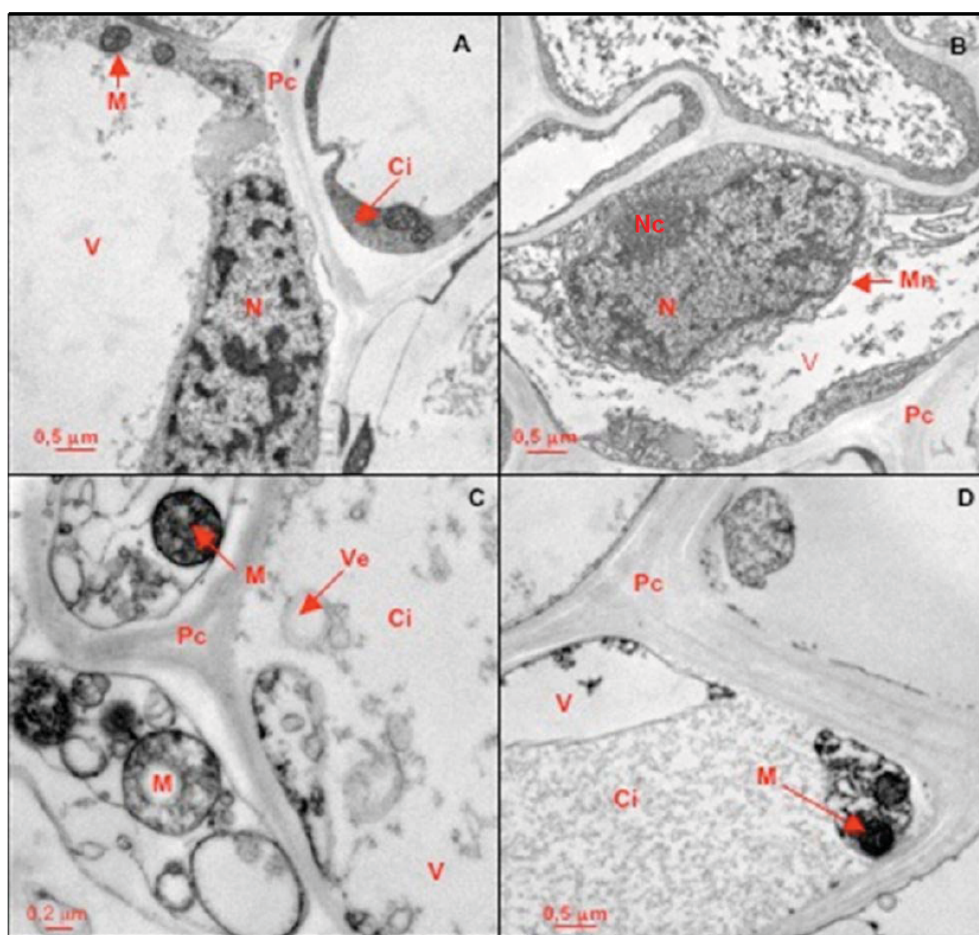


Figura 6.61. Imágenes realizadas al microscopio electrónico de transmisión de la raíz de plantas de maíz control con Aur 6 (A y B) y con agua de taladrina y con Aur 6 (C y D). Citoplasma (Ci), Membrana nuclear (Mn), Mitocondria (M), Núcleo (N), Nucleolo (Nc), Pared celular (Pc), Vacuola (V) y Vesícula (Ve).

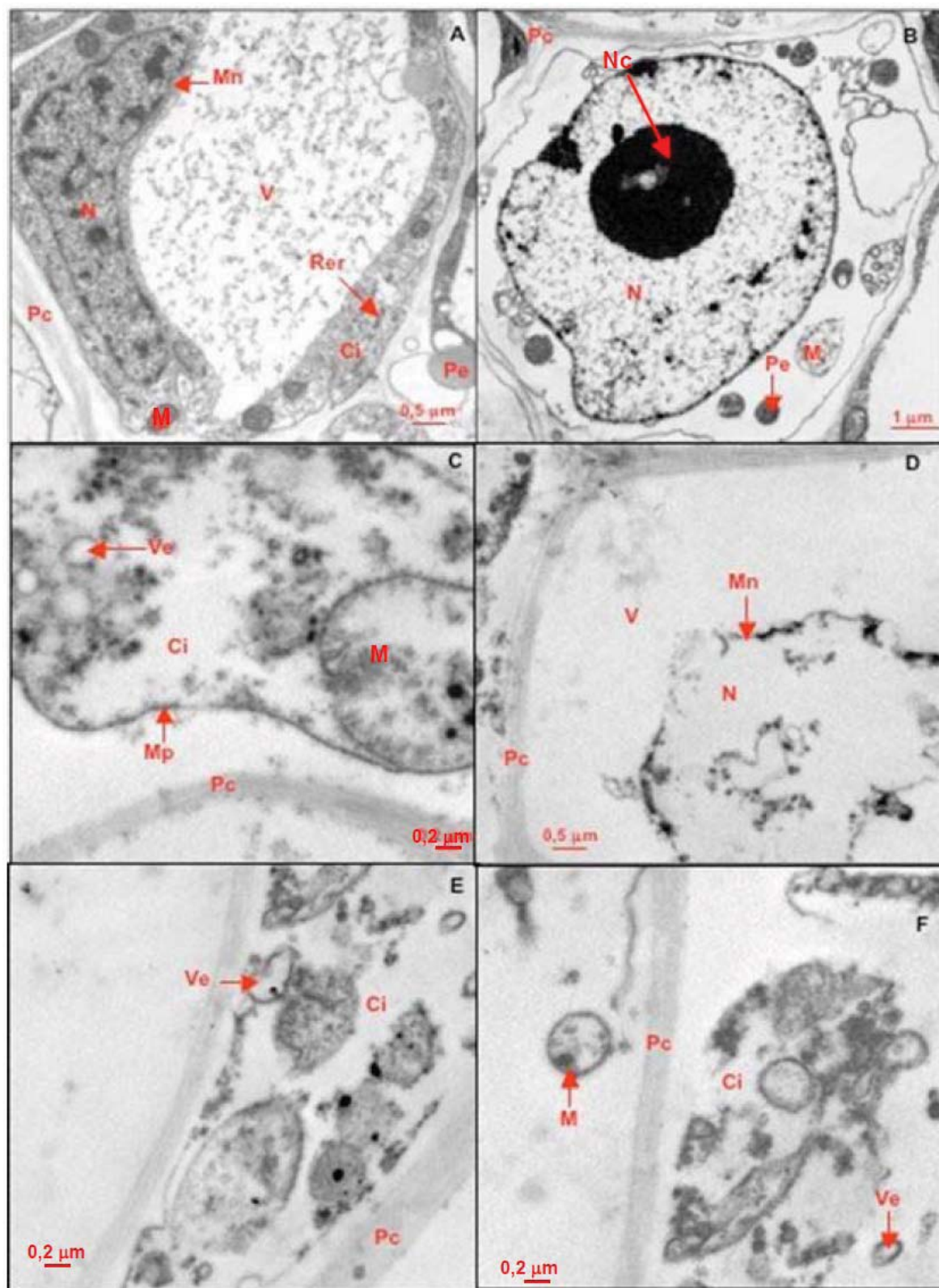


Figura 6.62. Imágenes realizadas al microscopio electrónico de transmisión de la raíz de plantas de maíz sin agua de taladrina y sin Aur 6 (A y B) y con agua de taladrina y sin Aur 6 (C, D, E y F). Citoplasma (Ci), Membrana nuclear (Mn), Membrana plasmática (Mp), Mitocondria (M), Núcleo (N), Nucleolo (Nc), Pared celular (Pc), Peroxisoma (Pe), Retículo endoplasmático rugoso (Rer), Vacuola (V) y Vesícula (Ve).

6.9.2.3. Microscopía electrónica de barrido

En la figura 6.63 se muestran las imágenes realizadas al microscopio electrónico de barrido de la raíz del maíz procedente de los distintos tratamientos.

No se observan diferencias entre los controles, con (6.63C) y sin bacteria (6.63A), pudiendo encontrar la estructura típica de una raíz de monocotiledónea.

Sin embargo, si se comparan los tratamiento con agua de taladrina (6.63B y 6.63D) frente a los controles (6.63A y 6.63C) se observa un gran deterioro de los primeros. La zona más dañada de la raíz es el parénquima (6.63B y 6.63D), donde se observa un gran número de células rotas, impidiendo en muchas zonas la identificación de las células. La zona del haz vascular presenta una menor deformación, lo que permite distinguir los dos tipos de vasos: xilema y floema. Además, en los tratamientos con agua de taladrina y con bacteria (6.63D), también se observa un deterioro de la cutícula de la raíz, lo que produce una estructura irregular de la misma, en vez de tener una estructura ovalada como en el resto de los tratamientos (6.63A, 6.63B y 6.63C).

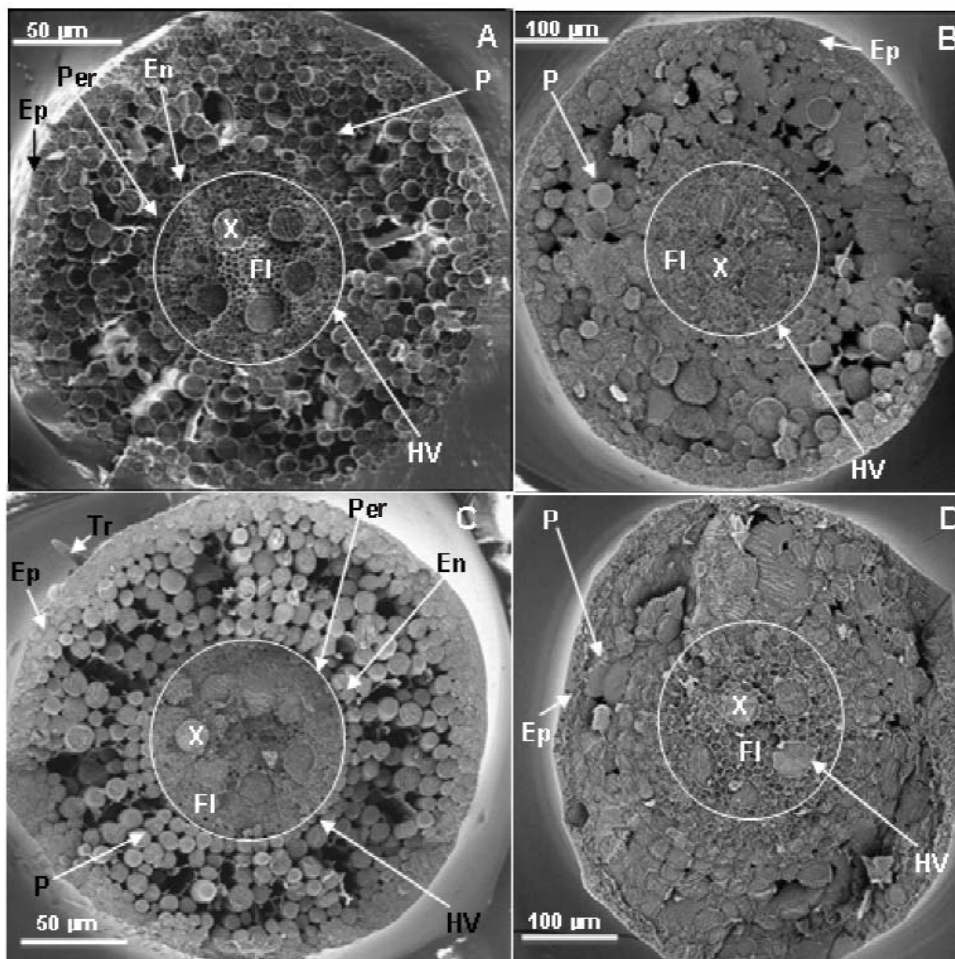


Figura 6.63. Imágenes realizadas al microscopio electrónico de barrido de la raíz de plantas de maíz sin agua de taladrina y sin Aur 6 (A), con agua de taladrina y sin Aur 6 (B), sin agua de taladrina y con Aur 6 (C), y con agua de taladrina y con Aur 6 (D). Epidermis (Ep), Endodermis (En), Floema (FI), Haz Vasculares (HV), Parénquima (P), Periciclo (Per), Tricoma (Tr) y Xilema (X).

En la figura 6.64 se muestra de forma más detallada las raíces de los distintos tratamientos.

Como se comentó en la figura anterior, no se observan diferencias en los controles (6.64A y 6.64C), mientras que se puede apreciar una gran degradación de las células del parénquima de los tratamientos con agua de taladrina (6.64B y 6.64D). Esta degradación parece mayor en el tratamiento donde se inoculó la bacteria (6.64D), en el que el número de células rotas parece mayor y además no se distingue el periciclo, es decir, no se distingue la separación entre los haces vasculares y el parénquima.

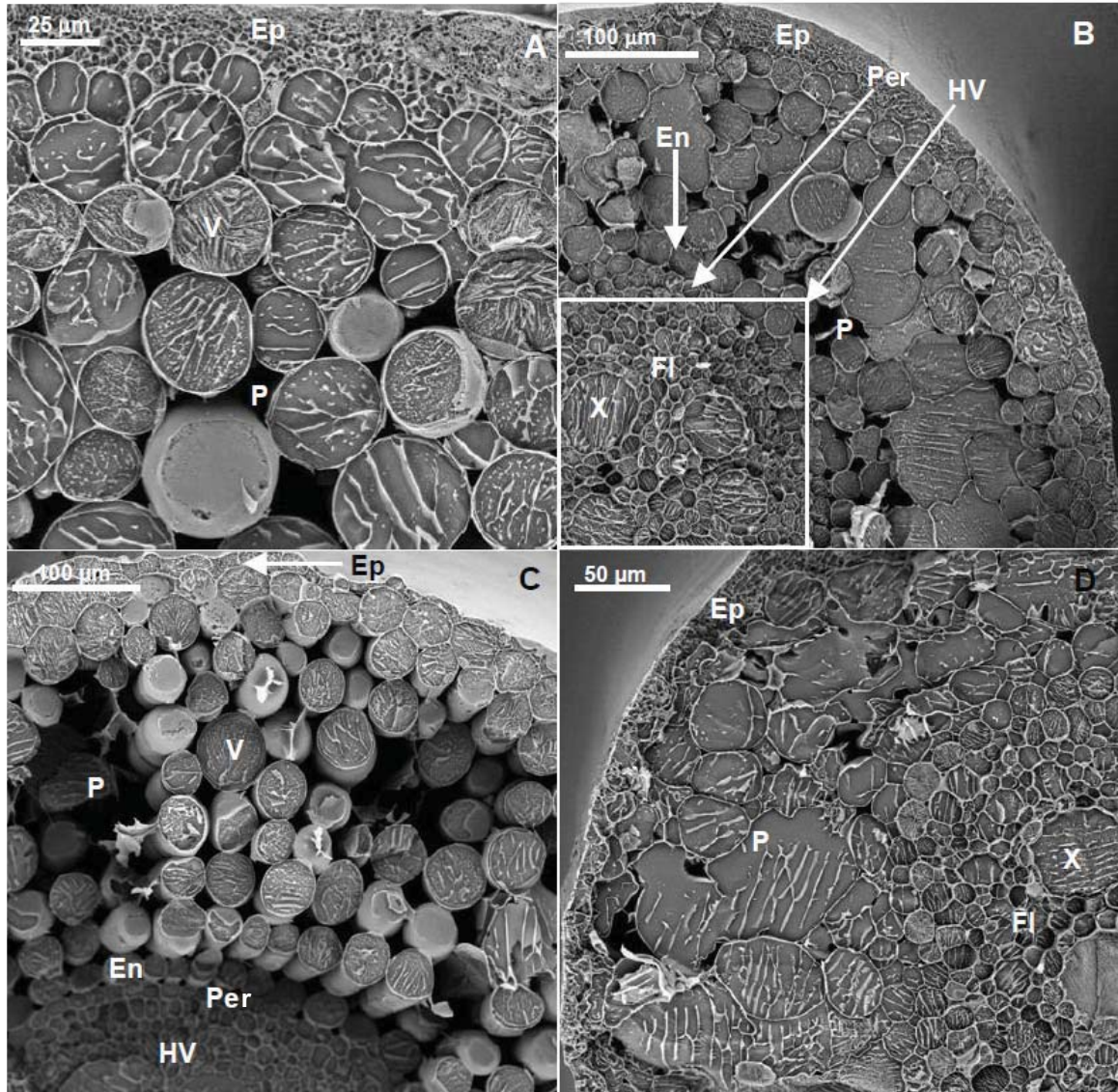


Figura 6.64. Imágenes realizadas al microscopio electrónico de barrido de la raíz de plantas de maíz sin agua de taladrina y sin Aur 6 (A), con agua de taladrina y sin Aur 6 (B), sin agua de taladrina y con Aur 6 (C), y con agua de taladrina y con Aur 6 (D). Epidermis (Ep), Endodermis (En), Floema (Fl), Haz Vascular (HV), Parénquima (P), Periciclo (Per), Vacuola (V) y Xilema (X).

6.10. Aportaciones a congresos

Los resultados obtenidos en los apartados 6.3, 6.4 y 6.5 se han presentado en el XIII National Meeting of the Spanish Society of Nitrogen Fixation, II Portuguese-Spanish Congress on Nitrogen Fixation y en la XIX Reunión de la sociedad española de Fisiología Vegetal. Los abstracts y pósters se muestran en el Anexo 19.

7. DISCUSIÓN: DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE SISTEMAS PLANTA-MICROORGANISMO PARA FITORREMIAR AGUA DE TALADRINA

En el capítulo 5 se presentaban dos objetivos principales: el primer objetivo fue el desarrollo de un sistema maíz-esparto-microorganismo capaz de reducir los valores de la demanda química de oxígeno (DQO) y el pH del agua de taladrina y valorar el efecto fisiológico sobre las plantas. El segundo objetivo consistió en el desarrollo de un sistema rentable que permita reutilizar las plantas en un segundo proceso de fitorremediación para así facilitar su aplicación en la industria. Junto a estos objetivos se quiso conocer la toxicidad real del agua de taladrina fitorremediada, para lo que se realizaron ensayos de toxicidad con una cianobacteria modelo y con el propio sistema fitorremediador. Finalmente, se quiso conocer el daño causado por el agua de taladrina en los distintos órganos de las plantas de maíz a nivel ultraestructural.

Como se vio en el capítulo 3, el agua de taladrina está formada por una gran variedad de compuestos orgánicos, incluyendo dos hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs). Este trabajo está encaminado al desarrollo de un sistema de fitorremediación que permita degradar los compuestos del agua de taladrina.

La generación, la distribución y los derrames accidentales de diferentes moléculas orgánicas xenobióticas (herbicidas, insecticidas, acaricidas e hidrocarburos, entre otros) han ocasionado el deterioro del ambiente, acumulándose directa o indirectamente en suelos, agua y aire (López Martínez, 2005). La velocidad de acumulación es mayor a la capacidad que tiene el planeta para remover estos compuestos orgánicos xenobióticos (Kvesitadze *et al.*, 2001).

Varios estudios han mostrado que las plantas acuáticas y terrestres pueden ser utilizadas para remediar contaminantes orgánicos e inorgánicos del suelo y del agua (Rmer y Keller, 2001; Mattina *et al.*, 2002; Kamel y Aly, 2003). Las plantas terrestres a través de sus sistemas radicales generan una alta superficie que incrementa el contacto con el material a fitorremediar y que permite albergar un gran número de microorganismos. Posiblemente por este motivo tengan una gran capacidad para reducir la DQO.

Se decidió realizar un sistema de bioaumentación para lo que se seleccionaron cepas aisladas del esparto y otras existentes en la colección del laboratorio. El bioaumentación mejora las capacidades biodegradativas de los sitios contaminados mediante la introducción de organismos individuales o consorcios con las capacidades catalíticas deseadas (Mrozik y Piotrowska-Seget, 2010). Evidencias actuales sugieren que tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos los microorganismos son los principales agentes de la biodegradación de moléculas contaminantes para el medio ambiente, incluyendo los hidrocarburos (Alexander *et al.*, 1982; Swanell y Head, 1994).

En el capítulo 3 se observó que cuando se utilizaba el esparto no estéril como medio de enraizamiento de la planta, la disminución de la DQO era mayor que cuando se utilizaba el esparto estéril. Esto nos hizo pensar en la posibilidad de que en el esparto existiesen microorganismos capaces de degradar estos hidrocarburos, por lo que se realizó un aislamiento e identificación de cepas según se describe en el apartado 5.1.1 y cuyos resultados aparecen en los apartados 6.1 y 6.2.

Los microorganismos aislados del esparto son principalmente bacterias, aunque también se encontró una levadura (tabla 6.1). Se observó que la mayoría de las cepas bacterianas pertenecían al género *Enterobacter sp.* (JF690924), esto indica la existencia de una baja diversidad microbiana que en su mayoría necesitaba nutrientes para realizar la degradación de los compuestos del agua de taladrina (apartado 6.1). Además de las bacterias se aisló una levadura (*Rhodotorula dairenensis* AF444501) que sí era capaz de utilizar los hidrocarburos del agua de taladrinas como única fuente de carbono.

Para bioaumentar los sistemas planta-microorganismo se seleccionó la levadura *Rhodotorula dairenensis* (Esp14) y una de las cepas clasificada dentro del género *Enterobacter sp.* (Esp1). Esta última no es capaz de degradar los compuestos del agua de taladrina en ausencia de fuentes de carbono fácilmente asimilables. Sin embargo, se selecciona porque pertenece al género mayoritario (*Enterobacter*) y porque en todos los sistemas desarrollados se adicionan fuentes nutritivas, tanto Hoagland como caldo nutritivo. La adición de fuentes de carbono fácilmente asimilables es una práctica común en los experimentos de biorremediación como se ha visto en otros estudios (Lee *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2006; Kamel *et al.*, 2007; Brunet *et al.*, 2008). La selección de *Rhodotorula dairenensis* se apoya en el hecho de que este grupo microbiano (las levaduras), junto con las bacterias, parecen ser las principales degradadoras (Cooney y Summers, 1976; Hanson *et al.*, 1997).

Además de las cepas procedentes del esparto, se decidió el empleo de cepas de la colección de la Universidad san Pablo-CEU debido a que se trataba de bacterias de las que se tenía un amplio historial como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs). Estas bacterias pueden proteger a las plantas de los efectos tóxicos producidos por los contaminantes y al mismo tiempo pueden participar en los procesos catabólicos conducentes a la degradación de los hidrocarburos presentes en el agua de taladrina (Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2003). Todas ellas eran capaces de crecer en el medio contaminado si se les suministraban nutrientes. Se decidió utilizar una cepa del género *Pseudomonas sp.* debido a su gran versatilidad nutritiva (Stanier *et al.*, 1966) y al hecho de que es un género encontrado en caracterizaciones de muestras de agua de taladrina por otros investigadores (Pivnick y Fabian, 1954; Bennett, 1974). Además, muchos de los experimentos en los que se ha realizado un bioaumentación han consistido en el uso de cepas de este género (Heinaru *et al.*, 2005). De entre las cepas de la colección, que podían cumplir con estos requisitos (Aur 6 y N 21.4), se eligió la cepa denominada internamente como Aur 6. Esta cepa fue ya utilizada en otros trabajos de fitorremediación de suelos contaminados con Zn y Cd (Grijalbo Fernández, 2007) y se tienen muchos datos de ella como una cepa que mejora el crecimiento de varias especies vegetales (Lucas García *et al.*, 2004).

En la construcción de los sistemas planta-microorganismo, se decidió la adición de fuentes de carbono generales a través del caldo nutritivo y nutrientes minerales a través de la solución de Hoagland, que sirven de ayuda a las fuentes de carbono liberadas en forma de exudados. La exudación de los nutrientes realizada por las raíces de las plantas crea un ambiente rico nutritivamente en el que la actividad microbiana es estimulada. Los exudados

radicales tienen azúcares, ácidos orgánicos, ácidos grasos, nucleótidos, fenoles, reguladores del crecimiento vegetal, putrescina, esteroides, vitaminas y aminoácidos como componentes principales (Vancura y Hovadik, 1965; Curl y Truelove, 1986; Uren, 2001; Dakora y Phillips, 2002; Uren, 2007). En ningún caso el aporte de estos sustratos generales (Hoagland y caldo nutritivo) sustituye a los que de modo selectivo son liberados por exudación.

Se sabe que para la degradación de xenobióticos en un sistema de biorremediación es fundamental la contribución de los exudados radicales en el metabolismo de los microorganismos presentes en el medio, activando las rutas de degradación de los xenobióticos, gracias a la aportación de compuestos orgánicos que complementen las necesidades metabólicas microbianas como es el caso de los terpenos (Davrock *et al.*, 1992; Gerhardson, 2002; Hadacek, 2002; Kim *et al.*, 2002), los metabolitos que producen el aumento de la raíz (Donnelly *et al.*, 1994; Fletcher y Hegde, 1995; Haby y Crowley, 1996; Miya y Firestone, 2001; Isidorov y Jdanova, 2002), el salicilato (Yen y Gunsalus, 1982; Meer *et al.*, 1992; Chen y Aitken, 1999; Singer *et al.*, 2000; Master y Mohn, 2001; Singer *et al.*, 2001) o los flavonoides (Donnelly *et al.*, 1994) y también por la liberación de enzimas que complementan las rutas catabólicas microbianas (Salt *et al.*, 1998; Wenzel *et al.*, 1999). Todas estas consideraciones apoyan la aportación de compuestos orgánicos en la construcción de los sistemas de fitorremediación desarrollados en este trabajo.

El objetivo fundamental del desarrollo de un sistema planta-microorganismo fue el de mejorar la reducción de la DQO e intentar alcanzar valores inferiores a los 500 ppm establecidos por el Ayuntamiento donde se encuentra la empresa. Para ello se desarrollaron 3 experimentos en los que se implementó el bioaumentación (apartados 6.3, 6.4 y 6.5).

Para evitar diferencias en la composición de la muestra de agua de taladrina que pudiesen distorsionar los resultados, todos los experimentos de biorremediación se realizaron a partir de una misma muestra suministrada por la empresa John Deere Ibérica S. A. La caracterización de la misma (se puede observar por ejemplo en la tabla 6.3), realizada cuando ésta tenía una DQO aproximada de 1.800 ppm. Estas muestras están formadas principalmente por compuestos de entre 12 y 23 átomos de carbono, aunque también se encuentran hidrocarburos de 6 y 8 átomos de carbono (como el fenol).

Bento *et al.* (2005) demostró que el bioaumentación fue el método más efectivo comparado con la bioestimulación y la bioatenuación en la eliminación de la fracción de hidrocarburos de entre 12 y 23 átomos de C. De las distintas fracciones del petróleo, los alcanos de longitud media (C₁₀-C₂₀) son los sustratos preferidos por las bacterias (Singer y Finnerty, 1984). En las tablas 6.2, 6.3 y 6.4 y en el Anexo 14 (tabla A4), puede observarse la eficacia del bioaumentación en la eliminación de la mayoría de los compuestos de entre 10 y 20 átomos de carbono. Algunos autores, indican que los compuestos de cadena corta son más tóxicos (Klug y Markovetz, 1991) al igual que los alcanos de cadena ramificada que son también más lentamente degradados que sus correspondientes alcanos (Singer y Finnerty, 1984). En nuestros sistemas, podemos apreciar como también los sustratos de cadena corta han sido eficazmente biorremediados.

Según Mrozik y Piotrowska-Seget (2010) en los procesos de selección de microorganismos para utilizar en el bioaumentación tiene una gran importancia la selección de aquellas cepas aisladas de medios contaminados o con capacidades para degradar los contaminantes. Las cepas Esp1 y Esp14 fueron aisladas de un medio (esparto) capaz de fitorremediar el agua de taladrina. La cepa Aur 6 fue también muy eficaz aún a pesar de haber sido aislada de un medio no contaminado, la rizosfera del altramuza, y de que no ha sido utilizada en procesos de biorremediación de hidrocarburos en estudios previos.

En dichas tablas (6.2, 6.3 y 6.4) y en el Anexo 14 (tabla A4) llama la atención los productos secundarios originados durante el proceso de fitorremediación. Al igual que ocurrió en el apartado 3.12.1, en las muestras fitorremediadas sin inocular y en las que se inocularon las cepas Esp1 y Aur 6 (tablas 6.2 y 6.4) apareció un compuesto orgánico combinado con el silicio, en la (figura 3,7B) se puede apreciar como el Si es uno de los elementos más abundantes en la composición del agua de taladrina. Además, en todos los experimentos, inoculados o no, se origina un compuesto secundario de 9 átomos de carbono y en el experimento donde se inoculó la levadura (apartado 6.4) aparece un compuesto secundario de 22 átomos de Carbono. Se ha comprobado que pocos compuestos químicos son completamente mineralizados por las plantas a agua y CO₂ y donde esto ocurre representa sólo un pequeño porcentaje de los compuestos parentales (Newman *et al.*, 1997). En este sentido, debemos indicar que no es posible la generalización y que en función de las plantas usadas en la fitoextracción de contaminantes orgánicos los metabolitos producidos a partir de los compuestos parentales son variables (Wenzel *et al.*, 1999).

La reducción de la concentración de hidrocarburos totales en el experimento donde se inoculó la levadura (apartado 6.4.1) fue llamativamente más baja que la producida en los otros dos experimentos (apartados 6.3.1 y 6.5.1). Esto puede observarse en el Anexo 14 (tabla A5), de manera que la concentración final en este experimento fue de 8 ppm, cuando en los experimentos en los que utilizábamos las bacterias eran de alrededor de 3-4 ppm y en sistemas sin inocular los valores se situaban entorno a 2 ppm. En la tabla A5 también puede observarse como la reducción de hidrocarburos totales en los tratamientos inoculados fue menor que en los no inoculados. Esto puede deberse a:

- Un posible efecto “priming” (Conrath *et al.*, 2002), de manera que las plantas estén desviando los recursos destinados al crecimiento en activar rutas enzimáticas, determinados genes... En términos generales, considerando los parámetros fisiológicos marcadores de la salud de la planta (parámetro fotosintéticos y biométricos, apartados 6.4 y 6.5), se observa como las plantas inoculadas no mejoran sus indicadores en presencia de las bacterias, incluso al contrario parece que estas plantas detectan una posible agresión externa que podría estar induciendo el desvío de recursos energéticos para mejorar su adaptación y de este modo disminuir su capacidad de descontaminación. Se ha observado que bacterias no patógenas, mediante la producción de algunas moléculas presentes en su pared celular, pueden disparar rutas metabólicas de respuestas defensivas asociadas a diferentes situaciones de estrés. Este concepto está unido con lo que desde un punto de vista fisiológico

se relaciona con el balance de la inversión coste/beneficio tras la inoculación con cepas que inducen efectos sistémicos (Conrath *et al.*, 2002; Van Hulten *et al.*, 2006). Gracias a este proceso, las plantas inducidas por agentes biológicos pueden mejorar su capacidad para adaptarse a diferentes situaciones de estrés, como por ejemplo al estrés salino (Timmusk y Wagner, 1999).

- Tampoco es descartable que las inoculaciones alteren la exudación radical, modificando la comunidad microbiana del esparto y su papel en la degradación de hidrocarburos. Se sabe que la estructura de las comunidades microbianas puede cambiar debido a modificaciones en los exudados radicales (Grayston y Campbell, 1996; Macek *et al.*, 2000; Kozdroj y Van Elsas, 2000).

La degradación de los contaminantes producida en el sistema de fitorremediación puede tener tres componentes: la ejercida por la planta, la ejercida por los microorganismos y la interacción entre la planta y los microorganismos. Pero también puede producirse una absorción de los hidrocarburos en las fibras del esparto. Se sabe que muchos contaminantes orgánicos, como los derivados del petróleo, PCBs, hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftaleno, pireno, fluoreno), solventes halogenados, etcétera, son hidrofóbicos y tienden a adsorberse en el suelo (Sánchez y Rodríguez, 2003).

La retirada directa de los contaminantes por las plantas está en un primer momento limitada por la disponibilidad del compuesto y los mecanismos de extracción (Salt *et al.*, 1998). Los compuestos orgánicos que más fácilmente son extraídos por las plantas son moderadamente hidrofóbicos con un coeficiente de reparto octanol-agua de entre 0,5 y 3 (Briggs *et al.*, 1982; Ryan *et al.*, 1988; Wenzel *et al.*, 1999). Las plantas producen un rango de metabolitos secundarios (liberados mediante los exudados radicales) que pueden contribuir a la activación del metabolismo de los microorganismos presentes en el medio (Singer *et al.*, 2003a).

La degradación de los xenobióticos puede deberse también a que las enzimas de las rutas metabólicas de las plantas presenten afinidad por los compuestos contaminantes, de manera que en el centro de reacción de estas enzimas no sólo se une el sustrato sino que pueden unirse algunos contaminantes con estructura similar a la del sustrato. Por ejemplo, se sabe que el complejo enzimático citocromo P450 mono-oxigenasas (hidroxilasas) a menudo referidas como CPY enzimas, catalizan la inserción del oxígeno en muchos tipos de sustrato diferentes, incluyendo esteroides naturales, ácidos grasos y xenobióticos. Este complejo enzimático puede ser potencialmente inducido por metabolitos secundarios no tóxicos para la biotransformación de compuestos, como por ejemplo contaminantes (Singer *et al.*, 2003b).

En todos los casos se observa una reducción del pH (figuras 6.2, 6.12 y 6.24), siendo por lo general más bajo en los tratamientos donde no se realizó la inoculación, salvo con la cepa Esp1 (figura 6.2). Como se comentó en el apartado 4, las bacterias son las primeras colonizadoras del agua de taladrina y sus actividades producen por ejemplo la bajada del pH por los procesos de degradación (Rossmore y Holtzman, 1974; von Holy, 1989), pero los resultados obtenidos en estos experimentos parecen indicar que no sólo las bacterias son

capaces de modificar las condiciones de pH sino que también las plantas pueden regular este parámetro.

El estudio de los parámetros biométricos altura y número de hojas mostró una disminución significativa en todos los experimentos en las plantas que crecieron en agua de taladrina (figuras 6.6, 6.7, 6.16, 6.17, 6.28 y 6.29). Esto es síntoma de la toxicidad producida por los hidrocarburos. Parece que la levadura protege ligeramente a las plantas cuando éstas crecen en presencia del contaminante (figuras 6.16 y 6.17), produciendo un incremento (significativo para el parámetro número de hojas). Esto puede explicarse según el análisis de bioluminiscencia que indica la toxicidad de las muestras (tabla 6.6), donde se observa cómo el tratamiento en el que se inoculó la levadura presenta una menor toxicidad en el análisis a las 24 horas, mientras que en los otros dos experimentos la toxicidad es mayor cuando se inoculó la bacteria. Posiblemente esta menor toxicidad fue la que permitió un mayor desarrollo del maíz.

También resultó interesante el estudio del peso seco de la parte radical (apartados 6.3.2, 6.4.2 y 6.5.2). En todos los controles se observó un incremento de este parámetro cuando se inoculó, lo que indica que estas cepas estimulan el desarrollo radical. Este estímulo resultó ser significativo en el caso de la inoculación con Esp 14 (figura 6.18), mientras que en el caso de Aur 6 y Esp1 esta estimulación se detecta solo como una tendencia (apartados 6.3.2 y 6.5.2). Los resultados obtenidos con Esp14 (apartado 6.4.2), concuerdan con la mejora de los parámetros fisiológicos comentada anteriormente.

El estudio microscópico de la estructura radical (apartado 6.9.2) mostró que solo el haz vascular se mantenía intacto en los tratamientos con agua de taladrina (figuras 6.60 y 6.63), aunque este tratamiento produjo una degradación de los orgánulos celulares (figuras 6.61 y 6.62). El hecho de que no se degrade el haz vascular es fundamental porque permite el intercambio de nutrientes y la translocación de los contaminantes.

Después de estudiar los parámetros biométricos se determinó el efecto de los hidrocarburos en el aparato fotosintético. La fotosíntesis es uno de los procesos metabólicos más investigado, representa una ruta central en las plantas conllevando la producción de los compuestos orgánicos ricos en energía necesarios para el crecimiento. Los parámetros de fluorescencia de la clorofila (F_o , F_v/F_m y $\Phi PSII$) pueden ser utilizados como indicadores de estrés afectando la ruta fotoquímica de utilización de energía luminosa absorbida (Krause y Weis, 1991; Mallakin *et al.*, 2002; Baker, 2008) y además el ratio F_v/F_m se utiliza como indicador de fotoinhibición u otros daños causados sobre los complejos del PSII (Rees *et al.*, 1990; Krause y Weis, 1991; Buffoni *et al.*, 1998; Lazár y Naus, 1998).

La fluorescencia emitida en condiciones de luz suave por plantas que provienen de la oscuridad (F_o) produjo una disminución significativa en todos los tratamientos con agua de taladrina, aunque esta disminución fue menor cuando se inocularon los distintos microorganismos (figura 6.8A, 6.19A y 6.30A). Se sabe que un incremento en este parámetro es indicador de un daño en los fotosistemas de las plantas (Bradbury y Baker, 1986; Osmond, 1994; Baker, 2008), pero sin embargo, el agua de taladrina, formado por diversas sustancias

contaminantes, produce una disminución de este parámetro. Como puede observarse en el análisis microscópico de las hojas de maíz (apartado 6.9.1), parece que el agua de taladrina disminuye el número de cloroplastos, principalmente en las células del mesófilo (figuras 6.54, 6.55, 6.58 y 6.59). Además, en las fotografías de microscopía electrónica de transmisión se observa una senescencia precoz de los orgánulos celulares, principalmente de los cloroplastos (figuras 6.56 y 6.57). Se ha demostrado que los cloroplastos son los primeros objetivos de diferentes factores de estrés abiótico (Alscher *et al.*, 1998) y que el efecto de los compuestos orgánicos en la membrana de los tilacoides puede causar una inactivación irreversible del fotosistema II (Huang *et al.*, 1997; Mallakin *et al.*, 2002). Por lo tanto, esta disminución en el número y la degradación de los cloroplastos supone una reducción de la fluorescencia emitida (F_o) que no se debe a un mejor estado de los cloroplastos sino a que hay menor número de estos orgánulos para absorber y emitir energía.

Posiblemente, la exposición de las plantas al agua de taladrina no fue suficiente como para causar daños en la membrana celular o al menos estos daños no se observaron. Ésta es una de las diferencias con los resultados obtenidos por otros investigadores que establecieron que algunos compuestos orgánicos pueden perturbar la membrana celular de forma indirecta mediante la formación de radicales libres, la inhibición de la síntesis de los lípidos o el cambio de los tipos de lípidos sintetizados (Huang *et al.*, 1996; Tukaj y Aksmann, 2007). Los PAHs y sus metabolitos pueden afectar la estructura y la función de los niveles celulares y subcelulares (Kolb y Harms, 2000). El primer objetivo a nivel celular de estas sustancias lipofílicas es la membrana plasmática, donde los lípidos de membrana pueden ser oxidados (Chiang *et al.*, 1996). La perturbación de esta membrana, así como de las membranas subcelulares, y los cambios en la actividad enzimática (en parte debidos al cambio en la estructura de los ácidos nucleicos y de las proteínas) puede producir la inhibición de los procesos de fotosíntesis y de respiración (Huang *et al.*, 1996; Kummerová *et al.*, 1996; Duxbury *et al.*, 1997).

El daño producido en las células de la zona aérea pudo producirse por un deterioro de las enzimas que catalizan las reacciones de oxidación. Un gran número de trabajos demuestran que las alteraciones fisiológicas producidas en las plantas debido a diferentes causas están relacionadas con las enzimas que catalizan las reacciones de oxidación. Algunos autores están de acuerdo en que la senescencia de los tejidos foliares está acompañada por la reducción de la catalasa (EC 1.11.1.6.) y la activación de la peroxidasa (EC 1.11.1.7.) (Horvath y vantran, 1976; Kar y Mishra, 1976; del Río *et al.*, 1978; Braber, 1980; etcétera).

Otros estudios también han observado daños en los orgánulos celulares de plantas (trigo, *Lolium*, gramíneas, lupino) que crecieron en presencia de xenobióticos. Por ejemplo, de Felipe *et al.* (1988) observó que los cloroplastos del trigo crecido durante 5 días en presencia de isoproturón estaban ampliamente afectados, con un considerable número de plastoglobulos y sustancias lipídicas; mientras que en los cloroplastos de *Lolium rigidum* observaron una desintegración general del sistema lamelar. También de María *et al.* (2005)

demonstraron que otro compuesto contaminante, como es el glifosato, causa daños en la ultraestructura celular del mesófilo y en la ultraestructura de los nódulos de *Lupinus albus* cv. Multolupa y vieron que las hojas jóvenes y los nódulos eran especialmente afectadas porque actuaban como órganos de almacenamiento de este herbicida. En el caso de las gramíneas, Puertas-Mejía *et al.* (2010) demostraron como el Cd produce un descenso en el contenido vacuolar de las células radicales de la cebada y en las células de la parte aérea del maíz.

Otro aspecto que ha podido afectar al valor de F_o es el contenido en clorofila a y b (apartados 6.3.3.c, 6.4.3.c y 6.5.3.c). Estas clorofilas son el principal componente de las antenas fotosintéticas y el valor de F_o representa la emisión de las moléculas antena excitadas de la clorofila a antes de que la excitación migre a los centros de reacción y es independiente de los eventos fotosintéticos (Krause y Weis, 1991). En contra de lo que cabría esperar, por lo general el contenido en clorofila a aumenta en presencia del agua de taladrina, salvo en el experimento con la cepa Esp14, y el contenido en clorofila b disminuye cuando no se inocula, salvo en el experimento con dicha cepa (apartado 6.4.3.c). Esto también está en contra de lo observado por Vassilev *et al.* (1998) que obtuvieron valores reducidos de F_o probablemente debidos a la degradación de la clorofila a después del tratamiento con Cd. Se debe tener en cuenta que, según Maxwell y Jonson (2000), la cantidad total de fluorescencia de la clorofila es muy pequeña (sólo el 1 o el 2% de la luz absorbida). Por lo tanto la disminución de F_o observada se debe muy probablemente a la destrucción de fotosistemas.

Este incremento en el contenido de las clorofilas puede deberse a una activación de las rutas de síntesis de estos pigmentos. Se sabe que un incremento de la relación entre la clorofila a y la clorofila b está relacionada con situaciones de estrés. Por ejemplo, es sabido que cambios en las condiciones de irradiación pueden producir dramáticos ajustes en el contenido de los compuestos fotoprotectores, como las clorofilas (García-Plazaola *et al.*, 2008). En los experimentos realizados la relación clorofila a / clorofila b aumenta significativamente al inocular Esp1, Esp14 y Aur 6 tanto en las plantas que crecieron sin agua de taladrina como en los tratamientos con agua de taladrina (figura 6.10B, 6.22B y 6.33B). Además, en la figura 6.10B y 6.33B se observa como la presencia del agua de taladrina en los tratamientos sin inocular incrementa, con respecto al control sin inocular, la relación entre ambas clorofilas, siendo este parámetro significativo en el experimento realizado con Aur 6 sin inocular (figura 6.33B). Como se ha comentado, cuando las plantas inoculadas con la levadura crecieron en presencia y en ausencia de agua de taladrina, se observó una disminución del contenido de la clorofila b (apartado 6.4.3.c) que pudo suponer el incremento del ratio clorofila a / clorofila b observado en estos experimentos.

Otro parámetro interesante es el estudio de la eficiencia potencial máxima del fotosistema II (F_v/F_m), cuyos resultados pueden observarse en las figuras 6.8B, 6.19B y 6.30B. El rango F_v/F_m es frecuentemente usado como un indicador de la fotoinhibición u otro tipo de daños producidos en los complejos del PSII (Rees *et al.*, 1990; Krause y Weis, 1991; Buffoni *et al.*, 1998; Lazár y Naus, 1998). F_v/F_m es generalmente constante para muchas especies en condiciones normales y tiene un valor de $0,832 \pm 0,004$ (Björkman y Demmig,

1987). Para plantas estresadas, este valor es marcadamente reducido. En todos los tratamientos (controles con y sin bacteria, agua de taladrina con y sin bacteria) este valor es inferior a 0,8 lo que indica que las plantas puedan tener cierto grado de estrés. El maíz es una planta terrestre de origen tropical, y en nuestros experimentos la estamos cultivando en un medio acuático, con baja intensidad de luz (como se ha visto en la microscopía electrónica de transición, figuras 6.56 y 6.57, donde apenas aparecen gránulos de almidón), quizás estas condiciones puedan producir estrés en los controles que suponga un deterioro del sistema fotosintético.

También se estudio la variación de la eficiencia máxima del fotosistema II (Φ_{PSII}) y la tasa relativa de transporte de electrones (ETR). El primero mide la eficiencia fotoquímica del PSII (Genty *et al.*, 1989). Este parámetro mide la proporción de la luz absorbida por la clorofila asociada con el PSII que es utilizada en fotoquímica, de manera que puede dar una medida del ratio del transporte de electrones y, por lo tanto, es un indicador de todo el proceso fotosintético (Maxwell y Johnson, 2000). Por su parte, la tasa relativa de transporte de electrones (ETR), es la relación entre la eficiencia de operación del PSII y el flujo lineal de electrones (Baker, 2008). Se observó una disminución significativa de estos parámetros en las plantas que crecían en agua de taladrina, aunque esta disminución no fue tan acusada cuando se inocularon los microorganismos (figuras 6.8C, 6.8E, 6.19C, 6.20B, 6.31A y 6.31C).

Otros investigadores, como Kummerová *et al.* (2006), también observaron una disminución de Φ_{PSII} en plantas de guisante crecidas en presencia de fluoranteno, lo que indica que la fotoquímica del PSII es seriamente inhibida por una alta concentración de este hidrocarburo. Además, es sabido que la inhibición de los procesos fotosintéticos es muy a menudo consecuencia de la acción tóxica de los mecanismos de muchas sustancias dañinas (Branquinho *et al.*, 1997). La disminución del parámetro Φ_{PSII} puede atribuirse a los compuestos orgánicos que inhiben el proceso fotoquímico de la fotosíntesis relacionado con la cadena de transporte electrónico en la membrana de los tilacoides. Esto puede deberse a que los productos de la transformación de los PAHs, especialmente las quinonas, pueden afectar el PSII y el transporte electrónico al PSI (Kummerová, 2008).

Finalmente, se analizó el quenching: quenching fotoquímico de la variación de la fluorescencia de la clorofila (qP) y el quenching no fotoquímico (NPQ). Una bajada de la fluorescencia puede ser causada tanto por un incremento de la conversión de la energía fotoquímica o por un incremento en la disipación del calor. Los análisis de quenching permiten distinguir estas dos vías fundamentales de la conversión de la energía lumínica absorbida (Vassilev y Manolov, 1999). La presencia del agua de taladrina produjo una disminución significativa del parámetro qP (figuras 6.8D, 6.20A y 6.31B). Este parámetro refleja la fracción de centros de reacción del PSII abiertos y denota la proporción de la energía de excitación atrapada en ellos (Krause y Weis, 1991; Baker, 2008). Estos autores señalan esta disminución como un mecanismo para evitar la sobrerreducción de los aceptores primarios de electrones del PSII (Q_A).

Sin embargo, en el parámetro NPQ se produjo un incremento en presencia del agua de taladrina (figuras 6.8F, 6.20C y 6.31D). El NPQ refleja la cantidad de energía liberada por el fotosistema II en forma de calor y que por lo tanto no contribuye al proceso fotosintético (Baker, 2008). Se ha descrito que el NPQ está linealmente relacionado con el exceso de radiación sobre un amplio rango de incidencia de la densidad del flujo de electrones, el grado de su desarrollo en las hojas está relacionado con la formación de la zeaxantina (Björkman y Demmig-Adams, 1995) y un incremento de este parámetro significa una situación de estrés (Baker, 2008).

Por otra parte, en la reacción de Hill (figuras 6.9, 6.21 y 6.32), se observó una disminución significativa en las plantas que crecieron en agua de taladrina. El PSII es inactivado por una gran variedad de estreses: alta radiación, temperaturas extremas, sequías, salinidad, deficiencia de nutrientes, la contaminación del aire, los metales pesados y algunos compuestos químicos orgánicos. El daño es primero localizado en la proteína D1 donde ocurre la transferencia de electrones entre el primer donador, Tyr Z, y la segunda plastoquinona aceptora, Q_b (Barber y Anderson, 1992). Posiblemente, el daño se haya producido en la plastoquinona, reduciendo el paso de electrones y por lo tanto disminuyendo la cantidad de DCPIP que se reduce (figura 5.4.) Las quinonas son los principales productos de fotomodificación de los PAHs (Delphin *et al.*, 1998) que son capaces de bloquear el transporte electrónico en la localización donde la plastoquinona actúa como un aceptor o donador de electrones (Huang *et al.*, 1997). Investigaciones realizadas con otros contaminantes orgánicos también demostraron una reducción de la reacción de Hill, como ocurrió con las fenilureas (de Felipe *et al.*, 1988), la simacina y otros herbicidas (Hernández-Terrones *et al.*, 2003) o en las plantas de guisantes expuestas durante 18 días a fluoranteno y al herbicida Basagran (Kummerová, 2008). Marwood *et al.* (1999) encontraron que el antraceno intacto y fotomodificado inhibe el transporte electrónico directamente, bloqueando el PSII o en el citocromo BLF entre el PSII y el PSI.

En definitiva, los distintos parámetros fotosintéticos estudiados, relacionados con la tasa de transporte electrónico, indican que el agua de taladrina produce un deterioro de los sistemas fotosintéticos de las plantas. Este daño no sólo es consecuencia de un menor número de cloroplastos y de una senescencia de los mismos en las plantas tratadas, sino que también se debe a un daño en los distintos aceptores de la cadena de transporte electrónico.

Otro experimento fundamental desarrollado en el capítulo 5 de la presente memoria fue el desarrollo de un sistema de biorremediación en fases que permitiese disminuir el daño causado por el agua de taladrinas. El objetivo de este experimento fue desarrollar un sistema económicamente rentable para la empresa. En los experimentos desarrollados hasta ahora, se ha visto que las plantas sufren un gran deterioro después de estar 5 días en contacto con el agua de taladrina y no es posible su recuperación. Esto es inviable para la empresa que sólo podría utilizar el sistema fitorremediador para una tanda de descontaminación y además tendría que retirar las plantas. Por ello, lo que se pretende es encontrar un sistema maíz-esparto donde las plantas puedan recuperarse después de estar en contacto con el

contaminante para a continuación someterlas a un nuevo proceso de descontaminación, esto es: un sistema en fases.

La reducción de la DQO (figura 6.35 y 6.36) ejercida por este sistema es mayor que en el tratamiento en continuo. La eficacia de este sistema está, por tanto, claramente relacionada con el menor daño producido por el agua de taladrina sobre las plantas, debido a que la toxicidad del agua de taladrina está reducida. También se observa que cuando las plantas están por segunda vez en contacto con el agua de taladrina (proceso de vuelta) producen una reducción significativamente mayor que la primera vez. Ésto puede deberse por una parte a que la DQO inicial del agua de taladrina del proceso de vuelta era significativamente menor, pero también puede deberse a que las plantas están aclimatadas a estos contaminantes y han desarrollado estrategias de acción para mejorar su degradación y disminuir el daño ejercido por los mismos.

En este experimento no se han producido nuevos productos secundarios como consecuencia de la degradación de los hidrocarburos. En los resultados del análisis cromatográfico (tabla 6.5) se puede ver como después del proceso de fitorremediación sólo aparecen 3 hidrocarburos. En esta tabla se observa como en las aguas de taladrina fitorremediadas el contenido del compuesto ácido hexanoico 3,5,5 – trimetil es mayor que en la muestra inicial, esto quizás se deba a que alguno de los compuestos de cadena larga han sufrido oxidaciones que quizás han producido compuestos de menor peso. En el proceso de vuelta, es donde se observa una mayor aparición de estos compuestos. Esto puede estar relacionado con los ensayos de bioluminiscencia (tabla 6.6) donde se observa como el proceso de ida es el que tiene una menor toxicidad. Este proceso es también donde aparece un menor contenido de hidrocarburos.

En los parámetros biométricos (figuras 6.39 y 6.40) se observa como todas las plantas del experimento en fases son capaces de recuperarse tras el contacto con el agua de taladrina. En el experimento en continuo, el agua de taladrina impidió la recuperación de las plantas. En la tanda 1 se aprecia inicialmente una recuperación, pero la inmensa mayoría de las plantas murieron antes de que se realizase el proceso de vuelta. Esto posiblemente se deba a que estas plantas fueron las que se sometieron a las condiciones más extremas, con mayor contenido en hidrocarburos y con mayor pH, por lo que es probable que sus parámetros fisiológicos fueran también mucho más afectados.

Los parámetros fotosintéticos, la reacción de Hill y el contenido en clorofilas (figuras 6.41, 6.42, 6.43, 6.44, 6.45, 6.46, 6.47, 6.48 y 6.49) demuestran que los hidrocarburos del agua de taladrina dañan el sistema fotosintético sin que se consiga en la fase de recuperación y posteriores una recuperación importante del mismo. Esto confirma que la eficacia del sistema se basa en la menor inducción de daños en la plantas, lo que a su vez permite su reutilización.

Finalmente, se quiso determinar la toxicidad de las muestras fitorremediadas, para lo que se realizó un estudio de toxicidad mediante el análisis de la bioluminiscencia con una cianobacteria del género *Anabaena sp.* (tabla 6.6 y 6.7). La reducción de la DQO por debajo

de los límites establecidos por la Ley 10/1998 de la Comunidad de Madrid, no implica necesariamente que dicho residuo no sea tóxico, por lo que llevamos a cabo una serie de experimentos para determinar su toxicidad. Es necesario demostrar que la biorremediación no produce ningún intermediario tóxico y que evita indeseables efectos ambientales y ecológicos (Cerniglia, 1984; Prince *et al.*, 1994).

Como puede observarse en las tablas 3.5, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 9.9 y en el Anexo 14 (tabla A4), los tratamientos en los que se ha obtenido una menor biotoxicidad medida según el parámetro IC_{50}^2 a las 24 horas (con TP9, sin Esp1, con Esp14, sin Aur 6, sin consorcio y la tanda 4 del experimento de fases) son, por lo general, aquellos tratamientos que presentan un menor contenido en compuestos con menos de 10 átomos de carbono, que de acuerdo con Klug y Markovetz (1971) son los más tóxicos. Además, en algunos de estos tratamientos encontramos compuestos de más de 20 átomos de carbono que son hidrofóbicos, con menor solubilidad en agua y, por lo tanto, menos biodisponibles (Barhta, 1986). Es sabido que factores importantes que inciden en la penetración del contaminante son su peso molecular e hidrofobicidad que determina que estas moléculas atraviesen las membranas celulares (Harvey *et al.*, 2002). De manera que cuanto mayor sea el peso molecular menor probabilidad habrá de que penetre en las células de la cianobacteria y por lo tanto menor toxicidad generarán.

Los procesos de biodegradación no siempre conllevan la reducción de la toxicidad del medio, como se ha observado por ejemplo en el experimento en fases durante el proceso de vuelta. Esto también se describe por Zuzana *et al.* (2008) quien vio como la disminución del pentaclorofenol durante la biodegradación no siempre está asociada con cambios en la ecotoxicidad del suelo. Esta ecotoxicidad después de la degradación del compuesto en la mayoría de las muestras de suelo fue mayor que al principio. Puede asumirse que la razón de una mayor toxicidad se debe a la producción de metabolitos más tóxicos durante la biotransformación, como fenoles clorados, catecoles clorados o quinonas cloradas que son más solubles en agua que las moléculas de pentaclorofenol y por lo tanto más biodisponibles y más tóxicos para la biota (Zuzana *et al.*, 2008).

Dado que teníamos la intención de establecer la relación entre la toxicidad que el agua de taladrina fitorremediada producía en las cianobacterias y la fitotoxicidad de ésta sobre las plantas de maíz (medida mediante los parámetros fotosintéticos), se realizó un experimento adicional. La toxicidad encontrada sobre las cianobacterias provenía de un agua de taladrinas que previamente había pasado 5 días en presencia de plantas de maíz, luego para poder relacionarlo con la toxicidad sobre plantas de maíz, necesariamente necesitábamos saber el efecto de ese mismo agua de taladrinas sobre nuevas plantas de maíz.

En el análisis de la toxicidad sobre plantas de maíz no se observaron daños considerables sobre los fotosistemas (apartado 6.8.2). Esto posiblemente se deba a que el maíz tiene la capacidad de degradar los contaminantes y de almacenarlos en distintas estructuras de la plantas, por lo que el daño ejercido por las mismas es menor. Por ejemplo, para agilizar la oxidación de las moléculas orgánicas xenobióticas en plantas, se han

realizado estudios de modificación transgénica en vegetales como el centeno y el maíz (Chapple, 1998) y se ha demostrado que las enzimas pueden ser inducibles por algunos contaminantes como herbicidas, nitroaromáticos, compuestos aromáticos, fenólicos, PAHs y dioxinas (Robineau *et al.*, 1998; Werck *et al.* 2000).

En definitiva, los sistemas de bioaumentación desarrollados en este capítulo han disminuido el daño del agua de taladrina sobre las plantas pero no han mejorado el proceso de reducción de la DQO, aunque en todos los casos se ha obtenido un agua de taladrina con una menor biotoxicidad. El experimento en fases ha permitido la reutilización de las plantas en un segundo proceso de fitorremediación, lo que reduce el coste (tanto económico como de mano de obra) necesario para el desarrollo de este sistema de fitorremediación.

**8. MATERIALES Y MÉTODOS:
ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE LAS
COMUNIDADES MICROBIANAS
QUE SE DESARROLLAN EN UN
REACTOR BIOLÓGICO DE
MEMBRANA DURANTE EL
PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN
DE TALADRINAS Y SU EMPLEO EN
SISTEMAS DE FITORREMEDIACIÓN**

8.1. Reactor biológico de membrana (R. B. M.)

Se utilizó un reactor biológico de membrana sumergida (R. B. M. s.) capaz de tratar 36L/h. El efluente de entrada (taladrina pretratada diluida con agua del grifo) tenía una DQO (demanda química de oxígeno) de 6.000 ppm y el efluente de salida (permeado) tenía una DQO de alrededor de 1.000 ppm. Este sistema está muy influido por 3 factores: la biomasa y las características del agua residual, las condiciones de operación y las características de la membrana (Paul y Hartung, 2008).

Su eficacia radica en una membrana interna (figura 8.1), que presenta unos pequeños orificios por los que puede pasar el agua limpia pero que impide salir a las cepas, consiguiéndose una concentración bacteriana óptima (figura 8.2). La membrana utilizada es una membrana de microfiltración de fibra hueca de polifluoruro de vinilideno (PVDF) con un área de 1 m² y un diámetro de poro de 0,4 µm, suministrado por Micronet Porous Fibers con 0,40 micras de diámetro de poro.

Los experimentos fueron realizados en una planta piloto de 75 L con un tiempo de retención hidráulica de 15 L/h (figura 8.3).

Figura 8.1. Imagen de módulo de la membrana de fibra hueca de polifluoruro de vinilideno (PVDF) eliminada porque procede de internet

Figura 8.2. Esquema del funcionamiento de la membrana utilizada en el reactor biológico de membrana (R. B. M.). Ver web http://www.toraywater.com/products/mbr/mbr_001.html

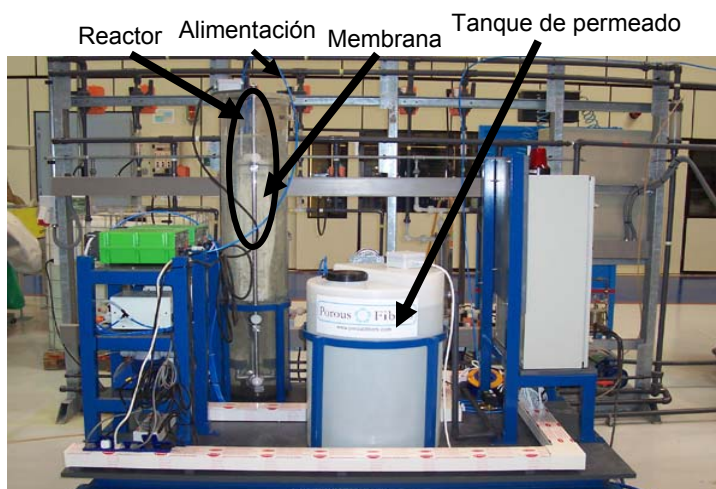


Figura 8.3. Planta piloto del R. B. M. donde se realizaron los experimentos.

Este reactor se alimenta mediante una bomba hasta alcanzar el nivel máximo (nivel de control) con un caudal de 36 L/h de taladrina pretratada con un valor de DQO de 6.000 ppm, esta alimentación está almacenada en un tanque de 500 litros de capacidad. El nivel máximo y mínimo están regulados por los sensores de nivel, de manera que cuando las taladrinas presentes en el reactor alcancen el nivel mínimo, se pondrá en marcha automáticamente la bomba de alimentación para rellenar el reactor hasta alcanzar el nivel máximo.

Se inyectó aire comprimido mediante difusores localizados en la zona inferior del reactor. Las burbujas de aire proporcionan el oxígeno necesario para las necesidades biológicas y también produjo un efecto de lavado hidrodinámico para reducir la adsorción del fango en la membrana.

Una vez en el reactor, esta taladrina entra en contacto con los microorganismos presentes en el fango. Este conjunto fango-taladrina permanece en agitación gracias a una aireación continua, con un caudal constante de 0,9 m³/h para garantizar el contacto de todos los microorganismos con el agua residual.

Después de pasar por la membrana, donde quedan retenidas las cepas, el efluente, con una DQO de alrededor de 1.000 ppm, pasa al tanque de permeado mediante una bomba de succión. A medida que se va obteniendo un flujo de permeado va disminuyendo el nivel en el R. B. M. hasta que se alcanza el nivel mínimo.

Cada 12 minutos de funcionamiento del sistema se realiza automáticamente un retro-lavado de unos 30 segundos. El retrolavado consiste en pasar en sentido inverso, mediante otra bomba, agua del permeado al R. B. M. para limpiar los poros de la membrana de las cepas que han quedado adheridas a la misma, el resto del permeado se vierte a la red de alcantarillado.

En el fondo del reactor encontramos una zona anaerobia donde se encuentra el fango que ha precipitado porque no es capaz de degradar la taladrina o porque existe una concentración excesiva de microorganismos. Para que las condiciones en el reactor sean óptimas y no disminuya la concentración de oxígeno se realiza una purga diaria siempre que la concentración de sólidos sea superior a 10 mg/L (concentración óptima a la que trabaja el reactor), ésta purga depende de dicha concentración y suele ser de alrededor de 1 litro.

Todas las bombas utilizadas son de la marca Watson Marlow modelo 520U.

En la figura 8.4 se puede ver un esquema del funcionamiento del reactor que se acaba de explicar.

Figura 8.4. Esquema del funcionamiento del R. B. M. Ver web <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol24num3/articulos/membrana/>

8.2. Medidas de seguimiento del R. B. M.

Para el correcto funcionamiento del reactor es necesario realizar medidas de distintos parámetros (DQO, pH, sólidos en suspensión) tres veces a la semana. Estas medidas permiten determinar la eficacia del mismo así como la necesidad de realizar purgas.

La caracterización tanto del efluente como del influente, se ha realizado empleando los métodos normalizados de ensayo (Standard Methods for the Examination of Water and wastewater APHA-AWWA-WPCF. 17 Ed.).

8.2.1 Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO)

La determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) se realiza siguiendo el método semimicro 5220D, mediante la oxidación de la materia orgánica a reflujo cerrado (figura 8.5).

Interesa conocer la DQO de:

- La fracción total.
- La fracción soluble de la alimentación: es la que resulta de filtrar la alimentación a través de filtros de 0,45 µm y es la fracción asimilable por los microorganismos.
- El permeado.

La materia orgánica presente en 2,5 mL de la muestra es digerida mediante la adición de 1,5 mL de una solución digestora y de 3,5 mL de una solución catalítica.

La solución digestora está formada por 10,22 g de dicromato potásico, 17 g de sulfato de plata (catalizador) y 250 mL de ácido sulfúrico concentrado, esta solución se enrasa a 1 L de agua.

La solución catalítica está formada por 10,7 g de sulfato de plata en 1 litro de sulfúrico al 98%, esta solución se mantiene en agitación durante 2 días antes de utilizarla.

Las muestras se someten a 150 °C durante 2 horas en un bloque calentador, donde se produce la oxidación de la materia orgánica y la reducción de dicromato.

Una vez enfriado, la determinación del dicromato reducido, Cr^{3+} , se realiza a través de la medida de la absorción en el visible (605 nm) de la muestra en el espectrofotómetro de radiación ultravioleta-visible SHIMADZU UV – 1800. Esta absorbancia se relaciona con el valor de la DQO a través de un calibrado previo con patrones conocidos de valores de este parámetro.

Los patrones se realizan a partir de una solución patrón de 1.000 ppm de ftalato ácido de potasio, formada por 0,425 g de $HOOC-C_6-H_4-COOK$ previamente secado (105 °C) y enrasada hasta 500 mL con agua mili Q. Cada vez que se cambian la solución catalítica o la solución digestora es necesario realizar una calibración.

Si la DQO de la muestra es superior a 500 ppm se diluye con agua mili Q.

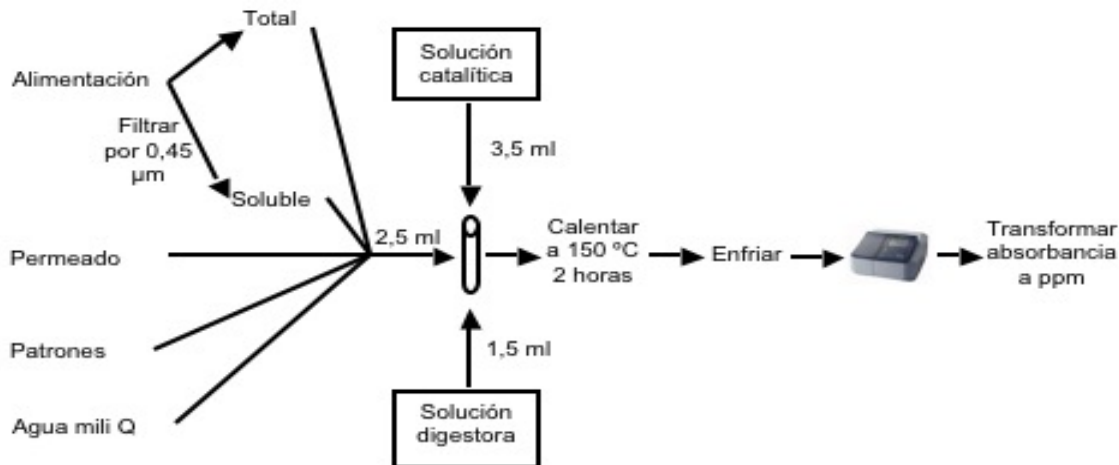


Figura 8.5. Medida de la demanda química de oxígeno (DQO) de la alimentación y permeado del R. B. M.

8.2.2. Determinación de la concentración de sólidos en suspensión

La determinación de los sólidos en suspensión totales se ha determinado por filtración y gravimetría, según el método SM 2540/D (figura 8.6).

Se seca el filtro (filtros acrílicos comerciales Millipore AP40 con tamaños de poros de 0,45 µm y diámetros comprendidos entre 2,2 cm y 4,7 cm) en estufa a 105 °C durante una hora y se pesa. Se toma una muestra de 20 mL del interior del reactor y se filtra a vacío a

través de un filtro de 0,45 µm. Una vez filtrado se deja secar el filtro en estufa durante hora y media y se pesa. La diferencia entre el peso inicial y final indicará el contenido en materias en suspensión de la muestra.

Para un determinado volumen de agua:

mg/L de sólidos en suspensión = $100 * (\text{peso final} - \text{peso inicial}) * (1000 / \text{mL muestra})$



Figura 8.6. Método para determinar la concentración de sólidos en suspensión.

8.2.3. Determinación de la turbidez del permeado

La determinación de la turbidez se ha realizado por el método nefelométrico, según SM 2130 B. El turbidímetro empleado fue un Hach model 2100A.

La turbidez en el agua está causada por la presencia de materias diversas en suspensión, arcilla, limos, coloides orgánicos, plancton y otros organismos microscópicos. Desde el punto de vista del agua residual se encuentran valores altos de turbidez asociados a la aparición de bacterias y virus. Es fundamental conocer la turbidez del permeado porque es un valor que indica el correcto funcionamiento de la membrana, de manera que el incremento de la turbidez indica la existencia de posibles fugas y por lo tanto de la rotura de la membrana.

8.2.4. pH

Para medir el pH se utilizó un pHmetro portátil Crison micro pH 2001. La medida se realiza tanto en la alimentación como en el efluente.

8.2.5. Velocidad del caudal de permeado

A pesar del efecto de la recirculación, este sistema tiene un problema porque la membrana se ensucia debido a la gran concentración de hidrocarburos presentes en la taladrina y también a la adsorción de las cepas a la membrana. Este problema conlleva la disminución del caudal de permeado, de manera que cuando este caudal es muy bajo indica la necesidad de realizar una limpieza de la membrana.

Para determinar esta velocidad se midió el tiempo que tardaba el permeado en rellenar una probeta de 100 mL.

8.3. Limpieza de la membrana

Debido a la adsorción de los microorganismos y de los aceites de las taladrinas en los poros de la membrana, se produjo una reducción de la velocidad del caudal de permeado, por lo que fue necesario realizar una limpieza 1 vez al mes aproximadamente. Se realizaron 2 tipos de limpieza.

8.3.1. Limpieza tradicional

Para llevar a cabo esta limpieza es necesario realizar primero un lavado físico y después una limpieza química.

El lavado físico consiste en limpiar la superficie de la membrana con agua a presión para despegar de la misma todo el fango adherido.

Para realizar la limpieza química, se introduce la membrana en un recipiente, con agua del grifo, cuyo volumen permita cubrir perfectamente toda la membrana. Se le adiciona hipoclorito sódico hasta conseguir un pH de 10 – 10,5. Inmediatamente se le añade ácido clorhídrico concentrado hasta que el pH sea de 6 – 6,5.

Sin vaciar el recipiente, se pone a permear la membrana con el flujo normal de funcionamiento (de fuera para adentro) a un caudal de 83 mL/min. Se deja permeando 30 minutos aproximadamente.

Pasado ese tiempo, se vacía, se aclara bien el recipiente y se introduce agua del grifo. Se pone a permear la membrana en flujo inverso a un caudal 10 veces mayor, es decir, 83 mL en 6 segundos. Se deja permeando en este sentido unas 24 horas.

8.3.2. Limpieza de la membrana específica para las taladrinas

El método tradicional no fue suficiente, por ello para conseguir una limpieza más efectiva se realizó un proceso más agresivo.

Esta nueva limpieza consistió en introducir la membrana en un recipiente con agua del grifo, cuyo volumen permitía cubrir perfectamente toda la membrana. Se añadió ultrasill al 2% (p/v).

Esta dilución agua-ultrasill se calentó hasta los 60 °C (sin sobrepasarlo porque si no se estropea la membrana) y se dejó filtrar en sentido normal (de alimentación a permeado) a un caudal de 10 L/h durante 1 hora.

Después de la limpieza básica se recomienda hacer otra ácida, pero antes pasando por un pH neutro (agua normal). Para realizar la limpieza ácida se utilizó ácido nítrico al 69% de

pureza a una concentración de 5 mL/L (las membranas pueden resistir hasta una concentración 6 N de ácido nítrico).

Finalmente, se realiza una nueva limpieza con el detergente básico.

8.3.3. Medida de la permeabilidad intrínseca de la membrana

Para conocer si la membrana se ha recuperado después de realizar la limpieza y antes de volver a instalarla en el sistema se calcula la permeabilidad intrínseca.

La permeabilidad intrínseca de la membrana se calcula circulando agua a diferentes presiones en funcionamiento normal (alimentación a permeado) y midiendo los caudales de permeado de cada una de las presiones.

El valor de permeabilidad obtenido tras la limpieza se compara con el inicial para conocer si la membrana se ha recuperado o no después del proceso de limpieza y para detectar la presencia de posibles roturas o degradación de la membrana.

8.4. Bacterias aisladas del R. B. M.

El fango utilizado para alimentar el reactor, y del que provienen las cepas que trabajarán en el interior del R. B. M., proviene de la estación depuradora de aguas residuales (E.D.A.R.) de Larrabetzu (Vizcaya). Las bacterias presentes en el fango son aclimatadas progresivamente a muestras de taladrina con concentraciones crecientes de DQO hasta alcanzar unos valores de alrededor de 6.000 ppm de taladrina pretratada (diluida con agua).

La E.D.A.R. de Larrabetzu, en servicio desde 1989 y gestionada por el Consorcio de Aguas Bilbao-Vizcaya, tiene un sistema de fangos activos en suspensión de carga convencional y es apta para un bioproceso de nitrificación (pero no desnitrifica). No dispone de tratamiento de eliminación de fósforo. Se trata de un tratamiento secundario aerobio con una eliminación de la DBO (demanda biológica de oxígeno) superior al 80% y con eliminación de nitrógeno amoniacal. Esta E.D.A.R., que trata solo agua urbana y de origen agrícola, recoge las aguas de 1.730 habitantes y recibe una carga de 4.205 habitantes equivalentes (eh-s). Su caudal de salida es de una media de 9 L/seg. (Agencia Vasca del Agua-URA).

Para aislar los organismos cultivables, se realizaron 5 muestreos después de la aclimatación del fango. Los 4 primeros se hicieron cada 15 días para conocer la evolución de las cepas del mismo. Sin embargo, entre el 4º y el 5º muestreo pasaron sólo 7 días en los que no se realizó purga del reactor para intentar seleccionar las cepas de crecimiento corto que se perderían con la purga.

Los muestreos se realizaron en condiciones de aerobiosis, tomando en todos ellos 100mL del fango de la zona aérea del reactor, utilizando un recipiente estéril. Para extraer las cepas, se agitó la muestra durante 5 minutos y después se sonicó 7 minutos. La mezcla se dejó decantar y se tomó 1 mL del sobrenadante (Ruíz Palomino, 2003).

Se hicieron diluciones seriadas en medio ringers (Oxoid, ref. BR0049G) y se sembraron 200 µL de cada dilución en agar nutritivo (Oxoid, ref. CM0003) y otros 200 µL en un medio selectivo formado por Ringers, Agar (BD, ref. 214010) y taladrina pretratada, de manera que la DQO final de este medio fuera de 6.000 ppm.

A las 48 horas y a los 7 días de sembrar las diluciones se seleccionaron al azar unas 5 cepas de cada medio, de manera que se obtuvieron cepas de crecimiento lento y de crecimiento rápido. Las cepas se seleccionaron de la mayor dilución que produjo crecimiento, ya que según Baecker *et al.* (1989) puede considerarse que en esta dilución es donde se encuentran los microorganismos más comunes en la muestra original.

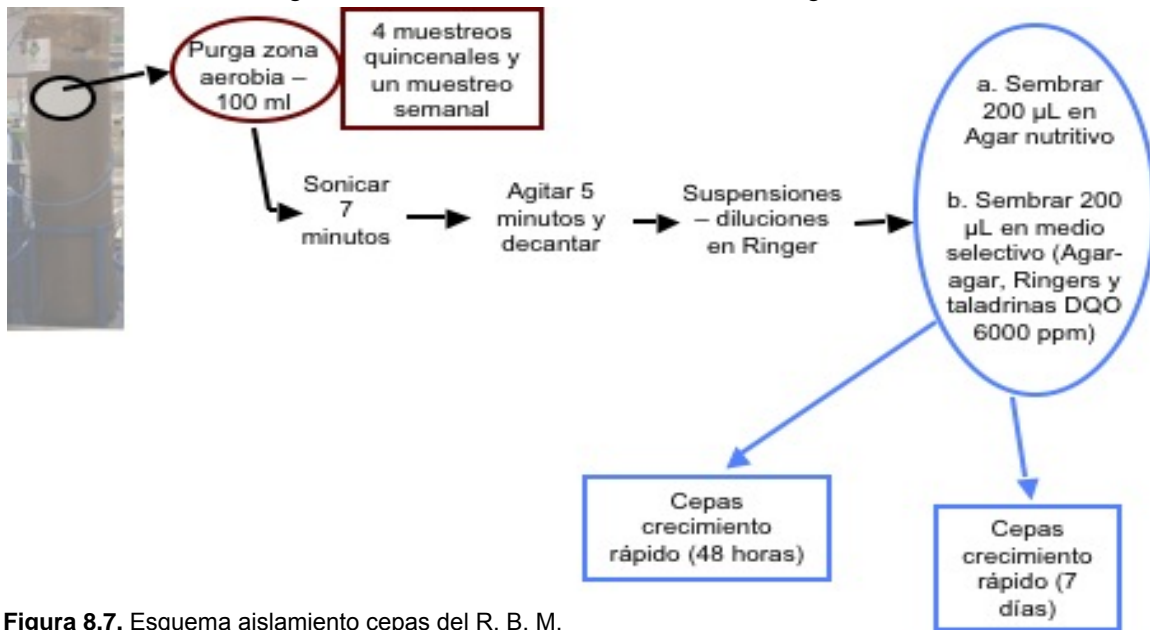


Figura 8.7. Esquema aislamiento cepas del R. B. M.

8.5. Estudios sobre las bacterias cultivables aisladas del biorreactor

8.5.1. Clasificación taxonómica

Se extrajo el ADN genómico de cada bacteria con el kit Ultraclean™ Microbial DNA isolation kit (MoBio, CA, EE.UU.), según las indicaciones del fabricante.

Se amplificaron mediante PCR los 1.500 pb correspondientes al gen que codifica para el ARN ribosomal 16s con los siguientes cebadores: directo 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' y reverso 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3' (Devereux y Willis, 1995) en una concentración 0,5 µM cada uno, en una reacción de 25 µL, 1X de 10X PCR Buffer con Mg (Roche), 1,5% de 100% de DMSO, 1 mM de cada dNTP, 1,4 unidades de ADN polimerasa (UltraTools DNA Polymerase de Biotools), 100 ng de ADN bacteriano y completado con agua. La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp 2700 (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 94 °C 2 minutos, seguido de 10 ciclos de 94 °C 30 seg, 50-54,5 °C

durante 30 seg y 72 °C 1 minuto, seguido de 20 ciclos de 94 °C 30 seg, 50 °C 30 seg y 72 °C 1 minuto (incrementando 5 segundos en cada ciclo) y finalizando con 7 minutos a 72 °C.

Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X) con Gel Red (concentración 1X) mediante un analizador de imagen GelDoc2000™ 170-8126 (BioRad, CA, EE.UU).

Una vez comprobada la amplificación se cortaron las bandas correspondientes a los fragmentos de 1.500 pb, purificándolas con el kit Qiaquick^R Gel Extraction kit de Qiagen.

La secuenciación parcial del gen 16s rRNA se llevó a cabo un equipo automatic sequencer 3730 XL en la empresa Macrogen Inc., utilizando para ello el cebador directo mencionado anteriormente. El tratamiento de las secuencias antes de ser enviadas a la base de datos Genbank se realizó mediante los software Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystem) y Clone Manager v6. Las secuencias una vez procesadas fueron comparadas en la base de datos del GenBank (NCBI BLAST^R Home page. Basic Local Alignment Search Tool) mediante el algoritmo BLASTN 2.2.25 (Zhang *et al.*, 2000) estableciendo el grado de homología de las cepas con las presentes en las base de datos. Las secuencias parciales del 16s rRNA obtenidas en este estudio para cada uno de los muestreos fueron depositadas en la base de datos del Genbank bajo los números de acceso JF937322- JF937420 (Anexo 15: Cepas aisladas del R. B. M.).

El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa Mafft (online version). La construcción del árbol filogenético se realizó utilizando el programa MEGA 5.0, con el algoritmo “neighbor-joining”, unos valores de “bootstrap” calculados a partir de 500 repeticiones y utilizando las opciones estándar del software MEGA.

8.5.2. Estudios de diversidad

8.5.2.1. Estimación de la riqueza

Se utilizaron dos estimadores de riqueza: índice de Chao y Jackknife. En ambos casos la estimación se hizo después de agrupar las cepas a nivel de género en base a los resultados obtenidos tras la comparación de las secuencias del 16S rRNA en el GenBank.

- Estimador de riqueza no paramétrico Chao (Chao, 1984): Los estimadores no paramétricos asumen el tipo de distribución en el conjunto de datos y no los ajustan a un modelo determinado (Smith y van Belle, 1984; Palmer, 1990; Colwell y Coddington, 1994), sino que requieren solamente de datos de presencia-ausencia.

$Chao_2 = S_r + [a^2/(2b)]$ donde S_r es la riqueza de géneros observados.

“ S_r ” es el número de géneros en una muestra, “ a ” es el número de géneros representados solamente por un único individuo en esa muestra (número de “singletons”) y b es el número de géneros representadas por exactamente dos individuos en la muestra (número de “doubletons”; Colwell y Coddington, 1994).

- Estimador de Jaknife de primer orden: Es una técnica para reducir el sesgo de los valores estimados, en este caso para reducir la subestimación del verdadero número de especies en una comunidad con base en el número representado en una muestra reduciendo el sesgo del orden $1/m$ (Palmer, 1990; Krebs, 1989).

Jack 1 = $S + L[(m - 1)/\mu]$ donde: μ = número de muestras; L = número de géneros que aparecen solamente en una muestra.

8.5.2.2. Medida de la diversidad biológica

Se utilizaron dos índices: índice de Shannon e índice de Simpson.

El índice de Shannon se utilizó tanto en el muestreo de organismos cultivables como en el de no cultivables. Este índice expresa la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra. Mide el grado promedio de incertidumbre en predecir a qué especie pertenecerá un individuo escogido al azar de una colección (Peet, 1974; Magurran, 1988; Baev y Penev, 1995). Asume que los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies están representadas en la muestra. Adquiere valores entre cero, cuando hay una sola especie, y el logaritmo de S , cuando todas las especies están representadas por el mismo número de individuos (Magurran, 1988).

Su expresión es: $H' = -\sum p_i \ln(p_i)$ donde p_i es la abundancia proporcional de un género.

El índice de Simpson manifiesta la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una muestra sean de la misma especie. Está fuertemente influido por la importancia de las especies más dominantes (Magurran, 1988; Peet, 1974).

$$\Lambda = \sum p_i^2$$

Donde p_i = abundancia proporcional de la especie i , es decir, el número de individuos de la especie i dividido entre el número total de individuos de la muestra.

8.5.2.3. Comparación de cobertura

Las comparaciones estadísticas de la cobertura de las librerías 16S rDNA de los 5 muestreos se realizó utilizando el programa Libshuff (Singleton *et al.*, 2001), que utiliza la fórmula de Good (1953) para generar curvas de cobertura homólogas y heterogéneas de las librerías de clones. Las secuencias fueron mezcladas al azar 999 veces entre las muestras antes de calcular las curvas utilizando el test de estadística Cramér-von Mises (Pettitt, 1982). El DNAdist del programa Phylip (Felsenstein, 1989), utilizando el modelo de Kimura (1980) para la sustitución de nucleótidos, fue utilizado para generar la matriz de distancias analizada por Libshuff.

Finalmente, para obtener una idea gráfica de qué grupos taxonómicos son compartidos y cuales son propios de cada librería, se llevó a cabo el estudio de shared OTUs con el programa SONS, realizando un diagrama de Venn. Estos estudios se realizaron con las secuencias de organismos cultivables y de no cultivables.

8.6. Estudios de las distintas librerías metagenómicas realizadas con el gen 16s rRNA amplificado a partir del ADN aislado de la comunidad total del biorreactor en cada momento de muestreo

8.6.1 Clasificación taxonómica

En cada momento de muestreo, se extrajo el ADN de la comunidad del R. B. M. para obtener la información génica de todas las cepas, tanto cultivables como no cultivables. Para extraer este ADN se utilizó el Kit UltraClean® Soil DNA Isolation Kit de MOBIO (REF: 12800-50/100), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Como se vio que el ADN extraído en el primer muestreo podía presentar sustancias que interfiriesen con el mismo, en el resto de los muestreos se realizaron 5 lavados previos de 2mL del fango con medio Ringers, centrifugando a 3.000 r. p. m. 5 minutos.

Se amplificaron mediante PCR los 1.500 pb correspondientes al gen que codifica para el ARN ribosomal 16s con los siguientes cebadores: directo 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' y reverso 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3' (Devereux y Willis, 1995) en una concentración 0,5 µM cada uno, en una reacción de 25 µL, 1X de 10X PCR Buffer con Mg (Roche), 1,5% de 100% de DMSO, 1 mM de cada dNTP, 1,4 unidades de ADN polimerasa (UltraTools DNA Polymerase de Biotools), 100 ng de ADN bacteriano y completado con agua. La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp 2700 (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 94 °C 2 minutos, seguido de 10 ciclos de 94 °C 30 seg, 50-54,5 °C 30 seg y 72 °C 1 minuto, seguido de 20 ciclos de 94 °C 30 seg, 50 °C 30 seg y 72 °C 1 minuto (incrementando 5 segundos en cada ciclo) y finalizando con 7 minutos a 72 °C.

Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE 1×) con Gel Red (concentración 1X) mediante un analizador de imagen GelDoc2000™ 170-8126 (BioRad, CA, EE.UU).

Una vez comprobada la amplificación se cortaron las bandas correspondientes a los fragmentos de 1.500 pb, purificándolas con el kit Qiaquick^R Gel Extraction kit de Qiagen.

Con este producto, se realizaron las genotecas del gen 16S rRNA para cada momento de muestreo. Para ello se utilizó el kit comercial Topo Ta Cloning Sequence (Invitrogen, ref. K458001) siguiendo las especificaciones técnicas que marca el fabricante.

Se aislaron entre 50-70 clones de cada genoteca o momento de muestreo (en el muestreo 1, se aislaron 71 clones; en el muestreo 2, se aislaron 56 clones; en el muestreo 3, se aislaron 55 clones; en el muestreo 4, se aislaron 64 clones; en el muestreo 5, se aislaron 57 clones), de manera que el número total de clones aislados fue de 303.

Para aislar los plásmidos se crecieron las cepas en medio luria broth (Pronadisa) con 50 µg/L de Kanamicina (Sigma) durante 24 horas a 37 °C y se utilizó el kit Speedtools Plasmid DNA purification Kit (Biotools), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Cada plásmido purificado fue secuenciado con el Primer T3 (5' ATTAACCCTCACTAAAGGGA 3'), cuya secuencia complementaria está presente en el vector utilizado. Las lecturas devueltas por el servicio de secuenciación (Macrogen Inc.) fueron visualizadas con el programa informático Sequence Scanner versión 1.0. Las tareas de edición de secuencias se realizaron con el programa informático Clone Manager Professional Suite versión 6.00. El chequeo de quimeras (secuencias que pertenecen a más de un individuo que son amplificadas como un solo contig, dando lugar a un amplicón de individuos diferentes) se realizó en el servidor online Bellerophon server (Huber *et al.*, 2004). El alineamiento de secuencias se llevó a cabo en el servidor Mafft version 6 (Kato *et al.*, 2009). Para la clasificación filogenética de las secuencias se llevaron en paralelo dos estrategias:

a) Uso del Blastn con cada una de las secuencias a través de la siguiente página web http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on

b) Introducción de las secuencias en RDP Release 10 (Wang *et al.*, 2007).

La construcción del árbol filogenético se realizó utilizando el programa MEGA 5.0, con el algoritmo “neighbor-joining”, unos valores de “bootstrap” calculados a partir de 500 repeticiones y utilizando las opciones estándar del software MEGA.

Las secuencias parciales del 16s rRNA obtenidas en este estudio para cada uno de los muestreos fueron depositadas en la base de datos del Genbank bajo los números de acceso JN191751 hasta el JN192053.

8.6.2. Análisis estadísticos realizados con las secuencias

Para estudiar la biodiversidad, la riqueza y comparar las librerías se utilizaron las herramientas estadísticas DOTUR, SONS y J-Libshuff (<http://schloss.micro.umass.edu/index.html>).

8.7. Estudio de la diversidad metabólica de las comunidades microbianas que se desarrollan en el R. B. M. mediante el uso de placas Biolog®

El estudio se realizó en colaboración con el equipo de investigación del Dr. Carlos Garbisu (Neiker, Vizcaya).

Las placas empleadas en este estudio (Gram positivas, Gram negativas y Anaerobia) constan de 96 pocillos que contienen la fuente de carbono liofilizada y un indicador del consumo de dicha fuente (sales de tetrazolio), que viran a violeta en medio reductor (más color cuanto más consumo del sustrato se produzca). En cada momento de muestreo se sembraron muestras en las tres placas y por triplicado.

Protocolo (figura 8.8):

- A partir del fango activo procedente del R. B. M. (sin previa refrigeración o congelación) se obtuvo una suspensión bacteriana. Para ello se pusieron las muestras en agitación en vaivén 125 r. p. m. durante una hora y después se centrifugaron en una centrífuga Labofuge 400 durante 10 minutos a 1.000 rpm. Como después de centrifugar quedaban partículas disueltas en el sobrenadante, se dejó decantar unos 15-20 minutos.

- La suspensión bacteriana se diluyó con tampón fosfato 1:10 hasta obtener diluciones con una absorbancia de entre 0,05 y 0,15 a 420 nm. La medida de absorbancia se realizó en un espectrofotómetro Shimadzu UV Spectrophotometer UV – 1800 a una longitud de onda a 420 nm.

- Se inocularon los pocillos de la placa con 150 µL por pocillo de la dilución en placas Gram positivas (GP), Gram negativas (GN) y anaerobia (AN).

- Las placas se incubaron a 30 °C en una estufa en semioscuridad. La placa AN se cultiva en anaerobiosis con Anaerogen.

- Se midió la absorbancia a tiempo 0 y cada 24 horas. En el caso de la placa de AN se mide a las 96 horas y cuando se termina la reacción.

La lectura de las placas se realizó en un lector de placas Anthos Zenyth 3100 a una longitud de onda de 595 nm.

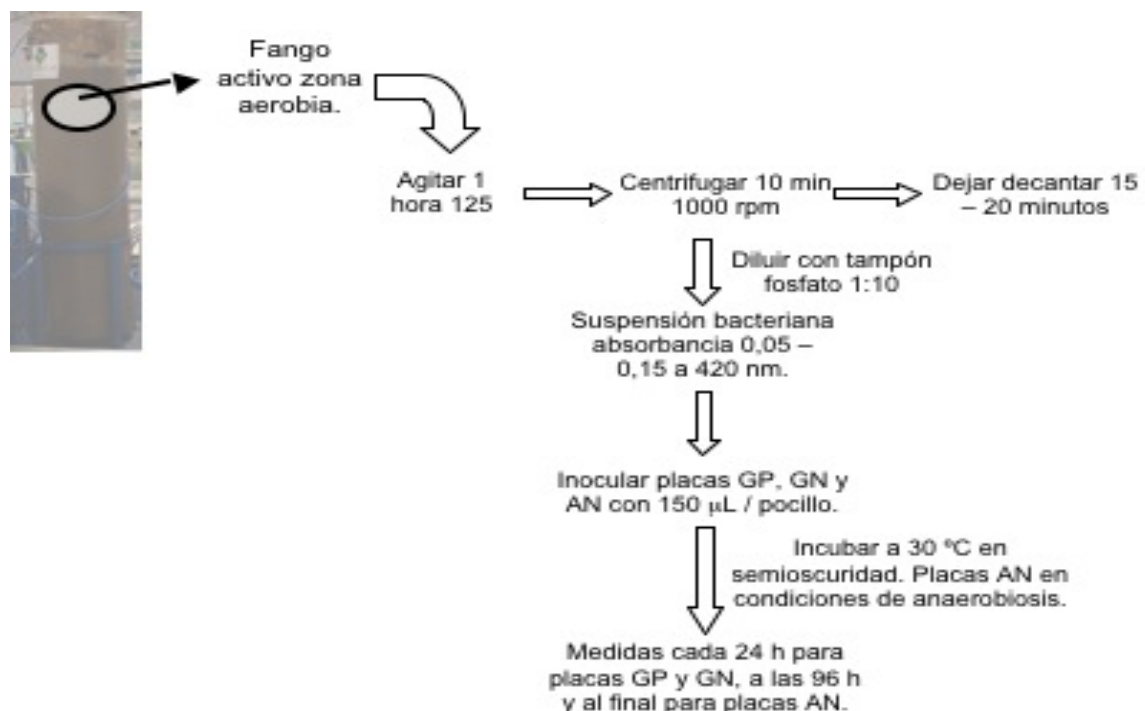


Figura 8.8. Esquema ensayo Biolog® con fango activo del R. B. M.

Tratamiento de los datos:

- Se corrigió cada valor de absorbancia restándole el blanco (absorbancia corregida). Todas las absorbancias negativas se transformaron en ceros. (Baudoin *et al.*, 2001).

- Se calculó la media de absorbancia corregida de todos los pocillos (AWCD, Average Well Colour Development) como la media de los 96 valores de absorbancia corregidos para cada réplica (Baudoin *et al.*, 2001).

$$AWCD = \Sigma(\text{Co-Rab})/N_s$$

Donde Co = producción del color por cada pocillo (densidad óptica medida a 595 nm); Rab = valor de absorbancia del pocillo de control; N_s = número de sustratos (95)

- Se representó el valor de AWCD frente al tiempo de incubación para obtener las curvas de crecimiento de la comunidad microbiana en los pocillos de la placa. En estas curvas se eligió el momento de incubación en el que el crecimiento de los microorganismos estaba iniciando la fase estacionaria.

- Los valores de absorbancia de cada pocillo en el momento de incubación seleccionado para cada tipo de placa y muestreo fueron divididos entre el valor del AWCD para normalizar los valores y minimizar la influencia de la densidad del inóculo entre las placas (Baudoin *et al.*, 2001; Graham y Haynes, 2005).

- Con los valores de absorbancia corregidos del momento de incubación escogido (en el punto anterior) se calculó la diversidad metabólica de cada muestra utilizando el índice de diversidad de Shannon - Weaver (Shannon y Weaver, 1963):

$$H_{(e)} = - \Sigma [n_{ip}/N_a * \text{Log } n_{ip}/N_a]$$

Donde:

n_{ip} = absorbancia corregida de cada sustrato (pocillo).

N_a = suma de los 95 valores de absorbancia corregidos.

Finalmente, con los valores de absorbancia correspondientes al momento de incubación en el que el que el crecimiento de los microorganismos estaba iniciando las fase estacionaria, se realizó un Análisis de Correspondencias (CA) con los valores medios de las tres réplicas de los datos de absorbancia (en la fase estacionaria) de las placas Biolog de cada momento de muestreo y también se realizó un estudio para conocer la evolución del consumo de las distintas fuentes de carbono a lo largo del tiempo.

8.8. Experimentos con *Lemna minor* inoculada con un consorcio del biorreactor

En los experimentos explicados en el apartado 2.13.1, realizados en colaboración con el equipo de investigación del Dr. José María Becerril (Universidad del País Vasco), se vio que las Lemnas eran capaces de crecer en el agua de taladrina.

Por ello, se desarrolló un nuevo experimento en el que las plantas estuvieron en contacto con el agua de taladrinas (DQO 1.968,33 ppm) durante 5 días, el pH de la solución a biorremediar y de la solución control se ajustó a 6,4. En este experimento se inóculo un

consorcio bacteriano formado por 4 cepas aisladas del R. B. M. (RBM-A11 - *Pseudomonas* sp. n° acceso Genbank JF937328, RBM-A12 - *Acinetobacter johnsonii* n° acceso Genbank JF937329, RBM-A16 - *Acinetobacter johnsonii* n° acceso Genbank JF937332 y RBM-A23 - *Sphingobium xenophagum* n° acceso Genbank JF937337).

Se pesaron 0,155 g de plantas de *Lemna minor* y se colocaron en placas petri de 6 cm de diámetro con 15 mL de la solución de tratamiento. Como medio nutritivo se utilizó medio Hutner, 1953 (anexo 3) a la mitad de la concentración normal.

Los ensayos se realizaron en cámaras de cultivo con una iluminación de 300 mmol/(s*m²), una humedad relativa de entre un 60 y un 70% y una temperatura de entre 18 y 25 °C.

Se realizaron distintos tratamientos (figura 2.26):

- Control sin inocular: Solución Hutner en concentración de ½ y caldo nutritivo en el mismo volumen que el inóculo.
- Control inoculado: Solución Hutner en concentración de ½ con caldo nutritivo e inóculo.
- Agua de taladrina sin inóculo: Agua de taladrina con una DQO de 1.968 ppm y caldo nutritivo en el mismo volumen que el inóculo. Se añadió el medio nutritivo Hutner en una concentración de ½.
- Agua de taladrina con inóculo: Agua de taladrina con una DQO de 1.968 ppm e inóculo. Se añadió el medio nutritivo Hutner en una concentración de ½.

En cada tratamiento, se realizaron medidas de peso fresco de las plantas, medidas de su capacidad fotosintética mediante la detección de la fluorescencia emitida por el fotosistema II (PSII) y determinación de pigmentos fotosintéticos (según apartado 2.13.1).

En todos los ensayos se realizaron medidas de peso fresco de las plantas por tratamiento, fluorescencia y extracción de pigmentos fotosintéticos según el procedimiento descrito en el apartado 2.14.

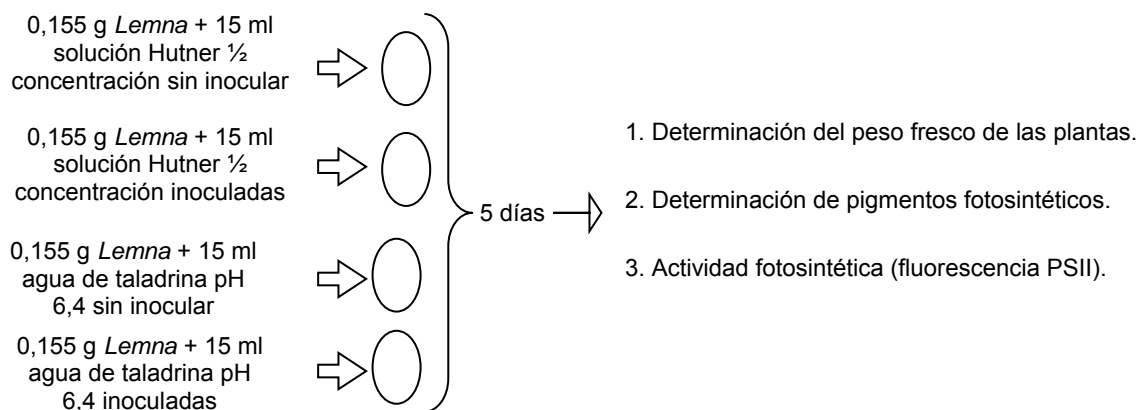


Figura 8.9. Experimento de fitorremediación de agua de taladrina con un consorcio del biorreactor.

8.9. Diseño de un sistema planta-microorganismo con cepas aisladas del biorreactor

8.9.1. Primer experimento: realizado en la Universidad del País Vasco y con una sola inoculación del consorcio

Con el objetivo de determinar el efecto del consorcio, descrito en el apartado anterior, sobre el sistema maíz-esparto, durante la estancia en Bilbao se realizó un experimento similar al descrito en el apartado 5.3, pero en él sólo se realizó una inoculación del consorcio bacteriano.

Se utilizó agua de taladrina con una DQO de 1.821 ppm y la intensidad de luz fue de 600 micromoles/(m²*s).

Los análisis biométricos realizados fueron: altura, número de hojas, peso seco de la parte aérea y radical, fluorescencia y análisis de pigmentos (según el apartado 2.13.1.). En las muestras de agua se midió la DQO y el pH.

8.9.2. Segundo experimento: realizado en la universidad San Pablo-CEU con dos inoculaciones del consorcio

Una vez comprobado que el consorcio bacteriano permitía una mayor reducción de la DQO, se realizó un nuevo experimento, esta vez con dos inoculaciones. Se siguió el esquema explicado en el apartado 5.3.

Al igual que en los ensayos anteriores, 5 días después de que las plantas estuviesen en contacto con las taladrinas, se realizaron medidas biométricas (altura, número de hojas y peso seco de la parte aérea y radical), también fotosíntesis (según el apartado 2.14), reacción de Hill y cantidad de clorofilas (según el apartado 5.4).

Respecto al agua de taladrinas, se tomaron muestras antes y después de pasar por el sistema fitorremediador y se midieron: la DQO (según apartado 2.2.2), el pH (según apartado 2.2.3), los hidrocarburos presentes, la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y los hidrocarburos totales (según apartado 2.3.) y se estudió la biotoxicidad según se explica en el apartado 5.5.

8.10. Tratamiento estadístico: Análisis de la varianza (ANOVA)

8.10.1 Análisis de la varianza (ANOVA)

En los experimentos explicados en los apartados 8.7, 8.8 y 8.9 se realizaron ANOVA, unidireccionales, a partir de los valores de las réplicas. Cuando el valor de P era menor a 0,05 (95% de confianza) se consideró que existían diferencias significativas entre las variables analizadas. En ese caso, se compararon los valores medios mediante el estadístico LSD (Least Significant Difference) de Fisher (Sokal y Rohlf, 1979). El software utilizado fue el Statgraphics Plus 5.1.

8.10.2. Análisis estadísticos multivariantes

Todos los análisis estadísticos multivariantes se realizaron utilizando el software CANOCO™ v4.5. Entre los métodos multivariantes disponibles en este trabajo se ha utilizado el análisis de correspondencias (CA) que es un método de ordenación apto para datos para datos cualitativos o cuantitativos que presenten una relación unimodal ya que está basado en distancias de Chi cuadrado (asimétrico) y por tanto, no toma los dobles ceros como similitudes.

**9. RESULTADOS: ESTUDIO DE LA
DINÁMICA DE COMUNIDADES
MICROBIANAS EN UN REACTOR
BIOLÓGICO DE MEMBRANA
DURANTE EL PROCESO DE
BIORREMEDIACIÓN DE
TALADRINAS Y SU EMPLEO EN
SISTEMAS DE FITORREMEDIACIÓN**

9.1. Seguimiento del reactor biológico de membrana (R. B. M.)

En el Anexo 16 se recoge una tabla con los resultados de los controles realizados durante el funcionamiento del biorreactor.

Las medidas realizadas antes del 14 de mayo de 2010 corresponden a las fechas en las que el biorreactor no trabajaba con una concentración de 100% de taladrinas, es decir, corresponden a la fase de aclimatación.

9.1.1 Evolución de la demanda química de oxígeno (DQO)

Como se puede ver en la figura 9.1, el efluente de entrada en el R. B. M. tiene una DQO de entre 4.000 y 8.600 ppm.

El fango activo presente en el reactor consigue reducir la DQO hasta valores de entre 1.000 y 2.000 ppm, salvo excepciones como el día 11 de junio de 2010 donde se obtuvo una DQO de 321 ppm y el día 21 de junio de 2011 donde se obtuvo una DQO de 4.800 ppm.

En el efluente de entrada, el valor de la DQO es muy superior al límite establecido por la Ley 10/1993, de la Comunidad de Madrid, de 26 de octubre, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento; mientras que en el efluente de salida, este valor está por debajo de ese límite salvo en las muestras del 17 de junio y el 21 de junio donde la DQO fue de 2.098 y 4.787 ppm.

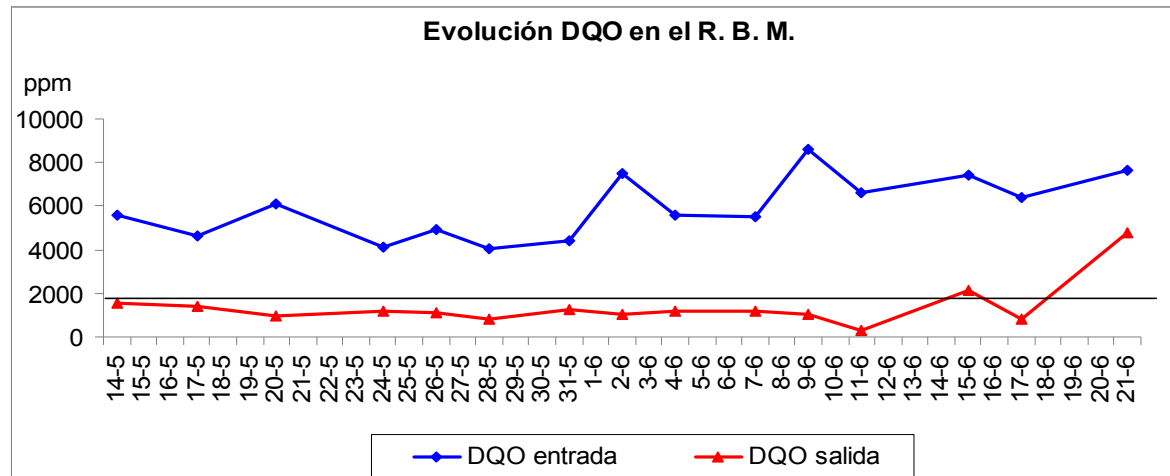


Figura 9.1. Evolución de la demanda química de oxígeno (DQO) en el reactor biológico de membrana (R. B. M.). Azul (DQO entrada); rojo (DQO salida). La línea negra indica el valor límite de este parámetro (1.750 ppm) permitido por la Ley 10/1993 de la Comunidad de Madrid, de 26 de octubre, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento.

Por otra parte, la figura 9.2 muestra la evolución del rendimiento (% de reducción de la DQO) del reactor. Este rendimiento es siempre superior al 70%, salvo el 21 de junio cuando el rendimiento fue de tan sólo el 37%.

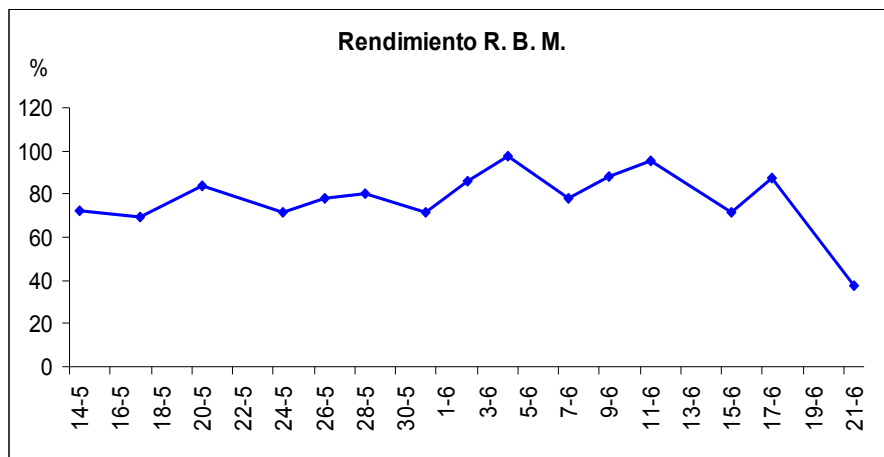


Figura 9.2. Evolución del rendimiento del R. B. M. (Diferencia entre la DQO total del influente y la DQO total del efluente multiplicado por 100 y dividido entre la DQO total del influente).

9.1.2. Determinación de la concentración de sólidos en suspensión

En la figura 9.3 se puede observar una disminución progresiva de este parámetro, salvo los días 18 de mayo, 28 de mayo y 9 de junio donde se produjeron ligeros incrementos.

Durante el mes de mayo, esta concentración fue de entre 15 y 20 ppm, alcanzando la concentración de sólidos óptima (alrededor de los 10 ppm) entre el 31 de mayo y el 9 de junio. A partir del 11 de mayo esta concentración disminuye por de bajo de los 10 ppm.

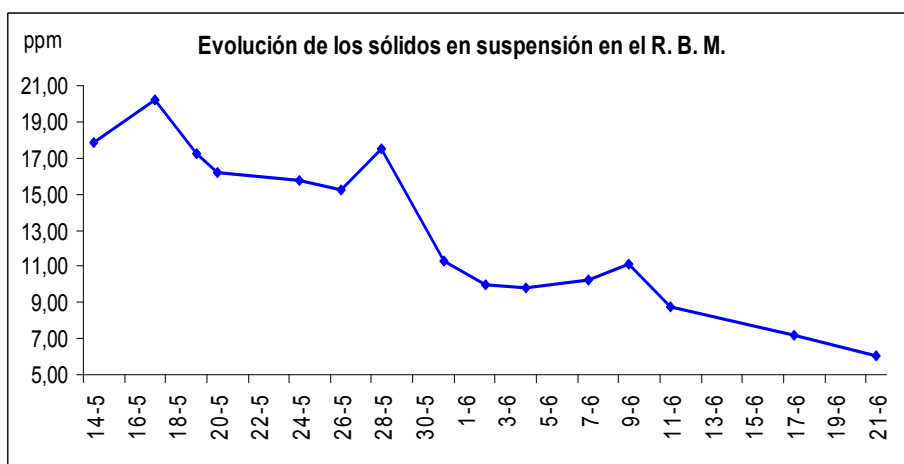


Figura 9.3. Evolución de la concentración de sólidos en suspensión en el R. B. M.

9.1.3. Determinación de la turbidez del permeado

La figura 9.4 muestra la evolución de la turbidez durante el funcionamiento del reactor. Desde el 17 de mayo hasta el 9 de junio este parámetro es inferior a 15 NTU, aumentando después de esta fecha hasta valores de 258 NTU.

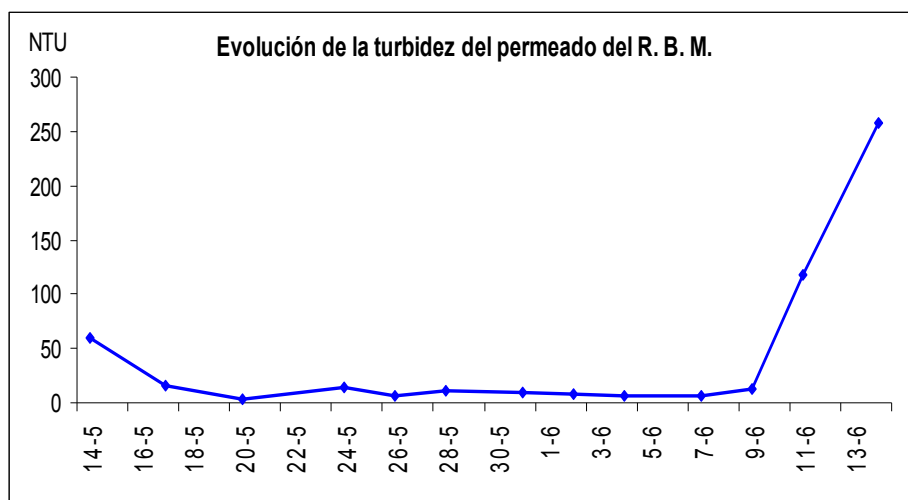


Figura 9.4. Evolución de la turbidez del permeado durante el funcionamiento del R. B. M.

9.1.4. pH

En la figura 9.5 se observa como en el efluente de salida el valor del pH apenas varía a lo largo del tiempo. Sin embargo, se observan oscilaciones del valor de este parámetro en el efluente de entrada.

También se puede destacar que el valor del pH en la taladrina pretratada inicial es inferior al obtenido para el agua de taladrina, aunque está dentro de los límites permitidos por la Ley 10/1993 de la Comunidad de Madrid (pH permitido entre 6 y 10).

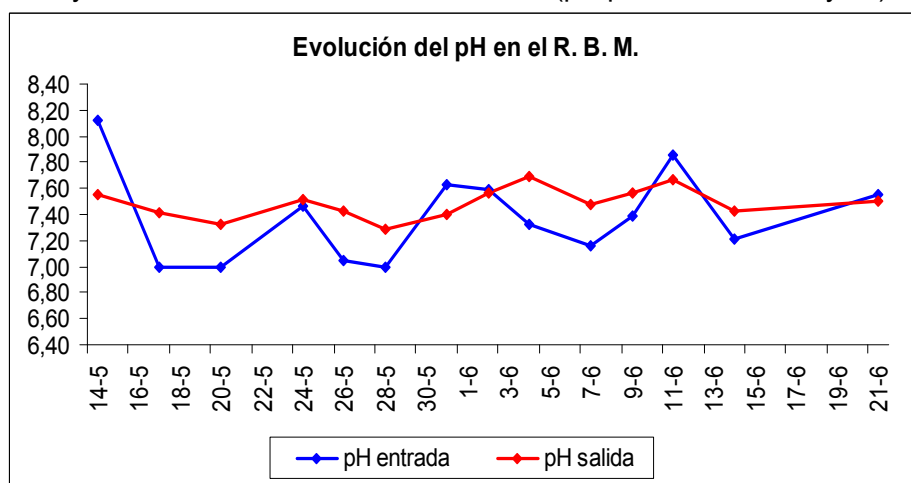


Figura 9.5. Evolución del pH en el R. B. M.

9.1.5. Velocidad del caudal de permeado

En la figura 9.6 se puede observar como el caudal de permeado apenas varía a lo largo del tiempo, observándose una disminución del mismo a partir del 11 de junio. El caudal más alto fue de 11 L/h y se obtuvo el día 19 de mayo.

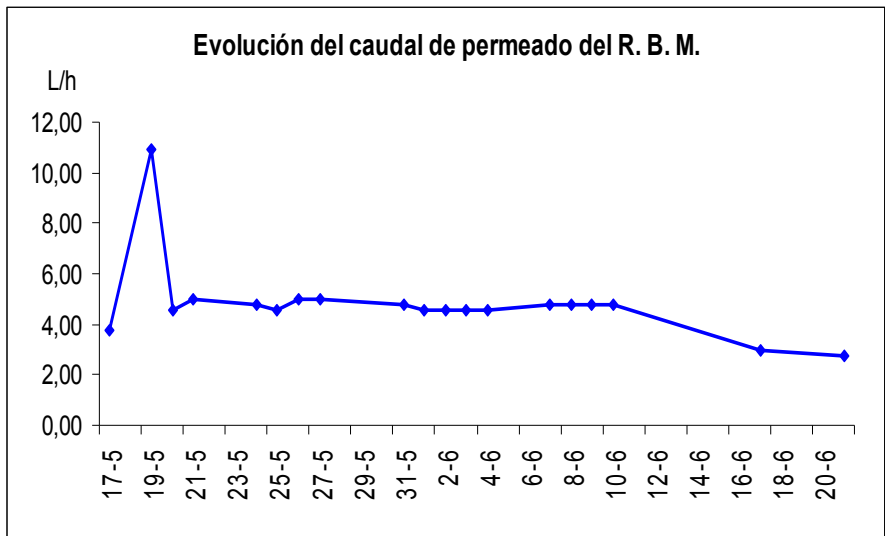


Figura 9.6. Evolución del caudal de permeado en el R. B. M.

9.1.6. Medida de la permeabilidad intrínseca de la membrana

En la figura 9.7 se muestran las medidas de permeabilidad intrínseca de la membrana.

Puede verse como, después de realizar las distintas limpiezas (figuras 9.7B y 9.7C), este parámetro no recupera los valores iniciales (figura 9.7A) sino que disminuye considerablemente. Además, en la última limpieza (figura 9.7C) la presión máxima a la que pudo someterse la membrana se redujo en 8 unidades, pasando de los 20 cm de Hg a los 12 cm de Hg. Esto indica la agresividad de las taladrinas.

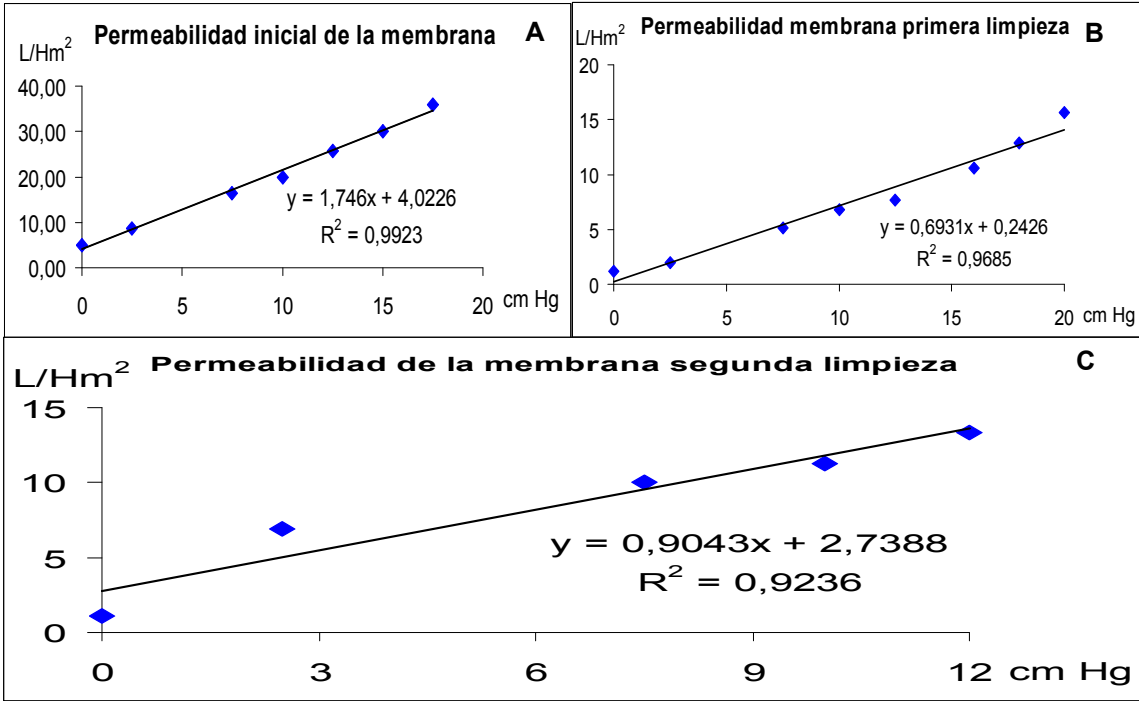


Figura 9.7. A - Permeabilidad inicial de la membrana. B - Permeabilidad de la membrana tras la primera limpieza química (19 de mayo de 2011). C - Permeabilidad de la membrana tras la segunda limpieza química (15 de junio de 2011).

9.2. Estudios de las bacterias cultivables aisladas del R. B. M.

9.2.1. Clasificación taxonómica

Como se explicó en el apartado 8.5, una vez que se puso a punto el R. B. M. (14 de mayo de 2011) se realizaron 5 muestreos (A, B, C, D y E) con el objetivo de determinar la variabilidad existente.

En el Anexo 15 se recoge la clasificación taxonómica de estas colonias, así como su morfología y la de la bacteria. Las bacterias aisladas en estos muestreos se han designado con la nomenclatura “RBM-Letra de muestreo y número de bacteria”. La letra de muestreo se ha designado como A, B, C, D o E.

Cabe destacar que las bacterias aisladas en todos los muestreos fueron Gram-negativas, salvo la cepa RBM – E2 (*Mycobacterium sp.*) que era Gram-positiva.

En el árbol filogenético realizado con las secuencias parciales del gen 16s rRNA de las bacterias aisladas del reactor (figura 9.8) se observa que las bacterias se agrupan en 5 grupos: *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Alfaproteobacteria*, *Actinobacteria* y *Flavobacteria*. Dentro del grupo de las *Alfaproteobacteria* se encuentran dos subgrupos *Familia Caulobacteriaceae* y *Orden Rhizobiales*.

La mayoría de las bacterias del primer y del segundo muestreo (A y B) se encuentran en el grupo *Gammaproteobacteria*, mientras que en el caso del quinto muestreo (E) se encuentran principalmente en el grupo de las *Alfaproteobacteria*. En el tercer y cuarto muestreo (C y D) están repartidas más o menos equitativamente entre los distintos grupos, salvo en el grupo *Actinobacteria* donde no aparecen.

También se puede observar que las bacterias de todos los muestreos se encuentran repartidas en 4 grupos, exceptuando los muestreos uno (A) y tres (C) que sólo se encuentran en 3 grupos.

Finalmente cabe destacar que el grupo de las *Actinobacteria* está formado por una única cepa que pertenece al quinto muestreo (E).

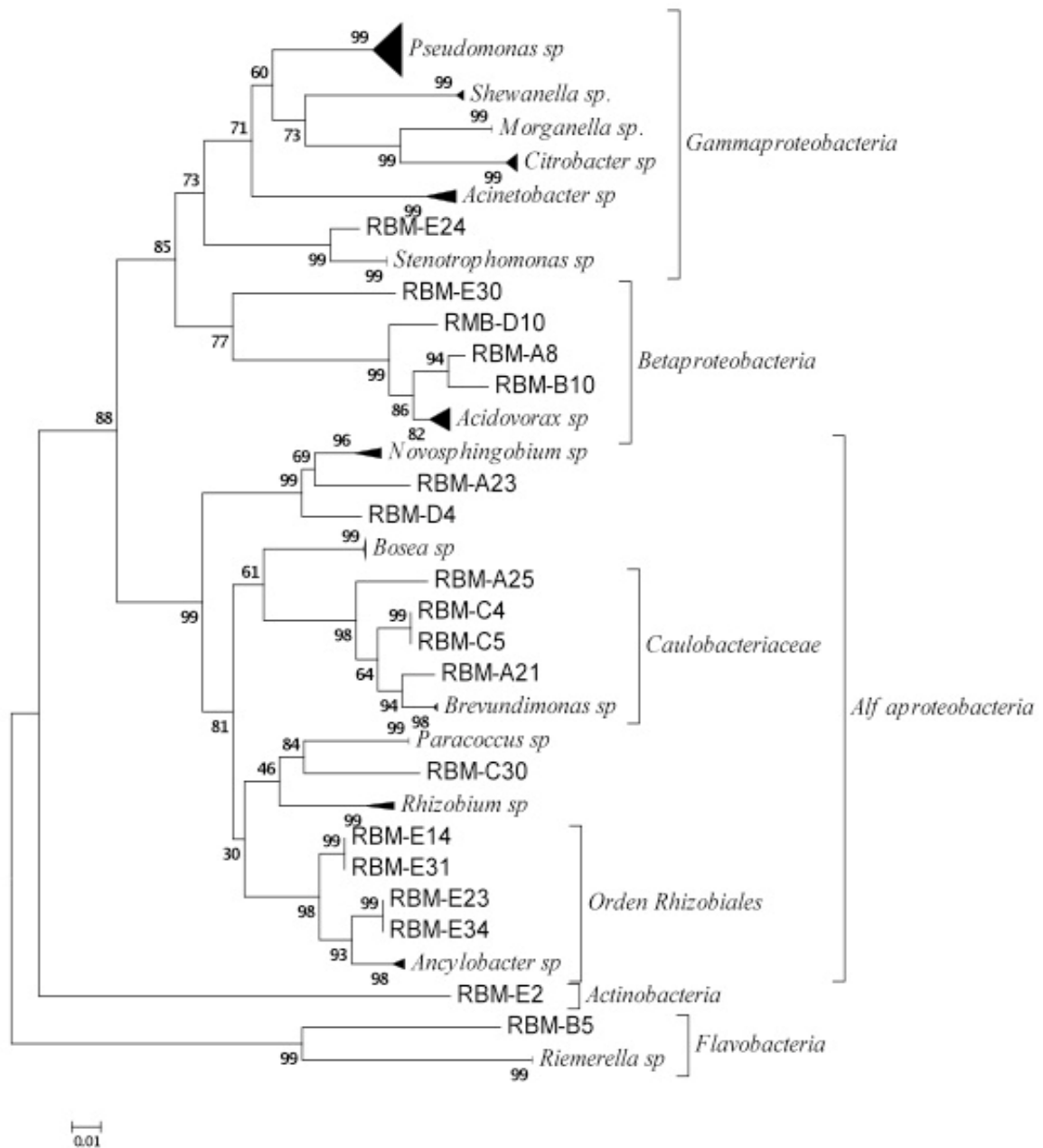


Figura 9.8. Árbol filogenético no enraizado realizado con las secuencias del gen 16s rRNA de las bacterias cultivables aisladas del R. B. M. El árbol filogenético ha sido realizado con el programa MEGA4 usando secuencias alineadas con el servicio MAFFT v6.0. La distancia evolutiva fue inferida utilizando el método del vecino más próximo y seguidamente la curva de Jukes y Cantor. El bootstrap del consenso del árbol inferido con 500 réplicas fue tomado como representante de la distancia evolutiva del taxón analizado. El porcentaje de réplicas del árbol en el que los taxones del clúster asociados juntos en más de un 50% de las réplicas de los bootstraps se muestran entre paréntesis. *Pseudomonas sp.* (RBM-A1, RBM-A3, RBM-A4, RBM-A11, RBM-A13, RBM-A15, RBM-A17, RBM-A19, RBM-A22, RBM-B1, RBM-B8, RBM-B9, RBM-B15, RBM-B18, RBM-C1, RBM-C12, RBM-C15, RBM-C18, RBM-C25, RBM-E20, RBM-E29,) *Shewanella sp.* (RBM-A5, RBM-A26, RBM-B3, RBM-C6), *Morganella sp.* (RBM-B17, RBM-B21, RBM-B23), *Citrobacter sp.* (RBM-B2, RBM-B24, RBM-B20, RBM-B25, RBM-B26, RBM-B27, RBM-C3), *Acinetobacter sp.* (RBM-A12, RBM-A16, RBM-C13, RBM-E25, RBM-E26), *Stenotrophomonas sp.* (RBM-D11, RBM-D13, RBM-E18, RBM-E27), *Acidovorax sp.* (RBM-A24, RBM-A27, RBM-C16, RBM-C21, RBM-D9, RBM-D12, RBM-E16, RBM-E32, RBM-E33), *Novosphingobium sp.* (RBM-B13, RBM-C10, RBM-E17, RBM-E22), *Bosea sp.* (RBM-A10, RBM-D3, RBM-D8, RBM-D14, RBM-E1, RBM-E10, RBM-E15, RBM-E21), *Brevundimonas sp.* (RBM-E6, RBM-E9, RBM-E13), *Paracoccus sp.* (RBM-B22, RBM-E19, RBM-E28), *Rizobium sp.* (RBM-B12, RBM-C17, RBM-D6,), *Ancylobacter sp.* (RBM-B14, RBM-C27, RBM-D5, RBM-E3), *Riemerella sp.* (RBM-B4, RBM-C7, RBM-C11)

9.2.2 Estudios de diversidad

9.2.2.1. Índice de Chao

Como se comentó en el apartado 8.5.2.1 este índice se basa en la estimación de la biodiversidad a partir del número de muestras que aparecen sólo en uno o dos muestreos. En base a la tabla 9.1 se calculó este índice obteniendo un valor de riqueza de géneros de 41. Entre los 5 muestreos se aislaron un total de 27 géneros.

En dicha tabla pueden observarse las especies que aparecen en un muestreo: *Afipia* sp. (muestreo A), *Sphingobium* sp. (muestreo A), *Caulobacter* sp. (muestreo C), *Catellibacter* sp. (muestreo C), *Flexibacter* sp. (muestreo B), *Morganella* sp. (muestreo B), *Enterobacter* sp. (muestreo B), *Sphingomonas* sp. (muestreo C), *Diaphorobacter* sp. (muestreo C), *Mycobacter* sp. (muestreo E), *Xanthobacter* sp. (muestreo E), *Pseudoxanthomonas* sp. (muestreo E) y *Achromobacter* sp. (muestreo E). También se muestran las especies que aparecen en dos muestreos: *Comamonas* sp. (muestreos A y B), *Brevundimonas* sp. (muestreos A y E), *Citrobacter* sp. (muestreos B y C), *Riemerella* sp. (muestreos B y C), *Paracoccus* sp. (muestreos B y E) y *Stenotrophomonas* sp. (muestreos D y E).

Tabla 9.1. Número de géneros observados en cada muestreo. Cero: ausencia del género en ese muestreo; uno: presencia del género en ese muestreo. En azul los géneros que aparecen sólo en un muestreo; en verde, los géneros que aparecen en dos muestreos.

	A	B	C	D	E	
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	1	1	0	1	4
<i>Shewanella</i> sp.	1	1	1	0	0	3
<i>Comamonas</i> sp.	1	1	0	0	0	2
<i>Bosea</i> sp.	1	0	0	1	1	3
<i>Acinetobacter</i> sp.	1	0	1	0	1	3
<i>Afipia</i> sp.	1	0	0	0	0	1
<i>Sphingobium</i> sp.	1	0	0	0	0	1
<i>Acidovorax</i> sp.	1	0	1	1	1	4
<i>Brevundimonas</i> sp.	1	0	0	0	1	2
<i>Citrobacter</i> sp.	0	1	1	0	0	2
<i>Caulobacter</i> sp.	0	0	1	0	0	1
<i>Riemerella</i> sp.	0	1	1	0	0	2
<i>Novosphingobium</i> sp.	0	1	1	0	1	3
<i>Rhizobium</i> sp.	0	1	1	1	0	3
<i>Ancylobacter</i> sp.	0	1	1	1	1	4
<i>Catellibacter</i> sp.	0	0	1	0	0	1
<i>Flexibacter</i> sp.	0	1	0	0	0	1
<i>Morganella</i> sp.	0	1	0	0	0	1
<i>Paracoccus</i> sp.	0	1	0	0	1	2
<i>Enterobacter</i> sp.	0	1	0	0	0	1
<i>Sphingomonas</i> sp.	0	0	0	1	0	1
<i>Diaphorobacter</i> sp.	0	0	0	1	0	1
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	0	0	0	1	1	2
<i>Mycobacterium</i> sp.	0	0	0	0	1	1
<i>Xanthobacter</i> sp.	0	0	0	0	1	1
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	0	0	0	0	1	1
<i>Achromobacter</i> sp.	0	0	0	0	1	1
	9	12	11	7	13	

9.2.2.2. Estimador de Jackknife

Este estimador se describe en el apartado 8.5.2.1. Utilizando la tabla 9.1 se obtuvo una riqueza de géneros de 39, un poco inferior a la obtenida según el índice de Chao.

9.2.2.3. Diversidad biológica: Índice de Shannon-Wiener

Como se explicó en el apartado 8.5.2.2, este índice tiene en cuenta el número de individuos de cada género y el número de individuos totales. Se calculó este índice para cada uno de los muestreos.

En la figura 9.9 se muestra la variación de la diversidad entre los distintos muestreos. Así se puede observar un incremento de la misma entre el muestreo A y B, el valor de la diversidad fue prácticamente igual en el muestreo B y en el C.

En el muestreo D, que se realizó dos semanas después de retirar la membrana del reactor, se produce una bajada de la diversidad aunque el valor de diversidad obtenido en este muestreo no es inferior al del muestreo A. Finalmente, en el muestreo E es donde se obtiene una mayor diversidad biológica.

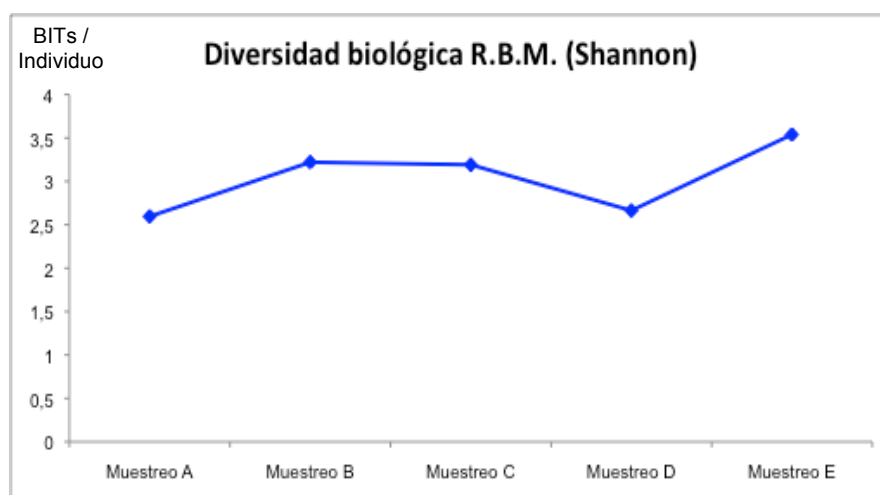


Figura 9.9. Diversidad biológica de cada muestreo según el índice de Shannon. La distancia considerada entre OTUs (unidades taxonómicas operativas) fue de 0,03 (3%).

9.2.2.4. Comparación de Libshuff

Esta comparación permite conocer la existencia de diferencias significativas entre los distintos muestreos.

En la figura 9.10 se observa como la comparación entre los diferentes muestreos no presenta diferencias significativas en la mayoría de los casos, salvo entre los muestreos A y D, B y D y, B y E donde el valor obtenido es menor a 0,0026.

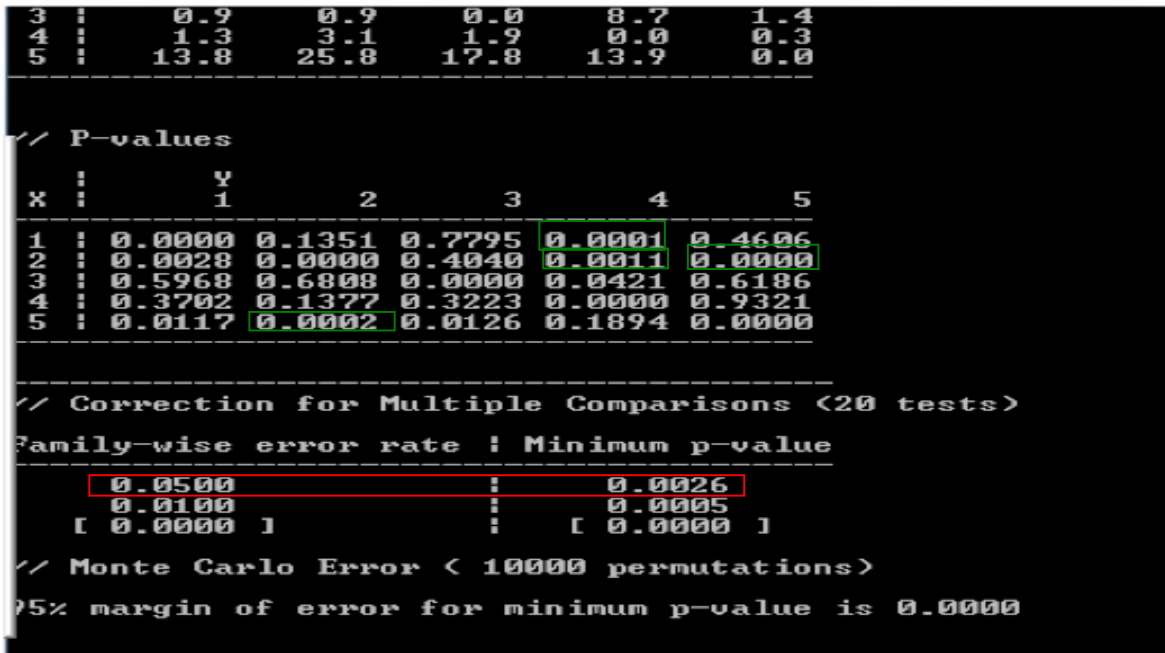


Figura 9.10. Resultados obtenidos con β -Libshuff. Se trata de una matriz asimétrica con los p-valores. 1 (muestreo A), 2 (muestreo B), 3 (muestreo C), 4 (muestreo D) y 5 (muestreo E). En verde están marcados los valores menores a 0,0026; en rojo el valor por debajo del cual existen diferencias significativas entre los muestreos con un 95% de confianza. La distancia considerada entre OTUs fue de 0,03 (3%)

9.2.2.5. Diagrama de Venn

En la figura 9.11 se muestra un diagrama que permite conocer el número de grupos taxonómicos (OTUs, unidades taxonómicas operativas) que son compartidos entre los distintos muestreos y los que son propios de cada uno de ellos. El tratamiento de las 97 secuencias se realizó mediante el estudio de “shared OTUs” con el programa SONS.

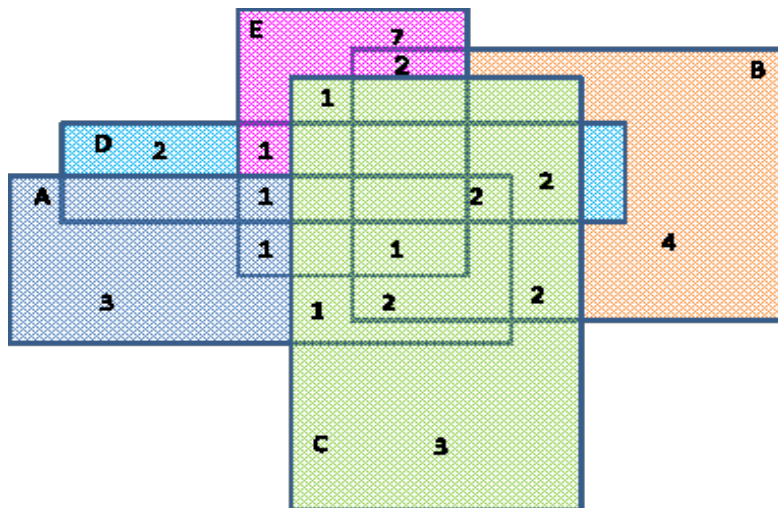


Figura 9.11. Diagrama de Venn en el que se muestran el número de OTUs compartidos y endémicos de cada muestreo. La distancia considerada entre OTUs fue de 0,03 (3%). Azul grisáceo (muestreo A), naranja (muestreo B), verde (muestreo C), azul claro (muestreo D) y rosa (muestreo E).

En la figura 9.11 se observa como todos los muestreos tienen OTUs propios, que no aparecen en otros. El muestreo con más OTUs endémicos fue el último que se realizó (muestreo E), donde aparecen 7 OTUs propios; mientras que el muestreo con menos OTUs endémicos fue el cuarto (D), en el que sólo aparecen 2 OTUs propios.

Todos los muestreos comparten algún OTUs, siendo el número máximo de OTUs compartidos entre muestreos de dos. Esto es lo que ocurre entre los muestreos B y E; B y C; B, C y D; y A, B, C y D. Sin embargo, entre los muestreos A y C; A y E; C y E; D y E; A, D y E; y A, B, C y E sólo se comparte 1 OTUs.

9.3 Estudios de las distintas librerías metagenómicas realizadas con el gen 16s rRNA amplificado a partir del ADN aislado de la comunidad total del biorreactor en cada momento de muestreo

Los clones aislados en estos muestreos se han designado con la nomenclatura “RBMU-Letra de muestreo y número de cepa”. La “U” hace referencia a “uncultured” y la letra de muestreo se ha designado como A, B, C, D o E.

9.3.1. Clasificación taxonómica

9.3.1.1. Muestreo A

Como puede observarse en la tabla 9.2, la mayoría de los clones corresponden a secuencias de *Proteobacterias* (*alpha*, *beta* y *gamma*) pero de organismos no cultivables.

Tabla 9.2. Clasificación taxonómica de los clones aislados en el muestreo A.

Clon	Clase	Orden	Afiliación	Nº acceso Genbank
RBMU-A1	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191751
RBMU-A2	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191752
RBMU-A3	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Variovorax</i>	JN191753
RBMU-A4	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	JN191754
RBMU-A5	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191755
RBMU-A6	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191756
RBMU-A7	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonas migulae</i>	JN191757

Tabla 9.2. Continuación.

Clon	Clase	Orden	Afiliación	Nº acceso Genbank
RBMU-A8	<i>Gammaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191758
RBMU-A9	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	Uncultured <i>Pseudomonas</i>	JN191759
RBMU-A10	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191760
RBMU-A11	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191761
RBMU-A12	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191762
RBMU-A13	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191763
RBMU-A14	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Acidovorax</i>	JN191764
RBMU-A15	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191765
RBMU-A16	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Bdellovibrionales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191766
RBMU-A17	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Aeromonadales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191767
RBMU-A18	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>migulae</i>	JN191768
RBMU-A19	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Bdellovibrionales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191769
RBMU-A20	<i>Gammaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191770
RBMU-A21	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191771
RBMU-A22	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191772
RBMU-A23	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacterales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191773
RBMU-A24	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191774
RBMU-A25	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191775

Tabla 9.2. Continuación.

Clon	Clase	Orden	Afiliación	Nº acceso GenBank
RBMU-A26	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Uncultured Bacterium	JN191776
RBMU-A27	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured Bacterium	JN191777
RBMU-A28	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Uncultured Bacterium	JN191778
RBMU-A29	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Betaproteobacterium</i>	JN191779
RBMU-A30	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	Uncultured Bacterium	JN191780
RBMU-A31	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	JN191781
RBMU-A32	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	Uncultured Proteobacterium	JN191782
RBMU-A33	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured Bacterium	JN191783
RBMU-A34	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured Bacterium	JN191784
RBMU-A35	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured Bacterium	JN191785
RBMU-A36	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Unidentified activated sludge Bacterium	JN191786
RBMU-A37	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured Bacterium	JN191787
RBMU-A38	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Uncultured Bacterium	JN191788
RBMU-A39	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	Uncultured δ -proteobacterium	JN191789
RBMU-A40	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured Bacterium	JN191790
RBMU-A41	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured Bacterium	JN191791
RBMU-A42	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured Bacterium	JN191792

Tabla 9.2. Continuación.

Clon	Clase	Orden	Afiliación	Nº acceso GenBank
RBMU-A43	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191793
RBMU-A44	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191794
RBMU-A45	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Acinetobacter</i> <i>ivofii</i>	JN191795
RBMU-A46	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191796
RBMU-A47	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191797
RBMU-A48	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191798
RBMU-A49	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	<i>Zooglea</i> <i>resiniphila</i>	JN191799
RBMU-A50	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191800
RBMU-A51	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>plecoglossicida</i>	JN191801
RBMU-A52	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191802
RBMU-A53	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Aeromonadales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191803
RBMU-A54	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Uncultured <i>Zooglea</i>	JN191804
RBMU-A55	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Unidentified <i>Bacterium</i>	JN191805
RBMU-A56	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191806
RBMU-A57	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	Uncultured soil <i>Bacterium</i>	JN191807
RBMU-A58	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191808
RBMU-A59	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191809

Tabla 9.2. Continuación.

Clon	Clase	Orden	Afiliación	Nº acceso GenBank
RBMU-A60	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured Bacterium	JN191810
RBMU-A61	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	Uncultured Bacterium	JN191811
RBMU-A62	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	Uncultured Bacterium	JN191812
RBMU-A63	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured Bacterium	JN191813
RBMU-A64	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured Bacterium	JN191814
RBMU-A65	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured Bacterium	JN191815
RBMU-A66			Uncultured Bacterium	JN191816
RBMU-A67	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured Bacterium	JN191817
RBMU-A68	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Unidentified Bacterium	JN191818
RBMU-A69	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	Uncultured Bacterium	JN191819
RBMU-A70	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	Uncultured Bacterium	JN191820
RBMU-A71	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	JN191821

En la figura 9.12 se muestra la distribución de las secuencias en función de los órdenes. Las cepas más abundantes pertenecen a la clase *Betaproteobacteria*, concretamente a las bacterias no clasificadas. La segunda clase más abundante es la *Gammaproteobacteria*, concretamente el orden de las *Pseudomonadales*, que incluso es superior a dos de los órdenes de la clase *Betaproteobacteria*. Las clases menos abundantes son la *Deltaproteobacteria* y la *Bacteroidetes*.

Entre los clones aislados se obtuvieron géneros de organismos cultivables, como las cepas del género *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Betaproteobacterium* sp. y *Zoogloea* sp. Los dos primeros géneros (*Acinetobacter* sp. y *Pseudomonas* sp.) también se aislaron en el muestreo A de los organismos cultivables.

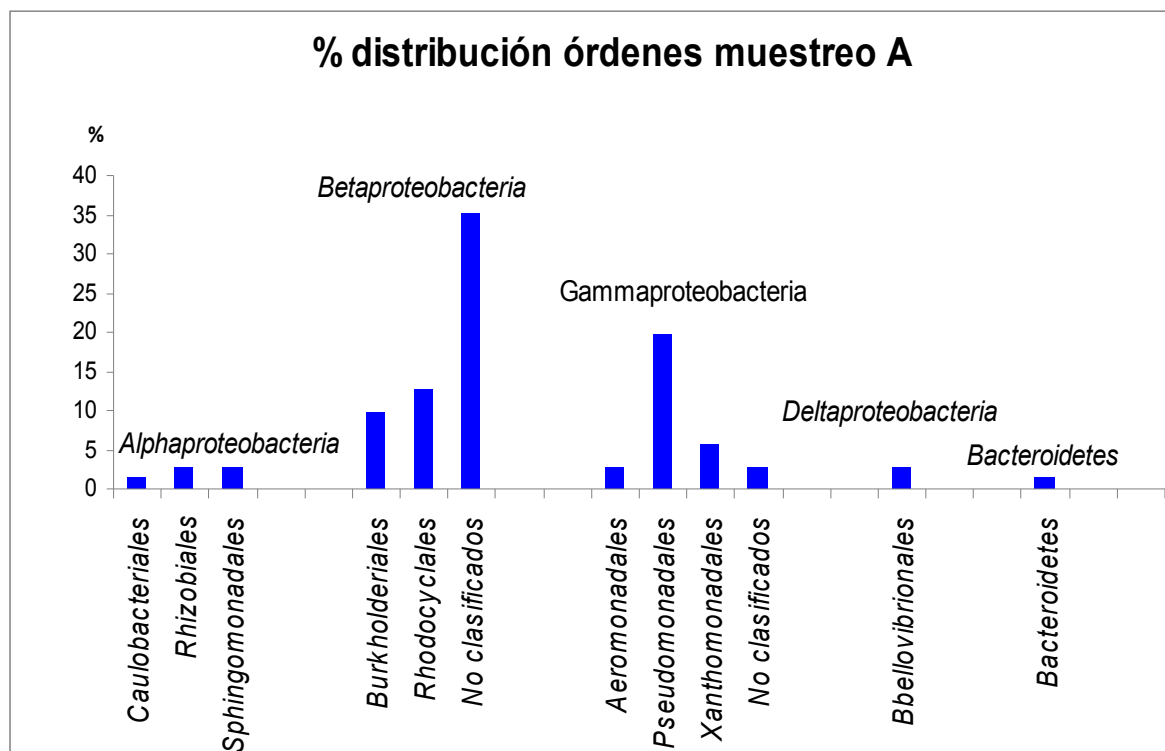


Figura 9.12. Porcentaje de distribución de los distintos órdenes aislados en el muestreo A.

En el árbol filogenético realizado con las secuencias de los clones del muestreo A (figura 9.13) se pueden observar claramente 2 ramas establecidas artificialmente ya que el árbol construido es de tipo no enraizado. En ambas se encuentran las clases *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*, además, en la rama inferior se encuentra una cepa perteneciente a la clase *Deltaproteobacteria*. El grupo más amplio está formado por las bacterias de la clase *Betaproteobacteria*.

Parece que existe una distancia filogenética más pequeña entre las cepas de la rama superior, lo que indica una menor diferencia evolutiva entre ellas. En la rama inferior se observa una mayor diferencia evolutiva.



Figura 9.13. Árbol filogenético no enraizado realizado con secuencias del gen 16s rRNA de bacterias no cultivables aisladas del R. B. M. en el muestreo A. Árbol filogenético realizado con programa MEGA4 usando secuencias alineadas con servicio MAFFT v6.0. Distancia evolutiva inferida utilizando método del vecino más próximo y después curva de Jukes y Cantor. Bootstrap del consenso del árbol inferido con 500 réplicas fue tomado como representante de distancia evolutiva del taxón analizado. El porcentaje de réplicas del árbol en el que los taxones del clúster asociados juntos en más de un 50% de las réplicas de los bootstraps se muestran entre paréntesis.

9.3.1.2. Muestreo B

En la figura 9.14 y en la tabla 9.3 se observa de nuevo como todos los clones pertenecen a la clase *Proteobacteria* (*alpha*, *beta* y *gamma*). En este muestreo no se encuentra ninguna bacteria de la clase *Deltaproteobacteria* ni ningún *Bacteroidete*. A diferencia del muestreo anterior, todas las secuencias obtenidas pertenecen a bacterias no cultivables (salvo una perteneciente al género *Shewanella* sp.), lo que da una idea de la importancia de estos organismos para el correcto funcionamiento del biorreactor.

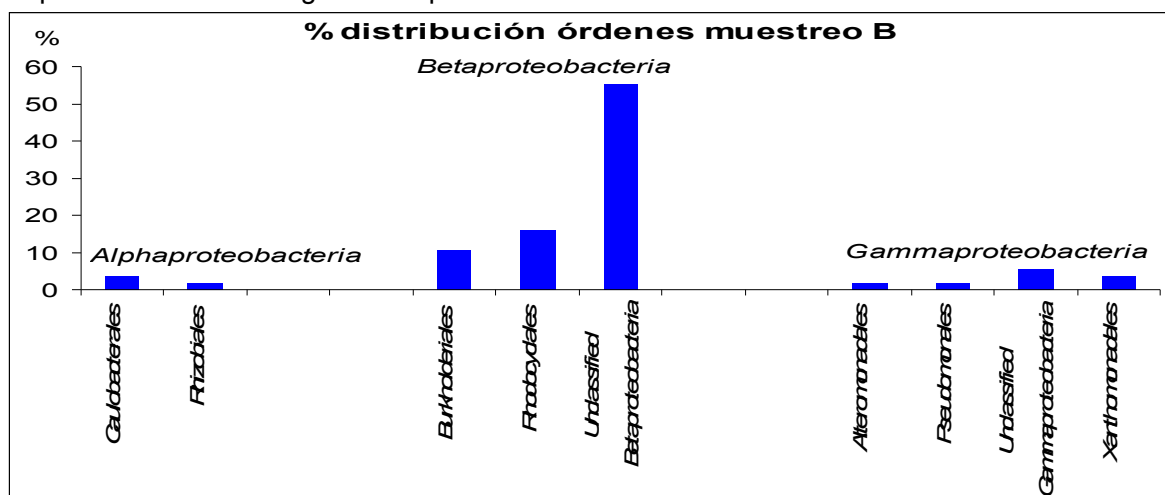


Figura 9.14. Porcentaje de distribución de los distintos órdenes aislados en el muestreo B.

Tabla 9.3. Clasificación taxonómica de los clones aislados en el muestreo B.

Clon	Clase	Orden	Afiliación	Nº acceso GenBank
RBMU-B1	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191822
RBMU-B2	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191823
RBMU-B3	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonales</i>	Uncultured <i>Prokaryote</i>	JN191824
RBMU-B4	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191825
RBMU-B5	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191826
RBMU-B6	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Uncultured <i>Zoogloea</i>	JN191827
RBMU-B7	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacterales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191828
RBMU-B8	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacterales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191829

Tabla 9.3. Continuación.

Clon	Clase	Orden	Afiliación	Nº acceso GenBank
RBMU-B9	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Uncultured <i>Eubacterium</i>	JN191830
RBMU-B10	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191831
RBMU-B11	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191832
RBMU-B12	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191833
RBMU-B13	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	<i>Zoogloea resiniphila</i>	JN191834
RBMU-B14	<i>Betaproteobacteria</i>		Unidentified ammonia-oxidizing <i>Bacterium</i>	JN191835
RBMU-B15	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191836
RBMU-B16	<i>Gammaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191837
RBMU-B17	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191838
RBMU-B18	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191839
RBMU-B19	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191840
RBMU-B20	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191841
RBMU-B21	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191842
RBMU-B22	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191843
RBMU-B23	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191844
RBMU-B24	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191845
RBMU-B25	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191846

Tabla 9.3. Continuación.

Clon	Clase	Orden	Afiliación	Nº acceso GenBank
RBMU-B26	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191847
RBMU-B27	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured β - <i>proteobacterium</i>	JN191848
RBMU-B28	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191849
RBMU-B29	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191850
RBMU-B30	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191851
RBMU-B31	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191852
RBMU-B32	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191853
RBMU-B33	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191854
RBMU-B34	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191855
RBMU-B35	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191856
RBMU-B36	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191857
RBMU-B37	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Comamonadaceae bacterium</i>	JN191858
RBMU-B38	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191859
RBMU-B39	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191860
RBMU-B40	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191861
RBMU-B41	<i>Gammaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191862
RBMU-B42	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191863

Tabla 9.3. Continuación.

Clon	Clase	Orden	Afiliación	Nº acceso GenBank
RBMU-B43	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191864
RBMU-B44	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Uncultured β - <i>proteobacterium</i>	JN191865
RBMU-B45	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191866
RBMU-B46	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191867
RBMU-B47	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Uncultured <i>Zoogloea</i>	JN191868
RBMU-B48	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191869
RBMU-B49	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191870
RBMU-B50	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191871
RBMU-B51	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191872
RBMU-B52	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	<i>Zoogloea resiniphila</i>	JN191873
RBMU-B53	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Uncultured <i>Rhodocyclaceae bacterium</i>	JN191874
RBMU-B54	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Uncultured <i>Ferribacterium</i>	JN191875
RBMU-B55	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Shewanella sp.</i>	JN191876
RBMU-B56	<i>Gammaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191877

En la figura 9.15 se pueden observar claramente 2 ramas, establecidas artificialmente ya que el árbol construido es de tipo no enraizado, en las que aparecen cepas de los tres órdenes. Se observa que las *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* se encuentran principalmente en la rama superior, mientras que las del orden *Betaproteobacteria* se encuentran fundamentalmente en la inferior. Parece que la distancia filogenética existente entre las cepas de la rama inferior es más pequeña que la existente entre las de la superior, lo que indica una menor distancia evolutiva.

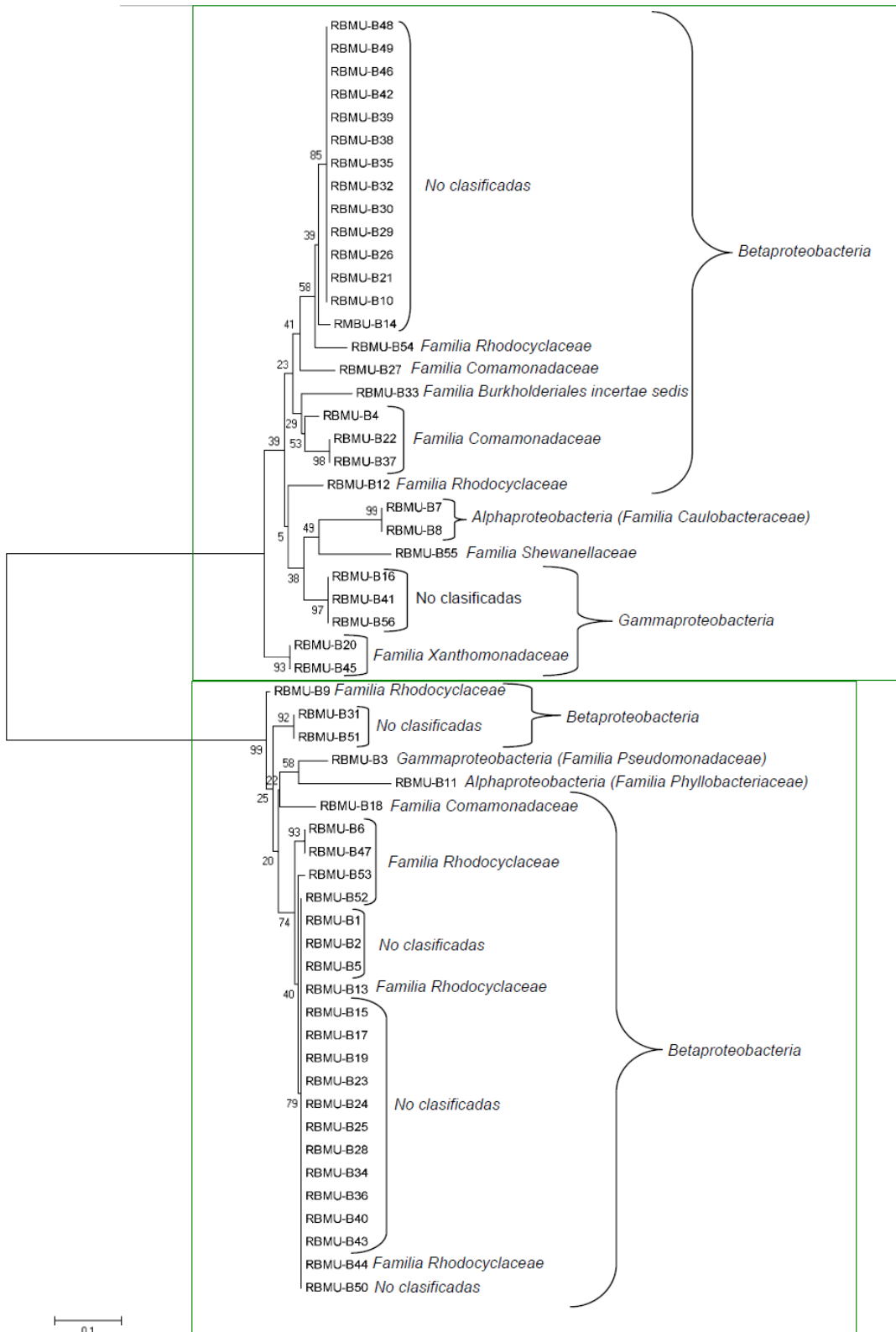


Figura 9.15. Árbol filogenético no enraizado realizado con secuencias del gen 16s rRNA de bacterias no cultivables aisladas del R. B. M. en el muestreo B. Árbol filogenético realizado con programa MEGA4 usando secuencias alineadas con servicio MAFFT v6.0. Distancia evolutiva inferida utilizando método del vecino más próximo y después curva de Jukes y Cantor. Bootstrap del consenso del árbol inferido con 500 réplicas fue tomado como representante de distancia evolutiva del taxón analizado. El porcentaje de réplicas del árbol en el que los taxones del clúster asociados juntos en más de un 50% de las réplicas de los bootstraps se muestran entre paréntesis.

9.3.1.3. Muestreo C

En la figura 9.16 y en la tabla 9.4 se puede observar como, al igual que en los muestreos anteriores, la comunidad existente en el biorreactor pertenece a las clases *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*. En este muestreo también se encontró la secuencia correspondiente a una *Cyanobacteria* no cultivable. El grupo más abundante perteneció de nuevo al de las *Betaproteobacterias* y concretamente a los organismos no clasificados.

Como en los muestreos anteriores la mayoría de las secuencias pertenecen a organismos no cultivables, pero también aparecieron secuencias de organismos cultivables correspondientes a los géneros *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Sphingomonas sp.*, *Marine bacterium* y *Zoogloea sp.* Al igual que ocurrió en el muestreo A, sólo los 2 primeros géneros (*Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.*) se aislaron durante el muestreo C de organismos cultivables.

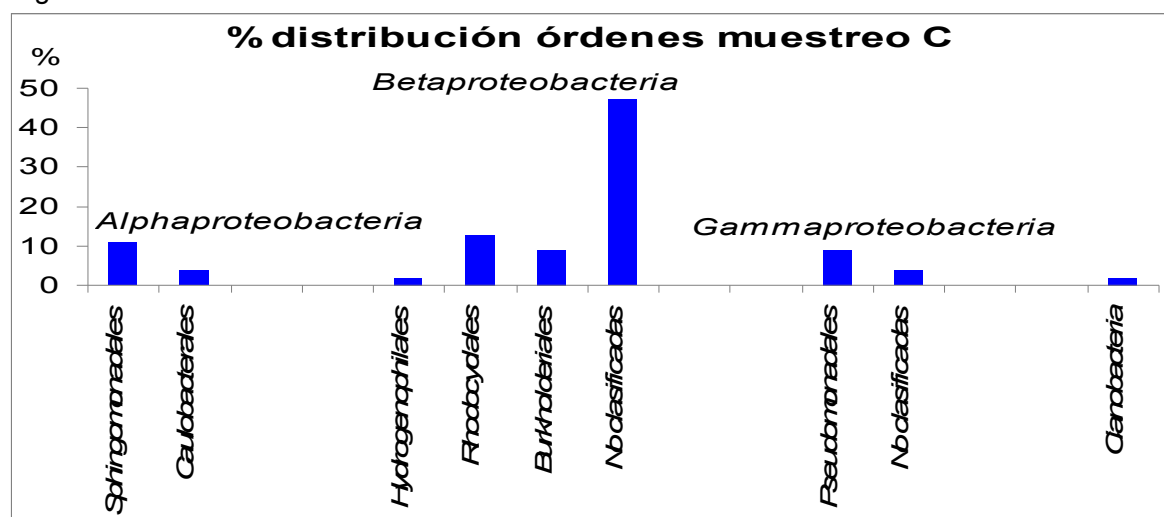


Figura 9.16. Porcentaje de distribución de los distintos órdenes aislados en el muestreo C.

Tabla 9.4. Clasificación taxonómica de los clones aislados en el muestreo C.

Clon	Clase	Orden	Afiliación	Nº acceso GenBank
RBMU-C1			Uncultured <i>Cyanobacterium</i>	JN191878
RBMU-C2	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191879
RBMU-C3	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	Unidentified <i>Proteobacterium</i>	JN191880
RBMU-C4	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191881
RBMU-C5	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191882

Tabla 9.4. Continuación.

Clon	Clase	Orden	Afiliación	Nº acceso GenBank
RBMU-C6	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191883
RBMU-C7	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacterales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191884
RBMU-C8	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Hydrogenophilales</i>	Uncultured <i>Thiobacillus</i>	JN191885
RBMU-C9	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191886
RBMU-C10	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonas</i> sp.	JN191887
RBMU-C11	<i>Gammaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191888
RBMU-C12	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Marine Bacterium</i>	JN191889
RBMU-C13	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	Uncultured α - <i>proteobacterium</i>	JN191890
RBMU-C14	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191891
RBMU-C15	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	JN191892
RBMU-C16	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Uncultured <i>Methyloversatilis</i>	JN191893
RBMU-C17	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	JN191894
RBMU-C18	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191895
RBMU-C19	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	Uncultured α - <i>proteobacterium</i>	JN191896
RBMU-C20	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191897
RBMU-C21	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191898
RBMU-C22	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191899

Tabla 9.4. Continuación.

Clon	Clase	Orden	Afiliación	Nº acceso GenBank
RBMU-C23	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191900
RBMU-C24	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191901
RBMU-C25	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191902
RBMU-C26	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191903
RBMU-C27	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Unidentified activated sludge <i>Bacterium</i>	JN191904
RBMU-C28	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Uncultured β - <i>proteobacterium</i>	JN191905
RBMU-C29	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacterales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191906
RBMU-C30	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Uncultured β - <i>proteobacterium</i>	JN191907
RBMU-C31	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191908
RBMU-C32	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191909
RBMU-C33	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	JN191910
RBMU-C34	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191911
RBMU-C35	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191912
RBMU-C36	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191913
RBMU-C37	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Uncultured β - <i>proteobacterium</i>	JN191914
RBMU-C38	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Alicyclophilus</i> sp.	JN191915
RBMU-C39	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	<i>Zoogloea resiniphila</i>	JN191916
RBMU-C40	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191917

Tabla 9.4. Continuación.

Clon	Clase	Orden	Afiliación	Nº acceso GenBank
RBMU-C41	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191918
RBMU-C42	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	<i>Zoogloea resiniphila</i>	JN191919
RBMU-C43	<i>Gammaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191920
RBMU-C44	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191921
RBMU-C45	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191922
RBMU-C46	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191923
RBMU-C47	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191924
RBMU-C48	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Uncultured β - <i>proteobacterium</i>	JN191925
RBMU-C49	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191926
RBMU-C50	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191927
RBMU-C51	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191928
RBMU-C52	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Acidovorax sp.</i>	JN191929
RBMU-C53	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	Uncultured <i>Sphingomonas sp.</i>	JN191930
RBMU-C54	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured β - <i>proteobacterium</i>	JN191931
RBMU-C55	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191932

En el árbol filogenético realizado con los clones del muestreo C (figura 9.17), éstos se agrupan en dos ramas establecidas artificialmente ya que el árbol construido es de tipo no enraizado. Los organismos de las clases *Alpha* y *Gammaproteobacteria* se agrupan principalmente en la rama superior, donde también se encuentra la *Cyanobacteria*, mientras que la mayoría de los organismos de la clase *Betaproteobacteria* están en la rama inferior.

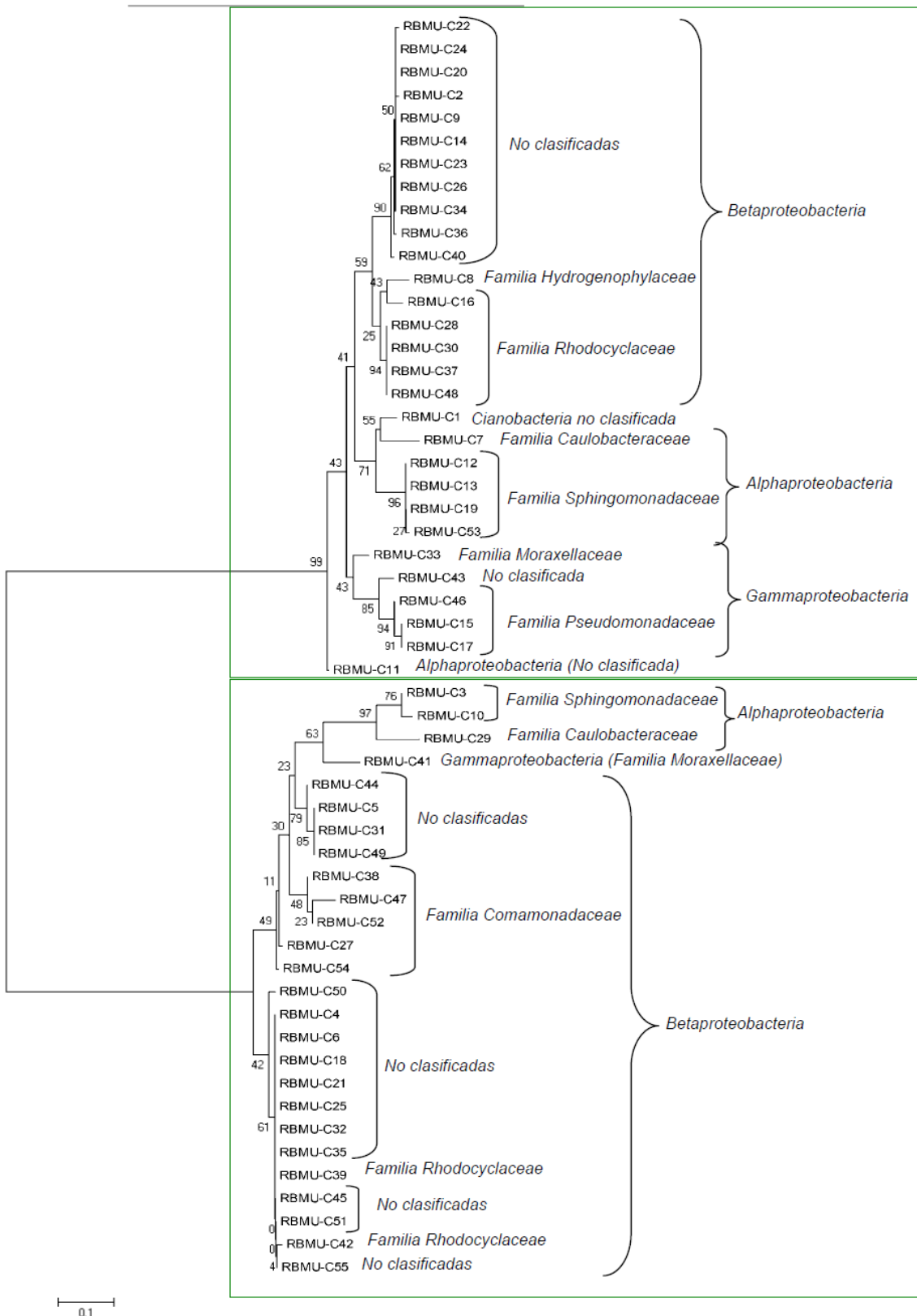


Figura 9.17. Árbol filogenético no enraizado realizado con secuencias del gen 16s rRNA de bacterias no cultivables aisladas del R. B. M. en el muestreo C. Árbol filogenético realizado con programa MEGA4 usando secuencias alineadas con servicio MAFFT v6.0. Distancia evolutiva inferida utilizando método del vecino más próximo y después curva de Jukes y Cantor. Bootstrap del consenso del árbol inferido con 500 réplicas fue tomado como representante de distancia evolutiva del taxón analizado. El porcentaje de réplicas del árbol en el que los taxones del clúster asociados juntos en más de un 50% de las réplicas de los bootstraps se muestran entre paréntesis.

9.3.1.4. Muestreo D

Este muestreo fue el primero que se realizó cuando el reactor funcionaba sin membrana. En él se observa un incremento de la biodiversidad. De esta manera, se encuentran las tres clases (*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*) presentes en los muestreos anteriores (figura 9.18 y tabla 9.5), pero aparecen dos clases nuevas (*Sphingobacteria* y *Flavobacteria*).

A diferencia de los muestreos anteriores el porcentaje de las bacterias no clasificadas ha disminuido hasta valores inferiores al 5% (figura 9.18). En este muestreo, los órdenes más abundantes son el de las *Burkholderiales* (*Betaproteobacterias*) y el de las *Sphingobacteriales* (*Sphingobacterias*).

La mayoría de las secuencias corresponden con bacterias no cultivables, pero hay 4 que codifican para organismos cultivables: *Marine bacterium*, *Comamonas sp.*, *Gammaproteobacteria* y *Acinetobacter*, ninguno de estos organismos cultivables fueron aislados durante el muestreo D de colonias cultivables.

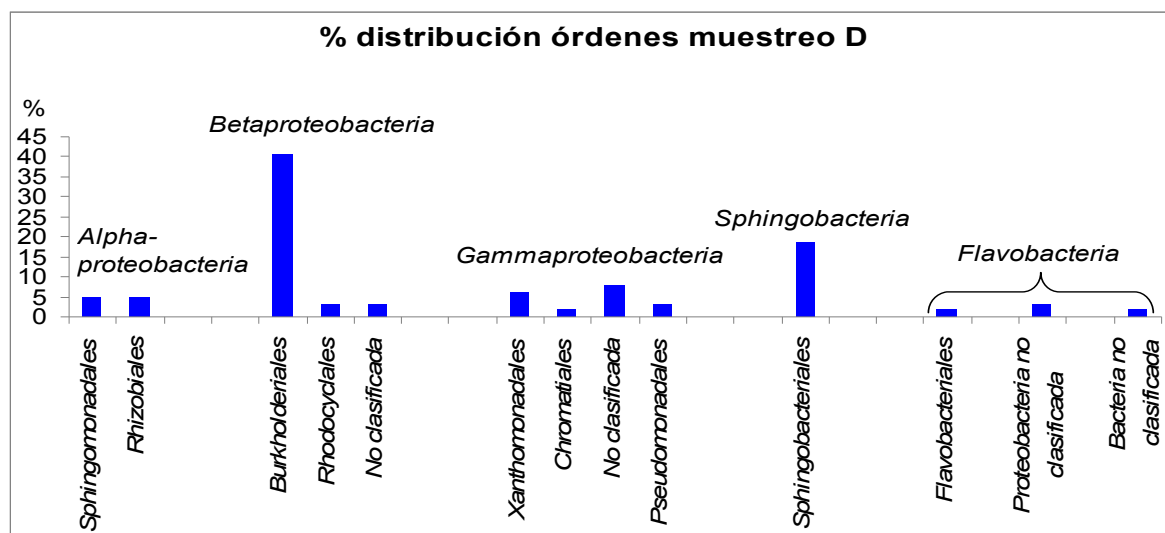


Figura 9.18. Porcentaje de distribución de órdenes en el muestreo D.

Tabla 9.5. Clasificación taxonómica de los clones aislados en el muestreo D.

Clon	Clase	Orden	Afiliación	Nº acceso GenBank
RBMU-D1	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191933
RBMU-D2	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Unidentified activated sludge <i>Bacterium</i>	JN191934
RBMU-D3	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191935
RBMU-D4	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191936

Tabla 9.5. Continuación.

Clon	Clase	Orden	Afiliación	Nº acceso GenBank
RBMU-D5	<i>Gammaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191937
RBMU-D6	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Unidentified activated sludge <i>Bacterium</i>	JN191938
RBMU-D7	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191939
RBMU-D8	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured β - <i>proteobacterium</i>	JN191940
RBMU-D9	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191941
RBMU-D10	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191942
RBMU-D11	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191943
RBMU-D12			Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191944
RBMU-D13	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Unidentified activated sludge <i>Bacterium</i>	JN191945
RBMU-D14	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Comamonadaceae bacterium</i>	JN191946
RBMU-D15	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191947
RBMU-D16	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191948
RBMU-D17	<i>Gammaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191949
RBMU-D18	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Unidentified activated sludge <i>Bacterium</i>	JN191950
RBMU-D19	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191951
RBMU-D20	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Unidentified activated sludge <i>Bacterium</i>	JN191952
RBMU-D21	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	Uncultured soil <i>Bacterium</i>	JN191953

Tabla 9.5. Continuación.

Clon	Clase	Orden	Afiliación	Nº acceso GenBank
RBMU-D22	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	Unidentified <i>Proteobacterium</i>	JN191954
RBMU-D23			Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191955
RBMU-D24	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Marine Bacterium</i>	JN191956
RBMU-D25	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured β - <i>proteobacterium</i>	JN191957
RBMU-D26	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191958
RBMU-D27	<i>Gammaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191959
RBMU-D28	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191960
RBMU-D29	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonas aquatica</i>	JN191961
RBMU-D30	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191962
RBMU-D31	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191963
RBMU-D32	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191964
RBMU-D33	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Unidentified <i>activated sludge Bacterium</i>	JN191965
RBMU-D34	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191966
RBMU-D35	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191967
RBMU-D36	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191968
RBMU-D37	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Unidentified <i>activated sludge Bacterium</i>	JN191969
RBMU-D38	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191970

Tabla 9.5. Continuación.

Clon	Clase	Orden	Afiliación	Nº acceso GenBank
RBMU-D39	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191971
RBMU-D40	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	Uncultured <i>Parvibaculum</i> sp.	JN191972
RBMU-D41	<i>Gammaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191973
RBMU-D42	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191974
RBMU-D43	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	Uncultured <i>Flavobacteriaceae</i> bacterium	JN191975
RBMU-D44	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191976
RBMU-D45			Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191977
RBMU-D46	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191978
RBMU-D47	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191979
RBMU-D48	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191980
RBMU-D49	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191981
RBMU-D50	<i>Gammaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191982
RBMU-D51	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191983
RBMU-D52	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191984
RBMU-D53	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191985
RBMU-D54	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	Uncultured organism	JN191986
RBMU-D55	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	γ -proteobacterium	JN191987

Tabla 9.5. Continuación.

Clon	Clase	Orden	Afiliación	Nº acceso GenBank
RBMU-D56	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Uncultured <i>Rhodocyclaceae bacterium</i>	JN191988
RBMU-D57	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191989
RBMU-D58	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Chromatiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191990
RBMU-D59	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	JN191991
RBMU-D60	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191992
RBMU-D61	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Comamonadaceae bacterium</i>	JN191993
RBMU-D62	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Unidentified <i>activated sludge Bacterium</i>	JN191994
RBMU-D63	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191995
RBMU-D64	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191996

En el árbol filogenético obtenido con las secuencias de los clones del muestreo D (figura 9.19) se distinguen dos ramas establecidas artificialmente ya que el árbol construido es de tipo no enraizado. Se puede observar que la distancia filogenética es mucho mayor entre las cepas que constituyen la rama inferior del árbol.

El grupo de las *Betaproteobacterias* y el de las *Gammaproteobacterias* se distribuye casi homogéneamente entre las dos ramas. Sin embargo, entre las clases que han aparecido nuevas las *Sphingobacterias* se encuentran principalmente en la rama inferior mientras que la *Flavobacteria* está en la rama superior junto con las *Proteobacterias* y la bacteria no clasificada.

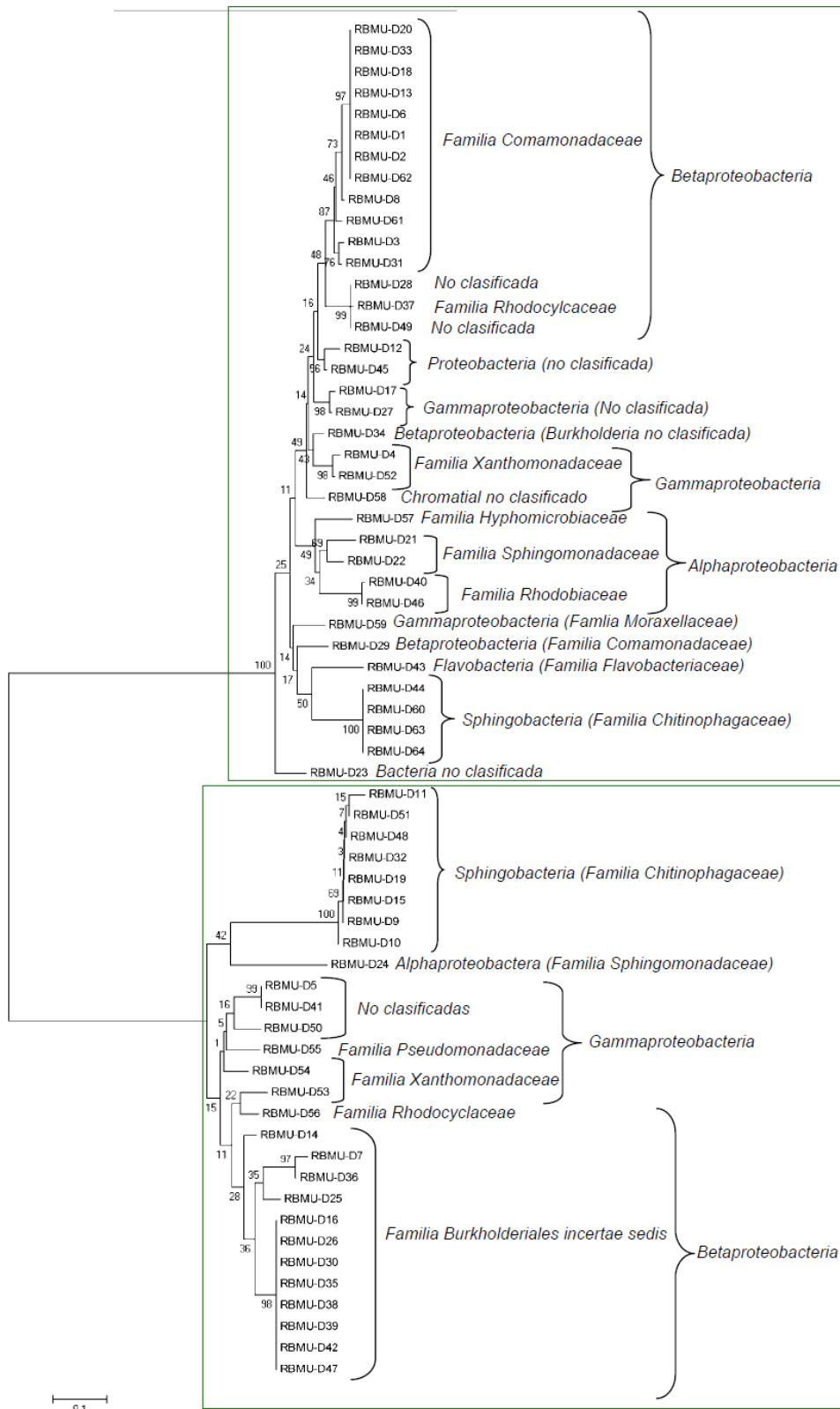


Figura 9.19. Árbol filogenético no enraizado realizado con secuencias del gen 16s rRNA de bacterias no cultivables aisladas del R. B. M. en el muestreo D. Árbol filogenético realizado con programa MEGA4 usando secuencias alineadas con servicio MAFFT v6.0. Distancia evolutiva inferida utilizando método del vecino más próximo y después curva de Jukes y Cantor. Bootstrap del consenso del árbol inferido con 500 réplicas fue tomado como representante de distancia evolutiva del taxón analizado. El porcentaje de réplicas del árbol en el que los taxones del clúster asociados juntos en más de un 50% de las réplicas de los bootstraps se muestran entre paréntesis.

9.3.1.5. Muestreo E

En este muestreo (figura 9.20 y tabla 9.6), las dos clases más importantes son la *Gammaproteobacteria* y la *Sphingobacteria*. En esta última se encuentra el orden más abundante que es el de las *Sphingobacteriales*. De nuevo, vuelven a tener un lugar importante los organismos no clasificados (figura 9.20), apareciendo un grupo de los mismos en las tres clases mayoritarias (*Sphingobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*). Además, se ha incrementado el porcentaje de *Proteobacterias* no clasificadas. La mayoría de las secuencias de este muestreo correspondían a organismos no cultivables, salvo una secuencia que correspondía al género *Comamonas* sp., que no fue aislado en el muestreo E de organismos cultivables realizado.

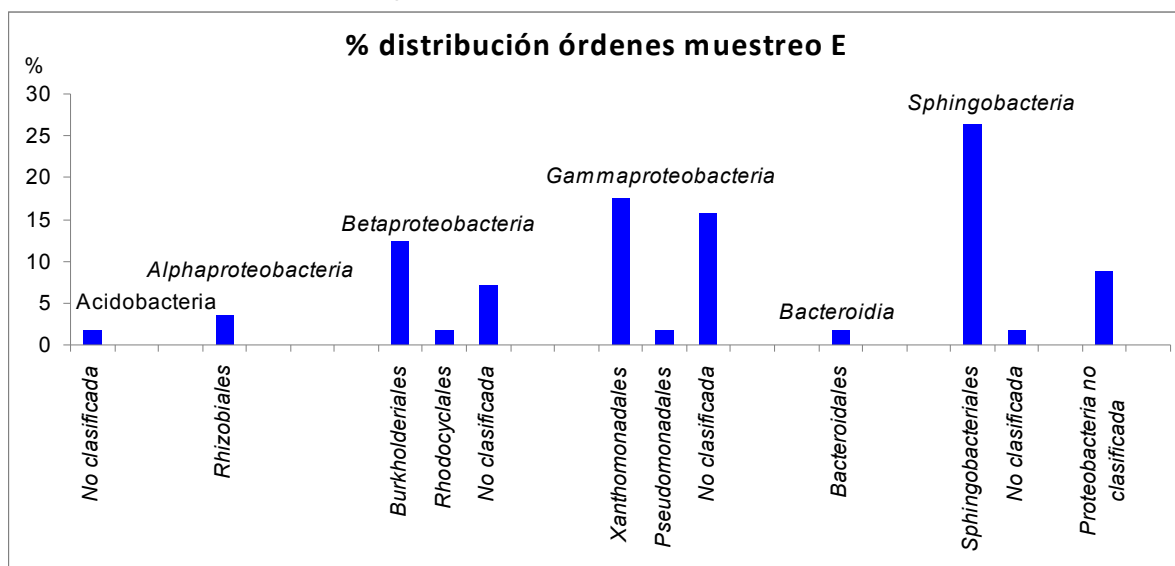


Figura 9.20. Porcentaje de distribución de órdenes en el muestreo E.

Tabla 9.6. Clasificación taxonómica de los clones aislados en el muestreo E.

Clon	Clase	Orden	Afiliación	Nº acceso GenBank
RBMU-E1	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae bacterium</i>	JN191997
RBMU-E2	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191998
RBMU-E3	<i>Gammaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN191999
RBMU-E4			Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192000
RBMU-E5	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192001
RBMU-E6			Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192002

Tabla 9.6. Continuación.

Clon	Clase	Orden	Afiliación	Nº acceso GenBank
RBMU-E7	<i>Gammaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192003
RBMU-E8	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192004
RBMU-E9	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192005
RBMU-E10	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192006
RBMU-E11			Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192007
RBMU-E12	<i>Gammaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192008
RBMU-E13	<i>Betaproteobacteria</i>		Unidentified <i>ammonia-oxidizing Bacterium</i>	JN192009
RBMU-E14	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192010
RBMU-E15	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192011
RBMU-E16			Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192012
RBMU-E17	<i>Gammaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192013
RBMU-E18	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192014
RBMU-E19	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192015
RBMU-E20	<i>Gammaproteobacteria</i>		Uncultured γ - <i>proteobacterium</i>	JN192016
RBMU-E21	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192017
RBMU-E22			Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192018
RBMU-E23	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192019
RBMU-E24	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192020

Tabla 9.6. Continuación.

Clon	Clase	Orden	Afiliación	Nº acceso GenBank
RBMU-E25	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192021
RBMU-E26	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Unidentified activated sludge <i>Bacterium</i>	JN192022
RBMU-E27	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	Uncultured organism	JN192023
RBMU-E28	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192024
RBMU-E29	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	Uncultured organism	JN192025
RBMU-E30	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192026
RBMU-E31	<i>Gammaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192027
RBMU-E32	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured β - <i>pro bacterium</i>	JN192028
RBMU-E33	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192029
RBMU-E34	<i>Gammaproteobacteria</i>		Uncultured γ - <i>proteobacterium</i>	JN192030
RBMU-E35	<i>Acidobacteria</i>		Uncultured <i>Acidobacteria bacterium</i>	JN192031
RBMU-E36	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192032
RBMU-E37	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192033
RBMU-E38	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192034
RBMU-E39	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192035
RBMU-E40	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192036
RBMU-E41	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Comamonadaceae bacterium</i>	JN192037

Tabla 9.6. Continuación.

Clon	Clase	Orden	Afiliación	Nº acceso GenBank
RBMU-E42	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192038
RBMU-E43	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192039
RBMU-E44	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	Uncultured organism	JN192040
RBMU-E45	<i>Betaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192041
RBMU-E46	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192042
RBMU-E47	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	JN192043
RBMU-E48	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192044
RBMU-E49	<i>Gammaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192045
RBMU-E50	<i>Gammaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192046
RBMU-E51	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192047
RBMU-E52	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	Uncultured <i>Bacteroidales bacterium</i>	JN192048
RBMU-E53	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192049
RBMU-E54	<i>Gammaproteobacteria</i>		Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192050
RBMU-E55	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192051
RBMU-E56	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	Uncultured <i>Bacterium</i>	JN192052
RBMU-E57	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	Unidentified activated sludge <i>Bacterium</i>	JN192053

En la figura 9.21 se pueden distinguir 2 ramas establecidas artificialmente ya que el árbol construido es de tipo no enraizado. En la superior se encuentran los organismos de la clase *Alphaproteobacteria* y también la mayoría de los organismos de la *Sphingobacteria*. Sin embargo, en la rama inferior se localizan principalmente los organismos de las clases *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*. En ambas ramas, la distancia filogenética es más alta que en los muestreos anteriores.

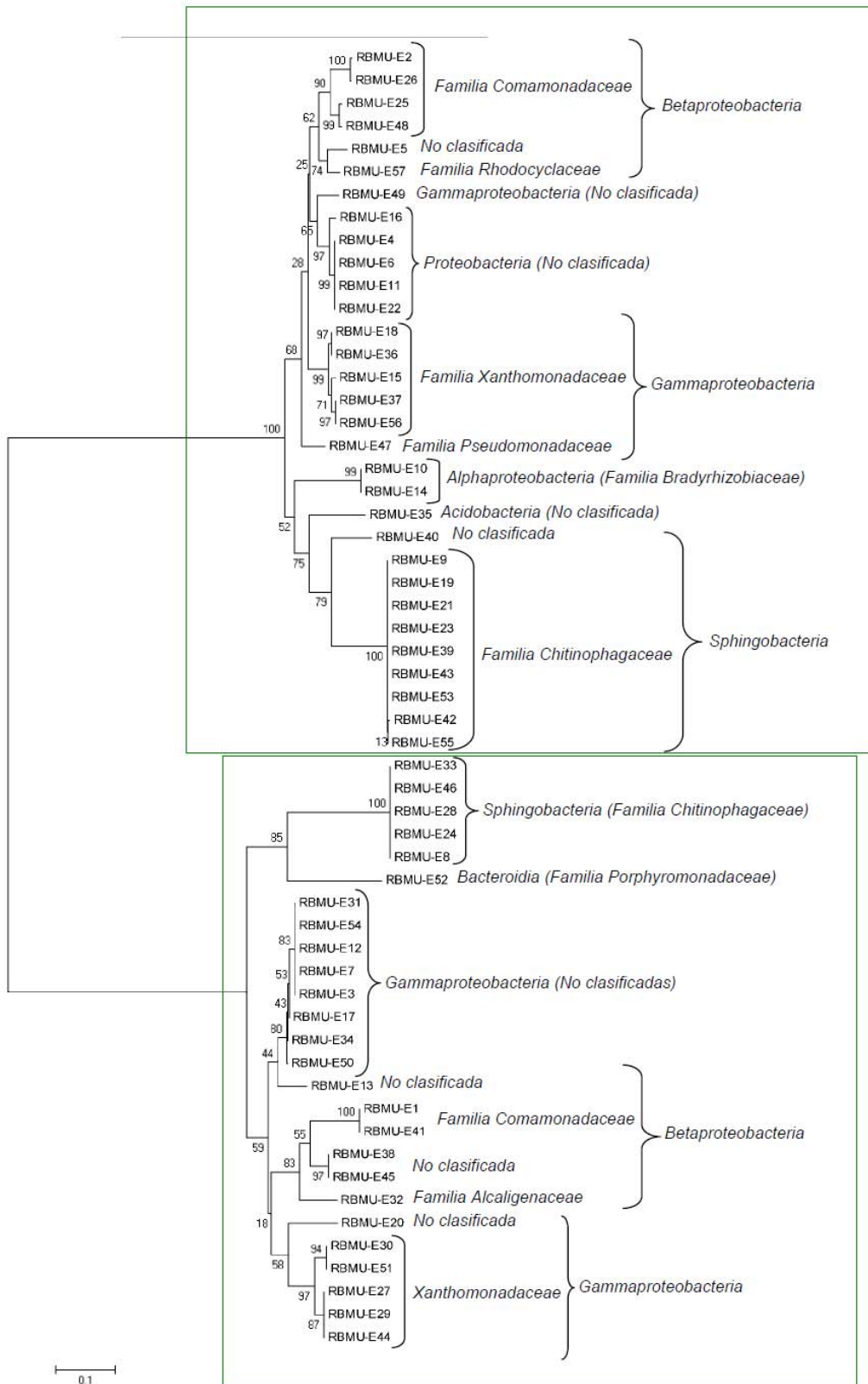


Figura 9.21. Árbol filogenético no enraizado realizado con secuencias del gen 16s rRNA de bacterias no cultivables aisladas del R. B. M. en el muestreo E. Árbol filogenético realizado con programa MEGA4 usando secuencias alineadas con servicio MAFFT v6.0. Distancia evolutiva inferida utilizando método del vecino más próximo y después curva de Jukes y Cantor. Bootstrap del consenso del árbol inferido con 500 réplicas fue tomado como representante de distancia evolutiva del taxón analizado. El porcentaje de réplicas del árbol en el que los taxones del clúster asociados juntos en más de un 50% de las réplicas de los bootstraps se muestran entre paréntesis.

9.3.1.6. Distribución de clases en el conjunto de muestreos realizados

En la figura 9.22 se muestra la variación en las clases filogenéticas existentes en el reactor a lo largo de los muestreos. En todos los muestreos se encontraron cepas de las clases *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*.

Se observa como en los 4 primeros muestreos la clase más abundante era la de las *Betaproteobacteria*. En los tres primeros sólo se observaron 3 clases mayoritarias *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*.

Cuando se retiró la membrana del reactor (muestreos D y E), comenzaron a proliferar nuevas clases, apareciendo organismos de la *Sphingobacteria* y también *Proteobacterias* no clasificadas.

En los distintos muestreos también aparecieron otras clases pero de menor relevancia porque representaban un porcentaje muy pequeño de microorganismos. Cabe destacar la aparición de *Cianobacterias* en el tercer muestreo.

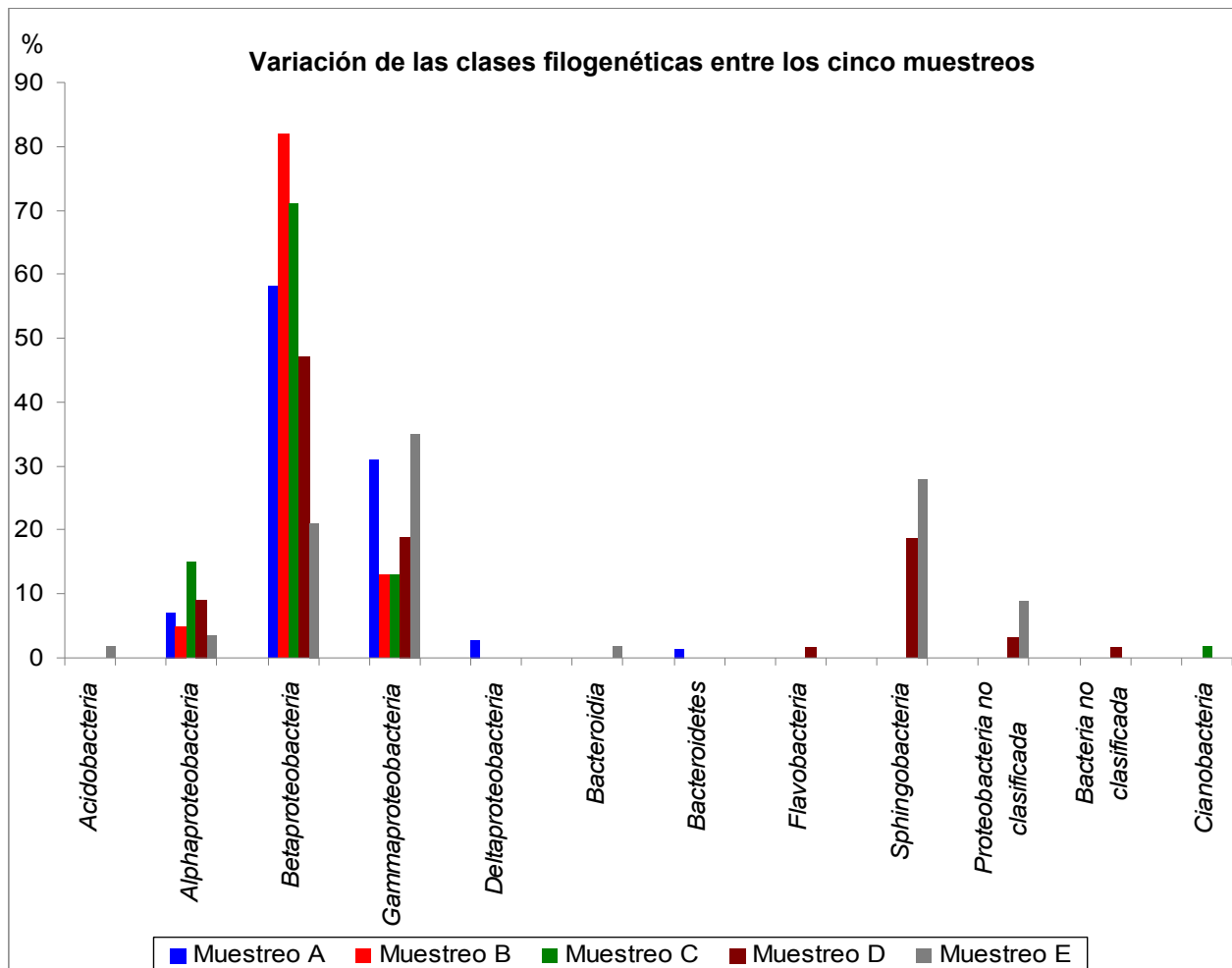


Figura 9.22. Distribución de las distintas clases filogenéticas en función del muestreo. Azul (muestreo A), rojo (muestreo B), verde (muestreo C), granate (muestreo D) y gris (muestreo E).

9.3.2. Análisis estadísticos realizados con las secuencias

9.3.2.1. Curvas de rarefacción

Se utilizó el programa Dotur-1.53 para obtener la curva de rarefacción (figura 9.23) y los valores de diversidad (riqueza), según el índice de Chao (figura 9.24) y diversidad biológica según los índices de Shannon (figura 9.25A) y de Simpson (figura 9.25B) respectivamente.

Como puede observarse en la figura 9.23 en ninguno de los muestreos se alcanzó un comportamiento lineal, observándose en todos ellos un comportamiento exponencial, aunque parece que en el muestreo E se empieza a alcanzar la linealidad.

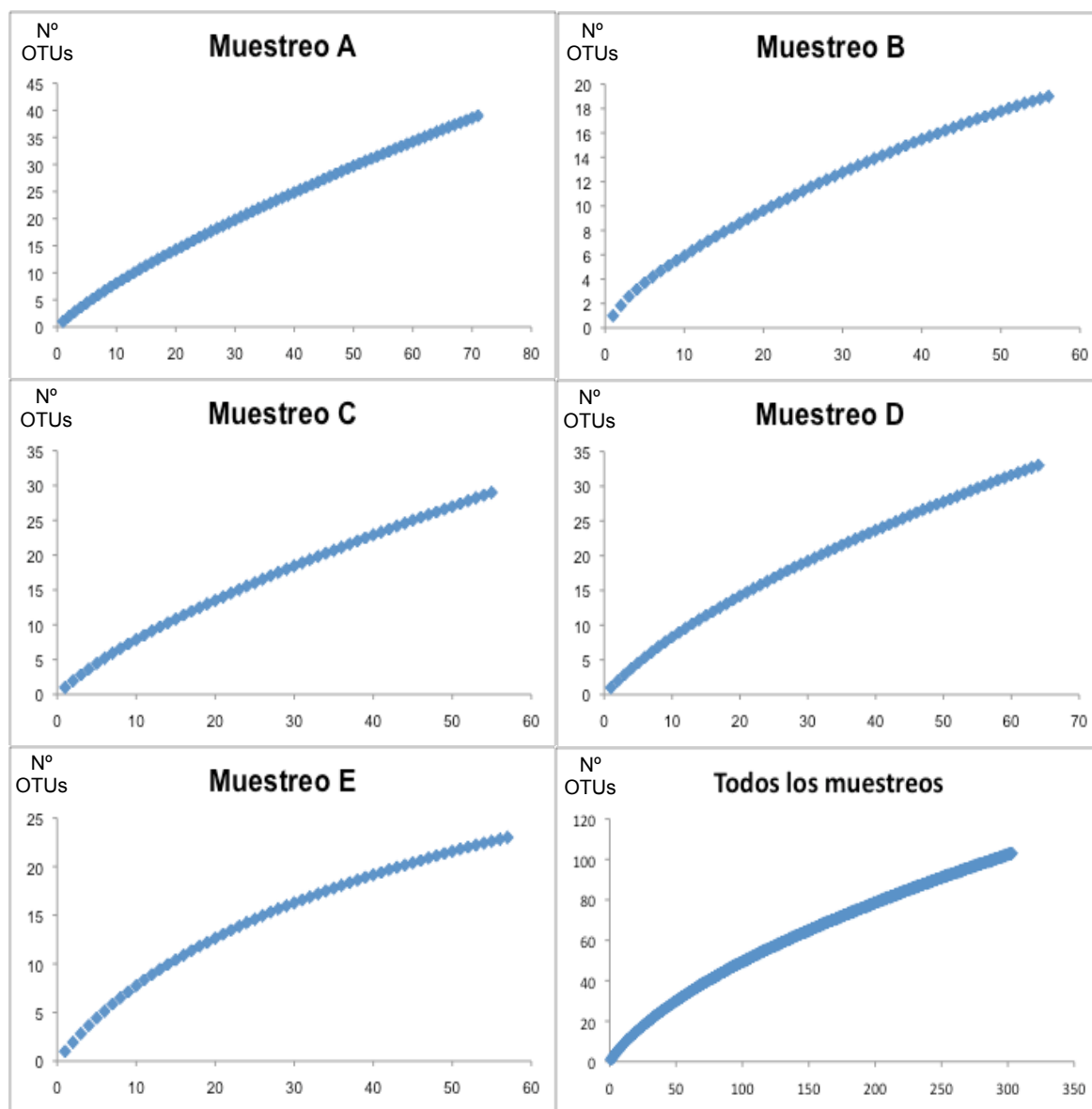


Figura 9.23. Curva de rarefacción de las secuencias obtenidas en la electroporación de los distintos muestreos (71 secuencias muestreo A; 56 muestreo B; 55 muestreo C; 64 muestreo D; 57 muestreo E; 303 el conjunto de las secuencias). El número de OTUs obtenido fue de 39 para el muestreo A; 19 para el B; 29 para el C; 33 para el D; 23 para el E; 103 para todos los muestreos). La distancia considerada entre OTUs fue de 0,02 (2%).

9.3.2.2. Estimación de la riqueza y diversidad

En la figura 9.24 se observa que el muestreo donde existía una mayor riqueza era el muestreo A. Los muestreos donde la riqueza estimada fue menor son el B y el E. Si se miran los datos de riqueza observada se aprecia una pequeña oscilación pero apenas hay diferencias, aunque de nuevo los valores más bajos se obtienen en los muestreos B y E.

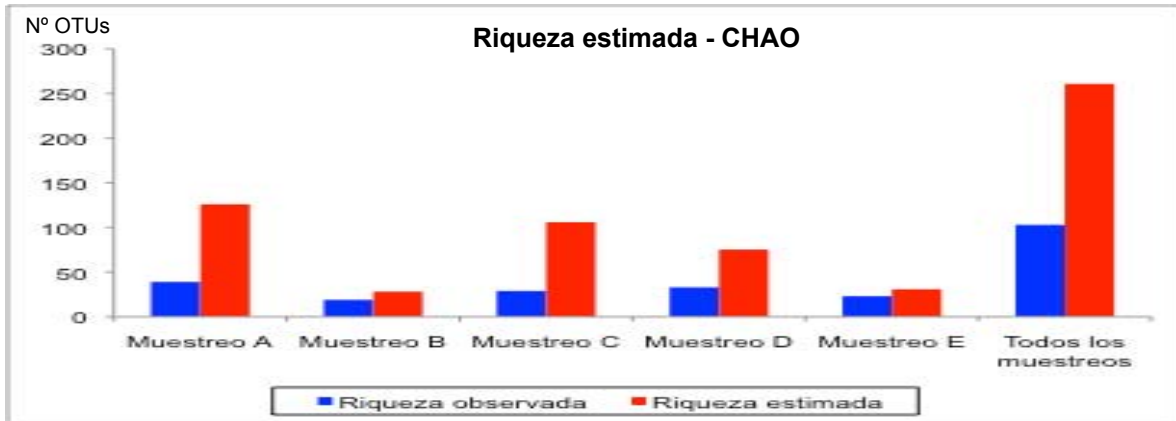


Figura 9.24. Comparativa entre riqueza observada y riqueza estimada. Índice de Chao1 para estimar la riqueza en cada muestreo. Número de OTUs observados: 39 muestreo A; 19 muestreo B; 29 muestreo C; 33 muestreo D; 23 muestreo E; 103 todos los muestreos. Número de OTUs estimados: 126 muestreo A; 106 muestreo B; 103 muestreo C; 75 muestreo D; 31 muestreo E; 261 todos los muestreos. Los valores observados se obtuvieron con la curva de rarefacción. La distancia considerada entre OTUs fue de 0,02 (2%).

En el valor de biodiversidad obtenido mediante el índice de Shannon–Weber (figura 9.25A), se observó la misma tendencia que en la figura 9.24 aunque en este caso fue menos acusada. De nuevo el valor de diversidad más alto se obtuvo en el muestreo A y el más bajo en el muestreo B seguido del muestreo E. En todos los casos la diversidad estuvo entre un 2,25 y un 3,2.

En la figura 9.25B se muestra la evolución de la biodiversidad según el índice de Simpson. A diferencia de la evolución de la diversidad obtenida con los índices anteriores (figuras 9.25 y 9.26), en esta gráfica se puede observar como el valor más alto se obtuvo en el muestreo B seguido del muestreo E. Entre los otros 3 muestreos apenas hubo diferencias. La diversidad observada en el conjunto de los muestreos también es baja.

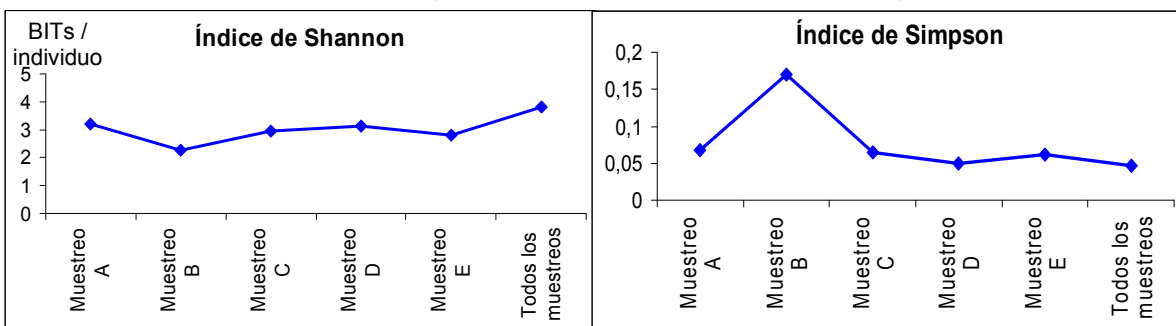


Figura 9.25. A - Estimación de la biodiversidad en cada muestreo según el índice de Shannon-Weber (3,2 OTUs muestreo A; 2,25 OTUs muestreo B; 2,96 OTUs muestreo C; 3,13 OTUs muestreo D; 2,82 OTUs muestreo E; 3,83 OTUs todos los muestreos). **B** - Evolución de la diversidad según el índice de Simpson (0,0684 muestreo A; 0,17 muestreo B; 0,064 muestreo C; 0,05 muestreo D; 0,062 muestreo E; 0,046 todos los muestreos). La distancia considerada entre OTUs fue de 0,02 (2%).

9.3.2.3. Comparación de Libshuff

Esta comparación permite conocer la existencia de diferencias significativas entre los distintos muestreos. En la figura 9.26 se observa como la comparación entre los tres primeros muestreos (A, B, C) no presenta diferencias significativas, dado que el valor obtenido es mayor a 0,0026. Lo mismo ocurre cuando se comparan los dos últimos (D, E). Sin embargo, si se comparan los tres primeros muestreos con los dos últimos se obtienen en todos los casos diferencias significativas lo que indica que la población microbiana existente en el biorreactor ha cambiado cuando se retiró la membrana del mismo.

```

X |      1      2      3      4      5
-----
1 | 0.0000 0.0148 0.0474 0.0046 0.0001
2 | 0.7834 0.0000 0.0374 0.0000 0.0000
3 | 0.8685 0.0058 0.0000 0.0003 0.0000
4 | 0.0000 0.0000 0.0000 0.0000 0.0818
5 | 0.0000 0.0000 0.0000 0.1058 0.0000
-----

// Correction for Multiple Comparisons (20 tests)
Family-wise error rate | Minimum p-value
-----
0.0500 | 0.0026
0.0100 | 0.0005
[ 0.0000 ] | [ 0.0000 ]

// Monte Carlo Error < 10000 permutations>
95% margin of error for minimum p-value is 0.0000

```

Figura 9.26. Resultados obtenidos con β -Libshuff. Se trata de una matriz asimétrica con los p-valores. 1 (muestreo A), 2 (muestreo B), 3 (muestreo C), 4 (muestreo D) y 5 (muestreo E). En verde están marcados los valores menores a 0,0026; en rojo el valor por debajo del que existen diferencias significativas entre los muestreos con un 95% de confianza.

9.3.2.4. Diagrama de Venn

En la figura 9.27 se muestra un diagrama que permite conocer el número de grupos taxonómicos que son compartidos entre los distintos muestreos y los que son propios de cada uno de ellos. El análisis de las 303 secuencias se realizó mediante el estudio de “shared OTUs” con el programa Sons.

En todos los muestreos se encontraron OTUs endémicos, siendo en el muestreo A donde más OTUs endémicos aparecieron. Sin embargo, los muestreos B y E fueron los que presentaban un menor número de OTUs propios.

Se observa la existencia de OTUs comunes entre varios muestreos. Por lo general, el número de OTUs comunes es de 1 como ocurre entre los muestreos A-D, C-D, C-E, A-B-C, A-D-E, A-C-D, B-A-E, A-B-C-D, A-B-C-E, A-C-D-E y A-B-C-D-E. También existen muestreos

con 2 y 3 OTUs comunes, como ocurre en A-B (2 OTUs comunes), B-D (2 OTUs comunes) y A-C (3 OTUs comunes). Finalmente, cabe destacar los muestreos D-E, donde existen 5 OTUs comunes.

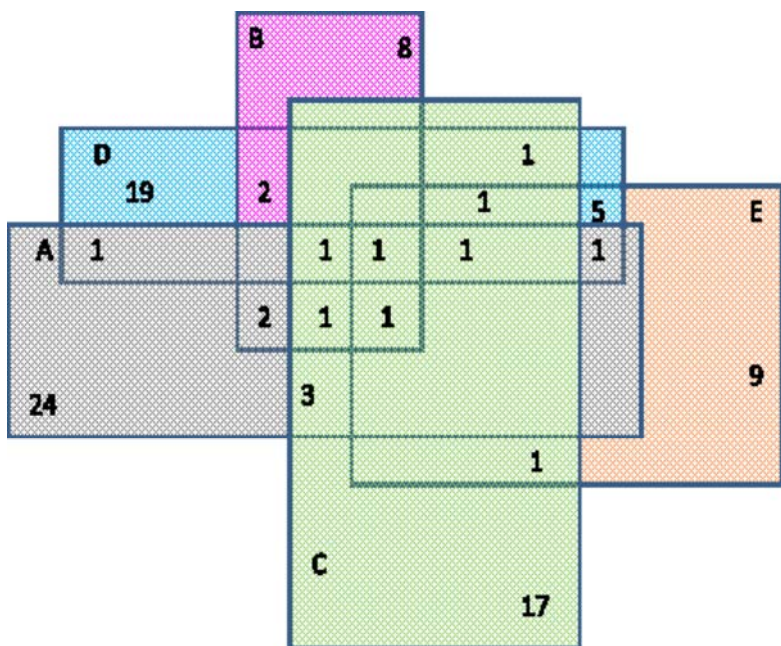


Figura 9.27. Diagrama de Venn en el que se muestra el número de OTUs compartidos y endémicos de cada muestreo. La distancia considerada entre OTUs fue de 0,02 (2%). Gris (muestreo A), rosa (muestreo B), verde (muestreo C), azul claro (muestreo D) y crema (muestreo E). En el diagrama no se muestran los OTUs compartidos entre los muestreos A-C-D (1 OTUs) y B-A-E (3 OTUs).

9.4. Estudio de la diversidad metabólica de las comunidades microbianas que se desarrollan en el R. B. M mediante el uso de placas Biolog®

9.4.1. Biolog® Gram-negativa (GN)

9.4.1.1. Evolución del AWCD (average well colour development)

En la figura 9.28 se muestra la evolución del AWCD (average well colour development) en las placas Biolog® Gram-negativa. Se observa como en todos los casos se alcanza la linealidad a las 94 horas, salvo en el muestreo A donde la evolución es significativamente más lenta que en el resto y no se alcanza la linealidad.

La velocidad de este parámetro fue significativamente mayor en los tres últimos muestreos, observándose una velocidad semejante entre el cuarto y el quinto. En el muestreo A fue donde esta tasa fue significativamente menor.

En base a esta gráfica se consideró que se alcanzó la linealidad a las 262 horas en el muestreo A y a las 94 horas en el resto de los muestreos. Con estos valores se realizaron los estudios de diversidad metabólica y de consumo de fuentes de carbono.

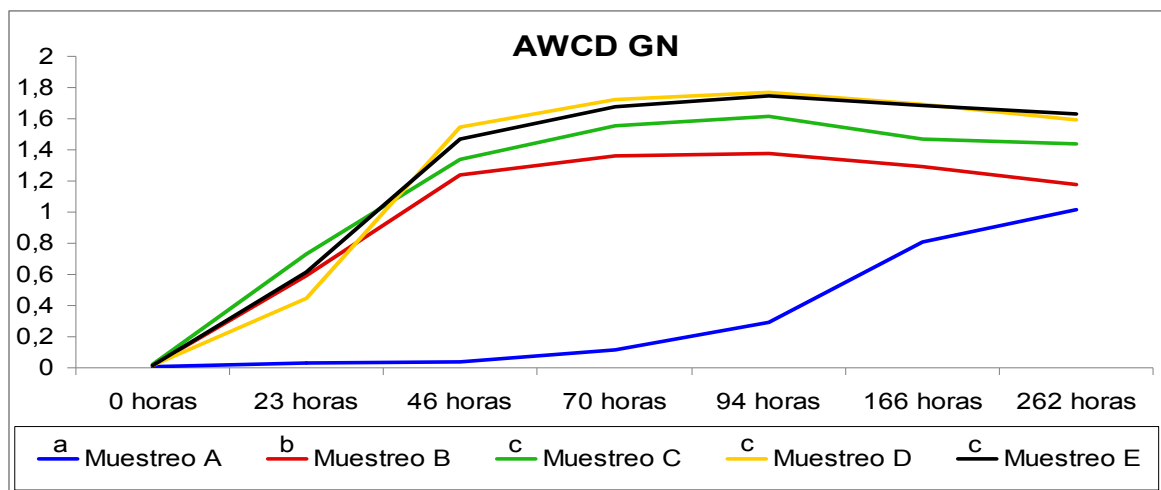


Figura 9.28. Evolución del average well colour development (AWCD) en las placas Biolog[®] Gram-negativa entre los distintos muestreos. Azul (muestreo A), rojo (muestreo B), verde (muestreo C), amarillo (muestreo D), negro (muestreo E). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

9.4.1.2. Diversidad metabólica

Para realizar este estudio se utilizó el índice de Shannon-Wiener. En la figura 9.29 se puede observar un crecimiento significativo de la diversidad en los 3 primeros muestreos para luego producirse una disminución significativa, aunque esta disminución no fue tan acusada como el incremento. La diversidad existente en el quinto muestreo fue igual que la encontrada en el segundo muestreo. El muestreo donde se obtuvo una diversidad metabólica más alta fue en el muestreo C, mientras que en el muestreo A este parámetro fue muy inferior al del resto.

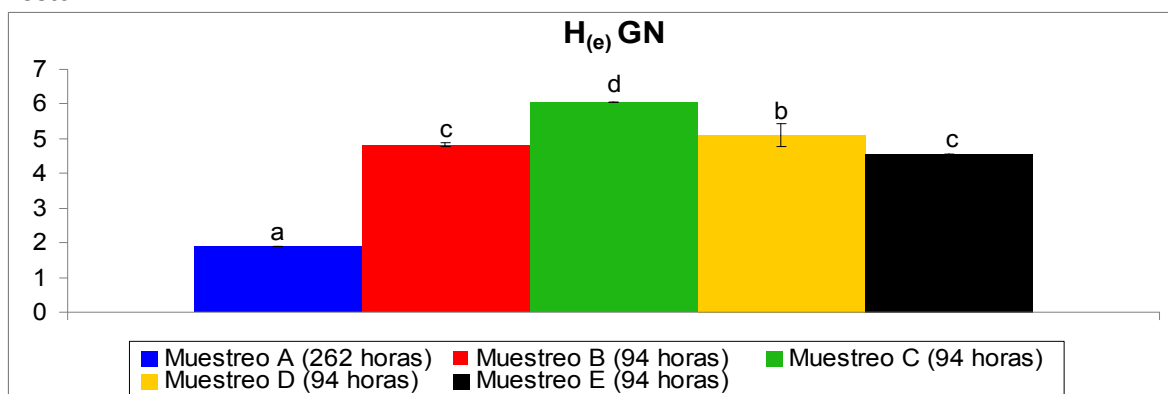


Figura 9.29. Diversidad metabólica ($H_{(e)}$) de las placas Biolog[®] Gram-negativa. Azul (muestreo A, 262 horas), rojo (muestreo B, 94 horas), verde (muestreo C, 94 horas), amarillo (muestreo D, 94 horas), negro (muestreo E, 94 horas). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

9.4.1.3. Consumo de fuentes nutritivas

En la figura 9.30 se pueden observar diferencias significativas entre los distintos compuestos, de manera que los compuestos significativamente más consumidos son los ésteres, los carbohidratos y los aminoácidos. Sin embargo, los alcoholes fueron los compuestos que significativamente menos se consumieron; este consumo se realizó

exclusivamente en las placas Biolog® GN del muestreo D. Se obtuvo un consumo intermedio para los compuestos aromáticos, los polímeros, las aminas/amidas y los ácidos carboxílicos. El consumo de las fuentes nutritivas no presenta diferencias entre los distintos muestreos.

Por otra parte, el análisis unidireccional, aportó la siguiente información:

- Polímeros: Se produce una disminución significativa entre los dos primeros muestreos y el tercero, para desaparecer en el cuarto y quinto muestreo.

- Ésteres: No se observan diferencias entre el primer, el tercer y el cuarto muestreo, presentando una disminución significativa en el segundo muestreo. En el quinto muestreo no se consumen este tipo de compuestos.

- Ácidos carboxílicos: Se observa un incremento significativo del consumo entre el segundo y el cuarto muestreo, en el quinto muestreo el consumo es similar al observado en los dos anteriores.

- Carbohidratos: El consumo disminuye significativamente entre el primer y el segundo muestreo. En el cuarto y el quinto muestreo se produce un consumo significativamente mayor al de los anteriores.

- Aminoácidos: Se produce un incremento significativo al avanzar en los muestreos, salvo entre el segundo y el tercero donde no se observan diferencias.

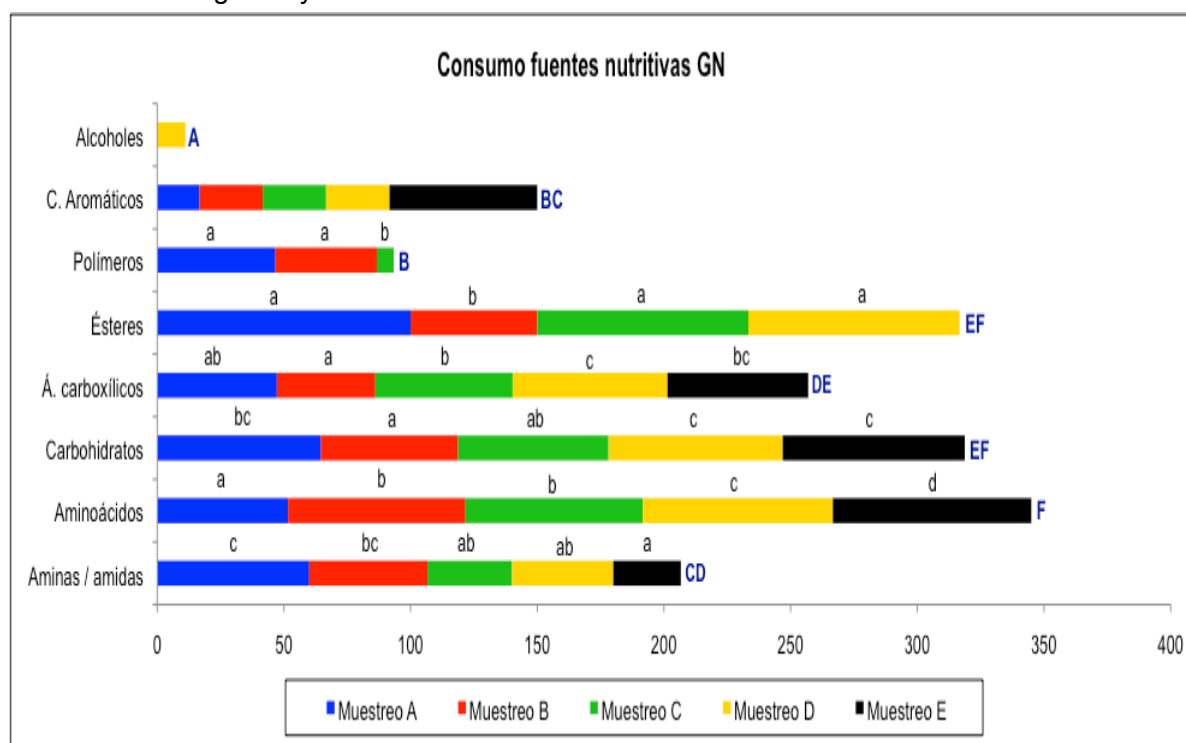


Figura 9.30. Consumo fuentes nutritivas en Biolog® Gram-negativa. Fuentes nutrientes (alcoholes, compuestos aromáticos, polímeros, ésteres, ácidos carboxílicos, carbohidratos, aminoácidos, aminas/amidas). Azul (muestreo A, 262 horas), rojo (muestreo B, 94 horas), verde (muestreo C, 94 horas), amarillo (muestreo D, 94 horas), negro (muestreo E, 94 horas). Se realizó ANOVA unidireccional para cada compuesto. Además se realizó un ANOVA factorial para conocer las diferencias entre fuentes teniendo en cuenta todos los muestreos (longitud de las barras). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$), letras minúsculas (ANOVA unidireccional), letras mayúsculas (ANOVA factorial).

9.4.1.4. Análisis de correspondencias de las placas Biolog® Gram-negativa

En la figura 9.31 se muestra el análisis de correspondencias (CA) realizado para los distintos muestreos en la placa Biolog® Gram-negativa. En esta figura se puede ver como el muestreo A se encuentra totalmente separado del resto de los muestreos, localizándose en los valores más altos del eje X y en los valores intermedios del eje Y. Se observa también como los muestreos D y E están agrupados en la zona con valores bajos de los ejes X e Y.

Por su parte, los muestreos B y C se encuentran en el cuadrante superior izquierdo de la gráfica, localizándose el muestreo B en los valores bajos del eje X y en los más altos del eje Y, mientras que el muestreo C se encuentra en los valores bajos del eje X y en los intermedios del eje Y. Esto indica que el muestreo A tiene una capacidad metabólica distinta en relación con los otros muestreos.

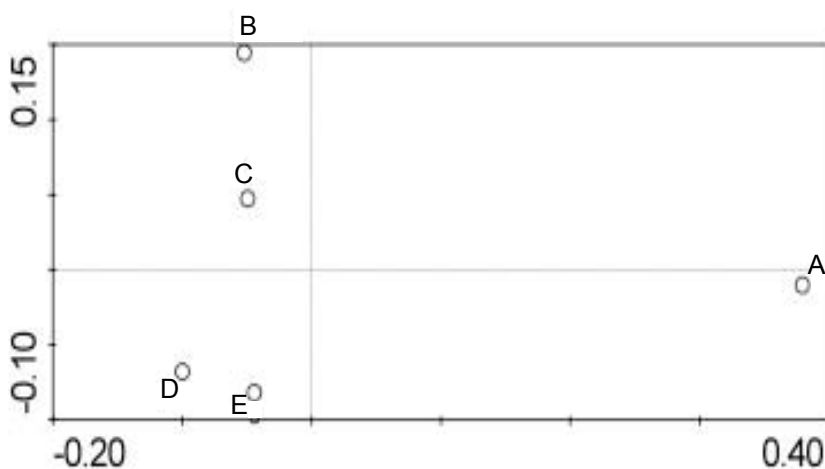


Figura 9.31. Ordenación de las muestras obtenida a partir del análisis de correspondencias (CA) realizado con los datos de absorbancia corregidos (595 nm) de las 95 fuentes de carbono de la placa Biolog® GN, medidas a las 262 horas (muestreo A) y 94 horas (muestreos B, C, D y E).

9.4.2. Biolog® Gram-positiva (GP)

9.4.2.1. Evolución del AWCD

En la figura 9.32 se muestra la evolución del AWCD para las placas Biolog® Gram-positiva entre los distintos muestreos. Al igual que en las placas Biolog® Gram-negativa (figura 9.28) se produjo una evolución mucho más lenta en el muestreo A que en el resto de los muestreos. De nuevo, en el primer muestreo no se alcanzó el crecimiento lineal.

El muestreo E tuvo una tasa de crecimiento significativamente más baja que el obtenido en el resto de los muestreos. El comportamiento entre los muestreos B y C no presentó diferencias significativas, observándose un incremento intermedio con respecto al resto de los otros muestreos. Cabe destacar la disminución observada en las dos últimas medidas realizadas en el cuarto muestreo.

En base a esta gráfica se consideró que se había alcanzado la linealidad a las 262 horas en el muestreo A, a las 166 horas en los muestreos B, C y E, y a las 94 horas en el muestreo D.

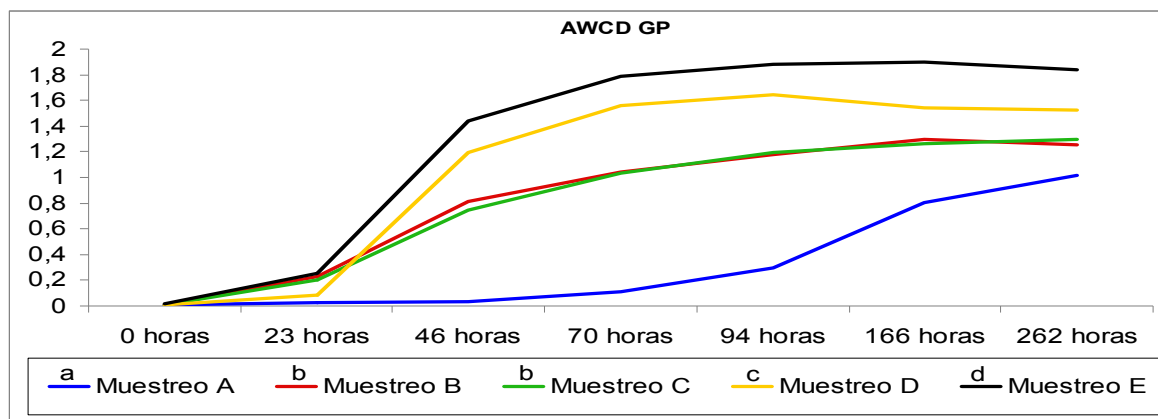


Figura 9.32. Evolución del AWCD en las placas Biolog® Gram-positiva entre los distintos muestreos. Azul (muestreo A), rojo (muestreo B), verde (muestreo C), amarillo (muestreo D), negro (muestreo E). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

9.4.2.2. Diversidad metabólica

En la figura 9.33 se puede observar una diversidad significativamente mayor en el tercer y cuarto muestreo. Esta diversidad es aproximadamente el doble que la obtenida en el resto, siendo de alrededor de 2 en los muestreos A, B y E; mientras que es de alrededor de 4 en los muestreos C y D.

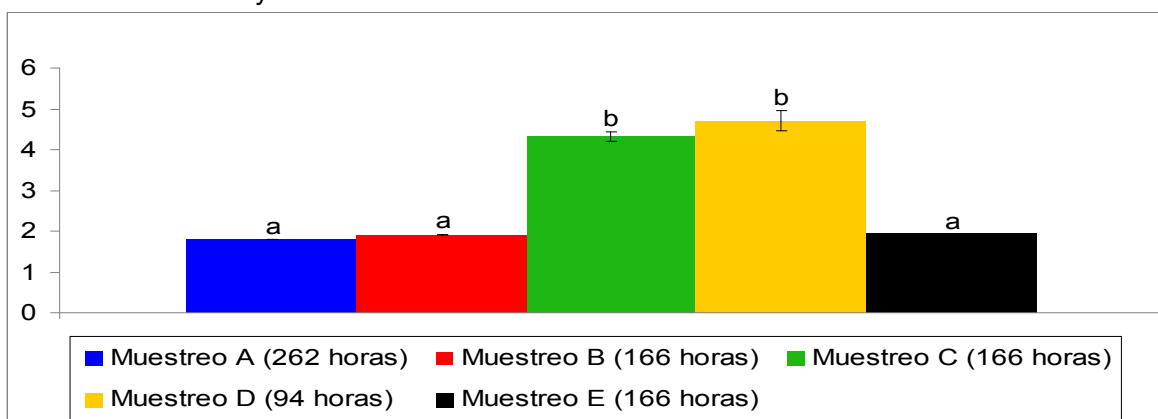


Figura 9.33. $H_{(e)}$ de las placas Biolog® Gram-positiva. Azul (muestreo A, 262 horas), rojo (muestreo B, 166 horas), verde (muestreo C, 166 horas), amarillo (muestreo D, 94 horas), negro (muestreo E, 166 horas). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

9.4.2.3. Consumo de fuentes nutritivas

En la figura 9.34 se observan diferencias entre los distintos muestreos presentando un consumo significativamente superior en el muestreo E, aunque no se observan diferencias entre este muestreo y el cuarto. El primer muestreo fue donde se obtuvo un consumo significativamente menor. Si se comparan los distintos muestreos entre sí, se observó un consumo significativamente mayor de las aminos/amidas y de los aminoácidos; sin embargo, el consumo de los polímeros fue el menor significativamente. No se produjo consumo de los alcoholes.

Por otra parte, se observa que en todos los muestreos se consumieron las distintas fuentes de carbono, excepto los alcoholes. El análisis unidireccional, aportó la siguiente información:

- Compuestos aromáticos: En el quinto muestreo se produjo un consumo significativamente mayor. En el primer muestreo fue donde el consumo fue significativamente más bajo, aunque no presentó diferencias significativas con el segundo y el cuarto muestreo.

- Ácidos carboxílicos y polímeros: En el primer muestreo se produjo un consumo significativamente menor que en el resto.

- Ésteres: El consumo fue significativamente más elevado en el cuarto y en el quinto muestreo.

- Carbohidratos: En el cuarto muestreo se produjo un consumo significativamente mayor; mientras que en el tercer muestreo el consumo fue el más bajo de todos, sin presentar diferencias entre éste y el segundo.

- Aminoácidos: Los muestreos segundo y quinto fueron los que presentaron un consumo significativamente mayor de estos compuestos. En el primer muestreo el consumo fue significativamente más bajo.

- Aminas/amidas: El mayor consumo (significativo) se produjo en los dos últimos muestreos, mientras que el primer muestreo fue el que presentó un consumo significativamente menor.

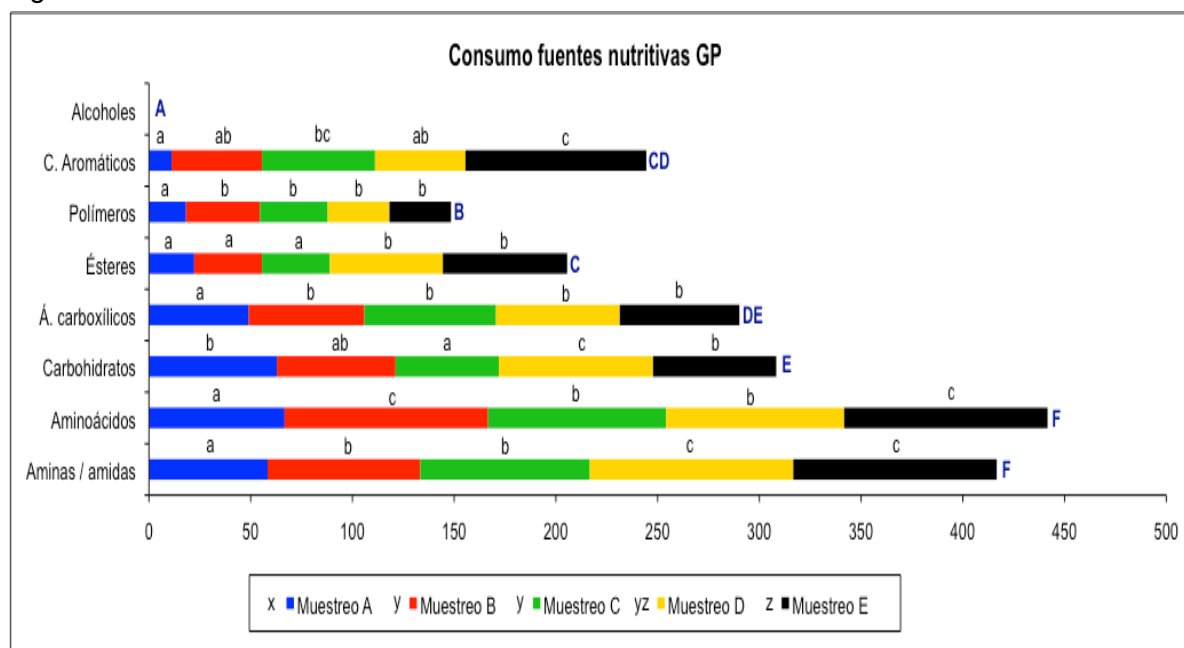


Figura 9.34. Consumo fuentes nutritivas en Biolog® Gram-positiva. Fuentes de nutrientes (alcoholes, compuestos aromáticos, polímeros, ésteres, ácidos carboxílicos, carbohidratos, aminoácidos, aminas/amidas). Azul (muestreo A, 262 horas), rojo (muestreo B, 166 horas), verde (muestreo C, 166 horas), amarillo (muestreo D, 94 horas), negro (muestreo E, 166 horas). Además se realizó un ANOVA factorial para conocer las diferencias entre fuentes teniendo en cuenta todos los muestreos (longitud de las barras). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$), letras minúsculas (a, b, c: ANOVA unidireccional), letras mayúsculas (ANOVA factorial) y letras minúsculas (x, y, z) ANOVA factorial que considera sólo los muestreos.

9.4.2.4. CA de las placas Biolog® Gram-positiva

El comportamiento observado (figura 9.35) fue similar al obtenido para las placas Biolog® Gram-negativa (figura 9.31). De nuevo, el muestreo A se encuentra en los valores superiores del eje X y en los valores intermedios del eje Y; los muestreos B y C se encuentran en el cuadrante superior izquierdo de la gráfica, mientras que los muestreos D y E se encuentran en el cuadrante inferior izquierdo.

En el Biolog® GP se observa como el tercer muestreo está en valores del eje X más bajos y en valores del eje Y más altos que el muestreo B. El muestreo E se encuentra en valores negativos tanto del eje X como del eje Y; el muestreo D se encuentra en valores un poco más superiores del eje X, pero en valores más bajos del eje Y. Esto indica que el muestreo A tiene una capacidad metabólica distinta en relación con los otros muestreos.

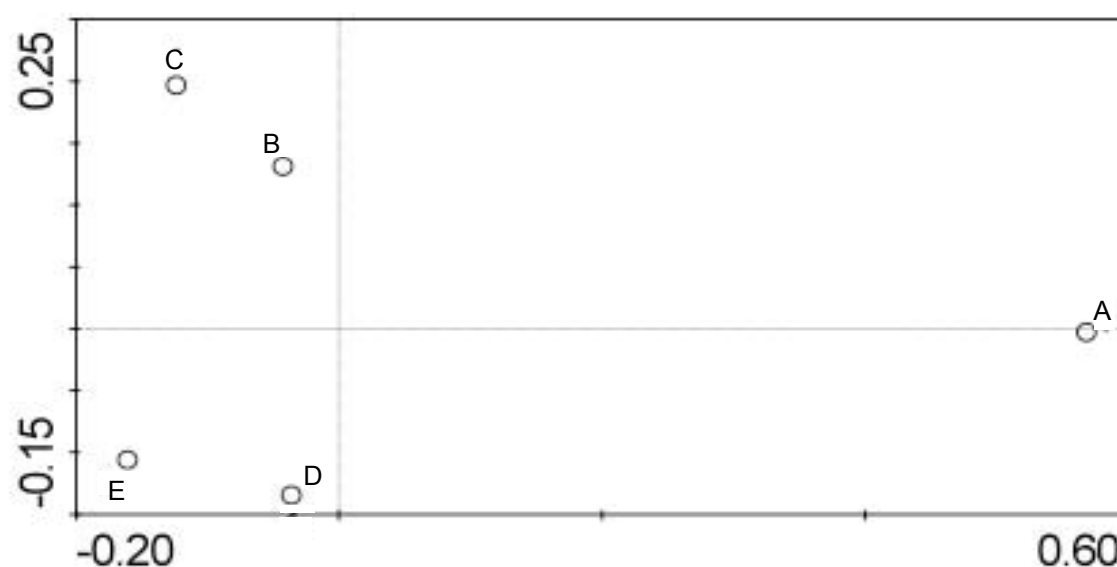


Figura 9.35. Ordenación de las muestras obtenida a partir del CA realizado con los datos de absorbancia corregidos (595 nm) de las 95 fuentes de carbono de la placa Biolog® Gram-positiva, medidas a las 262 horas (muestreo A), 166 horas (muestreos B, C y E) y 94 horas (muestreos D).

9.4.3. Biolog® Anaerobia (AN)

9.4.3.1. Evolución del AWCD

En la figura 9.36 se muestra la evolución del AWCD en las placas Biolog® Anaerobia. Al igual que en los otros tipos de placas Biolog® (Gram-positiva y Gram-negativa), el muestreo A fue el que presentó una tasa de crecimiento significativamente más lenta que en el resto, aunque no presentó diferencias con el cuarto muestreo. El quinto muestreo fue en el que de nuevo se obtuvieron los valores más rápidos del AWCD. Cabe destacar la lentitud tan acusada que se produjo en el muestreo D entre las 94 y las 262 horas.

En base a esta figura se consideró que se había alcanzado la linealidad a las 262 horas en todos los muestreos menos en el quinto que se consideró a las 94 horas.

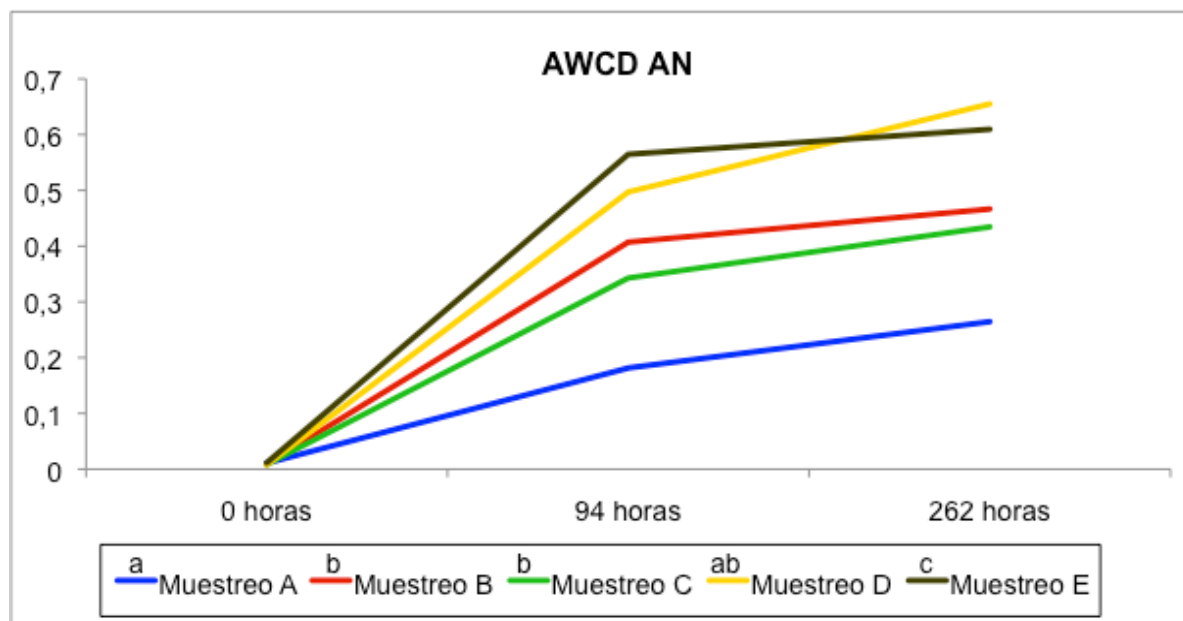


Figura 9.36. Evolución del AWCD en las placas Biolog® Anaerobia entre los distintos muestreos. Azul (muestreo A), rojo (muestreo B), verde (muestreo C), amarillo (muestreo D), negro (muestreo E). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

9.4.3.2. Diversidad metabólica

La diversidad metabólica de las placas Biolog® Anaerobia (figura 9.37) fue significativamente mayor en el muestreo C, mientras que en el A fue donde se obtuvo la diversidad más baja. En el resto de los muestreos no se produjeron diferencias significativas, aunque sí se observó un valor más bajo en el cuarto muestreo frente al segundo y al quinto.

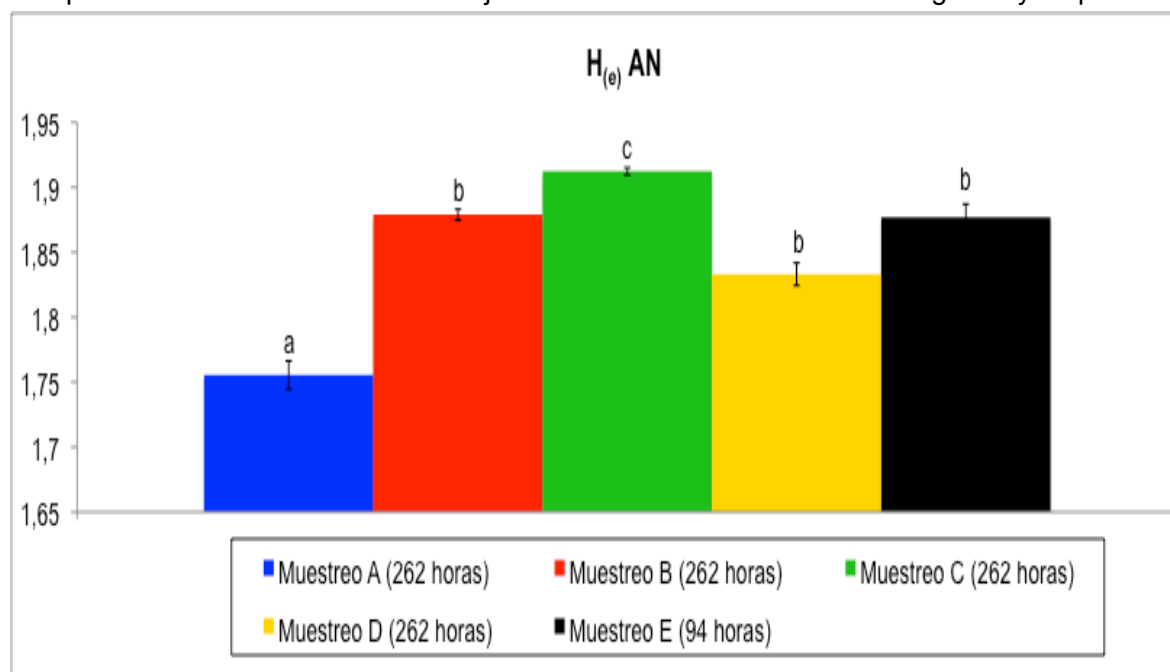


Figura 9.37. $H_{(e)}$ de las placas Biolog® Anaerobia. Azul (muestreo A, 262 horas), rojo (muestreo B, 262 horas), verde (muestreo C, 262 horas), amarillo (muestreo D, 262 horas), negro (muestreo E, 94 horas). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

9.4.3.3. Consumo de fuentes nutritivas

En la figura 9.38 se puede observar como las fuentes de carbono que se consumieron de forma significativamente mayor en las placas Biolog[®] Anaerobia fueron los compuestos aromáticos, los carbohidratos y los polímeros. Sin embargo, los compuestos sencillos como los alcoholes, los aminoácidos, las aminas/amidas y los dipéptidos fueron los que menos se consumieron, en el caso de los alcoholes sólo se consumieron en un muestreo (el segundo) y en el caso de las aminas/amidas sólo en dos muestreos (tercero y quinto).

También se observan diferencias en el análisis estadístico realizado entre los propios muestreos, obteniendo un consumo significativamente menor en el primer muestreo frente al resto.

Por otra parte, se observa que los alcoholes, las aminas/amidas y los dipéptidos no fueron consumidas en todos los muestreos. El análisis unidireccional aportó la siguiente información:

- Dipéptidos: Sólo fue consumido en los cuatro últimos muestreos. En el tercer muestreo fue donde más se consumió esta fuente de carbono, mientras que el segundo y el cuarto muestreo fue donde menos se consumió.

- Compuestos aromáticos: El consumo fue significativamente menor en el primer muestreo, entre los otros cuatro no se observan diferencias significativas.

- Polímeros: El primer muestreo fue en el que se produjo un menor consumo, mientras que en el cuarto muestreo el consumo fue el mayor de todos.

- Ésteres: En este caso el menor consumo se produjo en el quinto muestreo, aunque no se observan diferencias significativas con los dos primeros. El tercer muestreo fue donde se produjo un mayor consumo.

- Ácidos carboxílicos: De nuevo en el primer muestreo es donde se consumió menor cantidad de esta fuente de carbono; en el tercer y en el quinto muestreo fue donde más se consumió.

- Carbohidratos: El consumo fue menor en el primer y en el tercer muestreo. Después el consumo creció según el siguiente orden: quinto muestreo, segundo y cuarto.

- Aminoácidos: El consumo fue significativamente mayor en el segundo muestreo, en el resto no se observaron diferencias significativas.

- Aminas/amidas: Sólo se consumieron en el tercer y en el quinto muestreo, observándose un consumo significativamente menor en este último.

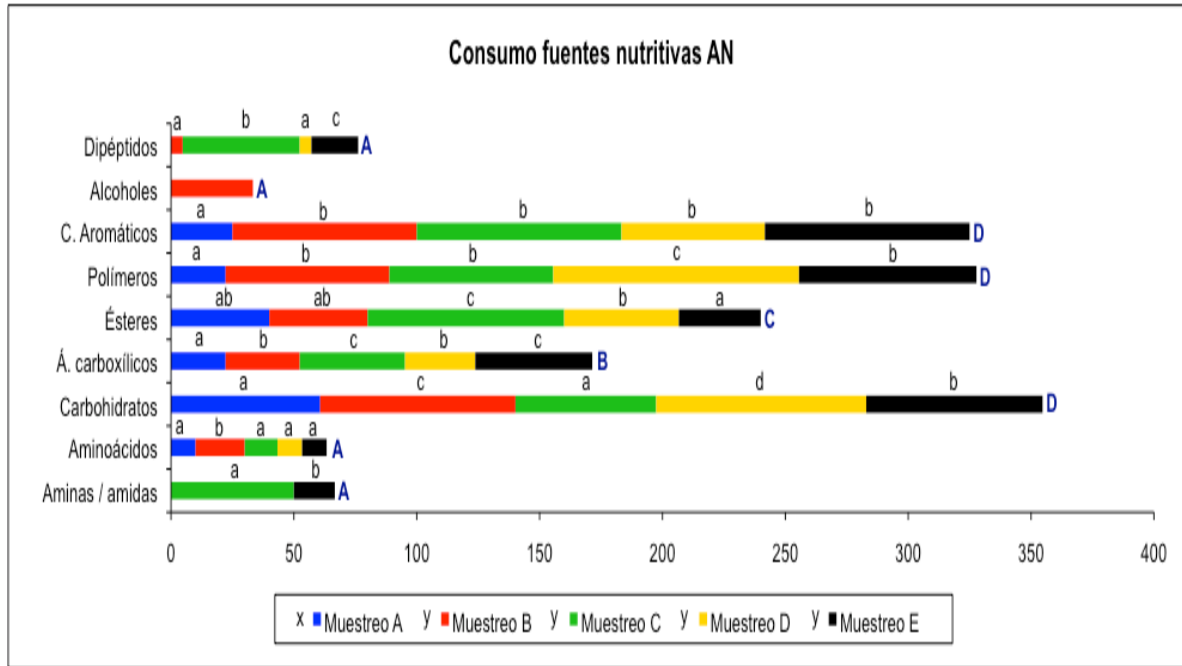


Figura 9.38. Consumo fuentes nutritivas Biolog[®] Anaerobia. Fuentes de nutrientes (dipéptidos, alcoholes, compuestos aromáticos, polímeros, ésteres, ácidos carboxílicos, carbohidratos, aminoácidos, aminas/amidas). Azul (muestreo A, 262 horas), rojo (muestreo B, 262 horas), verde (muestreo C, 262 horas), amarillo (muestreo D, 262 horas), negro (muestreo E, 94 horas). Se realizó un ANOVA unidireccional para cada compuesto y así conocer las diferencias entre muestreos. Además se realizó un ANOVA factorial para conocer las diferencias entre fuentes teniendo en cuenta todos los muestreos (longitud de las barras). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$), letras minúsculas (ANOVA unidireccional), letras mayúsculas (ANOVA factorial) y letras minúsculas (x, y) ANOVA factorial que considera sólo los muestreos.

9.4.3.4. Análisis de correspondencias de las placas Biolog[®] Anaerobia

A diferencia de los CA realizados con los Biolog[®] Gram-negativa (figura 9.31) y Gram-positiva (figura 9.35), en el análisis realizado para los Biolog[®] Anaerobia (figura 9.39) el muestreo A se encuentra en el cuadrante superior derecho del gráfico (valores grandes de ambos ejes), el muestreo B se encuentra en el cuadrante inferior derecho (en los valores casi medios de ambos ejes), el muestreo C está en el cuadrante superior izquierdo (valores pequeños del eje X, pero grandes del eje Y), el muestreo D está en el mismo cuadrante que el B pero en valores pequeños del eje Y; y el muestreo E está en el cuadrante inferior izquierdo en valores bajos del eje X y medios del eje Y. Esto indica que el muestreo A tiene una capacidad metabólica distinta en relación con los otros muestreos.

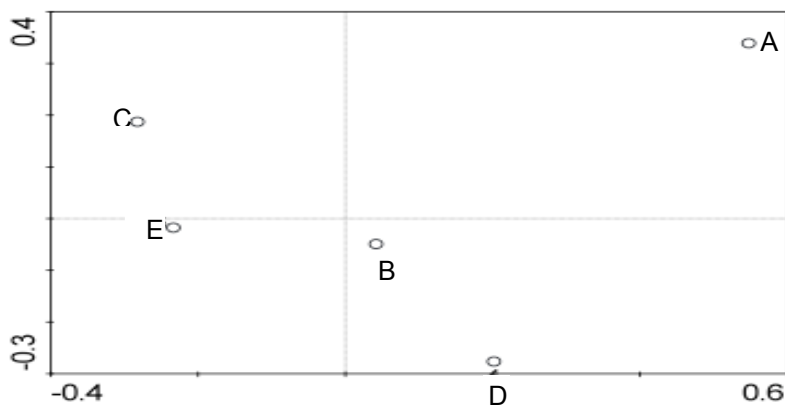


Figura 9.39. Ordenación de las muestras obtenida a partir del CA realizado con los datos de absorbancia corregidos (595 nm) de las 95 fuentes de carbono de la placa Biolog[®] Anaerobia, medidas a las 262 horas (muestreo A, B, C y E) y 94 horas (muestreo D).

9.5. Experimentos de fitorremediación con *Lemna minor* inoculada con un consorcio bacteriano procedente del biorreactor

9.5.1. Análisis del agua fitorremediada: DQO

En la figura 9.40 se puede observar una disminución significativa de la DQO en los tratamientos con la especie acuática (*Lemna minor*) cuando se inocula con el consorcio bacteriano aislado del biorreactor. Sin embargo, la disminución de este parámetro no es significativa cuando se utiliza el sistema vegetal sin inocular.

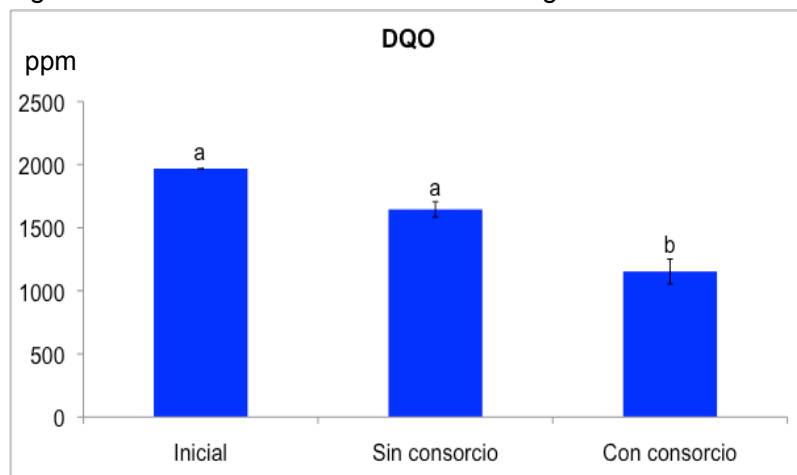


Figura 9.40. Variación de la DQO realizada por el sistema fitorremediador formado por la especie acuática *Lemna minor* inoculada o sin inocular con consorcio (RBM-A11, RBM-A12, RBM-A16 y RBM-A23). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

9.5.2. Parámetros biométricos: Peso fresco y fluorescencia

9.5.2.1. Peso fresco

En la figura 9.41 se puede observar como el incremento del peso fresco (diferencia entre el peso fresco final e inicial) disminuye significativamente en las plantas tratadas con agua de taladrina. Cabe destacar un ligero incremento de este parámetro, no significativo, tanto en controles como en plantas con agua de taladrina al inocular el consorcio. Los resultados mostrados en esta figura parecen indicar que el agua de taladrina ralentiza el crecimiento de las *Lemn*s pero no lo inhibe.

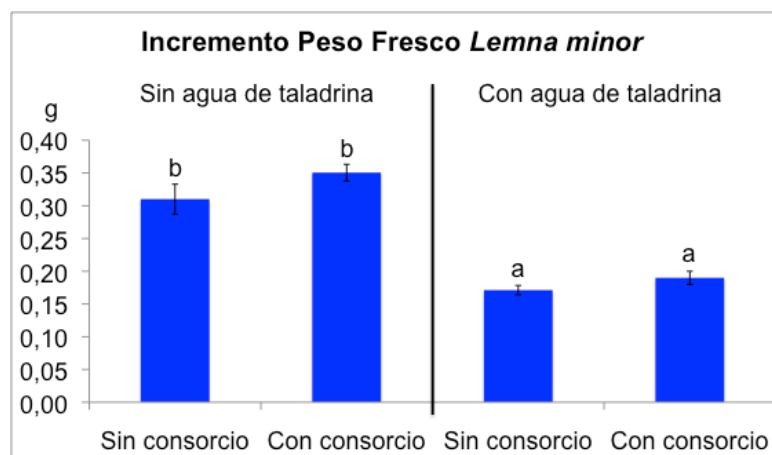


Figura 9.41. Incremento del peso fresco de la especie acuática *Lemna minor* en los controles y en los tratamientos con agua de taladrina. En ambos tratamientos hubo plantas sin inocular y otras inoculadas con el consorcio. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

9.5.2.2. Fluorescencia

En la figura 9.42A se muestra el comportamiento del parámetro fluorescencia emitida por el fotosistema dos en condiciones de luz suave por plantas que provienen de oscuridad (F_o). Se observa una disminución significativa en los controles cuando se inocula el consorcio frente al control sin inocular. Sin embargo, se observa un ligero incremento no significativo en los tratamientos con agua de taladrina cuando se inocula. También se produce una ligera disminución no significativa del tratamiento con agua de taladrina sin consorcio frente al control sin inoculación; sin embargo, cuando se inocula el consorcio se produce un incremento significativo en los tratamientos con agua de taladrina frente a los controles.

La figura 9.42B muestra el resultado de la fluorescencia máxima en el estado de adaptación a la oscuridad (F_m). Se puede observar como la inoculación del consorcio produce una disminución significativa tanto en los controles como en los tratamientos con agua de taladrina. Parece que el agua de taladrina produce un ligero incremento no significativo de este parámetro respecto al control cuando no se realiza la inoculación, pero sin embargo produce una ligera disminución no significativa cuando se inocula.

En la figura 9.42C se muestra la eficiencia potencial máxima del PSII (F_v/F_m). Se observa como, en presencia de agua de taladrina, se produce una disminución significativa cuando se inocula el consorcio; este mismo comportamiento se observa en los controles donde no hay diferencias significativas. Parece que cuando no se inocula, el agua de taladrina produce un incremento no significativo del valor de F_v/F_m respecto a los controles; sin embargo, cuando se inocula se observa una disminución significativa respecto al control.

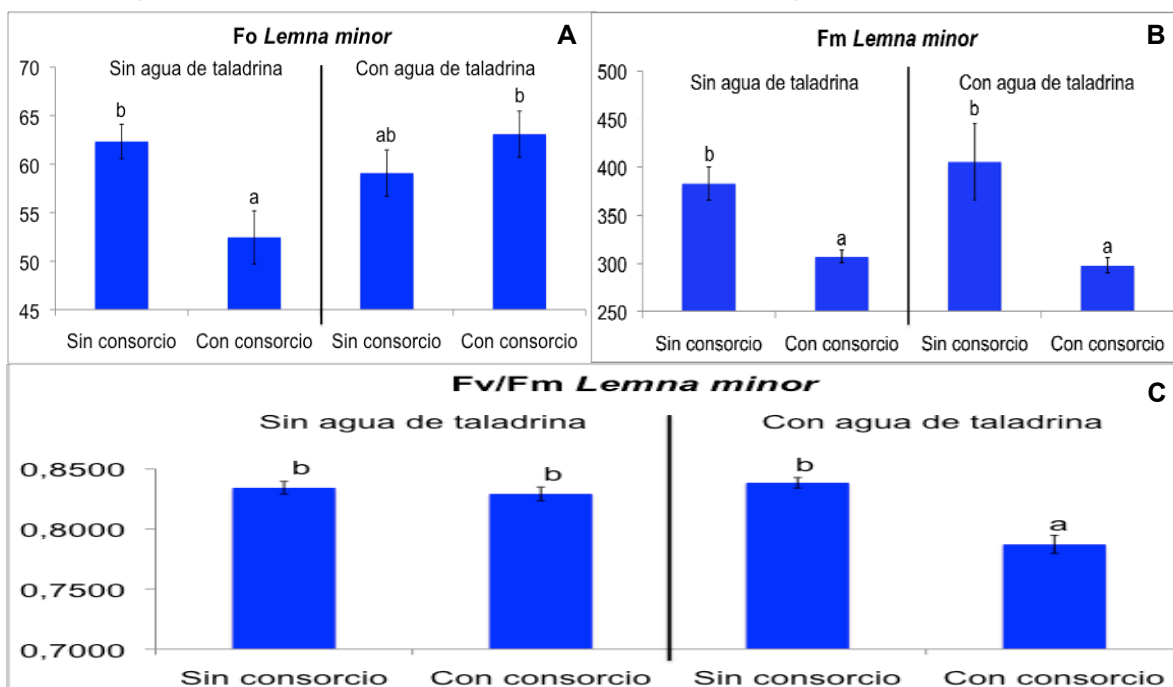


Figura 9.42. A - Variación de la fluorescencia emitida en condiciones de luz suave por plantas que provienen de oscuridad (F_o). B - Variación de la fluorescencia máxima en el estado de adaptación a la oscuridad (F_m). C - Variación de la eficiencia potencial máxima del PSII (F_v/F_m). Tratamientos: Control sin consorcio, control con consorcio, agua de taladrina sin consorcio y agua de taladrina con consorcio. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

9.5.3. Análisis de pigmentos fotosintéticos

En la tabla 9.7 se muestra el comportamiento de los pigmentos fotosintéticos en función del tratamiento al que estuvieron sometidas las plantas (control sin consorcio, control con consorcio, agua de taladrina sin consorcio, agua de taladrina con consorcio). Los cromatogramas correspondientes a estos pigmentos se adjuntan en el Anexo 17.

La inoculación del consorcio produjo un incremento significativo en los tratamientos con agua de taladrina y un incremento no significativo en los controles para los pigmentos clorofila b, feofitina a, luteína, A+Z/VAZ y total carotenoides. En el caso del pigmento feofitina a se produjo un incremento significativo también en los controles al realizar la inoculación.

En la relación clorofila a / clorofila b y en el conjunto de tocoferoles la inoculación del consorcio supuso una disminución tanto en los controles como en los tratamientos con agua de taladrina. Esta disminución fue significativa en el caso del agua de taladrina. Además, en el conjunto de tocoferoles los valores de estos pigmentos aumentan significativamente en el agua de taladrina respecto a los controles.

Finalmente, se observó una disminución no significativa cuando se inoculó en los controles y un incremento significativo cuando se inoculó en los tratamientos con agua de taladrina. Esto se observó para los pigmentos neoxantina, α -tocoferol, violaxantina, luteína epóxido (LX), LX/clorofila y conjunto VAZ (Violaxantina, anteraxantina y zeaxantina).

Cuando se comparó el comportamiento de los pigmentos del párrafo anterior entre los controles y el agua de taladrina se observó una tendencia distinta. Así se observó un aumento al añadir el agua de taladrina para los pigmentos δ -tocoferol, LX, LX/clorofila (incremento significativo), violaxantina y conjunto VAZ (incremento significativo en los tratamientos con consorcio). En los otros dos (neoxantina y α -tocoferol) se observó una disminución en los tratamientos sin bacteria (significativa en el α -tocoferol) y un incremento en los tratamientos con bacteria (significativa para la neoxantina).

Tabla 9.7. Contenido de pigmentos totales en plantas de *Lemna minor*. Tratamientos: Control sin consorcio, control con consorcio, agua de taladrina sin consorcio y agua de taladrina con consorcio. Para cada pigmento, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Contenido pigmentos totales	Control sin consorcio	Control con consorcio	Agua de taladrina sin consorcio	Agua de taladrina con consorcio
Clorofila a	922,80 \pm 22,42	937,32 \pm 25,38	895,05 \pm 14,59	943,94 \pm 23,56
Clorofila b	269,97 \pm 5,59 a	277,20 \pm 7,37 a	260,76 \pm 5,38 a	299,37 \pm 3,54 b
Clorofila a + b	1.192,78 \pm 27,87	1.214,52 \pm 32,67	1.155,81 \pm 19,96	1.243,31 \pm 26,43
Clorofila a / clorofila b	3,42 \pm 0,02 b	3,38 \pm 0,02 b	3,43 \pm 0,02 b	3,15 \pm 0,05 a
Neoxantina	49,58 \pm 1,13 ab	49,05 \pm 1,71 a	46,59 \pm 1,05 a	53,02 \pm 0,19 b
Feofitina a	5,11 \pm 0,18 b	6,08 \pm 0,15 c	4,16 \pm 0,25 a	4,67 \pm 0,19 ab

Tabla 9.7. Continuación.

Contenido pigmentos totales	Control sin consorcio	Control con consorcio	Agua de taladrina sin consorcio	Agua de taladrina con consorcio
γ -tocoferol	21,64 \pm 1,09	20,32 \pm 0,40	71,14 \pm 2,46	46,62 \pm 2,39
α -tocoferol	80,59 \pm 2,97 b	72,09 \pm 2,37 ab	66,46 \pm 4,20 a	78,38 \pm 2,05 b
Total tocoferol	102,23 \pm 3,41 a	92,41 \pm 2,71 a	137,59 \pm 4,81 c	125,01 \pm 3,08 b
Luteína	153,02 \pm 3,06 a	155,81 \pm 4,60 a	170,75 \pm 3,62 b	185,43 \pm 2,87 c
Luteína epóxido	1,34 \pm 0,05 a	1,23 \pm 0,08 a	2,14 \pm 0,25 b	2,75 \pm 0,27 c
LX/Clorofila	0,0011 \pm 0,00003 a	0,0010 \pm 0,00004 a	0,0018 \pm 0,00021 b	0,0022 \pm 0,00019 b
Violaxantina	80,31 \pm 2,11 ab	75,23 \pm 2,06 a	86,92 \pm 2,33 bc	90,48 \pm 2,78 c
Anteraxantina	7,26 \pm 0,23	7,30 \pm 0,19	6,06 \pm 0,35	8,40 \pm 0,99
Zeaxantina	14,74 \pm 0,40	15,47 \pm 0,72	14,09 \pm 0,71	15,99 \pm 0,56
Conjunto VAZ	102,31 \pm 2,71 ab	98,00 \pm 2,87 a	107,07 \pm 3,17 bc	114,87 \pm 2,82 c
A + Z / VAZ	0,22 \pm 0,001 b	0,23 \pm 0,003 b	0,19 \pm 0,005 a	0,21 \pm 0,012 b
β - Caroteno	113,88 \pm 3,19	116,93 \pm 2,53	109,49 \pm 2,24	109,64 \pm 4,46
Total Carotenoides	420,12 \pm 9,41 a	421,02 \pm 11,74 a	436,04 \pm 9,92 ab	465,70 \pm 8,28 b

9.6. Diseño de un sistema de fitorremediación planta-microorganismo inoculado con un consorcio bacteriano de cepas aisladas del biorreactor

9.6.1. Primer experimento: Realizado en la universidad del País Vasco y con una sola inoculación del consorcio

9.6.1.1. Análisis del agua fitorremediada

a) DQO: En la figura 9.43 se muestra la disminución de la DQO realizada por el sistema maíz-esparto en función de la inoculación o no del consorcio. Se observa una disminución significativa de este parámetro en ambos sistemas, siendo significativamente mayor cuando se inoculó el consorcio.

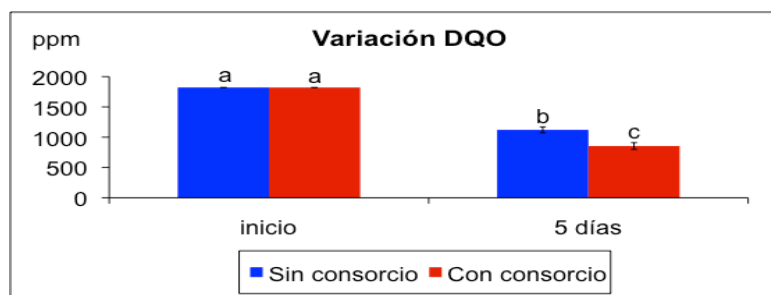


Figura 9.43. Variación de la DQO realizada por el sistema fitorremediador. En azul: sistema fitorremediador sin inocular; en rojo: sistema fitorremediador inoculado con el consorcio. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

b) pH: La figura 9.44 muestra la reducción del pH ejercida por el sistema de fitorremediación. Se puede observar como tanto en los sistemas donde se ha inoculado el consorcio como en los que no se ha hecho se produjo una reducción significativa del pH, siendo significativamente mayor en estos últimos.

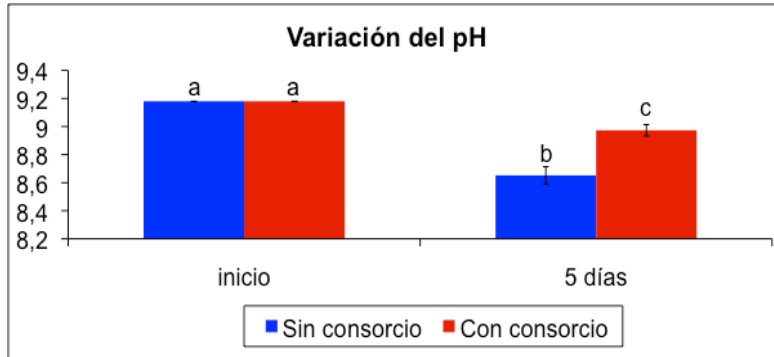


Figura 9.44. Variación del pH ejercido por el sistema fitorremediador. Azul: sistema sin inocular; rojo: sistema inoculado con el consorcio. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

9.6.1.2. Parámetros biométricos

En la figura 9.45 se muestra el estado de las plantas 5 días después de estar en contacto con el agua de taladrina. Se observan síntomas de clorosis tanto en los controles como en las plantas con agua de taladrina y también se puede destacar un tono rojizo en estas últimas.

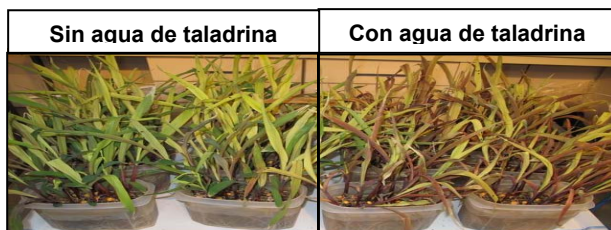


Figura 9.45. Estado de las plantas controles (izquierda) y del tratamiento (derecha, 5 días después de estar en contacto con el agua de taladrina).

El estudio de los parámetros biométricos no presentó variaciones estadísticamente significativas. En la altura se produjo un ligero incremento cuando se inoculó el consorcio. En los tratamientos con agua de taladrina la altura de las plantas disminuye ligeramente, siendo esta reducción menor en el tratamiento donde se inocularon las bacterias.

Al igual que ocurre con la altura, parece que la inoculación del consorcio hace aumentar el número de hojas tanto en los controles como en los tratamientos con agua de taladrina. Por otra parte, se produce una disminución del número de hojas en las plantas que crecieron en el agua de taladrina.

Otro parámetro estudiado fue el peso seco de la parte aérea y radical. En el primero se produjo un incremento no significativo en los controles inoculados del consorcio y en las plantas que crecieron en agua de taladrina, pero donde no se inocularon las bacterias. Sin embargo, la inoculación del consorcio en presencia del agua de taladrina supone una reducción del peso de la zona aérea. En el peso seco de la parte radical se produjo un incremento no significativo en las plantas inoculadas, tanto en controles como en plantas con agua de taladrina. El agua de taladrina por su parte disminuye el peso seco de la zona radical.

9.6.1.3. Fluorescencia y pigmentos fotosintéticos

9.6.1.3.a. Fluorescencia

En la figura 9.46A se observa una reducción no significativa del parámetro fotosintético F_o cuando se inocula el consorcio tanto en los controles como en los tratamientos con agua de taladrina. Si se comparan conjuntamente los controles frente a los tratamientos con agua de taladrina también se observa una disminución, aunque de nuevo no es significativa.

En la figura 9.46B se observa una reducción significativa del parámetro fotosintético F_m en las plantas que crecieron en el agua de taladrina. La inoculación del consorcio varía en los controles y en los tratamientos, de manera que en los primeros produce una disminución no significativa de este parámetro mientras que en el agua de taladrina supone un ligero incremento no significativo.

Finalmente, en el parámetro fotosintético F_v/F_m (figura 9.46C) se observa una disminución no significativa en los controles cuando se inocula el consorcio, pero se produce un incremento significativo en los tratamientos con agua de taladrina cuando se inoculan las bacterias. Si se comparan los controles frente a los tratamientos con agua de taladrina se observa una reducción significativa en estos últimos cuando no se inocula, sin embargo, cuando se inocula el consorcio la reducción no es significativa.

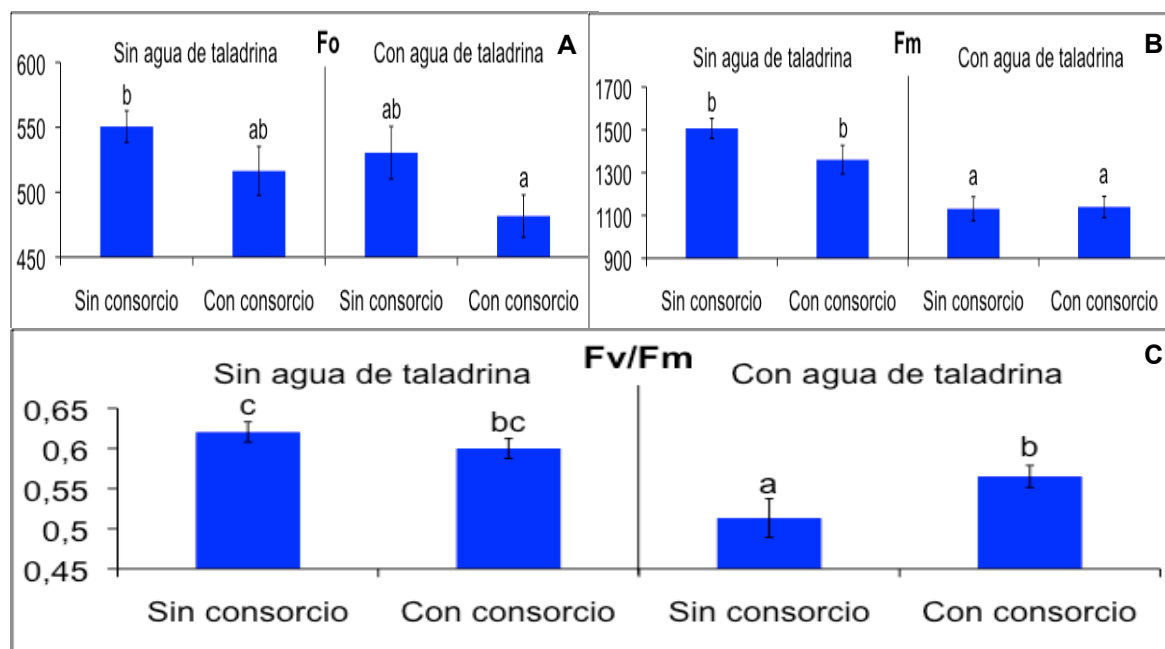


Figura 9.46. A - Variación del parámetro fotosintético F_o . B - Variación del parámetro F_m . C - Variación del parámetro F_v/F_m . Tratamientos: Control sin consorcio, control con consorcio, agua de taladrina sin consorcio y agua de taladrina con consorcio. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

9.6.1.3.b. Pigmentos fotosintéticos

En la tabla 9.8 se muestra la variación en la concentración de pigmentos en función del tratamiento. Los cromatogramas correspondientes a estos pigmentos se encuentran en el Anexo 18. Parece que la inoculación del consorcio bacteriano supone un incremento del

contenido en clorofilas (a, b, a+b y a/b), aunque no es significativo. Sí se observa una disminución significativa en el contenido de estos pigmentos en las plantas que crecieron en el agua de taladrina, salvo para la relación clorofila a / clorofila b, donde no hay diferencias significativas. Este mismo comportamiento (significativo) se produjo en los pigmentos neoxantina y violaxantina. En el caso del contenido total de tocoferoles, el incremento observado en las plantas con agua de taladrina al inocular el consorcio fue significativamente mayor que en las que no se inoculó.

La luteína y la luteína epóxido presentaron un incremento no significativo cuando se inoculó el consorcio tanto en controles como en tratamientos (en estos últimos, el incremento fue significativo para la luteína epóxido). Además, se observó una disminución significativa de estos pigmentos en las plantas que crecieron en agua de taladrina sin bacteria. Cuando se inoculó el consorcio también se produjo una reducción pero no significativa.

En la relación entre la luteína epóxido y la clorofila la inoculación del consorcio produjo un comportamiento distinto en los controles que en los tratamientos con agua de taladrina. Así, se observó una disminución no significativa en los controles mientras que se produjo un incremento no significativo en el agua de taladrina. Como consecuencia, se obtuvo un incremento significativo en el agua de taladrina cuando se inoculó el consorcio frente a los controles.

Finalmente, otro comportamiento observado en los pigmentos fue el que caracterizó el γ -tocoferol, la anteraxantina y el total de carotenoides. En este caso, se observó una disminución no significativa en los controles cuando se inoculó el consorcio, pero sin embargo se produjo un incremento significativo en los tratamientos con agua de taladrina cuando se inocularon las bacterias (salvo en el caso de la anteraxantina, donde no fue significativo). Por otra parte, la relación A+Z/VAZ presentó una disminución significativa en las plantas con agua de taladrina inoculadas con el consorcio. En todos estos pigmentos, se observó que cuando las plantas crecían en presencia de agua de taladrina se incrementaba significativamente el contenido de los mismos respecto a los controles.

Tabla 9.8. Contenido de pigmentos totales en plantas de *Zea mays*. Tratamientos: Control sin consorcio, control con consorcio, agua de taladrina sin consorcio y agua de taladrina con consorcio. Para cada pigmento, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Contenido pigmentos totales	Control sin consorcio	Control con consorcio	Agua de taladrina sin consorcio	Agua de taladrina con consorcio
Clorofila a	1481,17 \pm 190,19 a	1494 \pm 164,30 a	353,70 \pm 71,80 b	657,49 \pm 57,07 b
Clorofila b	407,60 \pm 52,09 a	408,58 \pm 46,41 a	114,74 \pm 27,75 b	190,88 \pm 38,07 b
Clorofila a + b	1.888,77 \pm 241,79 a	1.902,58 \pm 210,61 a	468,44 \pm 99,08 b	870,26 \pm 87,31 b
Clorofila a / clorofila b	3,64 \pm 0,07	3,67 \pm 0,03	3,17 \pm 0,15	3,29 \pm 0,26

Tabla 9.8. Continuación.

Contenido pigmentos totales	Control sin consorcio	Control con consorcio	Agua de taladrina sin consorcio	Agua de taladrina con consorcio
Neoxantina	62,89 ± 6,45 a	65,49 ± 7,30 a	18,77 ± 1,80 b	27,85 ± 4,90 b
Feofitina a	5,75 ± 0,92	5,57 ± 0,54	3,46 ± 0,86	11,05 ± 2,73
γ-tocoferol	11,50 ± 1,85 a	10,18 ± 0,86 a	110,49 ± 20,99 b	224,28 ± 33,57 c
α-tocoferol	129,29 ± 10,16	129,79 ± 13,32	139,23 ± 7,14	148,20 ± 16,49
Total tocoferol	139,40 ± 12 a	139,97 ± 14,13 a	249,72 ± 24,83 b	349,12 ± 28,40 c
Luteína	216,95 ± 23,13 b	219,49 ± 24,15 b	126,09 ± 7,56 a	184,14 ± 25,84 ab
Luteína epóxido	6,84 ± 0,94 b	7,12 ± 0,86 b	3,64 ± 0,62 a	6,92 ± 0,99 b
LX/Clorofila	0,0036 ± 0,0001 ab	0,0038 ± 0,0002 a	0,0103 ± 0,0017 ab	0,081 ± 0,0009 b
Violaxantina	104,12 ± 7,17 a	108,07 ± 12,71 a	63,17 ± 1,58 b	71,70 ± 7,47 b
Anteraxantina	5,57 ± 1,21 a	3,35 ± 0,53 a	12,37 ± 1,51 b	13,60 ± 3 b
Zeaxantina	15,93 ± 0,82	13,77 ± 1,47	20,41 ± 2,39	28,63 ± 8,68
Conjunto VAZ	125,62 ± 7,14	125,18 ± 14,52	95,95 ± 2,14	113,93 ± 13,61
A+Z/VAZ	0,17 ± 0,01 a	0,14 ± 0,005 a	0,36 ± 0,01 c	0,31 ± 0,02 b
β - Caroteno	177,48 ± 23,42	178,16 ± 20,22	103,80 ± 11,89	171,89 ± 29,17
Total Carotenoides	582,44 ± 66,06 a	577,63 ± 69,41 a	3.759,02 ± 515,16 b	7.240,34 ± 817,29 c

9.6.2. Segundo experimento: Realizado en la Universidad San Pablo-CEU con dos inoculaciones del consorcio

9.6.2.1. Análisis del agua fitorremediada

a) DQO: En la figura 9.47 se muestra la reducción de la DQO ejercida por el sistema de fitorremediación con y sin consorcio. Al igual que en el experimento preliminar (figura 9.43) se observa como la reducción ejercida por el consorcio es mayor que la realizada por el sistema fitorremediador sin inocular, pero en este caso no existen diferencias significativas entre ambos tratamientos.

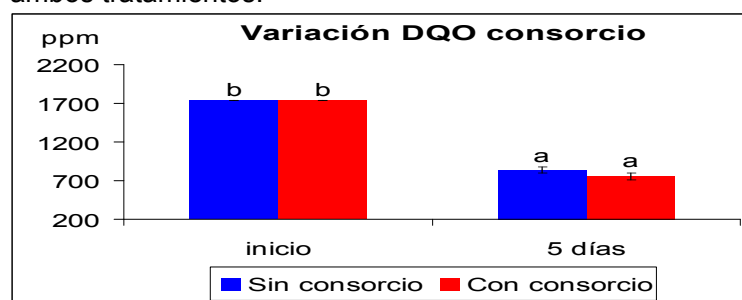


Figura 9.47. Variación de la DQO del agua de taladrina tras un proceso de fitorremediación de 5 días. Azul - sin consorcio; rojo - con consorcio. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

b) pH: En la figura 9.48 se observa como el sistema fitorremediador es capaz de reducir significativamente este parámetro. Al igual que se observó en el experimento preliminar (figuras 9.44), la reducción ejercida por el sistema fitorremediador sin consorcio es mayor que la ejercida por el sistema inoculado, aunque en este caso no se observan diferencias significativas entre ambos tratamientos.

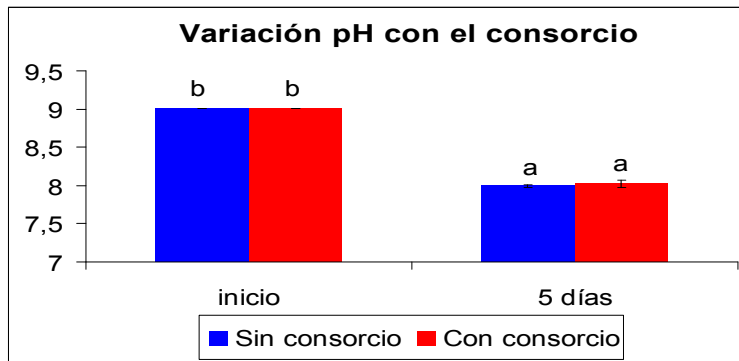


Figura 9.48. Variación del pH entre las muestras de agua de taladrina inicial y las muestras resultantes del proceso de fitorremediación. Azul - sin consorcio; rojo - con consorcio. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

c) Análisis de hidrocarburos:

- Análisis cualitativo de los hidrocarburos presentes: En la figura 9.49. se observan los cromatogramas resultantes del análisis de hidrocarburos de la muestra inicial y de las muestras fitorremediadas, en los que se muestran los picos con una mayor señal.

Se puede ver como, el proceso de fitorremediación supone la desaparición de los picos característicos de la muestra inicial, pero genera nuevos picos o productos de degradación (tabla 9.9). En el Anexo 9 se adjuntan los cromatogramas completos.

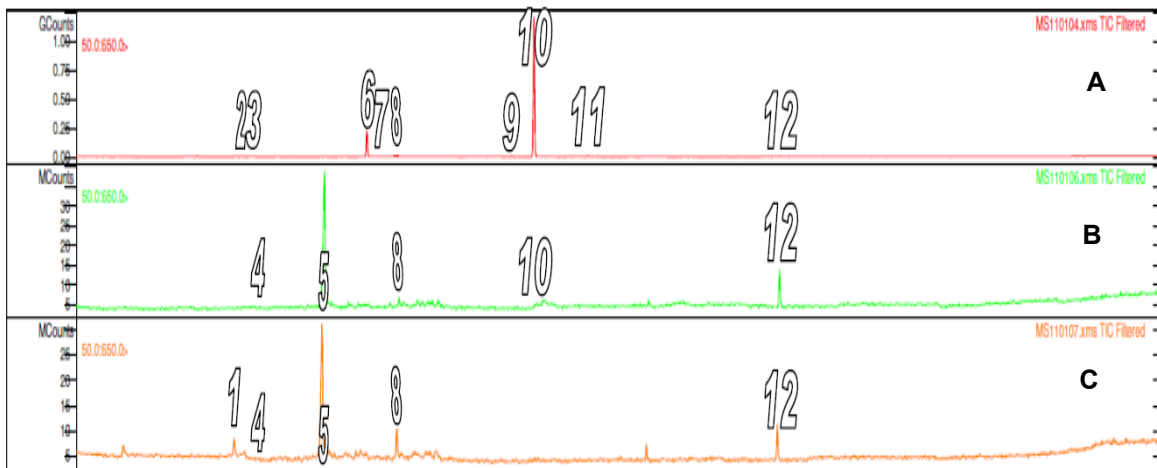








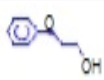
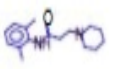

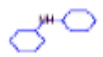
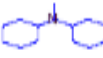

Figura 9.49. Cromatogramas correspondientes al análisis de hidrocarburos de la muestra inicial (A), sin consorcio (B) y con consorcio (C). 1: pico 5,77 min; 2: pico 6,80 min; 3: pico 7,30 min; 4: 7,32; 5: 8,54 min; 6: 9,17 min; 7: 9,55 min; 8: 9,59 min; 9: 11,19 min; 10: 11,49 min; 11: 12,25 min; 12: 14,92 min.

En la tabla 9.9 se puede ver como la mayoría de los compuestos presentes en la muestra de agua de taladrina inicial desaparecen tras el proceso de fitorremediación, pero algunos son recalcitrantes (compuestos 8, 10 y 12) y otros se descomponen dando lugar a compuestos secundarios (4, 5). Estos productos, que no desaparecen tras la fitorremediación pueden clasificarse como sustancias tóxicas de acuerdo con la Directiva 2008/1/CE del

Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de enero de 2008, relativa a la prevención y al control integrados de la contaminación.

Se ve como los compuestos 8 y 12 son más recalcitrantes cuando se inocula el consorcio bacteriano. Sin embargo, el compuesto 10 es recalcitrante en el proceso sin inoculación. En ambos procesos aparecen los compuestos 4 y 5, derivados del proceso de degradación, y en el tratamiento donde se inoculó el consorcio aparece el compuesto 1, que es un derivado del benceno y como tal se puede considerar un residuo tóxico y peligroso según la ley 10/1993 de la comunidad de Madrid (Anexo 1).

Tabla 9.9. Picos presentes en las muestras de taladrina inicial y en las muestras fitorremediadas con y sin consorcio. Los compuestos mostrados fueron seleccionados de la librería generada por los espectros de masas de cada compuesto. En cada caso se seleccionó la molécula que tenía una mayor probabilidad de semejanza con los espectros obtenidos en el análisis de las muestras

Pico	T. retención (min.)	Nombre compuesto	Fórmula	Molécula	Área Inicial	Área Sin consorcio	Área Con consorcio	Altura Inicial	Altura Sin consorcio	Altura Con consorcio
1	5,77	Benzenometanol, alpha-[1-(etilmetilamino) etil]	C ₁₂ H ₁₉ NO				2.203e+6			990914
2	6,80	Fenol	C ₆ H ₆ O		3.077e ⁻¹⁵			3.869e ⁻¹⁵		
3	7,30	1,1'-oxybis-heptano	C ₁₄ H ₃₀ O		843618			578871		
4	7,32	Silano, (2 - metoxietil) trimetil	C ₈ H ₁₉ OSi			323715	1.984e+6		167275	1.303e+6
5	8,54	Ácido hexanoico, 3,5,5 - trimetil	C ₉ H ₁₈ O ₂			2.302e+7	1.861e+7		1.196e+7	9.127e+6
6	9,17	Etanol, 1-(2-butoxi)etoxi	C ₈ H ₁₈ O ₃		1.105e ⁻¹⁸			8.544e ⁻¹⁷		
7	9,55	Etanol, 2 - fenoxi	C ₈ H ₁₀ O ₂		4.216e ⁻¹⁵			2.911e ⁻¹⁵		
8	9,59	Propanamida, N - (2,6 - dimetilfenil) - 3- (1 - piperidinilo)	C ₁₆ H ₂₄ N ₂ O		4.866e ⁻¹⁶	1.124e+6	2.852e+6	3.953e ⁻¹⁶	979215	2.183e+6
9	11,19	Ácido sulfúrico, butil dodecil éster	C ₁₆ H ₃₄ O ₃ S		1.513e ⁻¹⁶			1.144e ⁻¹⁶		
10	11,49	Ciclohexanamina N-ciclohexil-	C ₁₂ H ₂₃ N		5.169e ⁻¹⁸	415016		4.478e ⁻¹⁸	266553	
11	12,25	Ciclohexanamina N-ciclohexil-N-metil-	C ₁₃ H ₂₅ N		2.029e ⁻¹⁶			1.510e ⁻¹⁶		
12	14,92	Ácido ftálico, butil undec - 2 - en - 1 - yl éster	C ₂₃ H ₃₄ O ₄		958730	1.197e+7	8.486e+6	794272	9.643e+6	6.936e+6

- Presencia de PAHs (hidrocarburos aromáticos policíclicos): En el análisis realizado mediante la técnica de SPME (microextracción en fase sólida) no se observaron diferencias entre la muestra de agua de taladrina inicial y la final. Cabe destacar la ausencia de PAHs en la muestra inicial de agua de taladrina diluida hasta una DQO de unos 1.800 ppm y pH de alrededor de 9. Los cromatogramas se adjuntan en el Anexo 10.

- Hidrocarburos totales: El sistema de fitorremediación empleado, con y sin consorcio, ha disminuido significativamente la concentración de estos compuestos, sin presentar diferencias significativas entre ellos. De esta manera, la concentración de hidrocarburos totales se redujo desde los $12,53 \pm 0,35$ ppm existentes en la muestra inicial hasta los $2,45 \pm 0,04$ en el agua de taladrina fitorremediada sin consorcio y hasta los 2,4 en el agua de taladrina fitorremediada con consorcio.

9.6.2.2. Variación de los parámetros biométricos

En la figura 9.50 se muestra la parte aérea de una planta de maíz de cada tratamiento. Se observa un proceso de clorosis en todas las plantas, incluidas los controles, aunque parece menos acusado en el control con consorcio. Además, en las plantas que estuvieron 5 días en contacto con el agua de taladrina se observa un estado de marchitez, principalmente en las hojas inferiores, que parece más acusado en el tratamiento de agua de taladrina con consorcio.

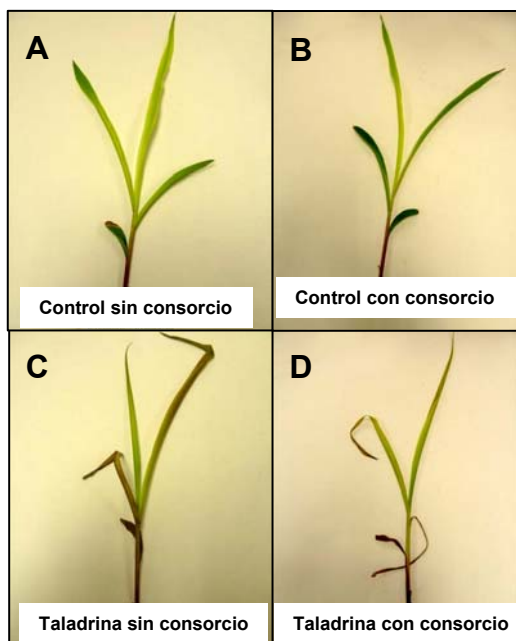


Figura 9.50. Plantas de maíz procedentes de los distintos tratamientos (**A** – control sin consorcio, **B** – control con consorcio, **C** – agua de taladrina sin consorcio, **D** – agua de taladrina con consorcio).

En la figura 9.51 se muestra la parte radical de una planta de maíz de cada tratamiento. Se observa como en los controles las raíces están más ramificadas que en las plantas tratadas con agua de taladrina, parece que en el control con consorcio tienen mayor densidad y grosor. En los tratamientos con agua de taladrina, las raíces adquieren una tonalidad más amarillenta, están menos ramificadas y tenían una consistencia más quebradiza. Además, parece que cuando se inocula con consorcio el sistema radical aumenta.

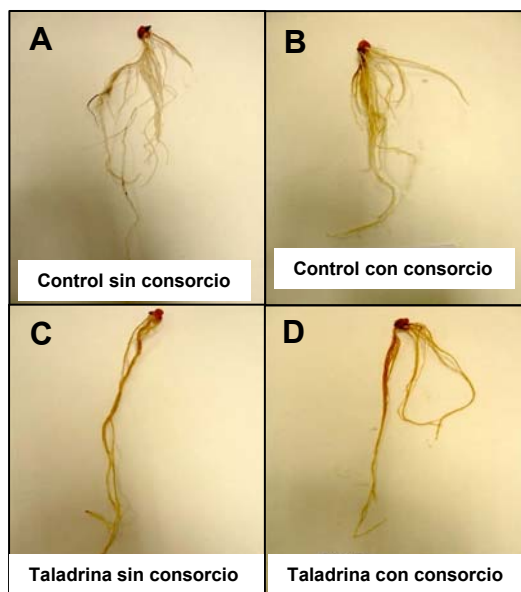


Figura 9.51. Raíces de plantas de maíz de cada tratamiento (**A** – control sin consorcio, **B** – control con consorcio, **C** – agua de taladrina sin consorcio, **D** – agua de taladrina con consorcio).

a) Altura: En la figura 9.52 se puede observar como la inoculación del consorcio en los controles produce un incremento significativo de este parámetro. Sin embargo, en los tratamientos con agua de taladrina se observa una disminución de la altura cuando se inocula el consorcio, sin presentar diferencias significativas. Por otra parte, se produce una disminución de este parámetro biométrico en las plantas que crecen en agua de taladrina frente a los controles, siendo significativa en el caso del tratamiento con consorcio.

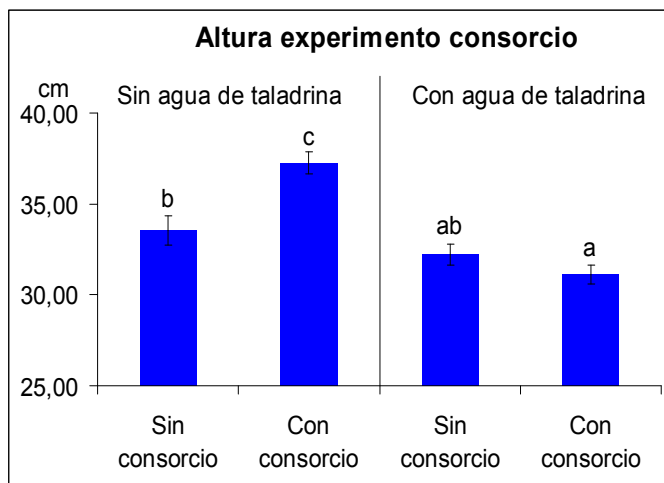


Figura 9.52. Variación de la altura de las plantas de maíz en función del tratamiento (control sin consorcio, control con consorcio, agua de taladrina sin consorcio y agua de taladrina con consorcio). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

b) Número de hojas: En los controles se produce el mismo comportamiento que para la altura, es decir, aumenta significativamente el número de hojas en las plantas inoculadas con el consorcio. En presencia de agua de taladrina y bacterias se produce un ligero incremento del número de hojas, pero no hay diferencias significativas. Esto puede observarse en la figura 9.53. Por otra parte, si se comparan los tratamientos con agua de taladrina frente a los controles se observa una disminución significativa del número de hojas en los primeros, tanto cuando se inocula como cuando no se hace.

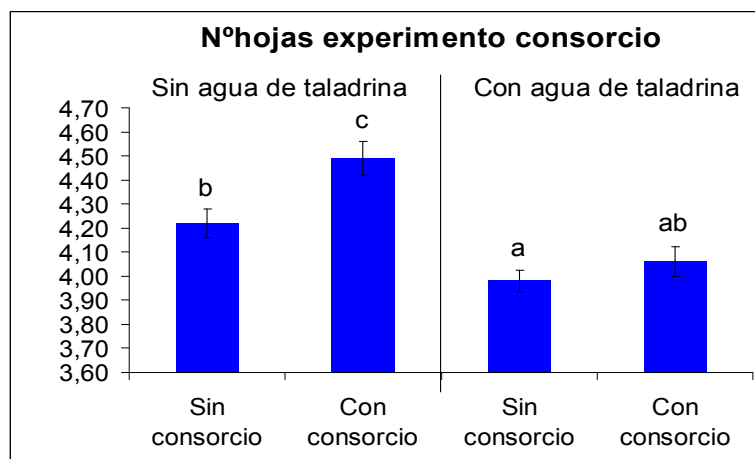


Figura 9.53. Variación del número de hojas de las plantas de maíz en función del tratamiento (control sin consorcio, control con consorcio, agua de taladrina sin consorcio y agua de taladrina con consorcio). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

c) Peso seco raíz y parte aérea: No se observan diferencias significativas entre los distintos tratamientos. En los controles la inoculación del consorcio produce un ligero incremento del peso seco de la parte aérea por unidad de planta. En los tratamientos sin consorcio el peso seco es el mismo, sin embargo, se produce una disminución en el tratamiento con agua de taladrina y consorcio respecto al control con consorcio.

En la parte radical tanto la inoculación del consorcio como la presencia de agua de taladrina produjeron un incremento del peso seco de la parte radical respecto al control sin consorcio. En estos tres tratamientos, el peso seco de la parte radical por unidad de planta tiene el mismo valor.

9.6.2.3. Eficiencia fotosintética de las plantas, reacción de Hill y cantidad de clorofila

a) Eficiencia fotosintética: En la figura 9.54A se muestran los resultados obtenidos para el parámetro F_o en función del tratamiento. Se observa un incremento significativo cuando se inocula el consorcio, mientras que se observa una ligera disminución en las plantas en presencia de agua de taladrina cuando se inoculan las bacterias. Si se compara entre los controles y los tratamientos con agua de taladrina se observa una disminución de este parámetro en estos últimos tratamientos. Esta disminución es significativa cuando se inocula el consorcio.

El siguiente parámetro estudiado fue F_v/F_m . No se produjeron diferencias significativas entre los tratamientos, pero sí se puede destacar una tendencia ascendente de este parámetro en los controles cuando se inoculó el consorcio (figura 9.54B), mientras que en los tratamientos con agua de taladrina la inoculación de las bacterias supuso una ligera reducción. Por otra parte, cabe destacar una disminución no significativa de este parámetro en los tratamientos con agua de taladrina frente a los controles.

En tercer lugar, se quiso conocer la evolución de la eficiencia máxima del fotosistema dos ($\phi PSII$), del quenching fotoquímico de la variación de la fluorescencia de la clorofila (qP) y de la tasa relativa de transporte de electrones (ETR). En las figuras 9.54C, 9.54D y 9.54E se puede observar un incremento no significativo de este parámetro cuando se inocula el consorcio en los controles, mientras que se produce una disminución no significativa cuando

se inoculan las bacterias en el agua de taladrina. Por otra parte, se produjo una disminución significativa en las plantas que crecieron en presencia de agua de taladrina frente a los controles.

Finalmente, se estudió el parámetro NPQ (quenching no fotoquímico). En la figura 9.54F se observa una disminución de este parámetro cuando se inocula el consorcio, siendo significativa en el tratamiento con agua de taladrina. También se ve una disminución del NPQ en el agua de taladrina frente a los controles, siendo significativa cuando se inoculan las bacterias.

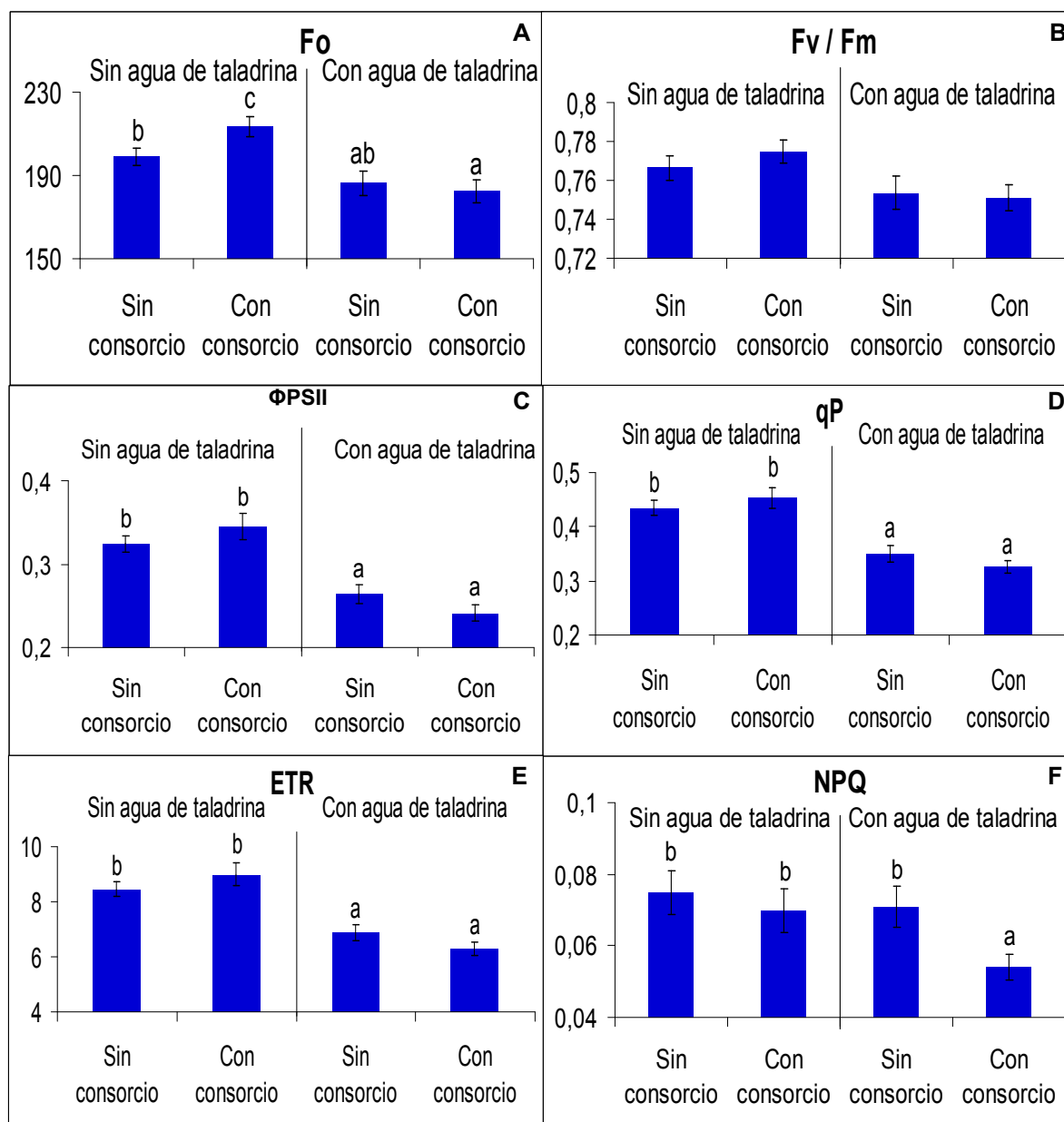


Figura 9.54. A - Variación del parámetro fotosintético F_o . B - Variación de la eficiencia potencial máxima del fotosistema II (F_v/F_m). C - Variación de la eficiencia máxima del fotosistema dos (ϕ_{PSII}). D - Quenching fotoquímico de la variación de la fluorescencia de la clorofila (q_P). E - Variación de la tasa relativa del transporte de electrones (ETR). F - Variación del Quenching no fotoquímico (NPQ). Tratamientos: Control sin consorcio, control con consorcio, agua de taladrina sin consorcio y agua de taladrina con consorcio. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

b) Reacción de Hill: En la figura 9.55 se observa como la inoculación del consorcio y la presencia del agua de taladrina supone una reducción significativa de esta reacción. De esta manera, el valor de esta reacción es significativamente mayor en el control sin consorcio frente al resto de los tratamientos. Por otra parte, en los tratamientos con agua de taladrina se produce un ligero incremento de este parámetro cuando se inocula el consorcio.

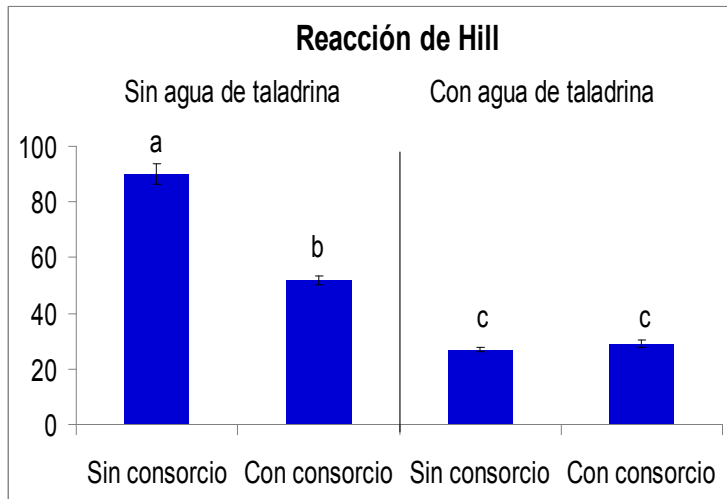


Figura 9.55. Variación de la velocidad de la reacción de Hill en función del tratamiento (control sin consorcio, control con consorcio, agua de taladrina sin consorcio y agua de taladrina con consorcio). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

c) Cantidad de clorofilas: En la figura 9.56A se muestra el contenido total de clorofilas en función del tratamiento. Se puede ver como la inoculación del consorcio supone un incremento, significativo en los tratamientos con agua de taladrina. Por otra parte, se observa una disminución significativa de los tratamientos con agua de taladrina frente a los controles.

En la figura 9.56B se observa un incremento significativo de la relación chl a / chl b (clorofila a y la clorofila b) en el tratamiento de agua de taladrina sin consorcio, lo que se debe a una menor concentración de clorofila b. En el resto de tratamientos no se observan diferencias.

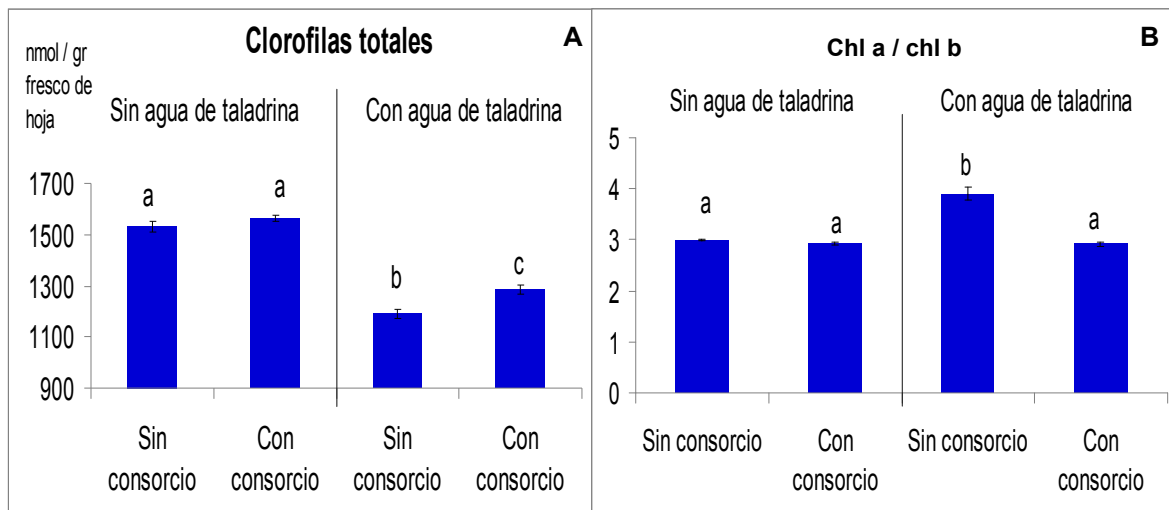


Figura 9.56. A - Variación de las clorofilas totales. **B** - Evolución de la relación chl a / chl b (Clorofila a / clorofila b). Tratamientos: control sin consorcio, control con consorcio, agua de taladrina sin consorcio y agua de taladrina con consorcio. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cuando se estudiaron las clorofilas por separado se observaron diferencias significativas. En la clorofila a se observó un incremento cuando se inoculó el consorcio (siendo significativo en los tratamientos con agua de taladrina). El crecimiento de las plantas en agua de taladrina supuso una disminución de este tipo de clorofila, siendo significativa cuando se inoculó el consorcio (control sin consorcio $1.148,12 \pm 15,62$ nmol/gr fresco de hoja; control con consorcio $1.167,86 \pm 8,61$ nmol/gr fresco de hoja; agua de taladrina sin consorcio $948,13 \pm 18,48$ nmol/gr fresco de hoja; agua de taladrina con consorcio $957,87 \pm 11,2$ nmol/gr fresco de hoja).

En el caso de la clorofila b también se observó un incremento cuando se inoculó el consorcio, siendo significativo en el tratamiento con agua de taladrina. Sin embargo, en las plantas que crecieron en agua de taladrina se produjo una disminución significativa de este parámetro respecto a los controles (control sin consorcio $383,23 \pm 5,76$ nmol/gr fresco de hoja; control con consorcio $397,39 \pm 5,48$ nmol/gr fresco de hoja; agua de taladrina sin consorcio $243,29 \pm 4,44$ nmol/gr fresco de hoja; agua de taladrina con consorcio $328,51 \pm 7,73$ nmol/gr fresco de hoja).

9.7. Aportaciones a congresos

Los resultados obtenidos en los apartados 9.2, 9.3 y 9.4 se presentaron en el IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. Los abstracts y pósters se muestran en el Anexo 19.

**10. DISCUSIÓN: ESTUDIO DE LAS
COMUNIDADES MICROBIANAS
QUE SE DESARROLLAN EN UN
REACTOR BIOLÓGICO DE
MEMBRANA DURANTE EL
PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN
DE TALADRINAS Y SU EMPLEO EN
SISTEMAS DE FITORREMEDIACIÓN**

En los sistemas planta-microorganismo desarrollados en los capítulos 5 y 6 se observó que ninguna de las cepas ensayadas eran capaces de reducir la demanda química de oxígeno (DQO) en mayor proporción que el sistema no inoculado. Por ello, nos planteamos aislar cepas de un medio en el cual las bacterias estuviesen muy bien adaptadas a las taladrinas. Para ello contamos con la colaboración de la empresa Gaiker (Parque Tecnológico de Zamudio – Bilbao) y concretamente con D. Javier Etxebarría. Dicha empresa tiene mucha experiencia en la remediación de taladrinas en reactores biológicos de membrana (R. B. M). El reactor es alimentado con fango procedente de depuradoras de residuos sólidos urbanos que aportan las comunidades microbianas encargadas de la biorremediación.

Las bacterias son cruciales para el funcionamiento del ecosistema y juegan un papel fundamental en los ciclos del carbono, nitrógeno y azufre (Strom, 2008). Los tratamientos biológicos del agua residual como fango activo o reactores biológicos de membrana son usados para proteger el ambiente acuático mediante la retirada de contaminantes del agua residual, incluidos compuestos orgánicos, nitrogenados y fosforados (Ahmed *et al.*, 2008; Horner-Devine y Martiny, 2008).

El R. B. M. es una innovación tecnológica que combina la biodegradación con la separación de la membrana en un solo proceso, separando microorganismos y sólidos en suspensión del agua tratada mediante una filtración. La principal ventaja de este reactor es mantener una alta concentración de sólidos en suspensión en la mezcla líquida, lo que permite trabajar con menores tiempos de retención hidráulica (HRTs) y volúmenes de reactor (Tazi-Pain *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004; Malamis y Andreadakis, 2009). De esta manera, el reactor puede incrementar y controlar el tiempo de retención de sólidos (SRT) independientemente del HRT (Meng *et al.*, 2008). Altos SRT permiten incrementar la concentración de fango y la carga orgánica aplicada, incrementando la población degradadora.

A diferencia de los sistemas de fitorremediación desarrollados hasta el momento, el reactor fue alimentado con taladrina pretratada para así seleccionar las bacterias con mayores capacidades de degradación. La taladrina pretratada y el agua de taladrina están formadas por hidrocarburos, de manera que es de esperar que las bacterias seleccionadas tengan la capacidad de degradar tanto los hidrocarburos más complejos de las taladrinas pretratadas como los hidrocarburos más sencillos del agua de taladrina. Se sabe que las bacterias utilizan en primer lugar las sustancias más energéticas, que generalmente son aquellas más sencillas de degradar, y luego pasan a degradar las sustancias que progresivamente aporten menor energía. También es sabido que la introducción de poblaciones microbianas aclimatadas, aisladas de un medio contaminado, puede ser la mejor opción para realizar ensayos de bioaumento (Beaulieu *et al.*, 2000; Vogel y Walter, 2001), ya que se ha visto que estas poblaciones son más resistentes a las extremas condiciones del ambiente e incluso a la predación (Fewson, 1988; Otte *et al.*, 1994; Hamer, 1997).

El estudio del rendimiento del R. B. M. (figura 9.2) muestra que éste es un sistema efectivo, cuyo rendimiento es superior al 70%, incluso sobrepasando el 80%. Este sistema

conseguía reducir la DQO desde valores superiores a los 4.000 ppm hasta valores que estaban por debajo del límite establecido por la Ley 10/1993 de la Comunidad de Madrid (figura 9.1). Este rendimiento tan elevado fue observado también por Van der Gast *et al.* (2003) quienes introdujeron 4 cepas en biorreactores para bioaumentar el tratamiento de las taladrinas agotadas y vieron que la DQO se reducía en un 80% y las cepas introducidas eran persistentes después de 100 h.

Las muestras de taladrina pretratada presentan un pH de entre 7 y 8,2 (figura 9.5). Esto contrasta con otros estudios realizados. Según Van der Gast *et al.* (2003), las taladrinas son un medio de gran alcalinidad con un rango de pH entre 9 y 11. Esta diferencia puede deberse a que la degradación de las taladrinas genera nuevos hidrocarburos, derivados de los distintos procesos de manipulación durante la fabricación de las piezas de los tractores y la adición de sustancias como biocidas.

Para conseguir la adaptación del fango activo del reactor a los hidrocarburos de las taladrinas pretratadas se fue incrementando progresivamente la concentración de esta sustancia en la alimentación del R. B. M. Una vez aclimatado (cuando la DQO de la alimentación tenía un valor de unos 6.000 ppm) se realizaron diversos muestreos, tanto de organismos cultivables como no cultivables. La estabilidad funcional es un requisito para las comunidades microbianas en un sistema de tratamiento biológico que retira continuamente contaminantes durante un largo periodo de tiempo. Las relaciones entre la estabilidad funcional y las dinámicas de la comunidad microbiana todavía no están claras. Entender la comunidad microbiana es un paso necesario para realizar un diseño racional y una operación funcional y estable en los sistemas de tratamiento de agua residual (Briones y Raskin, 2003; Curtis *et al.*, 2003; Rittman *et al.*, 2006; Gentile *et al.*, 2007; Lv *et al.*, 2010).

A pesar de la gran relevancia de los tratamientos biológicos para las industrias, muchos de los estudios relacionados se han enfocado principalmente en el rendimiento del tratamiento y otros parámetros asociados, sin prestar atención a las comunidades microbianas que participan. La comunidad de bacterias presentes en los reactores de fango activo o biofilms son las responsables de la eliminación del carbono y nutrientes del efluente y representan el principal componente de todos los procesos biológicos de tratamientos de agua residual (Silva *et al.*, 2010).

El estudio de la comunidad microbiana del reactor tuvo dos aproximaciones: por una parte se estudió la comunidad cultivable y por otra la comunidad no cultivable.

En primer lugar, se quiso determinar la diversidad de los organismos cultivables porque son los microorganismos que pueden ser utilizados en los ensayos de bioaumentación. Como el fango activo provenía de depuradoras podía estar formado por organismos nocivos para la salud humana que, por lo tanto, no se podían utilizar en este tipo de ensayos. Estos ensayos tienen que realizarse con organismos conocidos y fáciles de cultivar de manera que los experimentos puedan repetirse y, en el caso de que se obtengan resultados satisfactorios, puedan ser aplicados en la empresa.

Todas las cepas aisladas, salvo una, pertenecían al grupo de las Gram-negativa. Esto coincide con los resultados observados por otros autores (Bennet, 1972; Lonon, 1996). Además, el estudio de organismos cultivables reveló la abundancia del género *Pseudomonas* sp. Este género es predominante en el reactor, lo que puede deberse a su gran versatilidad nutritiva (Stanier *et al.*, 1966) y a que *Pseudomonas* es un género que ha sido frecuentemente encontrado en taladrinas por otros investigadores (Pivnick, 1954; Tant y Bennet, 1956; Bennet, 1974; Baecker *et al.*, 1983). Además, *Pseudomonas* produce un gran número de enzimas extracelulares que las permiten degradar macromoléculas, transformándolas en sustratos simples (Lonon, 1996).

Otros organismos encontrados en el reactor (en los muestreos A, C y E) pertenecen al género *Acinetobacter*. Este género ha aparecido en otros estudios con taladrinas (Salmeen *et al.*, 1987) y es capaz de usar una amplia variedad de hidrocarburos sencillos o complejos como fuente de energía (Lonon, 1996).

En el reactor también se encontraron géneros pertenecientes a la familia *Caulobacteraceae*, que han aparecido en otros estudios de diversidad en R. B. M. (Baker *et al.*, 1983) pero no ha aparecido en muestras de taladrinas.

Sin embargo, no se han encontrado cepas del género *Rhodococcus*, que sí han aparecido en otros estudios (Lonon, 1996). Estos microorganismos son capaces de utilizar hidrocarburos y compuestos que contienen nitrógeno como sustratos y habitualmente se han aislado de suelos contaminados con petróleo (Van der Gast *et al.*, 2002, 2003 y 2004).

Parece que los géneros más resistentes a los cambios existentes entre los distintos muestreos fueron *Pseudomonas*, *Acidovorax* y *Ancylobacter*, ya que son los únicos que aparecen en 4 de los 5 muestreos. En el caso de *Pseudomonas* puede deberse a su gran diversidad metabólica y a que son capaces de colonizar un amplio rango de nichos (Madigan y Martinko, 2005).

Los índices de diversidad sirven como herramientas que aportan valiosa información sobre la dinámica y estructura del ecosistema combinando información sobre la riqueza y componentes del mismo. Según la estima realizada mediante el índice de Chao (apartado 9.2.2.1) la riqueza (biodiversidad) es de 41 géneros (se habían aislado 27 géneros). Esto contrasta con los resultados obtenidos por Van der Gast *et al.* (2004) quienes observaron que la diversidad fenotípica de un fango activo y la comunidad indígena de un biorreactor es baja, con entre 3 y 8 especies cultivables detectadas durante las operaciones del biorreactor. El número tan reducido de especies obtenido en el trabajo de Van der Gast *et al.* (2004) en comparación con los resultados obtenidos en este trabajo puede deberse a varios factores:

- Existe una diferencia en el tiempo de incubación de las cepas aisladas del reactor. En nuestro caso se realizaron incubaciones a corto (24-48 horas) y a largo plazo (7 días) y a dos temperaturas (25 °C y 30 °C), mientras que en el trabajo de Van der Gast sólo realizaron incubaciones durante 24 horas a 28 °C.

- El medio utilizado para el aislamiento fue diferente. En nuestro caso se utilizó agar nutritivo y un medio selectivo (taladrina pretratada, medio Ringers y agar), mientras que en el trabajo de Van der Gast sólo se utilizó un medio de aislamiento (R2A).

- La diversidad genotípica y la identificación de las cepas individuales aisladas del biorreactor se analizó de forma diferente. En nuestro caso se utilizaron técnicas de PCR y secuenciación, mientras que en el trabajo de Van der Gast este proceso se realizó mediante el análisis de los ácidos grasos de membrana (FAMES).

- Una diferencia fundamental fue el valor de la DQO del efluente de entrada, que en nuestro caso fue de alrededor de 6.000 ppm mientras que en el trabajo de Van der Gast *et al.* (2004) fue de 48.000 ppm.

La evolución de la diversidad biológica según el índice de Shannon para los organismos cultivables (figura 9.9) se incrementó según el siguiente orden: muestreo A < muestreo D < muestreo B < muestreo C < muestreo E. Las dinámicas de poblaciones microbianas están bien documentadas en sistemas de tratamiento tradicional (Lee *et al.*, 2002; Wells *et al.* 2009). Fluctuaciones sustanciales en la estructura de la comunidad bacteriana se han demostrado en estudios previos en R. B. M. a nivel de laboratorio o en escala piloto (Stamper *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008).

En segundo lugar, se quiso conocer los cambios producidos en las comunidades del reactor por el paso del tiempo y las diferentes concentraciones de taladrinas. Para ello, se realizó un estudio de los organismos no cultivables a través de un abordaje metagenómico: aislamiento del ADN total, amplificación del gen 16S rRNA, clonaje, transformación y posterior secuenciación (Mirete *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2011).

Con las secuencias obtenidas del gen 16S rRNA se realizaron curvas de rarefacción. Estas curvas muestran la acumulación del número de especies grabadas como una función de esfuerzo (Silva *et al.*, 2010). Estas curvas establecen el rango en el que las nuevas especies fueron encontradas. La cobertura completa de estos datos se encontraría en la zona en forma de meseta de la curva. En ninguna de las librerías realizadas en los distintos muestreos del R. B. M. se alcanzó dicha zona de meseta, sino que la curva tendía a una forma de asíntota (figura 9.23), por lo que sería necesario obtener nuevos clones para alcanzar la saturación. Estos resultados no eran esperados porque las muestras procedían de sistemas cerrados que recibían grandes cantidades de compuestos contaminantes y por lo tanto tendían a seleccionar poblaciones específicas capaces de utilizar y / o degradar estos compuestos, reduciendo la diversidad. Hughes *et al.* (2001) argumentaron que la diversidad microbiana no puede ser completamente estimada debido a la gran diversidad bacteriana en las muestras ambientales, tamaños de muestras pequeños o a ambos factores, de manera que se obtienen curvas de acumulación lineales o cercanas a la linealidad.

En el estudio de los microorganismos no cultivables (figura 9.25A) la mayor diversidad, según el índice de Shannon-Weaver, se encontró en el primer muestreo (A), disminuyendo según el siguiente orden: muestreo D > muestreo C > muestreo E > muestreo B. Algunos

estudios previos han demostrado que la comunidad bacteriana tiene una alta variabilidad en los biorreactores a escala de laboratorio (Zumstein *et al.*, 2000; Wittebolle *et al.*, 2008).

Se acepta que sólo el 5% de las bacterias pueden ser cultivadas con los métodos disponibles actualmente (Bakken y Olsen, 1987; Ward *et al.*, 1995; Tiedje y Stein, 1999), lo que demuestra que para llegar a conocer con mayor exactitud qué microorganismos se desarrollan en una comunidad es necesario utilizar herramientas que no necesiten pasar por un cultivo previo. El estudio de los organismos no cultivables tiene una gran importancia. Las herramientas moleculares desarrolladas en las últimas décadas para superar las limitaciones impuestas por las técnicas tradicionales de cultivo se han usado en los estudios de diversidad bacteriana en los tratamientos biológicos de aguas residuales (Loy *et al.*, 2002). Estos estudios han demostrado que la mayoría de los organismos aislados mediante técnicas de cultivo no son relevantes en el funcionamiento de los reactores y que otros microorganismos, algunos de ellos no cultivables, tienen la llave de los procesos ecológicos que tienen lugar (Silva *et al.*, 2010). Además, caracterizaciones moleculares en ecosistemas de tratamiento de aguas residuales han revelado que los organismos desconocidos, como las bacterias no cultivables, son responsables de la mayoría de los procesos en fango activo convencional y reactores biológicos (Wagner y Loy, 2002).

El objetivo de este trabajo no es sólo conocer los aspectos dinámicos de funcionamiento del biorreactor, sino también aplicar dicho conocimiento para mejorar los procesos de biorremediación. Los análisis de cultivos puros de los microorganismos del suelo han revelado que son una rica fuente terapéutica para compuestos como antibióticos (Raaijmakers *et al.*, 1997), agentes anticancerígenos (Shen *et al.*, 2001), inmunosupresores (Skoko *et al.*, 2005), así como un amplio rango de valiosos productos biotecnológicos (Ullrich *et al.*, 2004; Inoue *et al.*, 2005). Gracias a la metagenómica se han podido aislar nuevos genes que pueden utilizarse como antibióticos o aplicaciones farmacéuticas (Brady *et al.*, 2001; MacNeil *et al.*, 2001; Gillespie *et al.*, 2002; Brady *et al.*, 2004; Riesenfeld *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2005); enzimas oxidoreductasas y deshidrogenasas (Henne *et al.*, 1999; Knietzsch *et al.*, 2003), amidasas (Voget *et al.*, 2003; Gabor *et al.*, 2004; Gabor y Janssen, 2004), síntesis de vitaminas (Entcheva *et al.*, 2001), degradadores de polisacáridos, enzimas modificadas y genes amiolíticos (Wong y Saddler, 1992; Bhat, 2000; Sun y Cheng, 2002; Richardson *et al.*, 2002; Voget *et al.*, 2003; Yun *et al.*, 2004; Ferrer *et al.*, 2005; Voget *et al.*, 2006) y genes lipolíticos (Henne *et al.*, 2000; Elend *et al.*, 2006)

Otro índice de diversidad estudiado fue el índice de Simpson (figura 9.25B). El comportamiento de este índice es inverso al del índice de Shannon, obteniendo en el muestreo B la mayor diversidad. Es sabido que el índice de Shannon se correlaciona con la riqueza de especies y la igualdad, dando más peso a las especies individuales que a las comunes, siendo sensible al tamaño de la muestra (Magurran, 2004). Sin embargo, según Silva *et al.* (2010) en el índice de Simpson tienen un gran peso las especies más abundantes de la muestra, mientras que es menos sensible a la riqueza de especies. El índice de Shannon se encuentra entre 2,5 y 3,5 (figura 9.25A). Magurran (2004) describió que el valor

del índice de Shannon obtenido para datos empíricos generalmente está entre 1,5 y 3,5 y que raramente sobrepasa el 4.

También se estudió el índice de Chao (figura 9.24) que dio información de la biodiversidad del reactor. Se observa como en todos los muestreos la riqueza observada es menor que la estimada. Los datos combinados de los análisis de riqueza nos permiten concluir que la diversidad observada en todas las librerías a nivel de orden está infraestimada respecto a la diversidad bacteriana total que se encuentra en el ambiente.

En la figura 9.26 se observó la existencia de diferencias significativas cuando se comparaban los muestreos A, B y C con los muestreos D y E. Esto posiblemente se debió a un cambio en las condiciones del reactor ya que en estos dos muestreos el reactor funcionó sin la membrana y la alimentación se hacía tres veces a la semana, en vez de realizarse de forma continua como en los otros 3 muestreos, de manera que el fango del reactor tenía que degradar hidrocarburos más sencillos en vez de estar sometido a una presión selectiva de forma constante. Otro aspecto que pudo afectar es que para retirar el permeado se utilizó un aspirador, intentando no aspirar el fango, pero quizás pudo perderse una mínima parte del mismo que afectó a la diversidad. Las presiones selectivas realizadas por la separación de la membrana afectan a la estructura de la comunidad y a la diversidad de los reactores (Wan *et al.*, 2010). El impacto de la adición de sustratos de carbono listos para su biodegradación por los grupos funcionales microbianos puede suponer el paso a una comunidad microbiana con menos diversidad (Hagman *et al.*, 2008).

Como se puede observar en las figura 9.12, 9.14, 9.16, 9.18 y 9.20 parece que en la comunidad biológica del reactor (tanto en organismos cultivables como en no cultivables) las clases más comunes fueron α -*proteobacteria*, β -*proteobacteria* y γ -*proteobacteria*. Según estudios realizados en R. B. M. (Wagner y Loy, 2002; Wang *et al.*, 2011) unos de los OTUs más comunes en estos sistemas es *Proteobacteria*, corroborando los datos de la literatura que establecen la predominancia de este grupo en muestras de fango residual y aguas residuales de tratamientos industriales (Juretschko *et al.*, 2002, Kraigher *et al.*, 2008). Las β -*proteobacteria* han sido identificadas comúnmente como la principal subpoblación del agua residual en los biorreactores (Snaird *et al.*, 1997). Muchos de los organismos que pertenecen a las *Proteobacterias* no están clasificados dentro de ningún orden (tablas 9.2, 9.3, 9.4, 9.5 y 9.6). Huang *et al.* (2008) ha demostrado mediante una clonación de la librería del 16S rRNA que nuevos miembros del dominio *Bacteria* son ecológicamente importantes a escala de laboratorio en los R. B. M. s que trabajan con agua residual urbana bajo diferentes condiciones.

Además, en las distintas librerías encontramos los órdenes *Hydrogenophilales* (muestreo C) y *Rhodocyclales* (todos los muestreos), dentro de los *Hydrogenophilales* se encuentra el género *Thiobacillus* (muestreo C). Este género ha sido descrito en otros estudios sobre diversidad de tratamientos de agua residual (Manefield *et al.*, 2002; Bodour *et al.*, 2003; Sipma *et al.*, 2004; Shinoga *et al.*, 2005; Silva *et al.*, in press.). El género *Thiobacillus* es capaz de oxidar compuestos orgánicos e inorgánicos de azufre y ha sido comúnmente

encontrado en aguas residuales de tratamiento de refinados del petróleo (como hidrógeno, sulfuro, tiosulfuro, metanotiol, etanotiol, etcétera) a sulfatos (Cho *et al.*, 1991; Sipma *et al.*, 2004). Las cepas de *Thiobacillus* también han sido relacionadas con la degradación de PAHs (Silva *et al.*, 2010).

Un hecho que resulta llamativo es la abundancia del género *Ferruginibacter* en los muestreos D y E. Sin embargo, en ninguna de las muestras aparecen las especies *Clavibacter michiganensis* ni *Methylobacterium mesophilicum*, que sí aparecieron de forma dominante en los estudios de Baecker *et al.* (1989), Van der Gast *et al.* (2002) y Van der Gast *et al.* (2003) y que según estos autores juegan un papel importante en la biodegradación de las taladrinas sintéticas.

Ninguna de las bacterias predominantes en el reactor pertenecen estrictamente a grupos patógenos. Pero sí se encontraron géneros con patógenos oportunistas como los *Acinetobacter* y *Pseudomonas*.

En este estudio se ha visto que el fango activo aclimatado a las taladrinas presenta un bajo número de secuencias diferentes (figuras 9.13, 9.15, 9.17, 9.19 y 9.21) por lo que se puede decir que existe una baja diversidad a diferencia de otros ecosistemas como el suelo donde en una muestra de suelo forestal se estima que existen 4.000 genomas bacterianos diferentes (Torsvik *et al.*, 1990) o, superior, de entre 8000 y 10000 genomas diferentes según el mismo autor (1998). Esta baja diversidad en el conjunto del reactor se debe a la gran selección ejercida por el sustrato (Baker *et al.*, 1983; Baecker *et al.*, 1989; Mattsby-Baltzer *et al.*, 1989; Van der Gast *et al.*, 2001), además, la organización de la comunidad bacteriana cambia a lo largo del tiempo. Sólo un pequeño grupo de especies bacterianas fue numéricamente dominante en el sistema de tratamiento de agua a escala piloto. Otros estudios han demostrado que la dinámica de las poblaciones bacterianas puede mantener estable el rendimiento del sistema de tratamiento del reactor (Fernandez *et al.*, 1999; Stamper *et al.*, 2003). Actualmente existe una extensa información sobre la diversidad microbiana de un amplio rango de ambientes. La mayoría del conocimiento se refiere a la diversidad genética y taxonómica, pero para entender el papel (función y actividad) de la comunidad microbiana en muchos ambientes es esencial tener un conocimiento de la actividad de la comunidad microbiana y de la diversidad funcional. En este sentido, los perfiles fisiológicos a nivel de la comunidad (CLPP) han sido ampliamente determinados utilizando los sistemas Biolog[®], que aportan un conocimiento de las habilidades catabólicas de los microorganismos para utilizar las distintas fuentes de nutrientes presentes en las placas (Garland y Mills, 1991; Grayston y Campbell, 1996; Baudoin *et al.*, 2001; García-Villaraco *et al.*, 2009). Este complejo set de datos ha sido una herramienta relevante para discriminar entre comunidades microbianas basándose en sus habilidades catabólicas. Su uso ha sido satisfactorio en numerosas situaciones ambientales, como en el estudio del efecto de las plantas modificadas genéticamente (Siciliano *et al.*, 1998; Griffiths *et al.*, 1999; Heuer y Smalla, 1999; Lottmann y Berg, 2001; Liu *et al.*, 2005; García-Villaraco *et al.*, 2009).

Las placas utilizadas en este estudio (Gram-negativa, Gram-positiva y Anaerobias) constan de 96 pocillos con 95 fuentes de carbono liofilizadas distintas. También contienen un indicador del consumo de dicha fuente (sales de tetrazolio) que viran a violeta en medio reductor (más color cuanto más consumo del sustrato se produzca). La utilización de sustratos en estas placas se valora colorimétricamente (Classen *et al.*, 2003) con el paso del tiempo se ha incrementado el conocimiento de los ensayos Biolog[®], demostrando la reproducibilidad de estos perfiles y sosteniendo la teoría de que cambios en las pautas de la diversidad metabólica de Biolog[®] están relacionados con cambios en la composición de la comunidad (Schutter y Dick, 2001; Crecchio *et al.*, 2004). Las técnicas de Biolog[®] proporcionan un rápido y conveniente ensayo de los organismos heterotróficos cultivables, como se ha visto en otros estudios que ha encontrado en estos análisis un indicador sensible para los cambios en la diversidad funcional de los microorganismos del suelo (Grayston *et al.*, 1998, 2001; Rogers y Tate, 2001).

En el apartado 9.4 se muestran los resultados del estudio de las placas Biolog[®]. Si bien las placas utilizadas fueron diseñadas con el objetivo de estudiar perfiles metabólicos de cepas individuales, son utilizadas habitualmente también para estudiar los perfiles metabólicos de comunidades microbianas (Heuer y Smalla, 1997; Di Giovanni *et al.*, 1999; Ara-Rojas y Massol-Deyá, 2007). Este método ha sido empleado con éxito para determinar la diversidad metabólica o funcional de las comunidades microbianas en lugares contaminados (Derry *et al.*, 1998), rizosferas de plantas (Ellis *et al.*, 1995; Garland, 1996; Grayston y Campbell, 1996; Grayston *et al.*, 1998), suelos árticos (Derry *et al.*, 1999), suelos tratados con herbicidas (el Fantroussi *et al.*, 1999) o inoculación de microorganismos (Bej *et al.*, 1991).

Los análisis de correspondencias (CA) realizados (figuras 9.31, 9.35 y 9.39) indican que el muestreo A es claramente diferente al resto de los muestreos. Se debe tener en cuenta que en este primer muestreo el fango del reactor llevaba poco tiempo en contacto con taladrinas al 100%, de manera que posiblemente todavía no se ha aclimatado completamente a los compuestos que la componen. Por otra parte, en los CA realizados en las placas Gram-negativas y Gram-positivas (figuras 9.31 y 9.35) se aprecia una agrupación de los otros 4 muestreos, dos a dos, de manera que por una parte se encuentran los muestreos B y C y por otra los muestreos D y E. Como ya se ha comentado, esta diferencia posiblemente se debe a que en los muestreos D y E el reactor funcionó sin membrana.

En el estudio de la diversidad funcional de las placas Gram-negativa y Anaerobia (figuras 9.29 y 9.37) se observa como el muestreo A fue el que tuvo una diversidad metabólica significativamente más baja que el resto de los muestreos. En la placa Gram-positiva figura 9.33, se observa como esta diversidad es menor que en el resto de los muestreos, aunque no presenta diferencias significativas con los muestreos B y E. Algunos autores sugieren que cambios en la diversidad metabólica de Biolog[®] están relacionados con cambios en la composición de la comunidad (Schutter y Dick, 2001; Crecchio *et al.*, 2004). Parece que la presencia de las taladrinas en el reactor estimuló la capacidad de la comunidad microbiana del fango activo para degradar los distintos compuestos carbonados de las placas

Biolog[®], de manera que ésta se incrementa entre el primer y el tercer muestreo en las placas GN (figura 9.29) y AN (figura 9.37) o entre el primero y el cuarto muestreo en las placas GP (figura 9.33). Esta capacidad metabólica de las bacterias existentes en el fango activo parece estar relacionada con la capacidad de las mismas para reducir la DQO (figura 9.1), como ya se vio en otros estudios (Van der Gast *et al.*, 2004). Este autor en el año 2002 (Van der Gast *et al.*, 2002) también ha observado que la mayoría de los compuestos de las taladrinas fueron utilizados por las cepas aisladas de un R. B. M. Además, otros estudios han demostrado que la adición de sustancias contaminantes (retardantes o fertilizantes) suponen el aumento de la actividad microbiana (Dunn *et al.*, 1985; Adams y Attiwil, 1991; Lasanta *et al.*, 2002; García-Villaraco Velasco *et al.*, 2009b). Lasanta *et al.* (2002) han demostrado que la adición de retardantes al suelo no produce cambios en la biomasa microbiana pero incrementa la actividad enzimática, sugiriendo una estimulación más que un efecto tóxico en la producción de la comunidad microbiana. Dunn *et al.*, (1985) y Adams y Attiwil (1991) señalaron que la adición de fertilizantes aumenta la biomasa y la actividad microbiana.

El análisis Biolog[®] también reveló que los carbohidratos, los compuestos aromáticos y los polímeros son las fuentes de carbono más consumidas por los organismos anaerobios (figura 9.38). Sin embargo, en las placas Biolog[®] GP (figura 9.34) y GN (figura 9.30) estos compuestos son los menos consumidos (salvo los carbohidratos en las placas GN), siendo preferidos los aminoácidos. Se sabe que los aminoácidos pueden ser una significativa fuente de nitrógeno (Jones *et al.*, 2004); esto es muy importante porque el N es uno de los factores limitantes a nivel de las taladrinas, compuestas principalmente por hidrocarburos y por lo tanto con una relación C/N muy alta, que es probable que suponga una baja disponibilidad de N en las taladrinas lo que haga que las rutas metabólicas relacionadas con la obtención de N estén fuertemente activadas, reflejándose posteriormente en la alta utilización de aminoácidos observada en las placas Biolog[®].

Estos resultados demuestran que el Biolog[®] es un ensayo rápido y eficaz en el estudio de las actividades de organismos heterotróficos cultivables, lo que coincide con otros estudios que muestran que los análisis de Biolog[®] son unos indicadores sensibles de cambios en la diversidad funcional debido a diferentes perturbaciones y bajo estrategias de manejo diferentes (Crecchio *et al.*, 2004; Graham y Haynes, 2005; Grayston y Prescott, 2005; White *et al.*, 2005; Garcia-Villaraco *et al.*, 2009a y b).

El bioaumentación con microorganismos que tengan las vías catabólicas deseables puede ser efectivo en el procesamiento biológico de los contaminantes. Se ha visto que es efectivo en el tratamiento de agua cuando la actividad de degradación indígena es lenta o incluso no existe (Stevens, 1989; Stephenson y Stephenson, 1992; Briglia *et al.*, 1994). La evidencia sugiere que los inóculos mixtos pueden ser mejores para el tratamiento de las taladrinas. El bioaumentación en diferentes hábitats (agua contaminada, agua subterránea, suelo o arcilla) con cultivos puros ha sido poco efectivo (Goldstein *et al.*, 1985; Bouchez *et al.*, 2000)

Para realizar los experimentos con bioaumentación se seleccionaron al azar 4 cepas procedentes del muestreo A. Cuando se realizó la secuenciación de las cepas, éstas se

afiliaron taxonómicamente con: *Pseudomonas sp.* (RBM-A11), *Acinetobacter johnsonii* (RBM-A12 y RBM-A16) y *Sphingobium xenophagum* (RBM-A23). Cepas de algunos de estos géneros han sido utilizadas en diversos experimentos de bioaumentación, por ejemplo, Stallwood *et al.* (2005) utilizó la cepa *Pseudomonas sp.* para tratar gasoil marino, Dams *et al.* (2007) utilizó la cepa *Sphingobium chlorophenolicum* para retirar pentaclorofenol del suelo y Ruberto *et al.* (2003) utilizó la cepa *Acinetobacter johnsonii* o *Acinetobacter sp.* para descontaminar suelos que tenían hidrocarburos.

En los tres experimentos realizados se observó que cuando se bioaumentaba el sistema de fitorremediación la reducción de la DQO era mayor que cuando no se inoculaba (figuras 9.40, 9.43 y 9.47). Esta mejora de la biorremediación también fue observada por Van der Gast *et al.* (2004) quienes obtuvieron una reducción de la DQO por el consorcio aproximadamente del 85%, un 30 – 40% más efectivo que la comunidad indígena aislada y que los reactores que contienen poblaciones indefinidas del fango activo. Existen numerosas evidencias de la utilidad del bioaumentación (Ruberto *et al.*, 2003; Dams *et al.*, 2007).

Parece que el proceso de bioaumentación aportó mejores resultados cuando sólo se inoculó una vez (apartados 9.5.1 y 9.6.1.1), de manera que en estos experimentos la reducción de la DQO ejercida por el sistema biorremediador con inóculo fue significativamente mayor que la producida por el sistema sin inocular. Sin embargo, en el experimento donde se realizaron dos inoculaciones (figura 9.47 y apartado 9.6.2.1) la disminución de la DQO no presentó diferencias significativas entre los tratamientos con taladrina, aunque fue mayor en el tratamiento con consorcio. Singer *et al.* (2003) sugirió que las interacciones entre plantas, insectos y microorganismos generan indirectamente una amplia gama de enzimas catabólicas, muchas de las cuales son perfectamente utilizables en el metabolismo y detoxificación de compuestos xenobióticos.

La medida de la fluorescencia ha permitido incrementar el conocimiento de los procesos fotoquímicos y no fotoquímicos que ocurren en las membranas de los tilacoides de los cloroplastos (Govindjee, 1995; Krämer y Crofts, 1996; Lazár, 1999; Maxwell y Johnson, 2000). Es sabido que el sistema de transporte electrónico del fotosistema II es uno de los más sensibles indicadores de daño en el aparato fotosintético (Krause y Weis, 1991).

Los resultados de los parámetros fotosintéticos tienen un comportamiento similar independientemente del número de inoculaciones realizadas. Parece que la inoculación del consorcio daña los fotosistemas de las plantas, de manera que la fluorescencia emitida en condiciones de luz suave por plantas que provienen de la oscuridad (F_0) disminuye de forma no significativa cuando se inocula el consorcio en los tratamientos de maíz inoculados en presencia de agua de taladrina (figura 9.46A y 9.54A). Sin embargo, se observa un incremento significativo en las plantas de maíz que se inocularon dos veces y crecieron en presencia de agua del grifo (figura 9.54A), aunque en los experimentos realizados con una sola inoculación (figura 9.42A y 9.46A) se observa una disminución de este parámetro, siendo significativo en las *Lemnas*.

Por otra parte, los valores del parámetro eficiencia potencial máxima del fotosistema II (Fv/Fm) en el experimento con *Lemna minor* se reducen significativamente cuando se inocula el consorcio en los tratamientos con agua de taladrina (figura 9.42a). Esto también se observó en otros trabajos en los que sometían a las plantas a distintos contaminantes ambientales, como en Kummerová *et al.* (2006) donde trataron plantas de guisante con fluoranteno o en Marwood *et al.* (2003) quienes trataron las plantas de *Myriophyllum spicatum* con creosota.

En el maíz inoculado sólo una vez el parámetro Fv/Fm aumenta significativamente (figura 9.46C) y cuando se realizan dos inoculaciones se observa un incremento aunque éste no es significativo (figura 9.54B). Como se vio en el análisis de bioluminiscencia (tabla 6.6), parece que el agua de taladrina fitorremediada con el consorcio presenta una mayor toxicidad, lo que puede producir un mayor daño en los fotosistemas. La inhibición de los procesos fotosintéticos es generalmente una consecuencia de los efectos tóxicos de numerosas sustancias nocivas. Se sabe que los cloroplastos son afectados primeramente por los factores de estrés abiótico (Alscher *et al.*, 1998). Parece que en el tratamiento con agua de taladrina y consorcio las plantas están más estresadas, lo que conlleva una mayor producción de pigmentos como los carotenoides (tablas 9.7 y 9.8).

Sin embargo, parece que la doble inoculación del consorcio mejora ligeramente la reacción de Hill en los tratamientos con taladrina (figura 9.55). El fotosistema II es esencial para la regulación de la fotosíntesis porque cataliza la oxidación del agua en oxígeno (complejo de la evolución del oxígeno – reacción de Hill) y aporta los electrones de transporte (Geiken *et al.*, 1998). Es sabido que las unidades y los procesos de transporte electrónico pueden estar distorsionados por un hinchamiento y gran desorganización de la arquitectura de los tilacoides. Estas evidencias en el estado de la estructura de la hoja pueden afectar también a parámetros de fluorescencia primarios, incluso cuando el ratio Fv/Fm no muestra cambios o estos son pequeños (Araus y Hogan, 1994).

Las tablas 9.7 y 9.8 y la figura 9.56A muestran una reducción significativa del contenido de las clorofilas totales en los tratamientos con taladrina. Se observó un decrecimiento en la clorofila a y b al igual que en los trabajos de Bromilow y Chamberlain (1995), Huang *et al.* (1996) y Kummerová *et al.* (2001). Como establecieron Huang *et al.* (1997) y Mallakin *et al.* (2002) la disminución en el contenido de la clorofila es indicadora de muchos estreses bióticos.

En dichas tablas se observó que en los tratamientos con agua de taladrina también disminuían los pigmentos neoxantina, β -caroteno y feofitina A y aumentaban el total de tocoferol, la relación entre la luteína epóxido y las clorofilas y el total de carotenoides. Según Kummerová *et al.* (2001), los cambios en el contenido de los pigmentos fotosintéticos pueden estar relacionados con las afecciones producidas por la extracción, distribución y utilización de los nutrientes debidos a los daños en las raíces. En la figura 6.62 se observó que las taladrinas producían daños en las raíces, concretamente en las células del parénquima. Además, se sabe que el fenol (uno de los compuestos presentes en el agua de taladrina de la muestra inicial, como puede observarse en la tabla 9.9) se acumula preferentemente en las

raíces (Cataldo *et al.*, 1987) y posiblemente existan más compuestos que se acumulen en dichas células.

En la tabla 9.8 se observa un incremento del contenido en zeaxantina y en anteraxantina, mientras que disminuye el contenido de la violaxantina. Esto posiblemente se deba a un efecto en la protección de la disipación de la energía del exceso de la excitación. Es sabido que para contrarrestar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), los cloroplastos poseen una alta eficiencia en el sistema de defensa fotoprotectivo. Este proceso depende de la presencia de zeaxantina, que se forma por epoxidación de la violaxantina producida por la inducción de la luz utilizando la anteraxantina como intermediario, en el llamado ciclo de la violaxantina o ciclo de las xantofilas (Demmig-Adams y Adams, 1992 a y b). Las hojas son capaces de modular su contenido en VAZ durante los 5-6 días después de transferirlas a condiciones de estrés; ésto se ha visto en respuesta al frío (Venema *et al.*, 1999; Koroleva *et al.*, 2000) o a tratamientos con drogas (Demmig *et al.*, 1988). La fuerte modulación del contenido de las VAZ por el ambiente ha sido probada bajo un amplio margen de condiciones (Demmig-Adams *et al.*, 1989; Demmig-Adams, 1990) mostrando que cuando las plantas que crecían en la sombra eran trasladadas a la luz se acumulaba más zeaxantina que pudo ser formada por la violaxantina y la anteraxantina antes de la transferencia, resultando en incrementos del contenido de los pigmentos VAZ.

En las tablas 9.7 y 9.8 se observa una disminución en el contenido de los β -carotenos. Esto puede deberse a que los compuestos existentes en las taladrinas actúan como inhibidores de la síntesis de este pigmento. Además, el incremento observado en *Lemna minor* puede deberse, como describieron Demmig *et al.* (1988) y Schindler y Lichtenthaler (1996) a que bajo condiciones de estrés se produce la hidroxilación de este pigmento para formar la zeaxantina, observándose un incremento de este último en plantas inoculadas con consorcio que crecieron en presencia de agua de taladrina, lo que pudo resultar en el incremento del ciclo VAZ.

Al igual que se ha visto en el capítulo 9, la explotación de los microorganismos en un bioreactor es una gran promesa en el tratamiento químico de aguas mixtas como las taladrinas (Van der Gast *et al.*, 2004). El problema de este sistema es que tiene un coste excesivo, en primer lugar porque las grasas de las taladrinas producen la rotura de la membrana, cuyo coste económico de reemplazo es muy elevado, y además requieren mano de obra continua para realizar las medidas de seguimiento del reactor y la limpieza del mismo. Otro problema que incrementa el coste de los reactores es que cualquier modificación en el agua de alimentación o en la aireación supone la pérdida de los microorganismos del reactor y requeriría comenzar de nuevo la aclimatación del nuevo fango. Se está incrementando el interés de aplicar un proceso híbrido, donde los residuos de las taladrinas primero se ultrafiltren para retirar el volumen de carga de DQO y luego pasen a bioreactores donde se retiren los residuos que queden. Esto permitiría disminuir las grasas de las taladrinas y con ello reducir la rotura de la membrana.

11. CONCLUSIONES

1. De todas las cepas bacterianas aisladas de las taladrinas y de suelos contaminados con hidrocarburos, sólo las que estuvieron previamente en contacto con taladrinas fueron capaces de sobrevivir en este medio y de incrementar sus contingentes poblacionales.

2. De todas las especies vegetales ensayadas, el maíz creciendo en cultivo hidropónico con esparto como soporte presentó la mayor capacidad para fitorremediar el agua de taladrina. Además, esta especie fue la que mejor soportó los medios contaminados con taladrinas, tanto en fase de germinación como de crecimiento.

3. El esparto resultó ser el soporte de crecimiento vegetal que más favoreció el enraizamiento de las plantas. El sistema maíz-esparto fue el más eficaz en el proceso de fitorremediación, consiguiendo reducciones del parámetro de la demanda química de oxígeno en torno a un 60% partiendo de niveles próximos a las 2.000 ppm. Estas reducciones permiten obtener un residuo con estándares de contaminación por debajo de los límites establecidos por la Ley 10/1993 de la Comunidad de Madrid.

4. Sólo el sistema de bioaumentación desarrollado con un consorcio bacteriano formado por cepas adaptadas a medios contaminados con taladrinas fue capaz de mejorar la fitorremediación ejercida por el sistema maíz-esparto.

5. Los ensayos de biotoxicidad realizados con la cianobacteria *Anabaena* CPB4337 y con plantas de maíz indicaron que los procesos de fitorremediación desarrollados disminuían la toxicidad del agua de taladrina.

6. Los parámetros fotosintéticos estudiados (fluorescencia y reacción de Hill) se pueden considerar buenos indicadores de biotoxicidad de los contaminantes presentes en el agua de taladrina, observándose una relación entre la eficacia de la fitorremediación y la salud del aparato fotosintético de las plantas.

7. El estudio ultraestructural de la parte aérea de las plantas de maíz muestra como el agua de taladrina produce una aparente reducción del número de cloroplastos y una fuerte alteración morfológica de los mismos. Ésto explica la disminución del parámetro fotosintético que determina la emisión de fluorescencia en condiciones de luz suave (F_0).

8. El estudio ultraestructural de la zona radical de las plantas de maíz parece indicar que el agua de taladrina no produce una alteración de los haces vasculares, lo que podría permitir la translocación de productos tóxicos a la zona aérea.

9. El sistema de fitorremediación realizado en fases disminuyó el daño causado por el agua de taladrina en las plantas de maíz, lo que permitió realizar una segunda fase de fitorremediación mejorando el rendimiento del proceso. Se observó también que la reducción de la DQO ejercida por este sistema fue mayor que la obtenida por el sistema en continuo.

10. El estudio metagenómico de la estructura de la comunidad microbiana del biorreactor demostró la importancia del grupo de microorganismos no cultivables para el conocimiento del reactor biológico de membrana.

11. Las bacterias no cultivables predominantes en todos los muestreos realizados pertenecen al *Phyllum Proteobacteria* y dentro de éste a la clase β -*Proteobacteria*. La composición estructural microbiana del biorreactor depende de las condiciones de funcionamiento del mismo.

12. El estudio con placas Biolog[®] ha mostrado una clara sucesión metabólica durante el funcionamiento del biorreactor, observándose en todos los casos la mayor diversidad metabólica en el tercer muestreo.

12. BIBLIOGRAFÍA

Adam, G. y Duncan, H. 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environ Pollut.* 120:363-370.

Adam, G.; Gamon, K.; Morris, D. G. y Duncan, H. 2002. Effect of alcohol on the movement of petroleum hydrocarbon fuels in soil. *J Sci Total Environ* 286(1-3):15-25.

Adams, M. A. y Attiwill, P. M. 1991. Nutrient balance in forests of Northern Tasmania 2. Alteration of nutrient availability and soil-water chemistry as a result of logging, slash-burning and fertilizer application. *Forest Ecol Management.* 44:115-132.

Ahmed, Z.; Lim, B. R.; Cho, J.; Song, K. G.; Kim, K. P. y Ahn, K. H. 2008. Biological nitrogen and phosphorus removal and changes in microbial community structure in a membrane bioreactor: Effect of different carbon sources. *Water Res.* 42:198–210.

Alexander, M. 1994. Biodegradation and bioremediation. Academic Press, San Diego. 302 pp.

Alexander, M. 1999. Biodegradation and Bioremediation 2nd ed. Academic Press, London.

Alexander, S. K.; Schropp, S. J. y Schwarz, J. R. 1982. Spatial and seasonal distribution of hydrocarbon-utilizing bacteria of sediment from the northwestern Gulf of Mexico. *Contrib Mar Sci.* 25:13-19.

Allen, M. B. y Arnon, D. I. 1955. Studies on nitrogen-fixing blue green algae. I Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. *Plant Physiol.* 30(4):366-372.

Alscher, R. G.; Donahue, J. L. y Cramer, C.L. 1998. Molecular responses to reactive oxygen species: multifaceted changes in gene expression. In: De Kok, L.J., Stulen, I. (Eds.), *Responses of Plant Metabolism to Air Pollution and Global Change.* Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 233–240.

Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. y Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402.

Alvarado, S.; Guedez, M.; Lue-Meru, M. P.; Nelson, G.; Anzalone, A.; Arroyo C., Jesús y Gyula, Z. 2008. Arsenic removal from waters by bioremediation with the aquatic plants Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and Lesser Duckweed (*Lemna minor*). *Bioresour Technol.* 99(17):8436-8440.

Amakiri, J. O. y Onofeghara, F. A. 1983. Effect of crud oil pollution on the germination of *Zea mays*, *Abelmoschus esculentus* and *Capsicum frutescens*. *J Environ Pollut* 35:159-167.

Amann, R. ; Lemmer, H. y Wagner, M. 1998. Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques. *FEMS Microbiol Ecol* 25:205-215.

Anderson, T. A.; Guthrie, E. A. y Walton, B. T. 1993 a. Bioremediation. *Environ Sci Technol.* 27:2630-2636.

Anderson, T. A.; Guthrie, E. A. y Walton, B.T. 1993 b. Bioremediation in the Rhizosphere. *Environmental Science & Technology* 27: 2630-2636.

Andreote, F. D.; Araújo, W L.; Azevedo, J. L.; Van Elsas, J. D. y Van Overbeek, L. 2009. Endophytic colonization of potato (*Solanum tuberosum* L.) by a novel competent bacterial endophyte, *Pseudomonas putida* strain P9, and the effect on associated bacterial communities. *Appl Environ Microbiol.* doi:10.1128/AEM.00491-09.

Angelova, V. y Ivanov, K. 2009. Bio-accumulation and distribution of heavy metals in black mustard (*Brassica nigra* Koch). *Environ Monit Assess.* 153(1-4): 449-459.

Aprill, W. y Sims, R. C. 1990. Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere.* 20:253-265.

Ara-rojas, S. L. y Massol-deyá, A. 2007. Diversidad bacteriana en un biorreactor de lecho fluidificado durante el tratamiento de agua contaminada con nafta. *Revista Argentina de Microbiología* 39:243-251.

Araus, J. y Hogan, K. 1994. Comparative leaf structure and patterns of photoinhibition of the neotropical palms *Scheelea zonensis* and *Socratea durissima* growing in clearings and forest understory during the dry season in Panama. *Am. J. Bot.*, 81:726-738.

Arshad, M. y Frankenberger, W. T. 1998. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions. *Advances in Agronomy.* 62:45-151.

Atlas, R. M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbiol Rev.* 45:180-209.

Baecker, A. A. W.; Le Roux, K. y von Holy, A. 1989. Microbiological contaminants of metal-working fluids in service. *S Afr J Sci* 85: 293– 295.

Baev, P. V. y Penev, L. D. 1995. BIODIV: program for calculating biological diversity parameters, similarity, niche overlap, and cluster analysis. Versión 5.1. Pensoft, Sofia-Moscow, 57 pp.

Baker, A. J. M. y Brooks, R. R. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements — a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery.* 1:81-126.

Baker, A. J. M.; McGrath, S. P.; Reeves, R. D. y Smith, J. A. C. 2000. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry N, Baelos G, editors. *Phytoremediation of contaminated soil and water.* Boca Raton, FL: Lewis Publishers; p. 85-107.

Baker, C. A.; Claus, G. W. y Taylor, P.A. 1983. Predominant bacteria in an activated sludge reactor for the degradation of cutting fluids. *Appl Environ Microbiol.* 46:1214-1223.

Baker, N. R. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu Rev Plant Biol.* 59:89-113.

Bakken, L. R., y Olsen, R. A. 1987. The relationship between cell size and viability of soil bacteria. *Microbial Ecol* 13:103-114.

Balba, M. T. 1993. Microorganisms and detoxification of industrial waste. En: Gareth Jones, D. (Ed.), *Exploitation of Microorganisms*, Chapman and Hall, London, pp. 411-409.

Balba, M. T.; Al-Awadhi, N. y Al-Daher, R. 1998. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *J Microbiol Methods*. 32:155-164.

Banks, M. K.; Lee, E. y Schwab, A. P. 1999. Evaluation of dissipation mechanisms for enzo[a]pyrene in the rhizosphere of tall fescue. *J Environ Qual*. 28(1):294-298.

Banks, M. K.; Govindaraju, R. S.; Schwab, A. P.; Kulakow, P. y Finn, J. 2000. Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soil. Lewis Publ., Baton Rouge, LA.

Bao, Q., Lu, C.Y., Song, H., Wang, M., Ling, W., Chen, W. Q., Deng, X. Q., Hao, Y. T. y Rao, S. 2009. Behavioural development of school-aged children who live around a multi-metal sulphide mine in Guangdong province, China: a cross-sectional study. *BMC Public Health*. Volumen 9. No artículo: 217.

Barber, J. y Andersson, B. 1992. Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem Sci*. 17:61-66.

Baroni, L.; Cenci, L.; Tettamanti, M. y Berati, M. 2007. Evaluating the environmental impact of various dietary patterns combined with different food production systems. *Eur J Clin Nutr*. 61:279-286.

Barreiro, R., Quintela, M. y Ruiz, J. M. 2004. TBT e imposex en Galicia: los efectos de un disruptor endocrino en poblaciones de gasterópodos marinos. *Ecosistemas* 13(3):13-29.

Barrionuevo, M.; Daniel, M. A.; Garavaglia, L., Méndez, N.; Sosa, G.; Candal, R.; Cerdeira, S.; Ceretti, H.; Ramírez, S.; Reciuschi, E.; Zalts, A. y Vullo, D. L. 2009. Tratamiento biológico de efluentes industriales con contenido en metales: factores a tener en cuenta para un diseño eficiente. *Metal loaded wastewater biotreatments: how to achieve a successful design*. *Química viva*. 8(2).

Bartha, R. 1986. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. *Microbiol Ecol*. 12:155-172.

Barton, A. 2000. Modelling chloroethene behaviour in groundwater in support of natural attenuation. Pages 89-86. En: *Natural Attenuation Considerations and Case Studies: Remediation of Chlorinated and recalcitrant Compounds*. G. B. Wickramanayake, A. R. Gavaskar, and M. E. Kelley, eds. Batelle Press, Columbus, OH, U.S.A.

Bashan, J. y Holguin, G. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPR (plant growth promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol Biochem*. 30(8/9):1225-1228.

Bashan, Y. y Levanony, H. 1990. Current status of *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can J Microbiol.* 36:591-608.

Baudoin, E.; Benizri, E. y Guckert, A. 2001. Metabolic fingerprint of microbial communities from distinct rhizosphere compartments. *Eur J Soil Biol.* 37:85-93.

Bazin, M. J.; Markham, P.; Scott, E. M. y Lynch, J. M. 1990. Population dynamics and rhizosphere interactions. En: *The rhizosphere.* (Lynch, J.M., ed.) Wiley – Interscience, Chichester. 32-64.

Beak, K. y Kim, H.S. 2009. Microbial Community Structure in Hexadecane- and Naphthalene-Enriched Gas Station Soil. *J Microbiol Biotechnol.* 19(7):651-657.

Beaulieu, M.; Becaert, V.; Deschenes, L. y Villemur, R. 2000. Evolution of bacterial diversity during enrichment of PCP-degrading activated soils. *Microbial Ecol.* 40:345-355.

Becher, M.; Talke, I. N.; Krall, L. y Krämer, U. 2004. Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant J.* 37:251-268.

Beck, D. P. 1991. Suitability of charcoal-amended mineral soil as carrier for *Rhizobium* inoculants. *Soil Biol Biochem.* 23:41-4.

Bej, A. K.; Perlin, M. y Atlas, R. M. 1991. Effect of introducing genetically engineered microorganisms on soil microbial community diversity. *FEMS Microbiol Ecol.* 86:169-176.

Benin, A. L.; Sargent, J. D.; Dalton, M.; Roda, S. 1999. High concentrations of heavy metals in neighbourhoods near one smelters in northern Mexico. *Environ Health Persp.* 107(4):279-284 (6 pages).

Bennett, E. O. 1972. The biology of metalworking fluids. *Lubr Eng.* 28:237-247.

Bennett, E. O. 1974. The deterioration of metal cutting fluids. *Prog Ind Microbiol.* 13:123-149.

Bento, F. M.; Camargo, F. A. O.; Okeke, B. C. y Frankenberger, W. T. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresour Technol.* 96:1049-55.

Berger, S.; Papadopoulos, M.; Schreiber, U.; Kaiser, W. y Roitsch, T. 2004. Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiol Plant.* 122:419-428.

Besalatpour, A.; Khoshgoftarmanesh, A. H.; Hajabbasi, M. A. y Afyuni, M. 2008. Germination and Growth of Selected Plants in a Petroleum Contaminated Calcareous Soil. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal.* 17(6):665-676.

Best, E. P. H.; Zappi, M. E.; Fredrickson, H. L.; Sprecher, S. L.; Larson, S. L. y Ochman, M. 1997. Screening of aquatic and wetland plant species for phytoremediation of

explosives – contaminated groundwater for the Iowa Army Ammunition Plant. *Ann New York Acad Sci.* 829:179-194.

Bhat, M. K. 2000. Research review paper: cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol Adv.* 18:355-383.

Bilger, W. y Björkman, O. 1990. Role of the xanthophyll cycle in protection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth Res.* 25:173-185.

Bio-Wise 2000. A Guide to Biological Treatment for Metalworking Fluids Disposal. Department of Trade and Industry. DTI/BW/25/2000/NP.

Bizily, S. P.; Rugh, C. L. y Meagher, R. B. 2000. Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants. *Nature Biotechnol.* 18:213-217.

Björkman, O. y Demmig, B. 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta.* 170:489-504.

Björkman, O. y Demmig-Adams, B. 1995. Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion and dissipation in leaves of higher plants. En: Schulze, E. D. Caldwell, M. M. (ed.): *Ecophysiology of photosynthesis*. Pp. 17-47. Springer-verlag, Berlin-Heidelberg.

Blackburn, J. W. y Hafker, W. R. 1993. The impact of biochemistry, bioavailability and bioactivity on the selection of bioremediation techniques. *Tibtech.* 11:328-333.

Blakebrough, N. 1978. Interactions of oil and microorganisms in soil. En: Chater, K.W., Somerville, J.H. (Eds.), *The Crude Oil Industry and Microbial Ecosystems*, Heydon and Son Ltd., London, pp. 28-40.

Bodour, A. A.; Wang, J. M.; Brusseau, M. L. y Maier, R. M. 2003. Temporal change in culturable phenanthrene degraders in response to long-term exposure to phenanthrene in a soil column system. *Environ Microbiol.* 5:888-895.

Boldt, T. S.; Soerensen, J.; Karlson, U.; Molin, S. y Ramos, C. 2004. Combined use of different Gfp reporters for monitoring single-cell activity of a genetically modified PCB degrader in the rhizosphere of Alfalfa. *FEMS Microbiol Ecol.* 48:139-48.

Bolton, H. J., Fredrickson, J. K. y Elliott, L. F. 1992. Microbial ecology of the rhizosphere. En: Metting, F.B.J. (Ed.) *Soil Microbial Ecology*, Marcel Dekker, New York, pp 27-63.

Bonfranceschi, B. A.; Flocco, C. G. y Donati, E. R. 2009. Study of the heavy metal phytoextraction capacity of two forage species growing in an hydroponic environment. *J Hazard Mater.* 165(1-3):366-371.

Bossert, I. y Bartha, R. 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. En: Atlas, R.M. (Ed.), *Petroleum Microbiology*, Macmillan, New York, pp. 435-473.

Bossert, I. y Bartha, R. 1985. Plant growth in soil with a history of oil sludge disposal. *J. Soil Sci.* 140:418-422.

Bouayed, J., Desor, F., Rammal, H., Kiemer, A. K., Tybl, E., Schroeder, H., Rychen, G. y Soulimani, R. 2009. Effects lactational exposure to benzo[alpha]pyrene (B[alpha]P) on postnatal neurodevelopment, neuronal receptor gene expression and behaviour in mice. *Toxicology.* 259(3):97- 106.

Bouchez, T.; Patureau, D.; Dabert, P.; Juretschko, S.; Dore, J.; Delgenes, P.; Moletta, R. y Wagner, M. 2000. Ecological study of bioaugmentation failure. *Environ Microbiol.* 2:179-190.

Bowen, G. D. y Rovira, A. D. 1991. The rhizosphere, the hidden half of the hidden half. En: Waisel, Y., Eshel, A. y Kafkafi, U. (Eds), *Plant roots-the hidden half*, Marcel Dekker, New York, pp. 641-649.

Braber, J. M. 1980. Catalase and peroxidase in primary bean leaves during development and senescence. *Z Pflanzenphysiol Bd.* 97s:135-144.

Bradbury, M. y Baker, N. R. 1986. The kinetics of photoinhibition of the photosynthetic apparatus in pea chloroplasts. *Plant Cell Environ.* 9:289-97.

Brady, S. F.; Choa, C. J.; Handelman, J. y Clardy, J. 2001. Cloning and heterologous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from eDNA. *Org. Lett.* 3:1981–1984.

Brady, S. F.; Chao, C. J. y Clardy, J. 2004. Long- chain N-acyltyrosine synthases from environmental DNA. *Appl Environ Microbiol* 70:6865-6870.

Branquinho, C.; Brown, D. H. y Catarino, F. 1997. The cellular location of Cu in lichens and its effects on membrane integrity and chlorophyll fluorescence. *Environ Exp Bot.* 38:165-179.

Brazil, G. M.; Kenefick, L.; Callanan, M.; Haro, A.; de Lorenzo, V.; Dowling, D. N. 1995. Construction of a rhizosphere pseudomonad with potential to degrade polychlorinated biphenyls and detection of bph gene expression in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol.* 61:1946-52.

Briggs, G. G.; Bromilow, R. H. y Evans, A. A. 1982. Relationship between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionized chemicals by barley. *Pestic Sci.* 13:495-504.

Briglia, M.; Nurmiaho-Lassila, E. L.; Vallini, G. y Salkinoja-Salonen, M. S. 1990. The survival of pentachlorophenol-degrading *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1 and *Flavobacterium sp.* in natural soil. *Biodegradation.* 1:273-81.

Briglia, M.; Middeldorp, P. J. M. y Salkinojassalonen, M. S. 1994. Mineralization performance of *Rhodococcus chlorophenolicus* strain PCP-1 in contaminated soil stimulating on site conditions. *Soil Biol Biochem.* 26:377-385.

Briones, A. y Raskin, L. 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. *Curr Opin Biotech.* 14:270-276.

Brodkorb, T. S. y Legge, R. L. 1992. Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil contaminated soils supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* 58:3117-3121.

Bromilow, R. H. y Chamberlain, K. 1995. Principles governing uptake and transport of chemicals. En: Trapp, S., McFarlane, J.C. (Eds.), *Plant Contamination: Modeling and Simulation of Organic Chemical Processes*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 37–69.

Brown, M. E. 1974. Seed and root bacterization. *Annu Rev Phytopathol.* 12:181-197.

Brunet, J.; Repellin, A.; Varrault, G.; Terryn, N. y Zuily-Fodil, Y. 2008. Lead accumulation in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.): a novel plant for phytoremediation systems? *C R Biologies.* 331:859–864.

Buée, M.; de Boer, W.; Martín, F.; van Overbeek, L. y Jurkevitch, E. 2009. The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant Soil.* 321:189–212.

Buffoni, M.; Testi, M. G.; Pesaresi, P.; Garlaschi, F. M. y Jennings, R. C. 1998. A study of the relation between CP29 phosphorylation, zeaxanthin content and fluorescent quenching parameters in *Zea mays* leaves. *Physiol Plant.* 102:318-324.

Burken, J. G. y Schnoor, J. L. 1996. Phytoremediation: plant uptake of atrazine and role of root exudates. *J Environ Eng.* 122:958-963.

Buttler, W. L. 1977. Chlorophyll fluorescence: a probe for electron transfer and energy transfer. En: *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. 5, Springer-Verlag, Berlin, pp. 149-167.

Campbell, R. y Greaves, M. P. 1990 Anatomy and community structure of the rhizosphere. En: *The rhizosphere*. (J.M. Lynch ed.). John Wiley and Sons Ltd, Essex. pp. 11-34.

Campos, V. M.; Merino, I.; Casado, R.; Pacios, L. F. y Gómez, L. 2008. Review. Phytoremediation of organic pollutants. *Span. J. Agric. Res.* 6(Special issue):38-47.

Caplan, J. A. 1993. The worldwide bioremediation industry: prospects for profit. *Tibtech* 11:320-323.

CAR/PL (Centro de Actividad Regional para la Producción Limpia). 2005. Manual sobre la Prevención de la contaminación en el subsector del mecanizado del metal.

Carpaena, R. O.; Peñalosa, J.; Esteban, E.; Gárate, A.; López, S.; Vázquez, S. y Zornoza, P. 2001. Effects of As and Cd on *Lupinus albus* L. potential use in phytoremediation. In *Phytoremediation of trace elements in contaminated soils and waters (with special emphasis on Zn, Cd, Pb and As)*. Pp 55–57 Cost Action 837 WG2 Workshop.

- Carson, R.** 1962. Silent Spring. Hamish Hamilton. Londres.
- Cassidy, M. B.; Lee, H. y Trevors, J. T.** 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *J Ind Microbiol.* 16:79-101.
- Castaldini, M.; Turrini, A.; Sbrana, C.; Benedetti, A.; Marchionni, M.; Mocali, S.; Fabiani, A.; Landi, S.; Santomassimo, F.; Pietrangeli, B.; Nuti, M. P.; Miclaus, N. y Giovannetti, M.** 2005. Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms. *Appl Environ Microbiol.* 71:6719-6729.
- Castrillón, L.** 2000. Residuos industriales y suelos contaminados. Universidad de Oviedo, servicio de publicaciones (Capítulo XIII). Gobierno del Principado de Asturias (Consejería de Medio Ambiente). Coordinador: Marañón, E.
- Cataldo, D. A.; Bean, R. M. y Fellows, R. J.** 1987. Uptake and fate of phenol, aniline and quinoline in terrestrial plants. En: Gray RH, Chess EK, Mellinger PJ, Riley RG, Springer DL, editors. Hanford Life Sci. Symp. Health Environ. Res. Complex Organic Mixtures, vol. 24, Richland, WA: Pacific Northwest Lab. pp. 631-40.
- Centro Canario del Agua.** 2003. Introducción a los Biorreactores de membranas. Canarias. [<http://www.fcca.es/Docs/introMBR.pdf>. Diciembre 2004].
- Cerniglia, C. E.** 1984. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv Appl Microbiol.* 30:31-37.
- Cerniglia, C. E. y Heitkamp, M. A.** 1987. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the aquatic environment. Pages 41-68. En: *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the aquatic environment.* U. Varanasi, ed. CRC Press, Inc., Boca Ratón, FL, U. S. A.
- Cerniglia, C. E.** 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol.* 4:331-338.
- Chandra, R.; Yadav, S.; Bharagava, R. N. y Murthy, R. C.** 2008. Bacterial pretreatment enhances removal of heavy metals during treatment of post-methanated distillery effluent by *Typha angustata* L. *J Environ Manage.* 88(4):1016-1024.
- Chang, C. H.; Tanong, K.; Xu, J. y Shon, H.** 2011. Microbial community analysis of an aerobic nitrifying-denitrifying MBR treating ABS resin wastewater. *Bioresour Technol* 102:5337-5344.
- Chang, Y. y Corapcioglu, M. Y.** 1998. Plant-enhanced subsurface bioremediation of non-volatile hydrocarbons. *J Environ Eng.* 112:162-169.
- Chanwya, C. P.; Holl, F. B. y Turkington, R.** 1988. Genotypic coadaptation in plant growth promotion of forage species by *Bacillus polymyxa*. *Plant Soil* 106:281-28.
- Chao, A.** 1984. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Stat.* 11:783-791.

Chapple, C. 1998. Molecular genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Plant Mol Biol.* 49:311-43.

Chauneau, C. H.; Morel, J. L. y Oudot, J. 1997 Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *J Environment Qual.* 26:1478-1483.

Cheema, S. A.; Khan, M. I. M.; Tang, X.; Zhang, C.; Shen, C.; Malik, Z.; Ali, S.; Yang, J.; Shen, K.; Chen, X.; Chen, Y. 2009. Enhancement of phenanthrene and pyrene degradation in rhizosphere of tall fescue (*Festuca arundinacea*). *J Hazard Mater.* 166:1226-1231.

Chen, S. H. y Aitken, M. D. 1999. Salicylate stimulates the degradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophilia* P15. *Environ Sci Technol.* 33:435-439.

Chen, Y. M.; Lin, T. F.; Huang, C.; Lin, J. C. y Hsieh, F. M. 2007. Degradation of phenol and TCE using suspended and chitosan-bead immobilized *Pseudomonas putida*. *J. Hazard Mater.* 148:660-70.

Cheng, C.; Phipps, D. y Alkhaddar, R. M. 2005. Review Treatment of spent metalworking fluids. *Water Research.* 39(17):4051-4063.

Cheng, S. P. 2003. Heavy metal pollution in China: Origin, pattern, and control. *Environ Sci Pollut Res.* 10(3):192-198 (7 pages).

Chiang, P.; Li, K. P. y Hseu, T. M. 1996. Spectrochemical behavior of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in biological systems. Part II: A theoretical rate model for BaP metabolism in living cells. *Appl Spectrosc.* 50:1352-1359.

Cho, K. S.; Hirai, M. y Shoda, M. 1991. Degradation characteristics of hydrogen sulfide, ethanethiol, dimethyl sulfide and dimethyl disulfide by *Thiobacillus thioparus* DW 44 isolated from peat biofilter. *J Ferment Bioeng.* 71:384-389.

Cho, Y. G.; Rhee, S. K. y Lee S. T. 2000. Effect of soil moisture on bioremediation of chlorophenol-contaminated soil. *Biotechnol Let.* 22:915-9.

Classen, A. T.; Boyle, S. I.; Haskins, K. E.; Overby, S. T. y Hart, S. C. 2003. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils. *FEMS Microbiol Ecol.* 44:319-328.

Clemens, S.; Palmaren, M. G. y Kramer, U. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plants Sci.* 7:309-315.

Cobbett, C. y Golfsbrough, P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol.* 53:159-182.

Colwell, R. E. y Walker, J. D. 1977. Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. *Crit Rev Microbiol.* 5:423-445.

Colwell, R. K. y Coddington, J. A. 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 345:101-118.

Conrath, U.; Pieterse, C. M. J. y Mauch-mani, B. 2002. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 7:210–216.

Cooney, J. J. y Summers, R. J. 1976. Hydrocarbon-using microorganisms in three fresh water ecosystems. En: Sharpley, J.M. et al. (Eds.), *Proceedings of the Third International Biodegradation Symposium, Applied Sciences, London*, pp. 141–156.

Cordes, K. B.; Mehra, A.; Farago, M. E. y Banerjee, D. K. 2000. Uptake of Cd, Cu, Ni and Zn by the water hyacinth, *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms from pulverized fuel ash (PFA) leachates and slurries. *Environ Geochem Health.* 22:297–316.

Cordova-Rosa, S. M.; Dams, R. I.; Corova-Rosa, E. V.; Radetski, M. R.; Correâ, A. X. R. y Radetski, C.M. 2009. Remediation of phenol-contaminated soil by a bacterial consortium and *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from an industrial wastewater treatment plant. *J Hazard Mater.* 164:61-6.

Crawford, R.L. y Mohn, W. W. 1985. Microbiological removal of pentachlorophenol from soil using *Flavobacterium*. *Enzyme Microbiol Technol.* 7:617-20.

Crecchio, C.; Gelsomino, A.; Ambrosoli, R.; Minati, J. L. y Ruggiero, P. 2004. Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices. *Soil Biol Biochem.* 36:1873-1883.

Cunningham, S. D. y Berti, W. R. 1993. Remediation of contaminated soils with green plants: an overview. *In Vitro Cell Dev Biol.* 29:207-212.

Cunningham, S. D.; Berti, W. R. y Huang, J. W. W. 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol.* 13:393-397.

Cunningham, S. D.; Anderson, T. A.; Schwab, A. P. y Hsu, F. C. 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Adv Agron.* 56:55-114.

Curl, E. A. y Truelove, B. 1986. The rhizosphere. *Advanced Series in Agricultural Sciences.* 15 (D.F.R. Bommer, Sabey, B.R., Vaadia, Y. Thomas, G.W. and Van Vleck, L.D. eds.). Springer – Verlag. Berlin. 280pp.

Curtis, T. P.; Head, I. M. y Graham, D. W. 2003. Theoretical ecology for engineering biology. *Environ Sci Technol.* 37:64A-70A.

Custodio, E. y Llamas, M. R. 2001. *Hidrología subterránea* (volumen 1), segunda edición. Editorial Omega.

Dakora, F. D. y Phillips, D. A. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil.* 245:35-47.

Dams, R. I.; Paton, G. y Killham, K. 2007. Bioaugmentation of pentachlorophenol in soil and hydroponic system. *Int Biodeterior Biodegrad.* 60:171-7.

Das, K. y Mukherjee, A. K. 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresour Technol.* 98:1339-45.

Dávila, J. I. 2001. Tesis doctoral: "Caracterización radiológica del agua potable en las ciudades de Zacatecas y Guadalupe, del estado de Zacatecas, México".

Davrock, B. 1992. Isopropylbenzene (cumene) - a new substrate for the isolation of trichloroethene-degrading bacteria. *Arch Microbiol.* 158:9-13.

De Boer, W.; Folman, L. B.; Summerbell, R. C. y Boddy, L. 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol Rev.* 29:795-811.

De Felipe, M. R.; Golvano, M. P.; Lucas, M. M.; Lang, P. y Pozuelo, J. M. 1988. Differential effects of isoproturon on the photosynthetic apparatus and yield of two varieties of wheat and *L. rigidum*. *Word Research.* 28:85-92.

De la Fuente, V.; Rufo, L.; Marin, I.; Sanz, J. L. y Amils, R. 2005. *Biotecnología y medioambiente*. Edit. Ephemera. Capítulo 9. Pp. 156.

De Lorenzo, C.; Fernández-Pascual, M. y De Felipe, M. R. 1998. Subcellular localization of glycoprotein epitopes during the development of lupin root nodules. *Protoplasma.* 201:71-84.

De María, N.; de Felipe, M. R. y Fernández-Pascual, M. 2005. Alterations induced by glyphosate on lupin photosynthetic apparatus and nodule ultrastructure and some oxygen diffusion related proteins. *Plant Physiol Biochem* 43:985–996.

De Wever, H.; Brepols, C. y Lesjean, B. 2009. "Decision tree for full-scale submerged MBR configurations", Final MBR-Network Workshop, Berlin <http://www.mbr-network.eu/mbr-projects/index.php>

Debusk, T. A.; Laughlin, R. B. y Schwartz, L. N. 1996. Retention and compartmentalization of lead and cadmium in wetland microcosms. *Water Research.* 30(11):2707-2716.

Dec, J. y Bollag, J. M. 1994. Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenols. *Biotechnol Bioeng.* 44:1132-1139.

Del Rio, L. A.; Lyon, D. S.; Olah, I.; Glick, B. y Salí, M. L. 1983. Immunocytochemical evidence for a peroxisomal localization of manganese superoxide dismutase in leaf protoplasts from higher plant. *Planta.* 158:216-224.

Delgado Díaz, S. 2009. Presente y futuro de la reutilización de aguas en Canarias. *Academia de Ciencias e Ingenierías de Lanzarote. Discursos académicos* 31.

Delphin, E.; Duval, J. C.; Etienne, A. L. y Kirilovsky, D. 1998. Delta pH-dependent photosystem II fluorescence quenching induced by saturating, multiturnover pulses in red algae. *Plant Physiol.* 118:103–113.

Demmig, B.; Winter, A.; Krüger, A. y Czygan, F. C. 1988. Zeaxanthin and heat dissipation of excess light energy in *Nerium oleander* exposed to a combination of high light and water stress. *Plant Physiol.* 87:17-24.

Demmig-Adams, B. y Adams III, W. W. 1992 a. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Rev Plant Physiol Mol Biol.* 43:599–626.

Demmig-Adams, B. y Adams III, W. W. 1992 b. Carotenoid composition in sun and shade leaves of plants with different life forms. *Plant Cell Environ.* 15:411–9.

Demmig-Adams, B.; Adams III, W. W.; Barker, D. H.; Logan, B. A.; Bowling, D. R. y Verhoeven, A. S. 1996. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiol Plant.* 98:253-264.

Derry, A. M.; Staddon, W. J. y Trevors, J. T. 1998. Functional diversity and community structure of microorganisms in uncontaminated and creosote-contaminated soils as determined by sole carbon-source utilization. *World J Microbiol Biotechnol.* 14:571-578.

Devereux, R. y Willis, S. G. 1995. Amplification of ribosomal RNA sequences. *Mol Microb Ecol Man.* 3.3.1:1-11.

Di Gennaro, P.; Franzetti, A.; Bestetti, G.; Lasagni, M.; Pitea, D. y Collina, E. 2008. Slurry phase bioremediation of PAHs in industrial landfill samples at laboratory scale. *Waste management.* 28(8):1338-1345.

Di Giovanni, G. D.; Watrud, L. S.; Seidler, R. J. y Widmer, F. 1999. Comparison of parental and transgenic alfalfa rhizosphere bacterial communities using biolog GN metabolic fingerprinting and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR (ERIC-PCR). *Microbial Ecol.* 37:129-139.

Dietz, A. C. y Schnoor, J. L. 2001. Advances in phytoremediation. *Environ Health Perspect* 109:163-168.

Dixon, B. 1996. Bioremediation is here to stay. *ASM News.* 62:527-528.

Dominguez-Rosado, E.; Pichtel, J. y Coughlin, M. 2004. Phytoremediation of soil contaminated with used motor oil: I. Enhanced microbial activities from laboratory and growth chamber studies. *Environ Eng Sci.* 21(2):157-168.

Dominguez-Rosado, E. y Pichtel, J. 2004. Phytoremediation of soil contaminated with used motor oil: II. Greenhouse studies. *Environ Eng Sci.* 21(2):169-180.

Dong, X.; Hong, Q.; He, L.; Jiang, X. y Li, S. 2008. Characterization of phenol-degrading bacterial strains isolated from natural soil. *Int. Biodeterior Biodegrad.* 62:257-62.

Donnelly, P. K.; Hedge, R. S. y Fletcher, J. S. 1994. Growth of PCB-degrading bacteria on compounds from photosynthetic plant. *Chemosphere.* 28:981-988.

Dos Santos, E. O.; Da Rosa, C. F. C.; Dos Passos, C. T.; Sanzo, A. V. L.; Burkert, J. F. M.; Kalil, S. J.. 2008. Pre-screening of filamentous fungi isolated from a contaminated site in Southern Brazil for bioaugmentation purposes. *Afr J Biotechnol.* 7(9):1311-7.

Dua, M.; Sethurnathan, N. y Johri, A. K. 2002. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59:143-152.

Dunfield, K. E. y Germida, J. J. 2003. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field- grown genetically modified Canola (*Brassica napus*). *Appl Environ Microbiol.* 69:7310-7318.

Dunn, P. H.; Barro, S. C. y Poth, M. 1985. Soil-moisture affects survival of microorganisms in heated chaparral soil. *Soil Biol Biochem.* 17(2):143-148.

Dushenkov, S. y Kapulnik, Y. 2000. Phytofiltration of metals. Pp. 89-106. En: *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment* (Raskin, I., and Ensley, D:D, eds.) John Wiley and Sons, EEUU.

Dushenkov, V.; Nanda Kumar, P. B. A.; Motto, H. y Raskin, I. 1995. Rhizofiltration: The use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environ Sci Technol.* 29:1239-1245.

Duxbury, C. L.; Dixon, D. G. y Greenberg, B. M. 1997. Effects of simulated solar radiation on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the duckweed *Lemna gibba*. *Environ Toxicol Chem.* 16:1739-1748.

Duysens, L. N. M. y Sweers, H. E. 1963. Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. En: *Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria.* Plant Cell. Physiol., Spec. Issue. 353-372. University of Tokio Press, Tokio.

Earth's water distribution. U.S. Geological Survey. Consultado el 17 de mayo 2007.

El Fantroussi, S.; Verschuere, L.; Verstraete, W. y Top, E. M. 1999. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Appl Environ Microbiol.* 65:982-988.

El Fantroussi, S. y Agathos, S.N. 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr Opin Microbiol.* 8:268-75.

Elend, C.; Schmeisser, C.; Leggewie, C.; Babiak, P.; Carballeira, J. D.; Steele, H. L.; Reymond, J. L.; Jaeger, K. E. y Streit W. R. 2006. Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Appl Environ Microbiol.* 72:3637-3645.

Ellis, R. J.; Thompson, I. P. y Bailey, M. J. 1995. Metabolic profiling as a means of characterizing plant associated microbial communities. *FEMS Microbiol Ecol.* 16:9-18.

England, L. S.; Lee, H. y Trevors, J. T. 1993. Bacterial survival in soil: effect of clays and protozoa. *Soil Biol Biochem.* 25:525-31.

Entcheva, P.; Liebl, W.; Johann, A.; Hartsch, T. y Streit, W. R. 2001. Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. *Appl Environ Microbiol* 67:89-99.

European Union 2000 a. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Communities* 2000: L327.

European Union 2000 b. Directive 2000/76/EC of the European Parliament and of the Council of 4 December 2000 on the incineration of waste. *Official Journal of the European Communities* 2000: L332.

Evangelou, M. W. H.; Kutschinski-Kloess, S.; Ebel, M. y Schaeffer, A. 2007. Potential of *Borago officinalis*, *Sinapis alba* L. and *Phacelia boratus* for Phytoextraction of Cd and Pb from Soil. *Water Air Soil Pollut.* 182(1-4):407-416.

Eweis, J. B.; Ergas, S. J.; Chang, D. P y Schroeder, E. D. 1998. *Bioremediation Principles*. McGraw-Hill International Editions. 296 pp.

Fane, A. G., Fell, C. J. D., Hodgson, P. H., Leslie, G., y Marshall, K. C. 1989. Microfiltration of biomass and biofluids: effects of membrane morphology and operating conditions. *Proc. of the Vth World Filtration Congress*. Nice, France. 320–329.

FAO. 2009. No hay crisis mundial de agua, pero muchos países en vías de desarrollo tendrán que hacer frente a la escasez de recursos hídricos.

Fedorova, E.; Redondo, F. J. y Koshiba, T. 2005. Aldehyde oxidase (AO) in the root nodules of *Lupinus albus* and *Medicago truncatula*: Identification of AO in meristematic and infection zones. *Mol Plant Microbe Interact.* 18(5):405-413.

Felsenstein, J. 1989. PHYLIP-phylogeny inference package (version 3.2.). *Cladistics.* 5:164-166.

Fernandes, P. H.; Kanuri, M.; Nechev, L. V.; Harris, T. M. y Lloyd, R. S. 2005. Mammalian cell mutagenesis of the DNA adducts of vinyl chloride and crotonaldehyde. *Environ Mol Mutagen.* 45(5):455-459.

Fernandez, A.; Huang, S. Y.; Seston, S.; Xing, J.; Hickey, R.; Criddle, C. y Tiedje, J. 1999. How stable is stable? Function versus community composition. *Appl Environ Microbiol.* 65:3697-3704.

Fernández-Álvarez, P.; Vila, J.; Garrido-Fernández, J. M.; Grifoll, M. y Lema, J. M. 2006. Trials of bioremediation on a beach affected by the heavy oil spill of the Prestige. *J. Hazard. Mater.* 137(3):1523-1531.

Ferreira, T. R.; Lopes, C. B.; Lito, P. F.; Otero, M.; Lin, Z.; Rocha, J.; Pereira, E.; Silva, C. M. y Duarte, A. 2009. Cadmium (II) removal from aqueous solution using microporous titanosilicate ETS-4. *Chem Eng J* 147:173–179.

Ferrer, M.; Golyshina, O. V.; Chernikova, T. N., Khachane, A. N.; Reyes-Duarte, D.; Martins Dos Santos, V. A. P.; Strompl, C.; Elborough, K.; Jarvis, G.; Neef, A.; Yakimov, A.; Timmis, M. M. y Golyshin, P. N. 2005. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. *Environ Microbiol.* 7:1996-2010.

Ferro, A. M.; Sims, R. C. y Bugbee, B. 1994. Hycrest crested wheatgrass accelerates the degradation of pentachlorophenol in soil. *J Environ Quality* 23:272-279.

Fewson, C. A. 1988. Biodegradation of xenobiotics and other persistent compounds: the cause of recalcitrance. *Trends Biotechnol.* 6:148-153.

Filonov, A. E.; Akhmetov, L. I.; Puntus, I. F.; Esikova, T. Z.; Gafarov, A. B.; Izmalkova, T. Yu. 2005. The construction and monitoring of genetically tagged, plasmid-containing, naphthalene degrading strains in soil. *Microbiology.* 74:453-8.

Fletcher, J. S. y Hegde, R. S. 1995. Release of phenols by perennial plant roots and their potential importance in bioremediation. *Chemosphere.* 31:3009-3016.

Forsyth, J. V.; Tsao, Y. M. y Bleam, R.D. 1995. Bioremediation: when is augmentation needed? En: Hinchee RE, Fredrickso J, Alleman BC, editors. Bioaugmentation for site remediation. Columbus, OH: Battelle Press.

Foy, C. D. 1992. Soil chemical factors limiting plant root growth. *Adv Soil Sci.* 19:97-131.

Foy, C. D. 1993. Role of the soil scientist in genetic improvement of plants for problem soils. En: J.W. Maranville, C. Baligar, R.R. Duncan y J.M. Yohe (eds), Intsormil Publication N° 94-2. University of Nebraska, Lincoln, NE.

Foyer, C. H.; Lelandais, M. y Kunert, K. 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant.* 92:696-717.

Franzetti, A.; Caredda, P.; Ruggeri, C.; La Colla, L.; Tamburini, E.; Papacchini, M. y Bestetti, G. 2009. Potential application of surface active compounds by *Gordonia sp.* strain BS29 in soil remediation technologies. *Chemosphere.* 75:801-7.

Gabor, E. M. y Janssen, D. B. 2004. Increasing the synthetic performance of penicillin acylase PAS2 by structure-inspired semi-random mutagenesis. *Protein Eng Des Sel* 17:571-579.

Gabor, E. M.; Vries, E. J. y Janssen, D. B. 2004. Construction, characterization, and use of small-insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases. *Environ Microbiol* 6:948-958.

Gallardo-Williams, M. T.; Whalen, V. A.; Benson, R. F. y Martin, D. F. 2002. Accumulation and retention of lead by cattail (*Typha domingensis*), hydrilla (*Hydrilla verticillata*), and duckweed (*Lemna obscura*). *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 37(8):1399-1408.

Gao, J. P.; Garrison, A. W.; Mazur, C.; Wolfe, N. L. y Hoehamer, C. 1999. Phytoremediation of organophosphorous (OP) compounds using axenic plant tissue cultures and enzyme extracts. *Phytoremediation and Innovative Strategies for Specialized Remedial Applications*. Pages: 151-156.

Gao, Y. Z. y Zhu, L. Z. 2004. Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere*. 55:1169-1178.

Garbeva, P.; van Elsas, J. D. y van Veen, J. A. 2008. Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant Soil*. 302:19-32.

Garbisu, C.; Hernández-Allica, J.; Barrutia, O.; Alkorta, I. y Becerril, J. M. 2002. Phytoremediation: a technology using green plants to remove contaminants from polluted areas. *Rev Environ Health*. 17:75-90.

García-Plazaola, J. I. y Becerril, J. M. 1999. A rapid HPLC method to measure lipophylic antioxidants in stressed plants: simultaneous determination of carotenoids and tocopherols. *Phytochem Anal*. 10:1-7.

García-Plazola, J. I.; Hernández, A. y Becerril, J. M. 2000. Photoprotective responses to winter stress in evergreen Mediterranean ecosystems. *Plant Biol*. 2:530-535.

García-Plazaola, J. I. y Becerril, J. M. 2001. Seasonal changes in photosynthetic pigments and antioxidants in beech (*Fagus sylvatica*) in a Mediterranean climate: implications for tree decline diagnosis. *Australian J Plant Physiol*. 28:225-232.

García-Plazaola, J. I.; Esteban, R.; Hormaetxe, K. y Becerril, J. M. 2008. Seasonal reversibility of acclimation to irradiance in leaves of common box (*Buxus sempervirens* L.) in a deciduous forest. *Flora*. 203:254-260

García-Villaraco Velasco, A.; Probanza, A.; Gutiérrez Mañero, F. J.; Ramos, B. y Lucas García, J. A. 2009a. Functional diversity of rhizosphere microorganisms from different genotypes of *Arabidopsis thaliana*. *Community Ecology* 10(1):11-119.

García-Villaraco Velasco, A.; Probanza, A.; Gutiérrez Mañero, F. J.; Cruz Treviño, A. Moreno, J. M. y Lucas García, J. A. 2009b. Effect of fire and retardant on soil microbial activity and functional diversity in a Mediterranean pasture. *Geoderma* 153:186-193.

Garland, J. L. 1996. Patterns of potential C source utilization by rhizosphere communities. *Soil Biol Biochem*. 28:223-230.

Garland, J. L. y Mills, A. L. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl Environ Microbiol*. 57:2351-2359.

Garon, D.; Sage, L.; Wouessidjewe, D. y Seigle-Murandi, F. 2004. Enhanced degradation of fluorene in soil slurry by *Absidia cylindrospora* and maltosyl-cyclodextrin. *Chemosphere*. 56:159-66.

Geiken, B.; Masojídek, J.; Rizutto, M.; Pompili, M. L. y Giardi, M. T. 1998. Incorporation of [35S]methionine in higher plants reveals that stimulation of the D1 reaction centre II protein turnover accompanies tolerance to heavy metal stress. *Plant Cell Environ.* 21:1265-1273.

Gentile, M. E.; Jessup, C. M.; Nyman, J. L. y Criddle, C. S. 2007. Correlation of functional instability and community dynamics in denitrifying dispersed-growth reactors. *Appl Environ Microbiol.* 73:680-690.

Gentili, A. R.; Cubitto, M. A.; Ferrero, M. y Rodríguez, M. S. 2006. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *Int Biodeterior Biodegrad.* 57:222-8.

Genty, B.; Briantais, J. M. y Baker, N. R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochem Biophys Acta.* 990:87-92.

Gerhardson, B. 2002. Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechnol.* 20:338-343.

Gerke, J.; Roemer, W. y Jungk, A. 1994. The excretion of citric and malic acid by proteoid roots of *Lupinus albus* L.: Effects on soil solution concentrations of phosphate, iron and aluminum in the proteoid rhizosphere in samples of a oxisol and aluvisol. *Zeit Pflanzenernar Bodenk.* 157:289-294.

Ghazali, F. M.; Rahman, R. N. Z. A.; Salleh, A. B. y Basri, M. 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *Int Biodeterior Biodegrad.* 54:61-7.

Ghazanfari, N. S. y Amoozegar, M. A. 2009. Evaluation of biosorption of Lead by *Halomonas eurihalina* strain NA-2. *Current Research Topics in applied Microbiology and Microbial Biotechnology.* Pages: 651-655.

Gibson, D. T. y Subramanian, V. 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. En: Gibson, D.T. (Ed.), *Microbial Degradation of Organic Compounds*, Dekker, New York, pp. 181-282.

Gillespie, D. E.; Brady, S. F.; Bettermann, A. D.; Cianciotto, N. P.; Liles, M. R.; Rondon, M. R.; Clardy, J.; Goodman, R. M. y Handelsman, J. 2002. Isolation of antibiotics turbomycin a and b from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl Environ Microbiol* 68: 4301-4306.

Gilmore, A. M. 1997. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol Plant.* 99:197-209.

Gleba, D.; Borisjuk, N. V.; Borisjuk, L. G.; Kneer, R.; Poulev, A.; Skarzhinskaya, M.; Dushenkov, S.; Logendra, S.; Gleba, Y. y Raskin, I. 1999. Use of plants roots for phytoremediation and molecular farming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:5973:5977. País Vasco.

Glick, B. R.; Jacobson, C. B.; Schwarze, M. M. K. Y Pasternak, J. J. 1994. 1-aminocyclopropae-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate Canola root elongation. *Can J Microbiol.* 40:911-915.

Glick, B. R.; Cheng, Z.; Czarny, J. Y Duan, J. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol.* 119:329-339.

Goldstein, J. F.; Mallory, L. M. y Alexander, M. 1985. Reason for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Appl Environ Microbiol.* 50:917-983.

Gordon, M.; Choe, N.; Duffy, J.; Ekuan, G.; Heilman, P.; Muiznicks, I.; Ruszaj, M.; Shurleff, B. B.; Strand, S.; Wilmoth, J. y Newman, L. A. 1998. Phytoremediation of trichloroethylene with hybrid poplars. *Environ Health Perspect.* 106:1001-1004.

Good, I. J. 1953. The population frequency of species and the estimation of population parameters. *Biometrika.* 40:237-264.

Goux, S.; Shapir, N.; El Fantroussi, S.; Lelong, S.; Agathos, S. N. y Pussemier, L. 2003. Long term maintenance of rapid atrazine degradation in soils inoculated with atrazine degraders. *Water Air Soil Pollut Focus.* 3:131-42.

Govindjee. 1995. Sixty-three years since Kausky: Chlorophyll a fluorescence. *Aust J Plant Physiol.* 22:131-160.

Graham, M. H. y Haynes, R. J. 2005. Catabolic diversity of soil microbial communities under sugarcane and other land uses estimated by Biolog and substrate-induced respiration methods. *Appl Soil Ecol.* 29:155-164.

Grayston, S. J. y Campbell, C. D. 1996. Functional biodiversity of microbial communities in the rhizosphere of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Tree Physiol.* 16(11-12):1031-1038.

Grayston, S. J.; Wang, S.; Campbell, C. D. y Edwards, A. C. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem.* 30:369-378.

Grayston, S. J.; Griffith, G. S.; Mawdsley, J. L.; Campbell, C. D. y Bardgett, R.D., 2001. Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. *Soil Biol Biochem.* 33:533-551.

Grayston, S. J. y Prescott, C. E. 2005. Microbial communities in forest floors under four tree species in coastal British Columbia. *Soil Biol Biochem.* 37:1157-1167.

Greer, L. E. y Shelton, D. R. 1992. Effect of inoculant strain and organic matter content on kinetics of 2,4-dichloro-phenoxyacetic acid degradation in soil. *Appl Environ Microbiol.* 58:1459-65.

Griffiths, B. S.; Ritz, K.; Ebbelwhite, N. y Dobson, G. 1999. Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biol Biochem.* 31:145-153.

Grijalbo Fernández, L. 2007. Proyecto de fin de carrera: Rizorremediación de suelos contaminados con Cd y Zn utilizando plantas de maíz y altramuz inoculadas con Aur 6 y M 12.

Grosser, R. J.; Warshawsky, D. y Vestal, J. R. 1991. Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo(a)pyrene, and carbazole in soils. *Appl Environ Microbiol.* 57:3462-3469.

Grossl, P. R. 2000. Natural attenuation mechanisms of inorganic pollutants: sorption / desorption kinetics on soil mineral surfaces. Pages 201-207. En: *Natural Attenuation Considerations and Case Studies: Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds.* Battelle Press, Columbus, OH, U.S.A.

Groudeva, V. I.; Groudev, S. N. y Stoyanova, A. D. 2004. Treatment of acid drainage in a uranium deposit by means of a natural wetland. *Nukleonika.* 49:S17-S20.

Guasch, L. M.; De Felipe, M. R. y Fernández-Pascual, M. 2001. Effects of different O₂ concentrations on nitrogenase activity, respiration and O₂. *J Plant Physiol.* 158:1395-1402.

Guckert, J. B.; Carr, G., J.; Johnson, T. D.; Hamm, B. G.; Davidson, D. H. and Kumagai, Y. 1996. Community analysis by Biolog: curve integration for statistical analysis of activated sludge microbial habitats. *J. of Microbiol Methods* 27:183-197.

Günter, N. y Martinoia, E. 2002. Closter roots an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends Plant Sci.* 4:162-167.

Gutiérrez Mañero, F. J.; Acero, N.; Lucas, J. A. y Probanza, A. 1996. The influence of native rhizobacteria on European alder [*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.] growth. II. Characterization of growth promoting and growth inhibiting strains. *Plant Soil.* 182:67-74.

Gutiérrez Mañero, F. J.; Lucas García, J. A.; Probanza Lobo, A. y Ramos Solano, B. 2003. Interacción planta-microorganismo en un ecosistema denominado rizosfera. En: *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones.* Bedmar, E. J.; González, J.; Lluch, C. y Rodelas, B. 2006. Pp. 244-255.

Haby, P. A. y Crowley, D. E. 1996. Biodegradation of 3-chlorobenzoate as affected by rhizodeposition and selected carbon substrates. *J Environ Qual.* 25:304-310.

Hadacek, F. 2002. Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 21:273-322.

Hagman, M.; Nielsen, J. L.; Nielsen, P. H. y Jansen, J. la C. 2008. Mixed carbon sources for nitrate reduction in activated sludge identification of bacteria and process activity studies. *Water Research.* 42:1539-1546.

Halden, R. U.; Tepp, S.; Halden, B. G. y Dwyer, D. F. 1999. Degradation of 3-phenoxybenzoic acid in soil by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB310(pPOB) and two modified *Pseudomonas* strains. *Appl Environ Microbiol.* 65:3354-9.

- Haluska, L.; Baranciková, G.; Baláz, S.; Dercová, K.; Vrana, B.; Paz-Weisshaar, M.; Furciova, E. y Bielek, P.** 1995. Degradation of PCB in different soils by inoculated *Alcaligenes xylosoxidans*. *Sci Total Environ.* 175:275–85.
- Hamer, G.** 1997. Microbial consortia for multiple pollutant biodegradation. *Pure Appl Chem.* 69:2343-2356.
- Hansen, A. T.; Stark, R. A.; Hondzo, M.** 2011. Uptake of dissolved nickel by *Elodea Canadensis* and epiphytes influenced by fluid flow conditions. *Hydrobiology.* 658(1):127-138.
- Hanson, K. G.; Nigam, A.; Kapadia, M. y Desai, A.** 1997. Bioremediation of crude oil contamination with *Acinetobacter* sp. A3. *Current Microbiol.* 35:191-193.
- Hartmann, A.; Schmid, M.; Van Tuinen, D. y Berg, G.** 2009. Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil.* 321:235-257.
- Harvey, P.; Campanella, B.; Castro, P.; Harms, H.; Lichtfouse, E.; Schöffner, A.; Smrcek, S. y Werck, D.** 2002. Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environ Sci Pollut Res Int.* 9:29-47.
- He, B.; Yang, X. E.; Wei, Y. Z.; Ye, Z. Q. y Ni, W. Z.** 2002. A new lead resistant and accumulating ecotype—*Sedum alfredii* H. *Acta Bot Sin.* 44(11):1365-70.
- Heidelberg, J. F.; Paulsen, I. T.; Nelson, K. E.; Gaidos, E. J.; Nelson, W. C.; Read, T.D. y Eisen, J. A.** 2002. Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducin bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nature Biotechnol.* 1:1-6.
- Heinaru, E.; Merimaa, M.; Viggor, S.; Lehiste, M.; Leito, I.; Truu, J.** 2005. Biodegradation efficiency of functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol- and oil-polluted area. *FEMS Microbiol Ecol.* 51:363–73.
- Heitkamp, M. A. y Steward, W. P.** 1996. A novel porous nylon biocarrier for immobilized bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 62:4662-9.
- Hem, J. D.** 1959. Study and interpretation of the chemical characteristics of natural water. *Geol. Surv. WSP # 1473:1-269.* Washington.
- Henne, A.; Daniel, R.; Schmitz, R. A. y Gottschalk, G.** 1999. Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol* 65:3901–3907.
- Henne, A.; Schmitz, R. A.; Bomeke, M.; Gottschalk, G. y Daniel, R.** 2000. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 66:3113–3116
- Hernández-Terrones, M. G.; Aguilar, M. I.; King-Diaz, B. y Lotina-Hennsen, B.** 2003. Inhibition of photosystem II in spinach chloroplasts by trachyloban-19-oic acid. *Pestic Biochem Phys.* 77:12-17.

Herschkovitz, Y.; Lerner, A.; Davidov, Y.; Rothballe, M.; Hartmann, A.; Okon, Y. y Jurkevitch, E. 2005. Inoculation with the plant growth promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* causes little disturbance in the rhizosphere and rhizoplane of maize (*Zea mays*). *Microb Ecol.* 50:277-288.

Heuer, H. y Smalla, K. 1997. Evaluation of community-level catabolic profiling using BIOLOG GN microplates to study microbial community changes in potato phyllosphere. *J. Microbiol Methods* 32:49-61.

Heuer, H. y Smalla, K. 1999. Bacterial phyllosphere communities of *Solanum tuberosum* L. and T4-Lysozyme-producing transgenic variants. *FEMS Microbiol Ecol.* 28:357-371.

Heuer, H.; Kroppenstedt, R. M.; Lottmann, J.; Berg, G. y Smalla, K. 2002. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors. *Appl Environ Microbiol.* 68:1325-1335.

Hiltner, L. 1904. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundung und Brache. *Arb. Dsch. Landwirt. Ges.*, 98:59-78.

Hoagland, D. R. y Arnon, D. I. 1950. The water culture method for growing plants without soil. *Col Agric Exp Stn Circ.* 347:1-32.

Hoagland, R. E.; Zablutowicz, R. M. y Locke, M. A. 1994. Propanil metabolism by rhizosphere microflora. Pages 160-183. En: *Bioremediation through Rhizosphere Technology*. Anderson, T.A., and Coats, J.R. eds. American Chemical Society. Washington. D.C.

Hoben, H. J. y Somasegaran, P. 1982. comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium spp* in inoculants made from pre-sterilized peat. *Appl Environ Microbiol.* 44:1246-1247.

Hong, Q.; Zhang, Z.; Hong, Y. y Li, S. 2007. A microcosm study on bioremediation of fenitrothion-contaminated soil using *Burkholderia sp.* FDS-1. *Int Biodeterior Biodegrad.* 59:55-61.

Horner-Devine, M. C. y Martiny, A. C. 2008. Biogeochemistrys News about nitrogen. *Science.* 320:757-758.

Horvath, M. M. y Vantran, L. E. 1976. Effect of the sodium salt of 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid on cucurbitaceae seedlings. *Acta Biol.* 22:79-81.

Huang, L. N.; De Wever, H. y Diels, L. 2008. Diverse and distinct bacterial communities induced biofilm fouling in membrane bioreactors operated under different conditions. *Environ Sci Technol.* 42:8360-8366.

Huang, X. D.; Zeiler, L. F.; Dixon, D. G. y Greenberg, B. M. 1996. Photoinduced toxicity of PAHs to the foliar regions of *Brassica napus* (canola) and *Cucumbis sativus* (cucumber) in simulated solar radiation. *Ecotox Environ Safe.* 35:190-197.

Huang, X. D.; McConkey, B. J.; Babu, T. S. y Greenberg, B. M. 1997. Mechanisms of photoinduced toxicity of photomodified anthracene to plants: Inhibition of photosynthesis in the aquatic higher plant *Lemna gibba* (Duckweed). *Environ Toxicol Chem.* 16:1707-1715.

Huber, T.; Faulkner, G. y Hugenholtz, P. 2004. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* 20:2317–2319.

Hughes, J. B.; Hellmann, J. J.; Ricketts, T. H. y Bohannon, B. J. M. 2001. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl Environ Microbiol.* 67:4399-4406.

Huisjes, E. ; Colombel, K. y Lesjean, B. 2009. The European MBR market: Specificities and future trends. Final MBR-Network Workshop, Berlin. <http://www.mbr-network.eu/mbr-projects/index.php>

Hurd, N. A. y Stenberg, S. P. K. 2008. Bioremoval of aqueous lead using *Lemna minor*. *Int J Phytoremediation.* 10(4):278-288.

Hutner, S. H. 1953. Comparative physiology of heterotrophic growth in plants. In: Loomis, W.E. (Ed.), *Growth and Differentiation in Plants*. Iowa State College Press, Ames, pp. 417-446.

Hynes, R. K.; Farrell, R. E. y Germida, J. J. 2004. Plant-assisted degradation of phenanthrene as assessed by solid-phase microextraction (SPME). *Int J Phytoremediation.* 6(3):253-268.

IHOBE, S.A. Taladrinas agotadas: Un residuo a reducir. 1993. Reed. 1997. (Accesible en la web: <http://www.ihobe.es>)

Inoue, K.; Makino, Y. e Itoh N. 2005. Purification and characterization of a novel alcohol dehydrogenase from *Leifsonia* sp. strain S749: a promising biocatalyst for an asymmetric hydrogen transfer bioreduction. *Appl Environ Microbiol* 71:3633– 3641.

Irukayama, M. 1969. The pollution of Minamata bay and Minamata disease. *Adv Pollut Res.* 3 :153.

Isidorov, V. y Jdanova, M. 2002. Volatile organic compounds from leaves litter. *Chemosphere.* 48:975-979.

Iwamoto, T. y Nasu, M. 2001. Current bioremediation practice and perspective. *J Biosci Bioeng.* 92:1-8.

Jacobsen, C. S. 1997. Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* DBO1(pRO101) in 2,4-D contaminated soil. *Plant Soil.* 189:239-144.

Jacques, R. J. S.; Okeke, B. C.; Bento, F. M.; Teixeira, A. S.; Peralba, M. C. R. y Comargo, F. A. O. 2008. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Bioresour Technol.* 99:2637-43.

Jakoby, W. y Ziegler, D. 1990. The enzymes of detoxication. *J Biol Chem.* 34:20715-20718.

Jayaweera, M. W.; Kasturiarachchia, J. C.; Kularatnea, R. K. A. y Wijeyekoonb, S. L. J. 2007. Contribution of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) grown under different nutrient conditions to Fe-removal mechanisms in constructed wetlands. *J Environ Manage.* 87:450–460.

Jernberg, C. y Jansson, J. K. 2002. Impact of 4-chlorophenol contamination and/or inoculation with the 4-chloro-phenol-degrading strain, *Arthrobacter chlorophenolicus* A6L, on soil bacterial community structure. *FEMS Microbiol Ecol.* 42:387-97.

Jobson, A.; Cook, F. D. y Wastelake, D. W. S. 1972. Microbial utilization of crude oil. *Appl Microbiol.* 32:1082-1089.

Johnson, G. N.; Scholes, J. D.; Grime, J. P. y Horton, P. 1990. In proceedings of the VIIIth Interantional Congress on Photosynthesis.

Johnson., J. F.; Allan, D. L. y Vance, C. R. 1994. Phosphorous stress-induced proteid roots show altered metabolism in *Lupinus albus* L. *Plant Physiol.* 104:657-665.

Joner, E. J. y Leyval, C. 2003. Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environ Sci Technol.* 37:2371-2375.

Jones, D. L.; Hodge, A. y Kuzyakov, Y. 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytol.* 163, 459-480.

Judd, S. 2007. The status of membrane bioreactor technology. *Trends Biotechnol.* 26:109-116.

Juretschko, S.; Loy, L.; Lehner, A. y Wagner, M. 2002. The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *System Appl Microbiol.* 25:84-99.

Jussila, M. M.; Zhao, J.; Suominen, L. y Lindström, K. 2007. TOL plasmid transfer during bacterial conjugation in vitro and rhizoremediation of oil compounds in vivo. *Environ Pollut.* 146:510-24.

Kamel, H. A. y Aly, M. A. S. 2003. Phytoremediation of 14C-fenvalerate insecticide contamination by fresh waterweed *Potamogeton sp.* *Isotope Rad Res.* 35:149-157.

Kamel, H. A.; Eskander, S. B. y Aly, M. A. S. 2007. Physiological response of *Epipremnum Aureum* for Cobalt-60 and Cesium-137 translocation and rhizofiltration. *Int J Phytoremediation.* 9(5):403-417.

Kar, M. y Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenolase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol.* 57:315-319.

Kas, J.; Burkard, J.; Demnerova, K.; Kostal, J.; Macek, T.; Mackova, M. y Pazlarova, J. 1997. Perspectives in biodegradation of polychlorinated biphenils by plant cells. *Pure Appl Chem.* 69:2369.

Kästner, M. y Mahro, B. 1996. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of composts. *Appl Microbiol Biotechnol.* 44:668-675.

Katoh, T. 2008 (Briefings in Bioinformatics 9:286-298) □ Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. □ (outlines version 6; Fast Breaking Paper in Thomson Reuters' ScienceWatch)

Katoh, K.; Asimenos, G. y Toh, H. 2009. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Methods Mol Biol* 537:39-64.

Kaufman, P. B.; Labavitch, J.; Anderson-Prouty, A. y Ghosheh. 1975. Laboratory experiment in Plant Physiology. Macmillan publishing Co., Inc. New York.

Khatisashvili, G.; Gordeziani, M.; Kvesitadze, G. y Korte, F. 1997. Plant monooxygenases: participation in xenobiotic oxidation. *Ecotoxicol Environ Saf.* 36:118-122.

Kelley, C.; Curtis, A. J.; Uno, J. K. y Berman, C. L. 2000. Spectroscopic studies of the interaction of Eu (III) with the roots of water hyacinth. *Water Air Soil Pollut.* 119:171-176.

Khan, A. G.; Kuek, C.; Chaudhry, T. M.; Khoo, C. S. y Hayes, W. J. 2000. Role of plants, micorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere.* 41:197-207.

Kim, B. R.; Rai, D. N.; Zemla, J. F.; Lipari, F. y Harvath, P. V. 1994. Biological removal of organic nitrogen and fatty acids from metal-cutting fluid wastewater. *Wat Res.* 28:1453-1461.

Kim, D.; Park, M. J.; Koh, S. C.; So, J. S. y Kim, E. 2002. Three separate pathways for the initial oxidation of limonene, biphenyl, and phenol by *Rhodococcus sp.* strain T104. *J Microbiol.* 40:86-89.

Kim, J. ; Kang, S. H. ; Min, K. A. ; Cho, K. S. y Lee, I. S. 2006. Rhizosphere microbial activity during phytoremediation of diesel-contaminated soil. *J Environ Sci Health, Part A.* 41:2503-2516.

Kimura, M. 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Mol Biol Evol.* 16:111-120.

King, J. M. H.; Di Grazia, P. M.; Applegate, B.; Larimer, F. y Sayler, G. S. 1990. Rapid, sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalene exposure and biodegradation. *Science.* 249:778-781.

King R. B.; Long, G. M. y Shel-don, J. K. 1997. Practical environmental bioremediation, the field guide. Lewis publishers, NY.

Kingsley, M. T.; Fredrickson, J. K.; Metting, F. B. y Seidler, R. J. 1994. Environmental restoration using plant-microbe bioaugmentation. Pages 287-292. En: Bioremediation of Chlorinated and Polyaromatic Hydrocarbon Compounds. R. E. Hinchee; A. Leeson; L. Semprini; and, S. K. Ong. Eds. Lewis Publishers. Boca Raton, FL. U. S. A.

Kloepper, J. W.; Lifshitz, R. y Schroth, M. N. 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. ISI Atlas Sci. Anim. Plant Sci. 60-64.

Kloepper, J. W. 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. En: Soil Microbial Ecology, (F.B.J. Metting, ed.). Marcel Dekker, Nueva York. pp .255-274.

Klug, M. J. y Markovetz, K. 1971. Utilization of aliphatic hydrocarbons by microorganisms. Adv Microbial Physiol. 5:1-39.

Klumpp, A.; Bauer, K.; Franz-Gerstein, C. y De Menezes, M. 2002. Variation of nutrient and metal concentrations in aquatic macrophytes along the Rio Cachoeira in Bahia (Brazil). Environ Int. 28:165–171.

Knietsch, A.; Waschowitz, T.; Bowien, S.; Henne, A. y Daniel, R. 2003. Metagenomes of complex microbial consortia derived from different soils as sources for novel genes conferring formation of carbonyls from short-chain polyols on *Escherichia coli*. J Mol Microbiol Biotechnol 5:46–56.

Kolb, M. y Harms, H. 2000. Metabolism of fluoranthene in different plant cell cultures and intact plants. Environ Toxicol Chem. 19:1304-1310.

Kolwzan, B. 2008. Assessment and Choice of Inoculants for the Bioremediation of Soil Contaminated with Petroleum Products. Ochrona Srodowiska. 30(4):3-14.

Koroleva, O.; Krause, G. H. y Brüggemann, W. 2000. Effects of long-term chilling under excessive light on xanthophyll cycle activity and non-photochemical fluorescence quenching in *Lycopersicum* genotypes. J Plant Physiol .156:341-349.

Kozdroj, J. y Van Elsas, J. D. 2000. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. Soil boil biochem. 32:1405-1417.

Kraigher, B.; Tina Kosjek, T.; Heath, E.; Kompare, B. y Mandic-Milec, I. 2008. Influence of pharmaceutical residues on the structure of activated sludge bacterial communities in wastewater treatment bioreactors. Water Res. 42:4578-4588.

Krämer, D. M. y Crofts, A. R. 1996. Control and measurement of photosynthetic electron transport *in vivo*. En: Baker, N. R. (ed.): Photosynthesis and the Environment. Pp. 25-66. Kluwer Academic Publ. Dordrecht-Boston-London.

Krämer, U; Cotter-Howells, J. D.; Charnock, J. M.; Baker, A. J. M. y Smith, J. A. C. 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. Nature. 379:635-638.

Krämer, U. 2005. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Curr Opin Biotechnol.* 16:133-141.

Krause, G. H.; Vernetto, C.; Briantais, J. M. 1982. Photoinduced quenching of chlorophyll fluorescence in intact chloroplasts and algae. Resolution into four components. *Biochim Biophys.* 679:116-124.

Krause, G. H. y Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu Rev Plant Phys.* 42:313-349.

Krebs, C. J. 1989. *Ecological methodology.* Harper Collins Publ. 654 pp.

Kuiper, I.; Bloemberg, G. V. y Lugtenberg, B. J. J. 2001. Selection of a plant-bacterium pair as a novel tool for rhizostimulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact.* 14:1197-1205.

Kuiper, I.; Langendijk, E. L.; Buemberg, G. V. y Lugtenberg, B. J. J. 2003. Rhizoremediation: a beneficial plant micro interaction. *APS press.* 17:6-15.

Kuiper, I.; Lagendijk, E. L.; Bloemberg, G. V. y Lugtenberg, B. J. J. 2004. Review. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *The American Phytopathological Society. Mol Plant Microbe Interact.* 17(1):6-15.

Kummerová, M.; Gloser, J.; Slovák, L. y Holoubek, I. 1996. Project TOCOEN. The fate of selected organic compounds in the environment. The growth response of maize to increasing concentration of fluoranthene. *Toxicol Environ Chem.* 54:99-106.

Kummerová, M.; Kmentová, E. y Koptíková, J. 2001. Effect of fluoranthene on growth and primary processes of photosynthesis in faba bean and sunflower. *Plant Prod. (Rostlinná Vyroba)* 47:344-351.

Kummerová, M.; Krulová, J.; Zezulka, S. y Triska, J. 2006. Evaluation of fluoranthene phytotoxicity in pea plants by Hill reaction and chlorophyll fluorescence. *Chemosphere.* 65:489-496.

Kummerová, M.; Vánová, L.; Krulová, J. y Zezulka, S. 2008. The use of physiological characteristics for comparison of organic compounds phytotoxicity. *Chemosphere.* 71:2050-2059.

Kuratsune, M.; Yoshimura, T.; Matsuzaka, J. y Yamaguchi, A. 1972. Epidemiologic study on Yuso, a poisoning caused by ingestion of rice oil contaminated with a commercial brand of polychlorinated biphenyls. *Environ Health Perspect.* 1:119.

Kvesitadze, G.; Gordeziani, M.; Khatisashvili, G.; Sadunishvili y Ramsdwn, J. 2001. Some aspects of the enzymatic basic of phytoremediation. *J Biol Phys Chem.* 1:49-57.

Lasanta, T.; Mosch, W.; Pérez-rontomé, M. C.; Navas, A.; Machín, J. y Maestro, M. 2002. Effets of irrigation on water salinization in semi-arid environments. A case study in Las Bardenas, Central Ebro Depresión, Spain. *Cuadernos de Investigación Geográfica.* 28:7-14.

Lazár, D. y Naus, J. 1998. Statistical properties of chlorophyll fluorescence induction parameters. *Photosynthetica*. 35:121-127.

Lazár, D. 1999. Chlorophyll a fluorescence induction. *Biochim Biophys Acta*. 1412:1-28.

Lee, N.; Jansen, J.; Aspegren, H.; Dircks, K.; Henze, M.; Schleifer, K. H. y Wagner, M. 2002. Population dynamics and in situ physiology of phosphorus-accumulating bacteria in wastewater treatment plants with enhanced biological phosphorus removal operated with and without nitrogen removal. *Water Sci Technol*. 46:163-170.

Leahy, J. G. y Colwell, R. R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev*. 54:305-315.

Lerner, A.; Herschkovitz, Y.; Baudoin, E.; Nazaret, S.; Moëne-Loccoz, Y.; Okon, Y. y Jurkevitch, E. 2006. Effect of *Azospirillum brasilense* on rhizobacterial communities analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and automated intergenic spacer analysis. *Soil Biol Biochem*. 38:1212-1218.

Levin, L. y Gealt, M. 1997. Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. Selección, estimación, modificación de microorganismos y aplicación. Ed. Mc Graw Hill.

Li, X.; Feng, Y. y Sawatsky, N. 1997. Importance of soil water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils. *Plant Soil*. 192:219–226.

Liang, Y.; Zhang, X.; Dai, D. y Li, G. 2009. Porous biocarrier-enhanced biodegradation of crude oil contaminated soil. *Int Biodeterior Biodegrad*. 63:80-7.

Lim, H. K.; Chung, E. J.; Kim, J. C.; Choi, G. J.; Jang, K. S.; Chung, Y. R.; Cho, K. L. y Lee, S. W. 2005. Characterization of a forest soil metagenome clone that confers indirubin and indigo production on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 71:7768-7777.

Limura, Y.; Ikeda, S.; Sonoki, T.; Hayakawa, T.; Kajita, S. y Kimbara, K. 2005. Expression of a gene for Mn-peroxidase from *Coriolus versicolor* in transgenic tobacco generates potential tools for phytoremediation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 59: 246- 451.

Lin, J. E. y Wang, H. Y. 1991. Use of co-immobilised biological systems to degrade toxic organic compounds. *Biotechnol Bioeng*. 38:273-9.

Lin, Q. y Mendelssohn, I. A., 1998. The combined effects of phytoremediation and biostimulation in enhancing habitat restoration and oil degradation of petroleum contaminated wetlands. *Ecol Eng*. 10:263-274.

Ling, W. T. y Gao, Y. Z. 2004. Promoted dissipation of phenantrene and pyrene in soils by amaranth (*Amaranthus tricolour* L.). *Environ Geol*. 46(5):553-560.

Lipthay, J.R.; Barkay, T. y Sørensen, S. J. 2001. Enhanced degradation of phenoxyacetic acid in soil by horizontal transfer of the *tfdA* gene encoding a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dioxygenase. *FEMS Microbiol Ecol*. 35:75-84.

Liste, H. H. y Prutz, I. 2006. Plant performance, dioxygenase-expressing rhizosphere bacteria and biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soil. *Chemosphere*. 62:1411-1420.

Liu, B.; Zeng, Q.; Yan, F.; Xu, H. y Xu, C. 2005. Effects of transgenic plants on soil microorganisms. *Plant Soil*. 271:1-13.

Liu, R.; Chen, L.; Wen, X. y Qian, Y. 2004. Operational performance of a submerged membrane bioreactor for reclamation of bath wastewater. *Process Biochem*. 40:125-130.

Liu, S. y Suflita, J. M. 1993. Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. *Tibtech*. 11:344-352.

Liu, W., Wang, X., Zhang y R., Zhou, Y. 2009. Effects of postnatal exposure to methylmercury on spatial learning and memory and brain NMDA receptor mRNA expression in rats. *Toxicology letters*. 188(3):230-235.

Lohaus, G.; Heldt, H. W. y Osmond, C. B. 2000. Infection with phloem limited abutilion mosaic virus causes localized carbohydrate accumulation in leaves of *Abutilon striatum*: relationships to symptom development and effects on chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction. *Plant Biol*. 2:161-167.

Lombi, E.; Tearall, K. L.; Howarth, J. R.; Zhao, F. J.; Hawkesford, M. J. y McGrath, S. P. 2002. Influence of iron status on calcium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol*. 128:1359-67.

Lomborg, B. 2001. *The Skeptical Environmentalist* (Cambridge University Press). 0-521-01068-3:22.

Long, G. M. 1993. Clean up hydrocarbon contamination effectively. *Cheng Eng Progress*. 5:58-67.

Lonon, M. K. 1996. Bacteria in metalworking fluids. *Symposium proceedings: the industrial metalworking environment. Assessment and control*. Pp. 231-233.

López Martínez, S.; Gallegos Martínez, M. E.; Pérez Flores, L. J. y Gutiérrez Rojas, M. 2005. Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 21(2):91-100.

Lottmann, J. y Berg, G. 2001. Phenotypic and genotypic characterisation of antagonistic bacteria associated with roots of transgenic and non-transgenic potato plants. *Microbiol Res*. 156: 75-82.

Low, E. W. y Chase, H. A. 1999. The effect of maintenance energy requirements on biomass production during wastewater treatment. *Water Research*. 33:847-853.

Loy, A.; Daims, H. y Wagner, M. 2002. Activated sludge: Molecular techniques for determining community composition pp. 26-43. In G. Bitton (ed.). *The Encyclopedia of Environmental Microbiology*. Wiley, New York.

Lynch, J. M. 1987. Microbial interactions in the rhizosphere. AFRC Institute of Horticultural Research. Soil microorganisms. Pub.no30. Soil Microbial Society of Japan. 42-73 pp.

Lynch, J. M. 1990. The rhizosphere. J.M. Lynch (ed.). John Wiley and sons. Chichester. pp 458.

Lynch y Whipps. 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil*. 129:1-10.

Lucas García, J. A.; Barbas, C.; Probanza, A.; Barrientos, M. L. y Gutiérrez Mañero, F. J. 2001. Low molecular weight organic acids (LOAs) and fatty acids in root exudates of two *Lupinus* cultivars at flowering and fruiting stages. *Phytochem Anal*. 12:305-311.

Lucas García, J. A.; Domenech, J.; Santamaría, C.; Camacho, M.; Daza, A. y Gutiérrez Mañero, F.J. 2004. Growth of forest plants (pine and holm-oak) inoculated with rhizobacteria: relationship with microbial community structure and biological activity of its rhizosphere. *Environmental and Experimental Botany*. 52:239-251.

Lugtenberg, B. J. J. y De Weger, L. A. 1992. Plant-root colonization by *Pseudomonas* sp. *Molecular biology and biotechnology*. 13-19.

Lugtenberg, B. J. J. y Dekkers, L. C. 1999. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent. *Environ Microbiol*. 1:9-13.

Lv, W.; Schanbacher, F. L. y Yu, Z. T. 2010. Putting microbes to work in sequence: recent advances in temperature-phased anaerobic digestion processes. *Bioresource Technol*. 101:9409-9414.

Macek, T.; Mackova, M. y Kas, J. 2000. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation, *Biotechnol Adv*. 18:23-34..

MacNeil, I. A.; Tiong, C. L.; Minor, C.; August, R. P.; Grossman, T. H.; Loiacono, K. A.; Lynch, B. A.; Phillips, T.; Narula, S.; Sundaramoorthi, R.; Tyler, A.; Aldredge, T.; Long, H.; Gilman, M.; Holt, D. y Osburne, M. S. 2001. Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3:301-308.

Macrae, A.; Lucon, C. M. M.; Rimmer, D. L. y O'Donnell, A. G. 2001. Sampling DNA from the rhizosphere of *Brassica napus* to investigate rhizobacterial community structure. *Plant Soil*. 233:223-230.

Madigan, M.; Martinko, J. 2005. *Brock Biology of Microorganisms*. (Eds.) 11. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2005.

Magurran, A. E. 1988. Ecological diversity and its measurement. Princeton University Press, New Jersey, pp 179.

Magurran, A. E. 2004. *Measuring biological Diversity*. Blackwell Publishing, Oxford.

Mahro, B.; Schaefer, G. y Kästner, M. 1994. Pathways of microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Pages 203-217. En: Bioremediation of Chlorinated and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds. R. E. Hinchee, A. Leeson, L. Semprini and S. K. Ong, eds. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, U. S. A.

Maila, M. P. y Cloete, T. E. 2002. Germination of *Lepidium sativum* as a method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. *Int Biodeter Biodegr.* 50:107-113.

Maiti, S. K. y Jaiswal, S. 2008. Bioaccumulation and translocation of metals in the natural vegetation growing on fly ash lagoons: a field study from Santaldih thermal power plant, West Bengal, India. *Environ Monit Assess.* 136(1-3):355-370.

Malamis, S. y Andreadakis, A. 2009. Fractionation of proteins and carbohydrates of extracellular polymeric substances in a membrane bioreactor system. *Bioresour Technol.* 100:3350-3357.

Mallakin, A.; Babu, T. S.; Dixon, D. G. y Greenberg, B. M. 2002. Sites of toxicity of specific photooxidation products of anthracene to higher plants: Inhibition of photosynthetic activity and electron transport in *Lemna gibba* L. G-3 (Duckweed). *Environ Toxicol.* 17:462-471.

Mancera-López, M. E.; Esparza-García, F.; Chávez-Gómez, B.; Rodríguez-Vázquez, R.; Saucedo-Castañeda, G. y Barrera-Cortés, J. 2008. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation – bioaugmentation with filamentous fungi. *Int Biodeterior Biodegrad.* 61:151-60.

Manefield, M.; Whiteley, A. S.; Griffiths, R. I. y Bailey, M. J. 2002. RNA stable isotope probing a novel means of linking microbial community function to phylogeny. *Appl Environ Microbiol.* 68:5367-5373.

Manem, J. y Sanderon, R. 1998. Biorreactores de membrana. Tratamiento del agua por procesos de membrana. Principios, procesos y aplicaciones. American Water Works Association Research Foundation. Madrid. McGraw Hill.

Mariano, J. B. 2001. Environmental impacts of petroleum refining. MSc. Dissertation, COPPE/UFRJ, Río de Janeiro, RJ, Brasil.

Marín, I., De la Fuente, V., Rufo, L., Sanz, J.L., Amils, R. 2005. Biotecnología y medioambiente. Edit. Ephemera. Capítulo 9. Pp. 156.

Márquez, S. y Zabala, E. 2011. Guías temáticas Biología 08. <http://genomasur.com>

Marshall, W. E.; Wartelle, L. H. y Akin, D. E. 2009. Flax shive as a source of activated carbon for metals remediation. *Bioresources.* 2(1):82-90.

Marwood, C. A.; Smith, R. E. H.; Solomon, K. R.; Charlton, M. M. y Greenberg, B. M. 1999. Intact and photomodified polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit photosynthesis in

natural assemblages of Lake Erie phytoplankton exposed to solar radiation. *Ecotox Environ Safe*. 44:322-327.

Marwood, C. A.; Bestari, K. T.; Gensemer, R. W.; Solomon, K. R. y Green-berg, B. M. 2003. Chlorophyll fluorescence as a bioindicator of creosote toxicity to plant growth in aquatic microcosms. *Environ Toxicol Chem*. 22:1075–1085.

Mashreghi, M. y Prosser, J. I. 2006. Survival and activity of luxmarked phenanthrene-degrading *Pseudomonas stutzeri* P16 under different conditions. *Iran J Sci Technol Trans A* 30:71-80.

Massa, V.; Infantino, A.; Radice, F.; Orlandi, V.; Tavecchio, F.; Giudiuci, R. 2009. Efficiency of natural and engineered bacterial strains in the degradation of 4-chlorobenzoic acid in soil slurry. *Int Biodeterior Biodegrad*. 63:112-25.

Master, E. R. y Mohn, W.W. 2001. Induction of bphA, encoding biphenyl dioxygenase, in two polychlorinated biphenyl-degrading bacteria, psychrotolerant *Pseudomonas* strain Cam-1 and mesophilic Burkholderia strain LB400. *Appl Environ Microbiol*. 67:2669-2676.

Mattina, M. J. I.; White, J.; Eitzer, B. y Lannucci-Berger, W. 2002. Cycling of weathered chlordane residues in the environment: Compositional and chiral profiles in contiguous soil, vegetation and air compartments. *Environ Toxicol Chem*. 21:281-288.

Mattsby-Baltzer, I.; Sandin, M.; Ahlstrom, B.; Allenmark, S.; Edebo, M.; Falsen, E. 1989. Microbial growth and accumulation in industrial metal-working fluids. *Appl Environ Microbiol*. 55:2681-2689.

Maxwell, K. y Johnson, G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J exp Bot*. 51:659-668.

McGrath, S. P. y Zhao, F. J. 2003. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Curr Opin Biotechnol*. 14:277-282.

McIntyre, T. 2003. Phytoremediation of heavy metals from soils. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 78:97-123.

MDG Report. 2008. Naciones Unidas.

Meagher, R. B. 2000. Phytoremediation of toxic elemental organic pollutants. *Curr Opin Plant Biol*. 3:162.

Meer, J. R. V. D. 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol Rev*. 56:677-694.

Meier, D. y Lichtenthaler, H. K. 1981. Ultrastructural development of chloroplasts in radish seedling grown at high and low light conditions in the presence of the herbicide bentazon. *Protoplasma*. 107:195-207.

Mellem, J.J.; Baijnath, H. y Odhav, B. 2009. Translocation and accumulation of Cr, Hg, As, Pb, Cu and Ni by *Amaranthus dubius* (Amaranthaceae) from contaminated sites. *J. Environ. Sci. Health, Part A: Environ. Sci. Eng.* 44(6):568-575.

Menéndez-Vega, D.; Gallego, J. L. R.; Peláez, A. I.; de Córdoba, G. F.; Moreno, J., Munoz, D. y Sánchez, J. 2007. Engineered in situ bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons. *Eur J Soil Biol.* 43(5-6):310-321.

Meng, F. G.; Yang, F. L.; Shi, B. Q. y Zhang, H. M. 2008. A comprehensive study on membrane fouling in submerged membrane bioreactors operated under different aeration intensities. *Sep Purif Technol.* 59(1):91-100.

Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. 1985 aprobado por el Standard Methods Committee.

Merbach, W.; Mirus, E.; Knof, G.; Remus, R.; Ruppel, S.; Russow, R.; Gransee, A. y Schulze, J. 1999. Release of carbon and nitrogen compounds by plant roots and their possible ecological importance. *J Plant Nutr Soil Sci.* 162(4):373-383.

Meredith, H.L. 1988. Lupin field nutrition studies. En: *Proceedings 5th International Lupine Conference.* Institute Plant Breeding and Acclimatization, Radzikow, Poland. Pp. 482-493.

Merkl, N.; Schultze-kraft, R. y Infante, C. 2005 a. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water Air Soil Pollut.* 165(1-4):195-209.

Merkl, N.; Schultze-Kraft, R. y Infante, C. 2005 b. Phytoremediation in the tropics- influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. *Environ Pollut.* 138:86-91.

Metcalf y Eddy. 1991. *Wastewater Engineering. Treatment, Disposal, Reuse.* 3rd edition, McGraw-Hill Int. Ed., Singapore.

Meyer, G. D. 1999. Nanogram amounts of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean. *Mol Plant Microbe Interact.* 12:450-458.

Miller-Perez, C., Sanchez-Islas, E., Mucio-Ramirez, S., Mendoza-Sotelo, J. y Leon-Olea, M. 2009. The polychlorinated biphenyls (PCBS) environmental pollutants and their effects on the Nervous System and health. *Salud mental.* 32(4):335-346.

Mirete, S.; de Figueras, C. G. y González-Pastor, J. E. 2007. Novel Nickel Resistance Genes from the Rhizosphere Metagenome of Plants Adapted to Acid Mine Drainage. *Appl Environ Microbiol.* 6001-6011.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7:405-10.

- Miura, Y.; Hiraiwa, M. N.; Ito, T.; Itonaga, T.; Watanabe, Y. y Okabe, S.** 2007. Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: relationship between community stability and reactor performance. *Water Research*. 41:627-637.
- Miya, R. K. y Firestone, M. K.** 2001. Enhanced phenanthrene biodegradation in soil by slender oat root exudates and root debris. *J Environ Qual*. 30:1911-1918.
- Monti, M. R.; Smania, A. M.; Fabro, G.; Alvarez, M. E. y Argarana, C. E.** 2005. Engineering *Pseudomonas fluorescens* for biodegradation of 2,4-dinitrotoluene. *Appl Environ Microbiol*. 71:8864-72.
- Moreland, D. E.** 1980. Mechanism of action of herbicides. *Annu Rev Plant Biol*. 31:597-63.
- Moreno, C. E.** 2001. Métodos para medir la biodiversidad. *M&T-Manuales y Tesis SEA*, vol. 1. Zaragoza, pp. 84.
- Morse, C. C.; Yevdokimov, I. V. y De Luca, T. H.** 2000. In situ extraction of rhizosphere organic compounds from contrasting plant communities. *Comm Soil Sci Plant Anal*. 31:725-742.
- Mrozik, A. y Piotrowska-Seget, Z.** 2010. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiol Res (Pavia)*. 165:363-375.
- Muller, E. B.; Stouthamer, A. H.; van Verseveld, H. W. y Eikelboom, D. H.** 1995. Aerobic domestic wastewater treatment in a pilot plant with complete sludge retention by cross-flow filtration. *Water Res*. 29:1179-1189.
- Munné-Bosch, S.** 2005. The role of alpha-tocopherol in plant stress tolerance. *J Plant Physiol* 162:743-8.
- Murakami, M. y Ae, N.** 2009. Potential for phytoextraction of copper, lead, and zinc by rice (*Oryza sativa* L.), soybean (*Glycine max* [L.] Merr.), and maize (*Zea mays* L.). *J Hazard Mater*. 162(2-3):1185-1192.
- Muratova, A. Y., Dmitrieva, T. V., Panchenko, L. V., Turkovskaya, O. V.** 2008. Phytoremediation of oil-sludge-contaminated soil. *Int J Phytoremediation*. 10(6):486-502.
- Namkoong, W.; Hwang, E. Y.; Park, J. S. y Choi, J. Y.** 2002. Bioremediation of diesel contaminated soil with composting. *Environ Pollut*. 119:23-31.
- Narayanan, M.; Davis, L. C. y Erickson, L. E.** 1995. Fate of Volatile Chlorinated Organic Compounds in a Laboratory Chamber with Alfalfa Plants. *Environ. Sci. Technol*. 29:2437-2444.
- Neal, J.R. Jr.; Larson, R. I. y Atkinson, T. G.** 1973. Changes in rhizosphere populations of selected physiological groups of bacteria related to substitution of specific pairs of chromosomes in spring wheat. *Plant Soil*. 39:209-212.

Newman, L. A.; Strand, S. E.; Choe, N.; Duffy, J. y Ekuan, G. 1997. Uptake and biotransformation of trichloroethylene by hidrid poplars. *Environ Sci Technol.* 31:1062-1067.

Nguyen, C. y Guckert, A. 2001. Short-term utilisation of C-14-[U]glucose by soil microorganisms in relation to carbon availability. *Soil Biol Biochem.* 33(1):53-6.

Nichols, T. D.; Wolf, D. C.; Rogers, H. B.; Beyrouthy, C. A. y Reynolds, C. M. 1997. Rhizosphere microbial populations in contaminated soils. *Water Air Soil Pollut.* 95:165-178.

Niu, G. L.; Zhang, J. J.; Zhao, S.; Liu, H.; Boon, N. y Zhou, N. Y. 2009. Bioaugmentation of a 4-chloronitrobenzene contaminated soil with *Pseudomonas putida* ZWL73. *Environ Pollut.* 157:763-771.

Noordermeer, M. A. 2001. Fatty acid hydroperoxide lyase: a plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. *Chem Biochem* 2:494-504.

Norberg-King, T. J. 1993. A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (ICp) approach program and user manual, version 2.0. US Environmental Protection Agency Environmental Research Laboratory, Duluth National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 03-930.

Núñez, L.; Meas, Y.; Ortega, B. y Olguín J. 2004. Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones. *Ciencia.* 69-83.

Nyyssonen, M.; Kapanen, A.; Piskonen, R.; Lukkari, T. y Itavaara, M. 2009. Functional genes reveal the intrinsic PAH biodegradation potential in creosote-contaminated groundwater following in situ biostimulation. *Appl microbiol biot.* 84(1):169-182.

Obayori, O. S., Ilori, M.O., Adebusoye, S.A., Amund, O.O. y Oyetibo, G.O. 2008. Microbial population changes in tropical agricultural soil experimentally contaminated with crude petroleum. *African Journal of Biotechnology.* 7(24):4512-4520.

Ögren, E. y Baker, N. R. 1985. Evaluation of a technique for the measurement of chlorophyll fluorescence from leaves exposed to continuous white light. *Plant Cell Environ.* 8(7):539-547.

Okon, Y. y Labandera-Gonzalez, C. A. 1994. Agronomic applications of *azospirillum*. En: *Improving Plant Productivity With Rhizosphere Bacteria* (M.H. Ryder, P.M. Stephens Y G.D. Bowen, Eds.). Commonwealth Scientific And Industrial Research Organization. Adelaide, Australia. 274-278.

Okon, Y.; Bloemberg, G. V. y Lugtenberg, B. J. J. 1998. Biotechnology of biofertilization and phytostimulation. In *Agricultural Biotechnology*, ed. A Altman, pp. 327-49. New York: Marcel Dekker.

Omar, S. H.; Budecker, U. y Rehm, H. J. 1990. Degradation of oily sludge from a flotation unit by free and immobilized microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 34: 259-63.

ONU. 2006. 2° Informe de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos en el mundo: "El agua, una responsabilidad compartida"

Orozco, C.; Pérez, A.; González, M. A.; Rodríguez, F. J. y Alfayate, J. M. 2002. Contaminación Ambiental, una visión desde la química. Editorial Thomson.

Osmond, C. B. 1994. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. En: Photoinhibition of Photosynthesis from Molecular Mechanisms to the Field, ed. NR Baker, JR Bowyer, pp. 1-24. Oxford: BIOS Scientific Publishers.

Osmond, C.B.; Daley, P. F.; Badger, M. R. y Lüttge, U. 1998. Chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction in leaves of *Abutilon striatum* Dicks infected with *Abutilon mosaic virus* observed with a field-portable system. *Bot Acta*. 111:390-397.

Otte, M. P.; Gangon, J.; Comeau, Y.; Matte, N.; Greer, C. y Samson, R. 1994. Activation of an indigenous microbial consortium for bioaugmentation of pentachlorophenol/ creosote contaminated soils. *Appl Microbiol Biotechnol* 40:926-932.

Palmer, M. W. 1990. The estimation of species richness by extrapolation. *Ecology*. 71:1195-1198.

Panuccio, M .R.; Sorgona, A.; Rizzo, M. y Cacco, G. 2009. Cadmium adsorption on vermiculite, zeolite and pumice: Batch experimental studies. *J Environ Manage*. 90:364-374.

Parrish, Z. D.; Banks, M. K. y Schwab, A. P. 2005. Effect of root death and decay on dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of yellow sweet clover and tall fescue, *J Environ Qual*. 34:207–216.

Pastor, J.; Hernández, A. J.; Prieto, N. y Fernández-Pascual, M. 2003. Accumulating behaviour of *Lupinus albus* L. growing in a normal and a decalcified calcic luvisol polluted with Zn. *J Plant Physiol*. 160:1457-1465.

Patten, C. L. y Glick, B. R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indole-acetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol*. 68:3795-3801.

Paul, A. y Clark, F. E. 1989. Occurrences and distribution of soil organics. En: *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, San Diego. Pp. 81-84.

Paul, P. y Hartung, C. 2008. Modelling of Biological Fouling Propensity by Inference in a Side Stream Membrane Bioreactor. *Desalination*. 224:154-159.

Pérez-Bueno, M. L.; Rahoutei, J.; Sajjani, C.; García-Luque, I y Barón, M. 2004. Proteomic analysis of the oxygen-evolving complex of photosystem II under biotic stress: studies on *Nicotiana benthamiana* infected with tobamoviruses. *Proteomics* 4:418–425.

Pérez-Bueno, M. L.; Ciscato, M.; Van de Ven, M.; García-Luque, I.; Valckle, R.; Barón, M. 2006. Imaging viral infection: Studies on *Nicotiana benthamiana* plants infected with the pepper mild mottle tobamovirus. *Photosynth Res*. 90:111-123.

Peet, R. K. 1974. The measurement of species diversity. *Annu Rev Ecol Syst.* 5:285-307.

Perry, J. J. 1981. Microbial metabolism of cyclic alkanes. En: Atlas, R.M. (Ed.), *Petroleum Microbiology*, Macmillan Inc., pp. 62-128.

Pettitt, A. N. 1982. Cramér- von misses statistic. Pp. 220-221. In S. Kozt and N. L. Johnson (eds.). *Encyclopedia of Statistical Sciences*. Wiley-interscience, New York, N. C.

Pieterse, C. M. J.; Van Pelt, J. A.; Verhagen, B. W. M.; Ton, J.; Van Wees, S. C. M.; Leon-Kloosterziel, K. M. y Van Loon, L. C. 2003. Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Symbiosis.* 35:39-54.

Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol.* 56:15-9.

Pivnick, H. y Fabian, F. W. 1954. Coliform bacteria in soluble oil emulsions. *Appl Microbiol.* 2:107-110.

Polle, J. E. W.; Niyogi, K. K. y Melis, A. 2001. Absence of lutein, violaxanthin and neoxanthin affects the functional chlorophyll antenna size of photosystem-II but not that of photosystem-I in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* 42:482-491.

Prince, R. C.; Clark, J. R.; Lindstrom, J. E. 1994. Bioremediation of the Exxon Valdez oil spill: Monitoring safety and efficacy. En: Hinchee, R.E., Alleman, B.C., Hoeppe, R.E., Miller, R.N. (Eds.), *Hydrocarbon Bioremediation*, Lewis Publishers, London, pp. 107-124.

Pritchard, P. H. 1992. Use of inoculation in bioremediation. *Curr Opin Biotechnol.* 3:232-43.

Pritchard, P. H.; Mueller, J. G.; Rogers, J. C.; Kremer, F. V. y Glaser, J. A. 1992. Oil spill bioremediation: experiences, lessons and results from the Exxon Valdez oil spill in Alaska. *Biodegradation.* 3:315-335.

Probanza, A.; Lucas, J. A.; Acero, N. y Gutiérrez Mañero, F. J. 1996. The influence of native rhizobacteria on european alder [*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.] growth. I. Charaterization of growth promoting and growth inhibiting strains. *Plant And Soil.* 182:59-66.

Puertas-Mejía, M. A.; Ruiz-Diez, B. y Fernández-Pascual, M. 2010. Effect of cadmium ion excess over cell structure and functioning of *Zea mays* and *Hordeum vulgare*. *Biochem Syst Ecol.* 38: 285-291.

Qiu, X.; Shah, S. I.; Kendall, E. W.; Sorensen, D. L.; Sims, R. C. y Engelke, M. C. 1994. Grass-enhanced bioremediation for elay soils contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons. Pp. 142-157. En: *Bioremediation Through Rhizosphere Technology*. Anderson, T.A., and Coats, J.R. eds. American Chemical Society. Washington. D.C.

Raaijmakers, J. M.; Weller, D. M. y Thomashow L. S. 1997. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl Environ Microbiol* 63:881–887.

Radwan, S. S.; Al-Awadhi, H.; Sorkhoh, N. A. y El-Nemr, I. M. 1998. Rhizospheric hydrocarbon-utilizing microorganisms as potential contributors to phytoremediation for the oily Kuwaiti desert. *Microbiol Res (Pavia)*. 153(3):247-251.

Rahman, K. S.; Rahman, T.; Lakshmanaperumalsamy, P. y Banat, I. M. 2002. Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. *J Basic Microbiol*. 42:284-291.

Ramadan, M. A.; Tayeb, O. M. y Alexander, M. 1990. Inoculation size as a factor limiting success of inoculation for biodegradation. *Appl Environ Microbiol*. 56:1392-1396.

Reay, P. F. y Waugh, C. 1981. Mineral-element composition of *Lupinus albus* and *Lupinus angustifolius* in relation to manganese accumulation. *Plant Soil*. 60:435-444.

Rees, D.; Noctor, G. D. y Horton, P. 1990. The effect of high-energy-state excitation quenching on maximum and dark level chlorophyll fluorescence yield. *Photosynth Res*. 25:199-211.

Rehman, A.; Shakoori, F. R. y Shakoori, A. R. 2009. Metal uptake by *Euplotes mutabilis* y its possible use in bioremediation of industrial wastewater. *Bull Environ Contam Toxicol*. 83(1):130-5.

Reilley, K. A.; Banks, M. K. y Schwab, A. P. 1996. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *J Environmental Qual*. 25:212-219.

Ren, L.; Zeiler, L. F.; Dixon, G. y Greenberg, B. M. 1996. Photoinduced effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on *Brassica napus* (Canola) during germination and early seedling development. *J Ecotoxic and Environ Safety*. 33:73-80.

Rengel, Z.; Ross, G. y Hirsch, P. 1998. Plant genotype and micronutrient status influence colonization on wheat roots by soil bacteria. *J Plant Nutr*. 21:99-113.

Reyes, I.; Valery, A. y Valduz, Z. 2006. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soil of colonizer plants at abandoned rock phosphate mine. *Plant Soil*. 287:69-75.

Reyes, I. y Valery, A. 2007. Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento Del maíz (*Zea mays* L.) Con *azotobacter* sp. *Bioagro*. 19(3):117-126. ISSN 1316-3361.

Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*. 17:208-213.

Reynoso-Cuevas, L.; Gallegos-Martínez, M. E.; Cruz-Sosa, F. y Gutiérrez-Rojas, M. 2008. In vitro evaluation of germination and growth of five plant species on medium supplemented with hydrocarbons associated with contaminated soils. *Bioresour Technol*. 99:6379-6385.

Richardson, T. H.; Xuqiu, T.; Gerhard, F.; Walter, C.; Mark, C.; David, L.; John, M.; Short, J. M.; Robertson, D. E. y Miller C. 2002. A novel, high performance enzyme for starch

liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable alpha-amylase. *J Biol Chem* 277:26501–26507.

Riesenfeld, C. S.; Goodman, R. M. y Handelsman J. 2004. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol* 6:981-989.

Riser-Roberts, E. 1998. Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical processes. Ed. Lewis Publishers, inc.

Rittman, B. E. y Snoeyink, V. L. 1984. Achieving biologically stable drinking water. *Jour. AWWA.* 76(10):106-114.

Rittmann, B. E.; Hausner, M.; Loffler, F.; Love, N. G.; Muyzer, G.; Okabe, S.; Oerther, D. B.; Peccia, J.; Raskin, L. y Wagner, M. 2006. A vista for microbial ecology and environmental biotechnology. *Environ Sci Technol.* 40:1096-1103.

Rmer, W. y Keller. 2001. Exudation of organic acids by spinach and mobilisation of Cu, Zn, and Cd in soil. *Plant Nutrition: Food Security and Sustainability of Agroecosystems.* H. Horst, W. J. (ed) pp. 556-557. Wolters Kluwer Academic, Amsterdam.

Robineau, T.; Batard, Y.; Nedelkina, S.; Cabello-Hurtado, F.; LeRet, M.; sorokine, O. Didierjean, L. y Werk-Reichhart, D. 1998. The chemical inducible plant Cytochrome CYP76B1 actively metabolizes phenylureas and others xenobiotics. *Plant Physiol.* 118:1049-1056.

Roberts, J. A.; Sutton, P. M. y Mishra, P. N. 2000. Application of the membrane biological reactor system for combined sanitary and industrial wastewater treatment. *Inter Biodeter Biodegr.* 46:37-42.

Rodea-Palomares, I.; González-García, C.; Leganés, F. y Fernández-Piñas, F. 2009. Effect of pH, EDTA, and anions on heavy metal toxicity toward a bioluminescent cyanobacterial bioreporter. *Arch Environ Contam Toxicol.* doi:10.1007/s00244-008-9280-9.

Rodrigues, J. L. M.; Maltseva, O. V.; Tsoi, T. V.; Helton, R. R.; Quensen, J.F.; Fakuda, M. 2001. Development of a *Rhodococcus* recombinant strain for degradation of products from anaerobic dechlorination of PCBs. *Environ Sci Technol.* 35:663–8.

Rodríguez, J. L. M.; Kachel, A.; Aiello, M. R.; Quensen, J. F.; Maltseva, O. V.; Tsoi, T. V. y Tiejde, J. M. 2006. Degradation of Aroclor 1242 dechlorination products in sediments by *Burkholderia xenovorans* LB400(ohb) and *Rhodococcus sp* strain RHA1(fcb). *Appl Environ Microbiol.* 72: 2476-82.

Rodríguez, C. T. C.; Chávez, A.; Roa-Morales, G.; Barrera-Díaz, C. E.; Urena-Núñez, F. 2010. An integrated electrocoagulation-phytoremediation process for the treatment of mixed industrial wastewater. *Int J Phytoremediation.* 12(8):772-784.

Rodríguez-Moreno, L.; Pineda, M.; Soukupová, J.; Macho, A. P.; Beuzón, C. R.; Barón, M. y Ramos, C. 2008 Early detection of bean infection by *Pseudomonas syringe* in asymptomatic leaf areas using chlorophyll fluorescence imaging. *Photosynth Res.* 96:27-35.

Rogers, B. F. y Tate, R. L. 2001. Temporal analysis of the soil microbial community along a topo sequence in Pineland soils. *Soil Biol Biochem.* 33:1389-1401.

Roháček, K. 2002. Review. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning and mutual relationships. *Photosynthetica.* 40(1):13-29.

Ronen, Z.; Vasiluk, L.; Abeliovih, A. y Nejidat, A. 2000. Activity and survival of tribromophenol-degrading bacteria in a contaminated desert soil. *Soil Biol Biochem.* 32: 1643–50.

Rosal, R.; Rodea-Palomares, I.; Boltes, K.; Fernández-Piñas, F.; Leganés, F.; Gonzalo, S. y Petre, A. 2009. Ecotoxicity assessment of lipid regulators in water and biologically treated wastewater using three aquatic organism. *Environ Sci Pollut Res.* doi:10.1007/s11356-009-0137-1.

Rosenberg, E. 1993. Exploiting microbial growth on hydrocarbons-new markets. *Tibtech.* 11:419-424.

Rossmore, H. W. y Holtzman, G. H. 1974. Growth of fungi in cutting fluids. *Dev Ind Microbiol.* 15:273-280.

Rovira, A. D. 1956. Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. I. The nature of root exudates from oats and peas. *Plant Soil.* 7:178-194.

Ruberto, L.; Vazquez, S. C. y Cormack, W. P. M. 2003. Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *Int Biodeterior Biodegrad* 52:115–25.

Ruiz Palomino, M. 2003. Tesis doctoral: Ecología microbiana en la rizosfera: estudios de sucesión, diversidad, dinámicas poblacionales y perturbaciones en el sistema.

Ruiz Palomino, M., Lucas García, J. A., Ramos, B., Gutiérrez Mañero, F. J. y Probanza, A. 2005. Sucesional diversity changes in alder (*Alnus glutinosa*) culturable rhizobacterial communities through a phenological cycle. *Appl Soil Ecol.* 29:215-224.

Russell, D. L. 1992. *Remediation Manual for Petroleum-Contaminated Sites*, Technomic Publishing Co., Lancaster, PA., USA.

Ryan, J. A.; Bell, J. M.; Davidson, J. M. y O'Connor. 1988. Plant uptake of non-ionic chemicals from soils. *Chemosphere.* 17:2299-2323.

Sajnani, C.; Zurita, J. L.; Roncel, M.; Ortega, J. M.; Barón, M. y Ducruet, J. M. 2007. Changes in photosynthetic metabolism induced by tobamovirus infection in *Nicotiana benthamiana* studied in vivo by chlorophyll thermoluminescence. *New Phytol.* 175:120-130.

Salanitro, J. P.; Dorn, P. B.; Huesemann, M. H.; Moore, K. O.; Rhodes, I. A.; Jackson, L. M. R.; Vipond, T. E.; Western, M. M. y Winniewski, H. L. 1997. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environ Sci Technol.* 31:1769-1776.

Salmeen, I.; Brown, J. A. Jr; Foxall-Van Aken, S. y Olsen, R. H. 1987. Presence of *Acinetobacter* species among the predominant bacteria found in a contaminated metal-working fluid. *Tribology Int.* 20:218- 221.

Salt, D. E.; Smith, R. D. y Raskin, I. 1998. Phytoremediation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol.* 49:643-668.

Sánchez, J. y Rodríguez, J. L. 2003. Biorremediación: Fundamentos y aspectos microbiológicos. *Industria y Minería.* 351:12-16.

Sandrin, T. R. y Maier, R. M. 2002. Effect of pH on cadmium toxicity, speciation, and accumulation during naphthalene biodegradation. *Environ Toxicol Chem.* 21(10):2075-2079 (5 pages).

Santacroce, M. P.; Conversano, M. C.; Casalino, E.; Lai, O.; Zizzadoro, C.; Cencoducati, G. y Crescenzo, G. 2008. Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. Review. En: *Fish biology and fisheries.* 18:99-130.

Sanz, B. 1998. Los residuos y sus riesgos para la salud. Real Academia de Farmacia. Monografía V (Capítulo IV). Coordinador: Jiménez, S.

Sastre, H. 2000. Residuos industriales y suelos contaminados. Universidad de Oviedo, servicio de publicaciones (Capítulo I). Gobierno del Principado de Asturias (Consejería de Medio Ambiente). Coordinador: Marañón, E.

Schilling, G.; Gransee, A.; Deubel, A.; Lezovic, G. y Ruppel, S. 1998. Phosphorus availability, root exudates, and microbial activity in the rhizosphere. *Z Pflanzenernähr Bodenk.* 161:465-478.

Schindler, C. y Lichtenthaler, H. K. 1996. Photosynthetic CO₂-assimilation, chlorophyll fluorescence and zeaxanthin accumulation in field grown maple trees in the course of a sunny and a cloudy day. *J Plant Physiol.* 148:399-412.

Schloss, P. D.; Larget, B. R. y Handelsman, J. 2004. Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. *Appl Environ Microbiol* 70: 5485-5492.

Schloss, P. D. y Handelsman, J. 2005. Introducing DOTUR, a Computer Program for Defining Operational Taxonomic Units and Estimating Species Richness. *Appl Environ Microbiol.* 71:1501-1506.

Schloss, P. D. y Handelsman, J. 2006. Introducing SONS, a tool for operational taxonomic unit-based comparisons of microbial community memberships and structures. *Appl Environ Microbiol.* 72:6773-6779.

Schuhmacher-Wolz, U., Dieter, H.H., Klein, D. y Schneider, K. 2009. Oral exposure to inorganic arsenic: evaluation of its carcinogenic and non-carcinogenic effects. *Critical reviews in toxicology.* 39(4):271-298.

Schutter, M. y Dick, R. 2001. Shifts in substrate utilization potential and structure of soil microbial communities in response to carbon substrates. *Soil Biol Biochem.* 33:1481-1491.

Schwab, A. P. y Banks, M. K. 1994. Biologically mediated dissipation of polyaromatic hydrocarbons in the root zone. Pages 132-141. En: *Bioremediation Through Rhizosphere Technology*. Anderson, T.A., and Coats, J.R. eds. American Chemical Society. Washington. DC.

Schwab, A. P.; Banks, M. K. y Arunachalam, M. 1995. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in rhizosphere soil. Pages 23-29. En: *Bioremediation of Recalcitrant Organics*. R. E. Hinchey; D. B. Anderson; and R. E. Hoepfel, eds. Battelle Memorial Institute, Columbus, OH, U. S. A.

Schwieger, F. y Tebbe, C. C. 2000. Effect of field inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the composition of bacterial communities in rhizospheres of a target plant (*Medicago sativa*) and a non-target plant (*Chenopodium album*)—linking of 16 S rRNA gene-based single-strand conformation polymorphism community profiles to the diversity of cultivated bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 66:3556-3565.

Sekhar, K. C.; Kamla, C. T.; Chary, N. S.; Sastry, A. R. K.; Nageswara Rao, T. y Vairamani, M. 2004. Removal of lead from aqueous solutions using an immobilized biomaterial derived from a plant biomass. *J Hazard Mater. B* 108:111-117

Seoáñez, M. 1998. Ingeniería del medio ambiente aplicada al medio natural continental. Segunda edición. Ediciones mundi-prensa, España.

Shann, J. R. y Boyle, J. J. 1994. Influence of plant species on in situ rhizosphere degradation. Pages 70-81. En: *Bioremediation Through Rhizosphere Technology*. Anderson, T.A., and Coats, J.R. eds. American Chemical Society. Washington. D.C.

Shannon, C. E. y Weaver, W. 1963. The mathematical theory of communication. University Illinois Press. Urbana, Illinois. p. 117.

Shen, B., Du, L.; Sanchez, C.; Edwards, D. J.; Chen M. y Murrell, J. M. 2001. The biosynthetic gene cluster for the anticancer drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 as a model for hybrid peptide-polyketide natural product biosynthesis. *J Ind Microbiol Biotechnol* 27:378–385.

Shimizu, Y., Rokudai, M., Tohya, S., Kayaware, E., Yazawa, T., Tanaka, H., y Eguchi, K. 1989. Filtration characteristics of charged alumina membranes for methanogenic waste. *J. Chem. Eng. Japan* 22:635–641.

Shimp, J. F.; Tracy, J. C.; Davis, L. C.; Lee, E. y Huang, W. 1993. Beneficial effects of plants in the remediation of soil and ground-water contaminated with organic materials. *Environ Sci Technol.* 23:41-77.

Shinoga, Y.; Akagi, J.; Uchihashi, Y.; Hiráis, A.; Yukawa, H. Yurimoto, H. Sakai, Y. y Kato, N. 2005. Anaerobic degradation of aromatic compounds by *Magnetospirillum* strains: Isolation and degradation genes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69:1483-1491.

Shokrollzadeh, S.; Azizmohseni, F.; Golmohammad, F.; Shokouhi, H. y Khademahaghighat, F. 2008. Biodegradation potential and bacterial diversity of a petrochemical wastewater treatment plant in Iran. *Bioresour Technol.* 99:6127-6133.

Siciliano, S. D.; Theoret, C. M.; de Freitas, J. R.; Hucl, P. J. y Germida, J. J. 1998. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. *Can J Microbiol.* 44:844-851.

Siciliano, S. D. y Greer, C. W. 2000. Plant-bacterial combinations to phytoremediate soil contaminated with high concentrations of 2,4,6-trinitrotoluene. *J Environ Qual.* 29(1):311-316.

Silva, C. C.; Ederson, C. J.; Torres, A. P. R.; Sousa, M. P.; Santiago, V. M. J. y Oliveira, V. M. 2010. Investigation of bacterial diversity in membrane bioreactor and conventional activated sludge processes from petroleum refineries using phylogenetic and statistical approaches. *J Microbiol Biotechnol.* 20(3):447-45.

Silva, C. C.; Viero, A. F.; Días, A. C. F.; Andreote, F. D.; Jesús, E. J.; De Paula, S. O.; Torres, A. P. R.; Santiago, V. M. J. y Oliveira, V. M. Monitoring the bacterial community dynamics in petroleum refinery wastewater membrane bioreactor fed with a high phenolic load. *J Microbiol Biotechnol.* Doi: 10.4014/jmb.0906.06001 [In press.].

Silva, I. S.; Grossman, M. y Durrant, L. R. 2009 a. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2–7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi. *Int Biodeterior Biodegrad.* 63(2):224-9.

Silva, I. S.; Dos Santos, E. C.; de Menezes, C. R.; de Faria, A. F.; Franciscon, E.; Grossman, M. y Durrant, L. R. 2009 b. Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresour Technol.* 100:4669–75.

Simon, L.; Biró, B. y Balázsy, S. 2008. Impact of *Pseudomonas* and Ethylene on the Cadmium and Nickel Rhizofiltration of Sunflower, Squash, and Indian Mustard. *Communications. En: Soil Science and Plant Analysis.* 39(15-16):2440-2455.

Singer, A. C.; Gilbert, E. S.; Luepromchai, E. y Crowley, D. E. 2000. Bioremediation of polychlorinated biphenyl- contaminated soil using carvone and surfactant-grown bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 54:838-843.

Singer, A. C.; Jury, W.; Luepromchai, E.; Yahng, C. S. y Crowley, D. E. 2001. Contribution of earthworms to PCB bioremediation. *Soil Biol Biochem.* 33:765-776.

Singer, A. C.; Smith, D.; Jury, W. A.; Hathuc, K. y Crowley, D. E. 2003 a. Impact of the plant rhizosphere and augmentation on remediation of polychlorinated biphenyl contaminated soil. *Environ Toxicol Chem.* 22(9):1998-2004.

Singer, A. C.; Crowley, D. E. y Thompson, I. P. 2003 b. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends Biotechnol.* 21:123-130.

Singer, A. C.; van der Gast, C. J. y Thompson, I. P. 2005. Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation. *Trends Biotechnol.* 23:74-7.

Singer, M. E. y Finnerty, W. R. 1984. Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes. En: Atlas, R.M. (Ed.), *Petroleum Microbiology*. Macmillan Inc., pp. 1-59.

Singh, A.; Eapen, S. y Fulekar, M. H. 2009. Potential of *Medicago sativa* for uptake of cadmium from contaminated environment. *Rom Biotechnol Lett.* 14(1):4164-4169.

Singleton, D. R.; Furlong, M. A.; Rathbun, S. L. y Whitman, W. B. 2001. Quantitative comparisons of 16s rRNA gene sequences libraries from environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 67:4374-4376.

Sipma, J.; Svitelskaya, A.; Van der Marka, B.; Pol, L. W. H.; Lettinga, G.; Buismana, C. J. N. y Janssen, A. J. H. 2004. Potentials of biological oxidation processes for the treatment of spent sulfidic caustics containing thiols. *Water Res.* 38:4331-4340.

Skoko, N.; Vujovic, J.; Savic, M.; Papic, N.; Vasiljevic, B. y Ljubijankic, G. 2005. Construction of *Saccharomyces cerevisiae* strain FAV20 useful in detection of immunosuppressants produced by soil actinomycetes. *J Microbiol Methods* 61:137-140.

Smalla, K.; Wieland, G.; Buchner, A.; Zock, A.; Parzy, J.; Kaiser, S.; Roskot, N.; Heuer, H. y Berg, G. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl Environ Microbiol.* 67:4742-4751.

Smith, E. P. y Van Belle, G. 1984. Nonparametric estimation of species richness. *Biometric.* 40:119-129.

Snaird, J.; Amann, R.; Huber, I.; Ludwig, W. y Schleifer, K. H. 1997. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol.* 63:2884-2896.

Soderberg, K. H.; Probanza, A.; Jumpponen, A. y Bååth, E. 2004. The microbial community in the rhizosphere determined by community-level physiological profiles (CLPP) an direct soil and cfu-PLFA techniques. *Appl Soil Ecol.* 25:135-145.

Sokal, R. R. y Rohlf, F. J. 1979. *Biometría*. H. Blume (ed.) pp. 832.

Somers, E.; Vanderleyden, J. y Srinivasan, M. 2004. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit Rev Microbiol.* 304:205-240.

Sørensen, S.J.; Schyberg, T. y Rønn, R. 1999. Predation by protozoa on *Escherichia coli* K12 in soil and transfer of resistance plasmid RP4 to indigenous bacteria in soil. *Appl Soil Ecol.* 11:79-90.

Soukupová, J., Smatanová, S., Nedbal, L. and Jegorov, A. 2003. Plant response to destruxins visualized by imaging of chlorophyll fluorescence. *Physiol Plant* 118:399-405.

Spadaro, J. T. 2000. Natural attenuation assessment of a highly impacted trichloroethene site. Pages 129-136. En: Natural Attenuation Considerations and Case Studies: Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. G. B. Wickramanayake, A. R. Gavaskar, and M.E. Kelley, eds. Battelle Press, Columbus, OH, U.S.A.

Stallwood, B.; Shears, J.; Williams, P. A. y Hughes, K. A. 2005. Low temperature bioremediation of oil-contaminated soil using biostimulation and bioaugmentation with a *Pseudomonas* sp. from maritime Antarctica. J Appl Microbiol. 99:794–802.

Stamper, D. M.; Walch, M. y Jacobs, R. N. 2003. Bacterial population changes in a membrane bioreactor for graywater treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoretic analysis of 16S rRNA gene fragments. Appl Environ Microbiol. 69:852-860.

Stanier, R. Y.; Palleroni, N. J. y Doudoroff, M. 1966. The aerobic *Pseudomonas*: a taxonomic study. J Gen Microbiol. 43:159-271.

Stephenson, D. y Stephenson, T. 1992. Bioaugmentation for enhancing biological waste-water treatment. Biotechnol Adv. 10:549-559.

Stevens, N. C. A. 1989. The application of bioaugmentation to waste-water treatment. Int Biodeter. 25:87-95.

Strain, H. H.; Cope, B. T. y Svec, W. A. 1971. Methods in enzymology. 23:452.

Strom, S. L. 2008. Microbial ecology of ocean biogeochemistry: A community perspective. Science. 320:1043-1045.

Strong, L. C.; McTavish, H.; Sadowsky, M. J. y Wackett, L. P. 2000. Field-scale remediation of atrazine-contaminated soil using recombinant *Escherichia coli* expressing atrazine chlorohydrolase. Environ Microbiol. 2:91-8.

Su, Y. y Yang, X. 2009. Interactions between selected PAHs and the microbial community in rhizosphere of a paddy soil. Sci Total Environ. 407(3):1027-1034.

Sun, Y. y Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic material from ethanol production: A review. Biores Technol. 83:1-11.

Sutherland, M. W. 1991. The generation of oxygen radicals during host plant response to infection. Physiol Mol Plant Pathol. 39:79-93.

Swanell, R. P. J. y Head, I. M. 1994. Bioremediation come of age. Nature. 368:396-397.

Swinnen, J.; Van Veen, J. A. y Merckx, R. 1994. ¹⁴C pulse labelling of field grown spring wheat: an evaluation of its use in rhizosphere carbon budget estimation. Soil Biol Biochem. 26:161-170.

Taiz, L. y Zeiger, E. 1991. Plant Physiology. Benjamin=Cummings, Redwood City, CA.

Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. y Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. MBE. 24:1596-1599.

Tang, W. H. 1994. Yield-increasing bacteria (yib) and biocontrol of sheath blight of rice. En: *Improving Plant Productivity With Rhizosphere Bacteria* (M.J. Ryder, P.M. Stephens Y G.D. Bowen, Eds.). Commonwealth Scientific And Industrial Research Organization, Adelaide, Australia, 267-278.

Tant, C. O. y Bennett, E. O. 1956. The isolation of pathogenic bacteria from used emulsion oils. *Appl Microbiol.* 4:332-338.

Tao, S.; Cui, Y.H.; Xu, F. L.; Li, B. G.; Cao, J.; Liu, W. X.; Schmitt, G.; Wang, X. J.; Shen, W. R.; Qing, B. P. y Sun, R. 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soils and vegetables from Tianjin. *Sci Total Environ.* 320:11-24.

Tausz, M.; Wonisch, A.; Grill, D.; Morales, D. y Jiménez, M. S. 2003. Measuring antioxidants in tree species in the natural environment: from sampling to data evaluation. *J Exp Bot.* 54:1505-1510.

Taylor, G. T. 2001. Evaluation of the potential of biodegradation for the disposal of cutting fluid from the machining of uranium. *Inter Biodeter Biodegr.* 47:215-224.

Tazi-Pain, A.; Schrotter, J. C.; Bord, G.; Payreaudeau, M. y Buisson, H. 2002. Recent improvement of the BIOSEP_ process for industrial and municipal wastewater treatment. *Desalination.* 146:439-443.

Terán Díaz, C. R. 2006. Vertidos industriales: Los reactores biológicos de membranas (RBM) y la industria de la alimentación y bebidas. 2º Diálogo internacional sobre la Crisis Mundial del Agua (Gestión Sostenible del Agua en las Ciudades).

Terje, K. 1984. Effects of oil pollution on the germination and vegetative growth of five species of vascular plant. *J Oil Petroleum Pollute.* 2:25-30.

Thomas, V.G.; Roberts, M.J. y Harrison, P.T.C. 2009. Assessment of the environmental toxicity and carcinogenicity of tungsten-based shot. *Ecotoxicol Environ Saf.* 72(4):1031-7.

Thompson, I.P.; van der Gast, C. J.; Ciric, L. y Singer, A. C. 2005. Minireview: Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environ Microbiol.* 7:909-15.

Tiedje, J. M. y Stein, J. L. 1999. Microbial biodiversity: Strategies for its recovery. En: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Demain, A.L., and Davies, J.E. (eds) Washington DC: American Society for Microbiology Press, pp. 682-692.

Timmusk, S. y Wagner, E. G. H. 1999. The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: A possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Mol Plant Microbe Interact.* 12(11):951-959.

Top, E. M.; Springael, D. y Boon N. 2002. Catabolic mobile elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soil and waters. *FEMS Microbiol Ecol.* 42:199-208.

Torsvik, V.; Goksoyr, J. y Daae, F. L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 56:782–787.

Torsvik, V.; Daae, F. L.; Sandaa, R. A. y Ovreas, L. 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J Biotechnol.* 64:53-62.

Tront, J. M. y Saunders, F. M. 2006. Role of plant activity and contaminant speciation in aquatic plant assimilation of 2,4,5 – trichlorophenol. *Chemosphere.* 64(3):400-407.

Tukaj, Z. y Aksmann, A. 2007. Toxic effects of anthraquinone and phenanthrenequinone upon *Scenedesmus* strains (green algae) at low and elevated concentration of CO₂. *Chemosphere.* 66:480-487.

Turgut, C. 2005. Uptake and modeling of pesticides by roots and shoots of parrotfeather (*Myriophyllum aquaticum*). *Environ Sci Pollut Res Int.* 12(6):342-346.

Ueno, A.; Hasanuzzaman, M.; Yumoyo, I. y Okuyama, H. 2006. Verification of degradation of n-alkanes in diesel oil by *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG in soil microcosms. *Curr Microbiol.* 52:182-5.

Ullrich, R.; Nuske, J.; Scheibner, K.; Spantzel, J. y Hofrichter, M. 2004. Novel haloperoxidase from the agaric basidiomycete *Agrocybe aegerita* oxidizes aryl alcohols and aldehydes. *Appl Environ Microbiol* 70:4575–4581.

US Environmental Protection Agency 1988. Technology Screening Guide for Treatment of CERCLA soils and sludges. EPA/ 540/288/004, Washington DC.

USEPA 1994. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, 3rd edn. US Environmental Protection Agency, Cincinnati EPA/600/ 4-91/002.

USEPA 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, 5th edn. US Environmental Protection Agency, Washington DC EPA-812-R02-012.

Uren, N. C. 2001. Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. *The Rhizosphere – Biochemistry and Organic Substances at the Soil–Plant Interface* (Pinton R, Varanini Z & Nannipieri P, eds), pp. 1–22. Marcel Dekker Inc., New York.

Uren, N. C. 2007. Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. In *The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*, ed. R Pinton, Z Varanini, P Nannipieri, pp. 1–21. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis Group. 2nd ed.

Vancura, V. y Hovadik, A. 1965. Root exudates of plants. Composition of root exudates of some vegetables. *Plant Soil*. 27:21-32.

Van der Gast, C. J.; Knowles, C. J.; Wright, M. A. y Thompson, I. P. 2001. Identification and characterisation of bacterial populations of an in-use metal-working fluid by phenotypic and genotypic methodology. *Int Biodeterior Biodegradation*. 47:113-123.

Van der Gast, C. J.; Knowles, C. J.; Starkey, M. y Thompson, I. P. 2002. Selection of microbial consortia for treating metal-working fluids. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 29:20–27.

Van der Gast, C. J.; Whiteley, A. S.; Lilley, A. K.; Knowles, C. J. y Thompson, I. P. 2003. Bacterial community structure and function in a metalworking fluid. *Environ Microbiol*. 5(6):453-461.

Van der Gast, C. J.; Whiteley, A. S. y Thompson, I. P. 2004. Temporal dynamics and degradation activity of an bacterial inoculum for treating waste metal-working fluid. *Environ Microbiol*. 6(3):254-263.

Van Hulten, M.; Pelsler, M.; Van Loon, L. C.; Pieterse, M. J. y Ton, J. 2006. Costs and benefits of priming for defence in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:5602-5607.

Van Overbeek, L. y Van Elsas, J. D. 2008. Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). *FEMS Microbiol Ecol*. 64:283-296.

Van Veen, J. A.; Liljeroth, E. y Lekkerkerk, L. J. A. 1991. Carbon fluxes in plant-soil systems at elevated atmospheric CO₂ levels. *Ecol Appl*. 1:175-185.

Van Veen, J. A.; Van Overbeek, L. S. y Van Elsas, J. D. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol Mol Biol Rev*. 61:121-35.

Van Vliet, P. C. J.; Bloem, J. y de Goede, R.G.M. 2006. Microbial diversity, nitrogen loss and grass production after addition of Effective Micro-organisms¹ (EM) to slurry manure. *Applied Soil Ecology*. 32:188–198.

Vancura, V. y Hovadik, A. 1965. Root exudates of plants. II. Composition of root exudates of some vegetables. *Plant Soil*. 27:21-32.

Varazashvili, T.; Khatishashvili, G.; Kurashvili, M.; Pruidze, M.; Ananiashvili, T.; Zaalishvili, G. y Gordeziani, M. 2001 a. Nitrobenzene oxidizing enzymes in plant cells. *J Biol Phy Chem*. 1:85-88.

Varazashvili, T.; Zaalishvili, G.; Kurashvili, M.; Pruidze, M. y Gordeziani, M. 2001 b. Participation of the plant monooxygenase system in adaptation to environmental stress. *J Biol Phy Chem*. 1:38-42.

Vassilev, A.; Berova, M. y Zlatev, Z. 1998. Influence of Cd²⁺ on growth, chlorophyll content, and water relations in young barley plants. *Biol Plant*. 41(4):601-606.

Vassilev, A. y Manolov, P. 1999. Chlorophyll fluorescente of Barley (*H. Vulgare* L.) seedlings brown in excess of Cd. Bulg. J. Plant Physiol. 25(3-4):67-76.

Venema, J. H.; Posthumus, F.; De Vries, M. y Van Hasselt, P. R. 1999 Differential response of domestic and wild *Lycopersicon* species to chilling under low light: growth, carbohydrate content, photosynthesis and the xanthophyll cycle. Physiol Plant. 105:81-88.

Vera, R.; Millán, R.; Schmid, T.; Tallos, A. y Recreo, F. 2002. Behaviour of mercury in the soil-plant system. Application to phytoremediation studies. In: Faz A, Ortiz R, Mermut AR (eds) Sustainable use and management of soils in arid and semiarid regions. Sumass 2002 Cartagena (Spain) Quaderna editorial Vol II, pp 482–483.

Vera Tomé, F. 2008. Elimination of natural uranium and ²²⁶Ra from contaminated waters by rhizofiltration using *Helianthus annuus* L. Sci Total Environ. 393(2-3):351.

Vidali, M. 2005. Bioremediation. An overview. Pure Appl. Chem. 73(7);1163–1172.

Viero, A. F.; Melo, T. M.; Torres, A. P. R.; Ferreira, N. R.; Sant'Anna Jr., G. L.; Borges, C. P. y Santiago, V. M. J. 2008. The effects of long-term feeding of high organic loading in a submerged membrane bioreactor treating oil refinery wastewater. J Membrane Sci. 319:223-230.

Vogel, T. M. 1996. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. Curr Opin Biotechnol. 7:311-6.

Vogel, T. M., y Walter, M. V. 2001. Bioaugmentation. En: Manual of Environmental Microbiology. Hurst, C. J., Crawford, R. L., Knudsen, G. R., McInerney, M. J., and Stetzenbach, L. D. (eds). Washington DC: American Society for Microbiology Press, pp. 952–959.

Voget, S.; Leggewie, C.; Uesbeck, A.; Raasch, C.; Jaeger, K. E. y Streit, W. R., 2003. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. Appl Environ Microbiol 69:6235–6242.

Voget, S.; Steele, H. L. y Streit, W. R. 2006. Characterization of a metagenome derived halo tolerant cellulase. J Biotechnol 126:26-36.

Volkering, F.; Breure, A. M. y Rulkens, W. H. 1998. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. Biodegradation. 8:401-417.

Von Holy, A. 1989. Susceptibility of metalworking fluids to microbiological contamination in service. S Afr J Sci. 85:149-151.

Wagner, M. y Loy, A. 2002. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. Curr Opin Biotechnol. 13:218-227.

Walker, T. S.; Bais, H. P.; Grotewold, E. y Vivanco, J. M. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. Plant Physiol. 132:44-51.

Walton, B. A., Hoylman, A. M., Perez, M. M., Anderson, T. A., Johnson, T. R., Guthrie, E. A., Christman, R. F., 1994 a. Rhizosphere microbial communities as a plant defense against toxic substances in soils. En: Anderson, T.A., Coats, J.R. (Eds.). Bioremediation through rhizosphere technology, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 82±92.

Walton, B. A.; Guthrie, E. A. y Hoylman, A. M. 1994 b. Toxicant degradation in the rhizosphere. En: Anderson, T.A., Coats, J.R. (Eds.). Bioremediation through rhizosphere technology, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 11-26.

Wan, C. Y.; De Wever, H.; Diels, L.; Thoeye, C.; Liang, J. B. y Huang, L. N. 2010. Biodiversity and population dynamics of microorganisms in a full-scale membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. *Water research*. 45:1129-1138.

Wang, J. Y.; Yang, L.; Tseng, C. y Hsu, H. 2008. Application of phytoremediation on soil contaminated by pyrene. *Environ Eng Sci*. 25(6):829-838.

Wang, Q. ; Cui, Y. y Dong, Y. 2002. Phytoremediation of polluted waters potentials and prospects of wetland plants. *Acta Biotechnol*. 22:199–208.

Wang, Q.; Garrity, G. M.; Tiedje, J. M. y Cole, J. R. 2007. Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbio*. 73:5261–5267.

Wang, X.; Yu, X. y Bartha, E. 1990. Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbon residues in soil. *Environ Sci Technol*. 24:1086-1089.

Wang, X.; Wen, X.; Yan, H.; Ding, K.; Zhao, F. y Hu, M. 2011. Bacterial community dynamics in a functionally stable pilot-scale wastewater treatment plant. *Bioresour Technol*. 102:2352-2357.

Wang, Y. y Oyaizu, H. 2009. Evaluation of the phytoremediation potential of four plant species for dibenzofuran-contaminated soil. *J hazard mater*. 168:760-764.

Ward, N.; Rainey, F. A.; Goebel, B. y Stackenbrandt, E. 1995. Identification and culturing the 'unculturables': a challenge for microbiologists. En: *Microbial Diversity and Ecosystem Function*. Allsopp, D., Colwell R. R., and Hawksworth, D.L. (eds). Wallingford: CAB International, pp. 89-110.

Watanabe, K. 2001 Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr Opin Biotechnol*. 12:237–241.

Watt, M. y Evans, J. 1999. Proteoid roots physiology and development. *Plant Physiol*. 121:317-323.

Weber, M; Harada, E; Vess, C; Von Roepenack-Lahaye, E. y Clemens, S. 2004. Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *Plant J*. 37:269-281.

Wei, W.; Zhang, C.; Liu, A. L.; Xie, S. H.; Chen, X. M. y Lu, W. Q. 2009. Effect of PCB153 on BaP-induced genotoxicity in HepG2 cells via modulation of metabolic enzymes. *Mutat Res. – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 675:71-76.

Weissenfels, W. D.; Beyer, M. y Klein, J. 1990. Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene by pure bacterial cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*. 32:479-484.

Weller, D. M. y Thomashow, L. S. 1994. Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. Pages 1-17. En: *Molecular Ecology of Rhizosphere Organisms*. F. O'Gara, D. N. Dowling and B. Boesten, eds. VCH Verlagsgesellschaft mbH., Weinheim, Germany.

Wells, G. F.; Park, H. D.; Yeung, C. H.; Eggleston, B.; Francis, C. A. y Criddle, C. S. 2009. Ammonia-oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge bioreactor: *betaproteobacterial* dynamics and low relative abundance of *Crenarchaea*. *Environ Microbiol*. 11:2310-2328.

Wenzel, W. W.; Adriano, D. C.; Salt, D. y Smith, R. 1999. Phytoremediation: a plant-microbe-based remediation system. En: *Bioremediation of Contaminated Soils*, Agronomy Monograph no. 37.

Werck, D.; Hehn, A. y Didierjean, L. 2000. Cytochrome P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends Plant Sci*. 5:116-123.

Westover, K.; Kennedy, A. C. y Kelleys, S. E. 1997. Patterns of the rhizosphere microbial community structure associated with co-occurring plant species. *J Ecol*. 85:863-873.

Wever, H.; Weiss, S.; Reemtsm, T.; Vereecken, V.; Muller, J.; Knepper, T. 2007. Comparison of sulfonated and other micropollutants removal in membrane bioreactor and conventional wastewater treatment. *Water Res*. 41:935-945.

Wittebolle, L.; Vervaeren, H.; Verstraete, W. y Boon, N. 2008. Quantifying community dynamics of nitrifiers in functionally stable reactors. *Appl Environ Microbiol*. 74:286-293.

Wittich, R. M. y Wolff, P. 2007. Growth of the genetically engineered strain *Cupriavidus necator* RW112 with chlorobenzoates and technical chlorobiphenyls. *Microbiology*. 153:186-95.

Whipps, J. M. 1987. Effect of media on growth and interaction between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytol*. 107:127-142.

White, C.; Tardif, J. C.; Adkins, A. y Staniforth, R. 2005. Functional diversity of microbial communities in the mixed boreal plain forest of central Canada. *Soil Biol Biochem*. 37:1359–1372.

Wolfe, N. L. y Hoehamer, C. F., 2003. Enzymes used by plants and microorganisms to detoxify organic compounds. En: *Phytoremediation. Transformation and control of contaminants* (McCutcheon S.C., Schnoor J.L., eds). Wiley, NY, USA. pp. 159-187.

- World health organization (WHO)** 2004. Guidelines for Drinking Water Quality. Geneva, WHO. www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3/en/index.html
- Wolski, E. A.; Murialdo, S. E. y Gonzales, J. F.** 2006. Effect of pH and inoculum size on pentachlorophenol degradation by *Pseudomonas sp.* *Water SA*. 32:1-5.
- Wong, K. K. Y. y Saddler, J. N.** 1992. Applications of hemicellulases in the food, feed and pulp and paper industries. In Coughlan PP, Hazlewood GP (eds) *Hemicellulose and Hemicellulases*. Portland Press, London, pp. 127-143.
- Wu, S. C.; Cheung, K. C.; Luo, Y. M. y Wong, M. H.** 2005. Effects of inoculation of plant growth promoting rhizobacteria on metal uptake by *Brassica juncea*. *Environ Pollut*. 140(1):124-135.
- Xing, X.J.; Rui, Q.; Du, M. y Wang, D.Y.** 2009. Exposure to lead and mercury in young larvae induces more severe deficits in neuronal survival and synaptic function than in adult nematodes. *Arch Environ Contam Toxicol*. 56(4):732-41.
- Xu, S. Y.; Chen, Y. X.; Lin, K. F.; Lin, Q.; Li, F. y Wang, Z. W.** 2009. Removal of Pyrene from contaminated soils by *White clover*. *Pedosphere*. 19(2):265-272.
- Yang, M.; Chang, Y.; Kim, J.; Shin, J. y Lee, M.** 2008. Study of the rhizofiltration by using *Phaseolus vulgaris var.*, *Brassica juncea (L.) Czern.*, *Helianthus annuus L.* to remove Caesium from groundwater. *Geochim Cosmochim Acta*. 72(12):1056.
- Yang, X.; Margolies, D.; Zhu, K. y Buschman, L.** 2001. Host plant-induced changes in detoxification enzymes and susceptibility to pesticide in the two spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *Entomol Soc Of America*. 94:381-387.
- Yang, X. E. y Roemheld, V.** 1999. Physiological and genetic aspect of micronutrient uptake by higher plants. In: Nielsen, editor. *Genetics and molecular biology of plant nutrition*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; p. 151–86.
- Yang, X. E.; Long, X. X.; Ni, W. Z. y Fu, C. X.** 2002a. *Sedum alfredii* H: a new Zn hyperaccumulating plant first found in China. *China Sci Bull*. 47(19):1634-7.
- Yang, X. E.; Long, X. X. y Ni, W. Z.** 2002b. Physiological and molecular mechanisms of heavy metal uptake by hyperaccumulating plant species. *J Plant Nutr Fert* 8:8-15.
- Yang, X. E.; Long, X. X.; Ye, H. B.; He, Z. L.; Stoffella, P. J. y Calvert, D. V.** 2004. Cadmium tolerance and hyperaccumulation in a new Zn-hyperaccumulating plant species (*Sedum alfredii* Hance). *Plant Soil*. 259(1-2):181-9.
- Yee, D. C.; Maynard, J. A. y Wood, T. K.** 1998. Rhizoremediation of trichloroethylene by a recombinant, root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain expressing toluene *ortho*-monooxygenase constitutively. *Appl Environ Microbiol*. 64:112-118.
- Yen, K. M. y Gunsalus, I. C.** 1982. Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 79:874-878.

Yerson, T. A.; Kruger, E. L. y Coats, J. R. 1994. Enhanced degradation of a mixture of three herbicides in the rhizosphere of a herbicide-tolerant plant. *Chemosphere* 28:1551-1557.

Yoshitomi, K. J. y Shann, J. R. 2001. Corn (*Zea mays* L.) root exudates and their impact on ¹⁴C – pyrene mineralization. *Soil Biol Biochem.* 33:1769-1776.

Yu, S. H.; Ke, L.; Wong, Y. S. y Tam, N. F. Y. 2005. Degradation of polycyclic aromatic (PAHs) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environ Int.* 32:149-54.

Yun, J.; Seowon, K.; Sulhee, P.; Hyunjin, Y.; Myo-Jeong, K.; Sunggi, H. y Sangyeol, R. 2004. Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil- derived metagenomic library. *Appl Environ Microbiol.* 70(12):7229-7235.

Zablutowicz, R. M.; Hoagland, R. E. y Locke, M. A. 1994. Glutathione S-transferase activity in rhizosphere bacteria and the potential for herbicide detoxification. Pages 184-198. En: *Bioremediation through rhizosphere technology.* Anderson, T.A., and Coats, J.R. eds. American Chemical Society. Washington. D.C.

Zalesny, R. S. Jr. y Bauer, E.O. 2007. Evaluation of *Populus* and *Salix* continuously irrigated with landfill leachate II. Soils and early tree development. *Int. J. Phytoremediat.* 9(4):307-323.

Zhang, F. S.; Ma, J. y Cao, Y. P. 1997. Phosphorus deficiency enhances root exudation of low-molecular weight organic acids and utilization of sparingly soluble inorganic phosphates by radish (*Raphanus sativus* L.) and rape (*Brassica napus* L.) plants. *Plant Soil.* 1996:261-264.

Zhang, H.; Dang, Z. y Zheng, L.C. 2009. Remediation of soil co-contaminated with pyrene and cadmium by growing maize (*Zea mays* L.). *Int J Environ Sci Tch.* 6(2):249-258.

Zhang, Z.; Schwartz, S.; Wagner, L. y Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol.* 7(1-2):203-14.

Zumstein, E.; Moletta, R. y Godon, J. J. 2000. Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ Microbiol.* 2:69-78.

Zuzana, S.; Katarina, D. y Livia, T. 2008. Biodegradation and ecotoxicity of soil contaminated by pentachlorophenol applying bioaugmentation and addition of sorbents. *World J Microbiol Biotechnol.* 10.1007/s11274-008-9885-1

ANEXO 1: LEGISLACIÓN

Índice legislativo

A1.1. CONSTITUCIÓN ESPAÑOLA: Artículo 45 -----	419
A1.2. DIRECTIVA 2000/60/CE, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas (DOCE nº L-327 de 22/12/2000): Considerando (1) y artículos 1 a 3 -----	421
A1.3. REAL DECRETO LEGISLATIVO 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas (BOE nº 176, de 24/07/2001): Artículo 1 y Título V, Capítulos I y II -----	427
A1.4. DIRECTIVA 91/271/CEE, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas (DOCE nº L-135 de 30/05/1991) -----	433
A1.5. REAL DECRETO-LEY 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas (BOE nº 312, de 30/12/1995) -----	447
A1.6. REAL DECRETO 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas (BOE nº 77, de 29/03/1996) -----	451
A1.7. LEY AUTONÓMICA 10/1993, de 26 de octubre, de la Comunidad de Madrid, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento (BOCAM nº 269 de 12/11/1993) -----	455
A1.8. LEY AUTONÓMICA 5/2003, de 20 de marzo, de Residuos de la Comunidad de Madrid (BOCAM nº 76 de 31/03/2003): Disposición adicional segunda.- Modificación de la Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento -----	465
A1.9. DECRETO 57/2005, de 30 de junio, de la Comunidad de Madrid, por el que se revisan los Anexos de la Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento (BOCAM nº 159 de 06/07/2005) -----	467
A1.10. ORDENANZA GENERAL PARA LA PROTECCIÓN DEL MEDIO AMBIENTE DEL MUNICIPIO DE GETAFE (BOCAM nº 154 de 30/06/2004, suplemento): Título I, Capítulo I: Normas Generales y Título IV: Normas particulares aguas -----	471

A1.1. CONSTITUCIÓN ESPAÑOLA: Artículo 45



**BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO
GACETA DE MADRID**

Depósito Legal M. 1-1958 Año CCCXVIII Viernes 29 de diciembre de 1978 Núm. 311.1

**CONSTITUCION
ESPAÑOLA**

**APROBADA POR LAS CORTES EN SESIONES PLENARIAS
DEL CONGRESO DE LOS DIPUTADOS Y DEL SENADO CELEBRADAS
EL 31 DE OCTUBRE DE 1978**

**RATIFICADA POR EL PUEBLO ESPAÑOL EN REFERENDUM
DE 6 DE DICIEMBRE DE 1978**

**SANCIONADA POR S. M. EL REY ANTE LAS CORTES
EL 27 DE DICIEMBRE DE 1978**

Artículo 40

1. Los poderes públicos promoverán las condiciones favorables para el progreso social y económico y para una distribución de la renta regional y personal más equitativa, en el marco de una política de estabilidad económica. De manera especial realizarán una política orientada al pleno empleo.

2. Asimismo, los poderes públicos fomentarán una política que garantice la formación y readaptación profesionales; velarán por la seguridad e higiene en el trabajo y garantizarán el descanso necesario, mediante la limitación de la jornada laboral, las vacaciones periódicas retribuidas y la promoción de centros adecuados.

Artículo 41

Los poderes públicos mantendrán un régimen público de Seguridad Social para todos los ciudadanos, que garantice la asistencia y prestaciones sociales suficientes ante situaciones de necesidad, especialmente en caso de desempleo. La asistencia y prestaciones complementarias serán libres.

Artículo 42

El Estado velará especialmente por la salvaguardia de los derechos económicos y sociales de los trabajadores españoles en el extranjero y orientará su política hacia su retorno.

Artículo 43

1. Se reconoce el derecho a la protección de la salud.

2. Compete a los poderes públicos organizar y tutelar la salud pública a través de medidas preventivas y de las prestaciones y servicios necesarios. La ley establecerá los derechos y deberes de todos al respecto.

3. Los poderes públicos fomentarán la educación sanitaria, la educación física y el deporte. Asimismo facilitarán la adecuada utilización del ocio.

Artículo 44

1. Los poderes públicos promoverán y tutelarán el acceso a la cultura, a la que todos tienen derecho.

2. Los poderes públicos promoverán la ciencia y la investigación científica y técnica en beneficio del interés general.

Artículo 45

1. Todos tienen el derecho a disfrutar de un medio ambiente adecuado para el desarrollo de la persona, así como el deber de conservarlo.

2. Los poderes públicos velarán por la utilización racional de todos los recursos naturales, con el fin de proteger y mejorar la calidad de la vida y defender

y restaurar el medio ambiente, apoyándose en la indispensable solidaridad colectiva.

3. Para quienes violen lo dispuesto en el apartado anterior, en los términos que la ley fije se establecerán sanciones penales o, en su caso, administrativas, así como la obligación de reparar el daño causado.

Artículo 46

Los poderes públicos garantizarán la conservación y promoverán el enriquecimiento del patrimonio histórico, cultural y artístico de los pueblos de España y de los bienes que lo integran, cualquiera que sea su régimen jurídico y su titularidad. La ley penal sancionará los atentados contra este patrimonio.

Artículo 47

Todos los españoles tienen derecho a disfrutar de una vivienda digna y adecuada. Los poderes públicos promoverán las condiciones necesarias y establecerán las normas pertinentes para hacer efectivo este derecho, regulando la utilización del suelo de acuerdo con el interés general para impedir la especulación.

La comunidad participará en las plusvalías que genere la acción urbanística de los entes públicos.

Artículo 48

Los poderes públicos promoverán las condiciones para la participación libre y eficaz de la juventud en el desarrollo político, social, económico y cultural.

Artículo 49

Los poderes públicos realizarán una política de previsión, tratamiento, rehabilitación e integración de los disminuidos físicos, sensoriales y psíquicos a los que prestarán la atención especializada que requieran y los ampararán especialmente para el disfrute de los derechos que este Título otorga a todos los ciudadanos.

Artículo 50

Los poderes públicos garantizarán, mediante pensiones adecuadas y periódicamente actualizadas, la suficiencia económica a los ciudadanos durante la tercera edad. Asimismo, y con independencia de las obligaciones familiares, promoverán su bienestar mediante un sistema de servicios sociales que atenderán sus problemas específicos de salud, vivienda, cultura y ocio.

Artículo 51

1. Los poderes públicos garantizarán la defensa de los consumidores y usuarios, protegiendo, mediante procedimientos eficaces, la seguridad, la salud y los legítimos intereses económicos de los mismos.

2. Los poderes públicos promoverán la información y la educación de los consumidores y usuarios, fomentarán sus organizaciones y oírán a éstas en las

A1.2. DIRECTIVA 2000/60/CE, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas (DOCE nº L- 327 de 22/12/2000): Considerando (1) y artículos 1 a 3

22.12.2000

ES

Diario Oficial de las Comunidades Europeas

L 327/1

I

(Actos cuya publicación es una condición para su aplicabilidad)

**DIRECTIVA 2000/60/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO
de 23 de octubre de 2000**

por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas

EL PARLAMENTO EUROPEO
Y EL CONSEJO DE LA UNIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea y, en particular, el apartado 1 de su artículo 175,

Vista la propuesta de la Comisión⁽¹⁾,

Visto el dictamen del Comité Económico y Social⁽²⁾,

Visto el dictamen del Comité de las Regiones⁽³⁾,

De conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 251 del Tratado⁽⁴⁾, a la vista del texto conjunto aprobado por el Comité de Conciliación el 18 de julio de 2000,

Considerando lo siguiente:

(1) El agua no es un bien comercial como los demás, sino un patrimonio que hay que proteger, defender y tratar como tal.

(2) En las conclusiones del seminario ministerial sobre la política de aguas de la Comunidad, celebrado en Fráncfort en 1988, se puso de manifiesto la necesidad de una legislación comunitaria que aborde la calidad ecológica. El Consejo, en su Resolución de 28 de junio de 1988⁽⁵⁾, solicitaba a la Comisión que presentara propuestas para mejorar la calidad ecológica de las aguas superficiales comunitarias.

⁽¹⁾ DO C 184 de 17.6.1997, p. 20, DO C 16 de 20.1.1998, p. 14 y DO C 108 de 7.4.1998, p. 94.

⁽²⁾ DO C 355 de 21.11.1997, p. 83.

⁽³⁾ DO C 180 de 11.6.1998, p. 38.

⁽⁴⁾ Dictamen del Parlamento Europeo de 11 de febrero de 1999 (DO C 150 de 28.5.1999, p. 419), confirmado el 16 septiembre de 1999. Posición Común del Consejo de 22 de octubre de 1999 (DO C 343 de 30.11.1999, p. 1) y Decisión del Parlamento Europeo de 16 de febrero de 2000 (no publicada aún en el Diario Oficial). Decisión del Parlamento Europeo de 7 de septiembre de 2000 y Decisión del Consejo de 14 de septiembre de 2000.

⁽⁵⁾ DO C 209 de 9.8.1988, p. 3.

(3) En la declaración del seminario ministerial sobre aguas subterráneas, celebrado en La Haya en 1991, se reconocía la necesidad de adoptar medidas para evitar el deterioro a largo plazo de los aspectos cualitativos y cuantitativos de las aguas dulces y se solicitó la aplicación de un programa de medidas antes del año 2000 encaminado a lograr la gestión sostenible y la protección de los recursos hídricos. En sus Resoluciones de 25 de febrero de 1992⁽⁶⁾ y de 20 de febrero de 1995⁽⁷⁾, el Consejo exigió un programa de actuación en materia de aguas subterráneas y una revisión de la Directiva 80/68/CEE del Consejo, de 17 de diciembre de 1979, relativa a la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas⁽⁸⁾ en el marco de una política general de protección de las aguas dulces.

(4) Las aguas de la Comunidad están sometidas a la creciente presión que supone el continuo crecimiento de la demanda de agua de buena calidad en cantidades suficientes para todos los usos; el 10 de noviembre de 1995, en su Informe «El medio ambiente en la Unión Europea — 1995», la Agencia Europea del Medio Ambiente presentó un estudio actualizado sobre el estado del medio ambiente en el que se confirmaba la necesidad de tomar medidas para proteger las aguas comunitarias tanto en términos cualitativos como cuantitativos.

(5) El 18 de diciembre de 1995, el Consejo adoptó unas Conclusiones en las que exigía, entre otras cosas, la elaboración de una nueva Directiva marco que estableciera los principios básicos de una política de aguas sostenible en la Unión Europea e invitaba a la Comisión a que presentara una propuesta.

(6) El 21 de febrero de 1996, la Comisión adoptó una Comunicación al Consejo y al Parlamento Europeo relativa a la política de aguas de la Comunidad Europea, en la que se enunciaban los principios de una política de aguas de la Comunidad.

(7) El 9 de septiembre de 1996, la Comisión presentó una propuesta de Decisión del Parlamento Europeo y del

⁽⁶⁾ DO C 59 de 6.3.1992, p. 2.

⁽⁷⁾ DO C 49 de 28.2.1995, p. 1.

⁽⁸⁾ DO L 20 de 26.1.1980, p. 43; Directiva modificada por la Directiva 91/692/CEE (DO L 377 de 31.12.1991, p. 48).

- (45) Los Estados miembros deben adoptar medidas para erradicar la contaminación de las aguas superficiales por las sustancias prioritarias y para reducir progresivamente la contaminación por otras sustancias que, de no disminuir, impediría a los Estados miembros lograr los objetivos establecidos para las masas de agua superficial.
- (46) Para garantizar la participación del público en general, incluidos los usuarios, en el establecimiento y la actualización de los planes hidrológicos de cuenca, es necesario facilitar información adecuada de las medidas previstas y de los progresos realizados en su aplicación, a fin de que el público en general pueda aportar su contribución antes de que se adopten las decisiones finales sobre las medidas necesarias.
- (47) La presente Directiva debe garantizar una serie de mecanismos para superar los obstáculos a la mejora del estado del agua, cuando éstos no se inscriban en el ámbito de aplicación de la legislación de aguas de la Comunidad, con miras a elaborar estrategias comunitarias adecuadas para su resolución.
- (48) La Comisión debe presentar anualmente un plan actualizado de cualesquiera iniciativas que tenga intención de proponer en el sector del agua.
- (49) Deben establecerse especificaciones técnicas para garantizar un enfoque coherente en la Comunidad en el marco de la presente Directiva. Los criterios para la evaluación del estado de las aguas constituyen un importante avance. La adaptación de determinados aspectos técnicos de la presente Directiva al progreso técnico y a la normalización de los métodos de supervisión, muestreo y análisis ha de realizarse mediante el procedimiento de comité. Con el fin de promover una profunda comprensión y una aplicación coherente de los criterios de caracterización de las demarcaciones hidrográficas y para la evaluación del estado de las aguas, la Comisión podrá adoptar orientaciones sobre la aplicación de dichos criterios.
- (50) Las medidas que se hayan de adoptar para la ejecución de la presente Directiva deben aprobarse con arreglo a la Decisión 1999/468/CE del Consejo, de 28 de junio de 1999, por la que se establecen los procedimientos para el ejercicio de las competencias de ejecución atribuidas a la Comisión⁽¹⁾.
- (51) La aplicación de la presente Directiva permitirá alcanzar un nivel de protección de las aguas equivalente, como mínimo, al previsto en determinadas disposiciones existentes que deben ser derogadas una vez se apliquen plenamente las correspondientes disposiciones de la presente Directiva.
- (52) Las disposiciones de la presente Directiva incorporan el marco de control de la contaminación causada por sustancias peligrosas establecido en la Directiva 76/464/CEE⁽²⁾. En consecuencia, dicha Directiva debe ser derogada una vez se apliquen plenamente las correspondientes disposiciones de la presente Directiva.
- (53) Ha de garantizarse la plena aplicación y el cumplimiento de la legislación medioambiental vigente relativa a la protección de las aguas. Es necesario garantizar la correcta aplicación de las disposiciones que den cumplimiento a la presente Directiva en todo el territorio de la Comunidad mediante sanciones apropiadas previstas en la normativa de los Estados miembros. Esas sanciones deben ser efectivas, proporcionadas y disuasivas,

HAN ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

Objeto

El objeto de la presente Directiva es establecer un marco para la protección de las aguas superficiales continentales, las aguas de transición, las aguas costeras y las aguas subterráneas que:

- a) prevenga todo deterioro adicional y proteja y mejore el estado de los ecosistemas acuáticos y, con respecto a sus necesidades de agua, de los ecosistemas terrestres y humedales directamente dependientes de los ecosistemas acuáticos;
- b) promueva un uso sostenible del agua basado en la protección a largo plazo de los recursos hídricos disponibles;
- c) tenga por objeto una mayor protección y mejora del medio acuático, entre otras formas mediante medidas específicas de reducción progresiva de los vertidos, las emisiones y las pérdidas de sustancias prioritarias, y mediante la interrupción o la supresión gradual de los vertidos, las emisiones y las pérdidas de sustancias peligrosas prioritarias;
- d) garantice la reducción progresiva de la contaminación del agua subterránea y evite nuevas contaminaciones; y
- e) contribuya a paliar los efectos de las inundaciones y sequías,

⁽¹⁾ DO L 184 de 17.7.1999, p. 23.

⁽²⁾ DO L 129 de 18.5.1976, p. 23; Directiva modificada por la Directiva 91/692/CEE (DO L 377 de 31.12.1991, p. 48).

y que contribuya de esta forma a:

- garantizar el suministro suficiente de agua superficial o subterránea en buen estado, tal como requiere un uso del agua sostenible, equilibrado y equitativo,
- reducir de forma significativa la contaminación de las aguas subterráneas,
- proteger las aguas territoriales y marinas, y
- lograr los objetivos de los acuerdos internacionales pertinentes, incluidos aquellos cuya finalidad es prevenir y erradicar la contaminación del medio ambiente marino, mediante medidas comunitarias previstas en el apartado 3 del artículo 16, a efectos de interrumpir o suprimir gradualmente los vertidos, las emisiones y las pérdidas de sustancias peligrosas prioritarias, con el objetivo último de conseguir concentraciones en el medio marino cercanas a los valores básicos por lo que se refiere a las sustancias de origen natural y próximas a cero por lo que respecta a las sustancias sintéticas artificiales

Artículo 2

Definiciones

A efectos de la presente Directiva se entenderá por:

- 1) «aguas superficiales»: las aguas continentales, excepto las aguas subterráneas; las aguas de transición y las aguas costeras, y, en lo que se refiere al estado químico, también las aguas territoriales;
- 2) «aguas subterráneas»: todas las aguas que se encuentran bajo la superficie del suelo en la zona de saturación y en contacto directo con el suelo o el subsuelo;
- 3) «aguas continentales»: todas las aguas quietas o corrientes en la superficie del suelo y todas las aguas subterráneas situadas hacia tierra desde la línea que sirve de base para medir la anchura de las aguas territoriales;
- 4) «río»: una masa de agua continental que fluye en su mayor parte sobre la superficie del suelo, pero que puede fluir bajo tierra en parte de su curso;
- 5) «lago»: una masa de agua continental superficial quieta;
- 6) «aguas de transición»: masas de agua superficial próximas a la desembocadura de los ríos que son parcialmente salinas como consecuencia de su proximidad a las aguas costeras, pero que reciben una notable influencia de flujos de agua dulce;
- 7) «aguas costeras»: las aguas superficiales situadas hacia tierra desde una línea cuya totalidad de puntos se encuentra a una distancia de una milla náutica mar adentro desde el punto más próximo de la línea de base que sirve para medir la anchura de las aguas territoriales y que se extienden, en su caso, hasta el límite exterior de las aguas de transición;
- 8) «masa de agua artificial»: una masa de agua superficial creada por la actividad humana;
- 9) «masa de agua muy modificada»: una masa de agua superficial que, como consecuencia de alteraciones físicas producidas por la actividad humana, ha experimentado un cambio sustancial en su naturaleza, designada como tal por el Estado miembro con arreglo a lo dispuesto en el anexo II;
- 10) «masa de agua superficial»: una parte diferenciada y significativa de agua superficial, como un lago, un embalse, una corriente, río o canal, parte de una corriente, río o canal, unas aguas de transición o un tramo de aguas costeras;
- 11) «acuífero»: una o más capas subterráneas de roca o de otros estratos geológicos que tienen la suficiente porosidad y permeabilidad para permitir ya sea un flujo significativo de aguas subterráneas o la extracción de cantidades significativas de aguas subterráneas;
- 12) «masa de agua subterránea»: un volumen claramente diferenciado de aguas subterráneas en un acuífero o acuíferos;
- 13) «cuenca hidrográfica»: la superficie de terreno cuya escorrentía superficial fluye en su totalidad a través de una serie de corrientes, ríos y, eventualmente, lagos hacia el mar por una única desembocadura, estuario o delta;
- 14) «subcuenca»: la superficie de terreno cuya escorrentía superficial fluye en su totalidad a través de una serie de corrientes, ríos y, eventualmente, lagos hacia un determinado punto de un curso de agua (generalmente un lago o una confluencia de ríos);
- 15) «demarcación hidrográfica»: la zona marina y terrestre compuesta por una o varias cuencas hidrográficas vecinas y las aguas subterráneas y costeras asociadas, designada con arreglo al apartado 1 del artículo 3 como principal unidad a efectos de la gestión de las cuencas hidrográficas;
- 16) «autoridad competente»: la o las autoridades designadas con arreglo a los apartados 2 y 3 del artículo 3;
- 17) «estado de las aguas superficiales»: la expresión general del estado de una masa de agua superficial, determinado por el peor valor de su estado ecológico y de su estado químico;

- 18) «buen estado de las aguas superficiales»: el estado alcanzado por una masa de agua superficial cuando tanto su estado ecológico como su estado químico son, al menos, buenos;
- 19) «estado de las aguas subterráneas»: la expresión general del estado de una masa de agua subterránea, determinado por el peor valor de su estado cuantitativo y de su estado químico;
- 20) «buen estado de las aguas subterráneas»: el estado alcanzado por una masa de agua subterránea cuando tanto su estado cuantitativo como su estado químico son, al menos, buenos;
- 21) «estado ecológico»: una expresión de la calidad de la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos asociados a las aguas superficiales, que se clasifica con arreglo al anexo V;
- 22) «buen estado ecológico»: el estado de una masa de agua superficial, que se clasifica como tal con arreglo al anexo V;
- 23) «buen potencial ecológico»: el estado de una masa de agua muy modificada o artificial, que se clasifica como tal con arreglo a las disposiciones pertinentes del anexo V;
- 24) «buen estado químico de las aguas superficiales»: el estado químico necesario para cumplir los objetivos medioambientales para las aguas superficiales establecidos en la letra a) del apartado 1 del artículo 4, es decir, el estado químico alcanzado por una masa de agua superficial en la que las concentraciones de contaminantes no superan las normas de calidad medioambiental establecidas en el anexo IX y con arreglo al apartado 7 del artículo 16, así como en virtud de otras normas comunitarias pertinentes que fijen normas de calidad medioambiental a nivel comunitario;
- 25) «buen estado químico de las aguas subterráneas»: el estado químico alcanzado por una masa de agua subterránea que cumple todas las condiciones establecidas en el cuadro 2.3.2 del anexo V;
- 26) «estado cuantitativo»: una expresión del grado en que afectan a una masa de agua subterránea las extracciones directas e indirectas;
- 27) «recursos disponibles de aguas subterráneas»: el valor medio interanual de la tasa de recarga total de la masa de agua subterránea, menos el flujo interanual medio requerido para conseguir los objetivos de calidad ecológica para el agua superficial asociada según las especificaciones del artículo 4, para evitar cualquier disminución significativa en el estado ecológico de tales aguas, y cualquier daño significativo a los ecosistemas terrestres asociados;
- 28) «buen estado cuantitativo»: el estado definido en el cuadro 2.1.2 del anexo V;
- 29) «sustancias peligrosas»: las sustancias o grupos de sustancias que son tóxicas, persistentes y pueden causar bioacumulación, así como otras sustancias o grupos de sustancias que entrañan un nivel de riesgo análogo;
- 30) «sustancias prioritarias»: sustancias identificadas de acuerdo con el apartado 2 del artículo 16 y enumeradas en el anexo X. Entre estas sustancias se encuentran las «sustancias peligrosas prioritarias», sustancias identificadas de acuerdo con los apartados 3 y 6 del artículo 16 para las que deban adoptarse medidas de conformidad con los apartados 1 y 8 del artículo 16;
- 31) «contaminante»: cualquier sustancia que pueda causar contaminación, en particular las sustancias enumeradas en el anexo VIII;
- 32) «vertido directo»: vertido de contaminantes en el agua subterránea sin atravesar el suelo o el subsuelo;
- 33) «contaminación»: la introducción directa o indirecta, como consecuencia de la actividad humana, de sustancias o calor en la atmósfera, el agua o el suelo, que puedan ser perjudiciales para la salud humana o para la calidad de los ecosistemas acuáticos, o de los ecosistemas terrestres que dependen directamente de ecosistemas acuáticos, y que causen daños a los bienes materiales o deterioren o dificulten el disfrute y otros usos legítimos del medio ambiente;
- 34) «objetivos medioambientales»: los objetivos establecidos en el artículo 4;
- 35) «norma de calidad medioambiental»: la concentración de un determinado contaminante o grupo de contaminantes en el agua, los sedimentos o la biota, que no debe superarse en aras de la protección de la salud humana y el medio ambiente;
- 36) «planteamiento combinado»: control de vertidos y emisiones en aguas superficiales de acuerdo con el enfoque expuesto en el artículo 10;
- 37) «aguas destinadas al consumo humano»: una expresión de significado igual al que establece la Directiva 80/778/CEE, modificada por la Directiva 98/83/CE;
- 38) «servicios relacionados con el agua»: todos los servicios en beneficio de los hogares, las instituciones públicas o cualquier actividad económica, consistentes en:
- a) la extracción, el embalse, el depósito, el tratamiento y la distribución de aguas superficiales o subterráneas;

- b) la recogida y depuración de aguas residuales, que vierten posteriormente en las aguas superficiales;
- 39) «uso del agua»: los servicios relacionados con el agua junto con cualquier otra actividad contemplada en el artículo 5 y en el anexo II que tenga repercusiones significativas en el estado del agua.

Este concepto se aplica a los efectos del artículo 1 y del análisis económico efectuado con arreglo al artículo 5 y a la letra b) del anexo III;

- 40) «valores límite de emisión»: la masa, expresada como algún parámetro concreto, la concentración y/o el nivel de emisión, cuyo valor no debe superarse dentro de uno o varios períodos determinados. También podrán establecerse valores límite de emisión para determinados grupos, familias o categorías de sustancias, en particular para las definidas con arreglo al artículo 16.

Los valores límite de emisión de las sustancias se aplicarán generalmente en el punto en que las emisiones salgan de la instalación y en su determinación no se tendrá en cuenta una posible dilución. En lo que se refiere a los vertidos indirectos en el agua, podrá tenerse en cuenta el efecto de una estación depuradora de aguas residuales a la hora de determinar los valores límite de emisión de la instalación, a condición de que se garantice un nivel equivalente de protección del medio ambiente en su conjunto y de que no origine mayores niveles de contaminación en el medio ambiente;

- 41) «controles de emisión»: los controles que exigen una limitación específica de las emisiones, por ejemplo un valor límite de emisión, o que imponen límites o condiciones a los efectos, naturaleza u otras características de una emisión o de unas condiciones de funcionamiento que afecten a las emisiones. El empleo del término «control de emisión» en la presente Directiva, con respecto a las disposiciones de cualquier otra Directiva, no se considerará en modo alguno como una reinterpretación de dichas disposiciones.

Artículo 3

Coordinación de disposiciones administrativas en las demarcaciones hidrográficas

1. Los Estados miembros especificarán las cuencas hidrográficas situadas en su territorio nacional y, a los efectos de la presente Directiva, las incluirán en demarcaciones hidrográficas. Las cuencas hidrográficas pequeñas podrán, en su caso, combinarse con cuencas más grandes o agruparse con pequeñas cuencas hidrográficas vecinas para formar una demarcación hidrográfica. En caso de que las aguas subterráneas no correspondan plenamente a ninguna cuenca hidrográfica en particular, se especificarán e incluirán en la demarcación hidrográfica más próxima o más apropiada. Las aguas costeras se especificarán e incluirán en la demarcación o demarcaciones hidrográficas más próximas o más apropiadas.

2. Los Estados miembros adoptarán las disposiciones administrativas adecuadas, incluida la designación de la autoridad competente apropiada, para la aplicación de las normas de la presente Directiva en cada demarcación hidrográfica situada en su territorio.

3. Los Estados miembros velarán por que cualquier cuenca hidrográfica que abarque el territorio de más de un Estado miembro se incluya en una demarcación hidrográfica internacional. A petición de los Estados miembros interesados, la Comisión intervendrá para facilitar su inclusión en dichas demarcaciones hidrográficas internacionales.

Cada uno de los Estados miembros adoptará las disposiciones administrativas adecuadas, incluida la designación de la autoridad competente apropiada, para la aplicación de las normas de la presente Directiva en la parte de cualquier demarcación hidrográfica internacional situada en su territorio.

4. Los Estados miembros velarán por que los requisitos de la presente Directiva encaminados al logro de los objetivos medioambientales establecidos en el artículo 4 y en particular todos los programas de medidas se coordinen para la demarcación hidrográfica en su conjunto. En lo que respecta a las demarcaciones hidrográficas internacionales, los Estados miembros interesados efectuarán dicha coordinación de forma conjunta y podrán, a tal fin, utilizar las estructuras existentes derivadas de acuerdos internacionales. A petición de los Estados miembros interesados, la Comisión intervendrá para facilitar el establecimiento de los programas de medidas.

5. Cuando una demarcación hidrográfica se extienda más allá del territorio de la Comunidad, el Estado miembro o los Estados miembros interesados se esforzarán por establecer una coordinación adecuada con los Estados no miembros concernidos, con el fin de lograr los objetivos de la presente Directiva en toda la demarcación hidrográfica. Los Estados miembros velarán por la aplicación en su territorio de las normas de la presente Directiva.

6. Los Estados miembros podrán designar un organismo nacional o internacional preexistente como autoridad competente a los efectos de la presente Directiva.

7. Los Estados miembros designarán la autoridad competente a más tardar en la fecha mencionada en el artículo 24.

8. Los Estados miembros facilitarán a la Comisión una lista de sus autoridades competentes y de las autoridades competentes de los organismos internacionales en los que participen, a más tardar seis meses después de la fecha mencionada en el artículo 24. Con respecto a cada autoridad competente, se facilitará la información indicada en el anexo I.

9. Los Estados miembros informarán a la Comisión acerca de cualesquiera cambios que se produzcan en la información facilitada en aplicación del apartado 8 en los tres meses siguientes a haberse producido dichos cambios.

A.1.3. REAL DECRETO LEGISLATIVO 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la LEY DE AGUAS (BOE nº 176, de 24/07/2001): Artículo 1 y Título V, Capítulos I y II

BOE núm. 176

Martes 24 julio 2001

26791

Artículo 14. *Entrada en vigor.*

1. El presente Acuerdo se aplicará provisionalmente a partir de su firma.

2. Cada parte comunicará a la otra el cumplimiento de los procedimientos exigidos por su legislación interna para la entrada en vigor del presente Acuerdo. El Acuerdo entrará en vigor en la fecha de recepción de la última notificación.

3. El Acuerdo tendrá un período inicial de vigencia de cinco años y se renovará tácitamente por períodos consecutivos de dos años; cualquiera de las partes podrá comunicar por escrito su intención de no renovar el Acuerdo, debiendo hacerlo con un preaviso mínimo de seis meses antes de la fecha de expiración, en el caso del período inicial de vigencia, y con un preaviso de tres meses en los demás supuestos.

4. En caso de denuncia y mientras la parte remitente no haya comunicado sus intenciones a la parte receptora, el material e información clasificados comunicados durante la vigencia del Acuerdo, así como cualquier información derivada de acuerdos, contratos o subcontratos concluidos en el marco del presente Acuerdo y todavía en vigor o en curso de ejecución, seguirán tratándose de conformidad con las disposiciones estipuladas, aun cuando su transmisión tenga lugar después de la denuncia del Acuerdo por una u otra de las partes.

Artículo 15. *Clarificaciones.*

1. La no exigencia estricta por una de las partes de cualquiera de los términos del presente Acuerdo o el no ejercicio de alguno de los derechos que se les confiere no serán interpretados como derogación o renuncia de su derecho a acogerse a ese término o derecho en el futuro.

2. Los títulos de los artículos sólo se tomarán como referencia al contenido de los mismos y no serán utilizados para limitar o ampliar la interpretación de las disposiciones a las que se refiere el título.

3. Ninguna de las partes tiene derecho a asignar o transferir sus derechos u obligaciones en virtud del presente Acuerdo sin el consentimiento escrito de la otra parte.

Artículo 16. *Notificaciones.*

1. Toda notificación o comunicación relacionada con la aplicación de las disposiciones de seguridad en el marco del presente Acuerdo se enviará a las direcciones siguientes:

MODSP. Ministerio de Defensa. Dirección General del Centro Superior de Información de la Defensa, avenida del Padre Huidobro, kilómetro 8,5, nacional VI, E-28071 Madrid.

MODSUIZA. VBS Generalstab. AIOS. Sektion Informationschutz und Industriesicherheit. CH-3003 Bern.

2. Toda comunicación proveniente de cualquiera de las partes en el presente Acuerdo se hará por escrito en el idioma inglés.

Artículo 17. *Relación del presente Acuerdo con otros anteriores.*

El presente Acuerdo pone fin a cualquier otro acuerdo, oral o escrito, sobre el mismo asunto celebrado entre las partes.

En fe de lo cual, los representantes de las partes, debidamente autorizados para ello, firman el presente Acuerdo.

Hecho en Madrid, el 22 de mayo de 2001, en doble ejemplar, dos textos en español, dos textos en inglés y dos textos en alemán, todos ellos igualmente auténticos.

Por el Reino de España,
Javier Calderón Fernández,
Director del CESID

Por Suiza,
Joseph Doswald,
Embajador de Suiza en España

El presente Acuerdo se aplica provisionalmente desde el 22 de mayo de 2001, fecha de su firma, según se establece en su artículo 14.1.

Lo que se hace público para conocimiento general. Madrid, 19 de junio de 2001.—El Secretario general técnico, Julio Núñez Montesinos.

MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE

14276 REAL DECRETO LEGISLATIVO 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas.

La disposición final segunda de la Ley 46/1999, de 13 de diciembre, de modificación de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas, en la redacción dada por la Ley 6/2001, de 8 de mayo, de Evaluación de Impacto Ambiental, autoriza al Gobierno para que, en el plazo de dos años a partir de su entrada en vigor, dicte un Real Decreto Legislativo en el que se refunda y adapte la normativa legal existente en materia de aguas.

Para ello, se hace preciso incorporar las modificaciones que en el texto de la Ley de Aguas, se introducen por la propia Ley 46/1999, antes citada y por la sentencia del Tribunal Constitucional 227/1988, de 29 de noviembre, en la que se estiman parcialmente tanto los recursos de inconstitucionalidad interpuestos contra la Ley de Aguas, como el conflicto positivo de competencias planteado contra determinados preceptos del Reglamento del Dominio Público Hidráulico; por la disposición adicional 9.ª 2 de la Ley 42/1994, de 30 de diciembre, de Medidas fiscales, administrativas y del orden social que modifica los apartados 1.º, segundo párrafo y 2.º, del artículo 109 de la Ley de Aguas en materia de sanciones; por los artículos 2 y 3 de la Ley 9/1996, de 15 de enero, en la que se adoptan medidas extraordinarias, excepcionales y urgentes en materia de abastecimientos hidráulicos como consecuencia de la persistencia de la sequía, modificando y ampliando respectivamente los artículos 63 y 109.2 de la Ley de Aguas; por los artículos 158, 173 y 174 de la Ley 13/1996, de 30 de diciembre, de Medidas fiscales, administrativas y del orden social, relativos a la gestión directa de la construcción o explotación de determinadas obras públicas, al régimen jurídico del contrato de concesión de construcción y explotación de obras hidráulicas, así como a la modificación del artículo 21 de la Ley de Aguas, al que añade un nuevo apartado y, finalmente, por la Ley 11/1999, de 21 de abril, de modificación de la Ley 7/1985, de 2 de abril, reguladora de las Bases de Régimen Local, y otras medidas para el desarrollo

del Gobierno Local en materia de tráfico, circulación de vehículos a motor, seguridad vial y en materia de aguas, que modifica y amplía respectivamente, los artículos 17 y 25 de la Ley de Aguas, relativos al Consejo Nacional del Agua y a la composición de la Junta de Gobierno de los Organismos de cuenca.

Por otra parte, y a pesar de su rango legal, no se ha entendido adecuado incluir en el texto refundido, el Real Decreto-ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas. Esta norma constituye un complemento de lo dispuesto en la Ley de Aguas en relación con los vertidos, pero tiene, sin duda, otros objetivos y afecta a otros ámbitos legislativos diferentes, como ocurre con las aguas marítimas reguladas por la Ley de Costas. Por ello, sin perjuicio de su vigencia y aplicación, se entiende que su inclusión en el texto refundido de la Ley de Aguas ocasionaría importantes disfunciones desde el punto de vista de la técnica legislativa.

En consecuencia, se ha elaborado un texto refundido de la Ley de Aguas, que se incorpora a este Real Decreto Legislativo y que tiene por objeto, en cumplimiento del mandato legal, recoger las modificaciones que han quedado detalladas.

En su virtud, a propuesta del Ministro de Medio Ambiente, de acuerdo con el Consejo de Estado y previa deliberación del Consejo de Ministros en su reunión del día 20 de julio de 2001,

DISPONGO:

Artículo único.

Se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas que se inserta a continuación.

Disposición derogatoria única.

Quedan derogadas todas las disposiciones de igual o inferior rango que se opongan al presente Real Decreto legislativo y al texto refundido que aprueba y, en particular, las siguientes:

1. La Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas.
2. La Ley 46/1999, de 13 de diciembre, por la que se modifica la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas, excepto la disposición adicional primera.
3. La disposición adicional 9.^a, apartado 2, de la Ley 42/1994, de 30 de diciembre, de Medidas fiscales, administrativas y del orden social, que modifica los apartados 1.^o, segundo párrafo y 2.^o, del artículo 109 de la Ley de Aguas, de 1985, en materia de sanciones.
4. Los artículos 2 y 3 de la Ley 9/1996, de 15 de enero, en la que se adoptan medidas extraordinarias, excepcionales y urgentes en materia de abastecimientos hidráulicos como consecuencia de la persistencia de la sequía, modificando y ampliando, respectivamente, los artículos 63 y 109.2 de la Ley 29/1985.
5. Los artículos 158, 173 y 174 de la Ley 13/1996, de 30 de diciembre, de Medidas fiscales, administrativas y del orden social, relativos a la gestión directa de la construcción y/o explotación de determinadas obras públicas, al régimen jurídico del contrato de concesión de construcción y explotación de obras hidráulicas, así como a la modificación del artículo 21 de la Ley 29/1985, al que añade un nuevo apartado.
6. El artículo 3 de la Ley 11/1999, de 21 de abril, de modificación de la Ley 7/1985, de 2 de abril, reguladora de las Bases de Régimen Local, y otras medidas para el desarrollo del Gobierno Local en materia de tráfico, circulación de vehículos a motor, seguridad vial y en materia de aguas, que modifica y amplía, respectivamente, los artículos 17 y 25 de la Ley 29/1985, de Aguas.

Disposición final única.

El presente Real Decreto legislativo y el texto refundido que aprueba entrarán en vigor el día siguiente a de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Dado en Palma de Mallorca a 20 de julio de 2001.

JUAN CARLOS R.

El Ministro de Medio Ambiente,
JAIME MATAS I PALOU

TEXTO REFUNDIDO DE LA LEY DE AGUAS

TÍTULO PRELIMINAR

Artículo 1. *Objeto de la Ley.*

1. Es objeto de esta Ley la regulación del dominio público hidráulico, del uso del agua y del ejercicio de las competencias atribuidas al Estado en las materias relacionadas con dicho dominio en el marco de las competencias delimitadas en el artículo 149 de la Constitución.

2. Las aguas continentales superficiales, así como las subterráneas renovables, integradas todas ellas en el ciclo hidrológico, constituyen un recurso unitario, subordinado al interés general, que forma parte del dominio público estatal como dominio público hidráulico.

3. Corresponde al Estado, en todo caso, y en los términos que se establecen en esta Ley, la planificación hidrológica a la que deberá someterse toda actuación sobre el dominio público hidráulico.

4. Las aguas minerales y termales se regularán por su legislación específica.

TÍTULO I

Del dominio público hidráulico del Estado

CAPÍTULO I

De los bienes que lo integran

Artículo 2. *Definición de dominio público hidráulico.*

Constituyen el dominio público hidráulico del Estado, con las salvedades expresamente establecidas en esta Ley:

a) Las aguas continentales, tanto las superficiales como las subterráneas renovables con independencia del tiempo de renovación.

b) Los cauces de corrientes naturales, continuas o discontinuas.

c) Los lechos de los lagos y lagunas y los de los embalses superficiales en cauces públicos.

d) Los acuíferos subterráneos, a los efectos de los actos de disposición o de afección de los recursos hidráulicos.

e) Las aguas procedentes de la desalación de agua de mar una vez que, fuera de la planta de producción, se incorporen a cualquiera de los elementos señalados en los apartados anteriores.

Artículo 3. *Modificación de la fase atmosférica.*

La fase atmosférica del ciclo hidrológico sólo podrá ser modificada artificialmente por la Administración del Estado o por aquellos a quienes ésta autorice.

Artículo 89. Requisitos para el abastecimiento a varias poblaciones.

1. El otorgamiento de las concesiones para abastecimiento a varias poblaciones estará condicionado a que las Corporaciones Locales estén constituidas a estos efectos en Mancomunidades, Consorcios u otras entidades semejantes, de acuerdo con la legislación por la que se rijan, o a que todas ellas reciban el agua a través de una misma empresa concesionaria.

2. Con independencia de su especial estatuto jurídico, el consorcio o Comunidad de que se trate elaborará las ordenanzas previstas en el artículo 81.

Artículo 90. Comunidades de usuarios de vertidos.

Las entidades públicas, corporaciones o particulares que tengan necesidad de verter agua o productos residuales, podrán constituirse en comunidad para llevar a cabo el estudio, construcción, explotaciones y mejora de colectores, estaciones depuradoras y elementos comunes que les permitan efectuar el vertido en el lugar más idóneo y en las mejores condiciones técnicas y económicas, considerando la necesaria protección del entorno natural. El Organismo de cuenca podrá imponer justificadamente la constitución de esta clase de comunidades de usuarios.

Artículo 91. Otras comunidades de usuarios. Normas de aplicación.

Las disposiciones contenidas en los artículos anteriores podrán ser aplicadas a otros tipos de comunidades no mencionadas expresamente, y, entre ellas, a las de avenamiento o a las que se constituyan para la construcción, conservación y mejora de obras de defensa contra las aguas.

TÍTULO V**De la protección del dominio público hidráulico y de la calidad de las aguas continentales****CAPÍTULO I****Normas generales****Artículo 92. Objetivos de la protección.**

Son objetivos de la protección del dominio público hidráulico:

- Prevenir el deterioro del estado ecológico y la contaminación de las aguas para alcanzar un buen estado general.
- Establecer programas de control de calidad en cada cuenca hidrográfica.
- Impedir la acumulación de compuestos tóxicos o peligrosos en el subsuelo, capaces de contaminar las aguas subterráneas.
- Evitar cualquier otra acumulación que pueda ser causa de degradación del dominio público hidráulico.
- Recuperar los sistemas acuáticos asociados al dominio público hidráulico.

Reglamentariamente, se establecerán los niveles de calidad correspondientes a los estados indicados en el párrafo a) y los plazos para alcanzarlos.

Artículo 93. Concepto de contaminación.

Se entiende por contaminación, a los efectos de esta Ley, la acción y el efecto de introducir materias o formas

de energía, o inducir condiciones en el agua que, de modo directo o indirecto, impliquen una alteración perjudicial de su calidad en relación con los usos posteriores o con su función ecológica.

El concepto de degradación del dominio público hidráulico a efectos de esta Ley, incluye las alteraciones perjudiciales del entorno afecto a dicho dominio.

Artículo 94. Policía de aguas.

La policía de las aguas superficiales subterráneas y de sus cauces y depósitos naturales, zonas de servidumbre y perímetros de protección se ejercerá por la Administración hidráulica competente.

Artículo 95. Apeo y deslinde de los cauces de dominio público.

1. El apeo y deslinde de los cauces de dominio público corresponde a la Administración del Estado, que los efectuará por los Organismos de cuenca, según el procedimiento que reglamentariamente se determine.

2. El deslinde aprobado declara la posesión y la titularidad dominical a favor del Estado, dando lugar al amojonamiento.

3. La resolución de aprobación del deslinde será título suficiente para rectificar las inscripciones del Registro de la Propiedad contradictorias con el mismo, en la forma y condiciones que se determinen reglamentariamente, siempre que haya intervenido en el expediente el titular registral, conforme a la legislación hipotecaria. Dicha resolución será título suficiente, asimismo, para que la Administración proceda a la inmatriculación de los bienes de dominio público cuando lo estime conveniente. En todo caso los titulares de los derechos inscritos afectados podrán ejercitar las acciones que estimen pertinentes en defensa de sus derechos, siendo susceptible de anotación preventiva la correspondiente reclamación judicial.

Artículo 96. Zona de servidumbre y policía en embalses superficiales, lagos y lagunas.

1. Alrededor de los embalses superficiales, el Organismo de cuenca podrá prever en sus proyectos las zonas de servicio, necesarias para su explotación.

2. En todo caso, las márgenes de lagos, lagunas y embalses quedarán sujetas a las zonas de servidumbre y policía fijadas para las corrientes de agua.

Artículo 97. Actuaciones contaminantes prohibidas.

Queda prohibida, con carácter general, y sin perjuicio de lo dispuesto en el artículo 100, toda actividad susceptible de provocar la contaminación o degradación del dominio público hidráulico, y, en particular:

- Acumular residuos sólidos, escombros o sustancias, cualquiera que sea su naturaleza y el lugar en que se depositen, que constituyan o puedan constituir un peligro de contaminación de las aguas o de degradación de su entorno.
- Efectuar acciones sobre el medio físico o biológico afecto al agua, que constituyan o puedan constituir una degradación del mismo.
- El ejercicio de actividades dentro de los perímetros de protección, fijados en los Planes Hidrológicos, cuando pudieran constituir un peligro de contaminación o degradación del dominio público hidráulico.

Artículo 98. Limitaciones medioambientales a las autorizaciones y concesiones.

Los Organismos de cuenca, en las concesiones y autorizaciones que otorguen, adoptarán las medidas necesarias para hacer compatible el aprovechamiento con el respeto del medio ambiente y garantizar los caudales ecológicos o demandas ambientales previstas en la planificación hidrológica.

En la tramitación de concesiones y autorizaciones que afecten al dominio público hidráulico que pudieran implicar riesgos para el medio ambiente, será preceptiva la presentación de un informe sobre los posibles efectos nocivos para el medio, del que se dará traslado al órgano ambiental competente para que se pronuncie sobre las medidas correctoras que, a su juicio, deban introducirse como consecuencia del informe presentado. Sin perjuicio de los supuestos en que resulte obligatorio, conforme a lo previsto en la normativa vigente, en los casos en que el Organismo de cuenca presuma la existencia de un riesgo grave para el medio ambiente, someterá igualmente a la consideración del órgano ambiental competente la conveniencia de iniciar el procedimiento de evaluación de impacto ambiental.

Artículo 99. Protección de aguas subterráneas.

La protección de las aguas subterráneas frente a intrusiones de aguas salinas, de origen continental o marítimo, se realizará, entre otras acciones, mediante la limitación de la explotación de los acuíferos afectados y, en su caso, la redistribución espacial de las captaciones existentes. Los criterios básicos para ello serán incluidos en los Planes Hidrológicos de cuenca, correspondiendo al Organismo de cuenca la adopción de las medidas oportunas.

CAPÍTULO II**De los vertidos****Artículo 100. Concepto.**

1. A los efectos de la presente Ley, se considerarán vertidos los que se realicen directa o indirectamente en las aguas continentales, así como en el resto del dominio público hidráulico, cualquiera que sea el procedimiento o técnica utilizada. Queda prohibido, con carácter general, el vertido directo o indirecto de aguas y de productos residuales susceptibles de contaminar las aguas continentales o cualquier otro elemento del dominio público hidráulico, salvo que se cuente con la previa autorización administrativa.

2. La autorización de vertido tendrá como objeto la consecución del buen estado ecológico de las aguas, de acuerdo con las normas de calidad, los objetivos ambientales y las características de emisión e inmisión establecidas reglamentariamente en aplicación de la presente Ley. Esas normas y objetivos podrán ser concretados para cada cuenca por el respectivo plan hidrológico.

Por buen estado ecológico de las aguas se entiende aquel que se determina a partir de indicadores de calidad biológica, físico-químicos e hidromorfológicos, inherentes a las condiciones naturales de cualquier ecosistema hídrico, en la forma y con los criterios de evaluación que reglamentariamente se determinen.

3. Cuando se otorgue una autorización o se modifiquen sus condiciones, podrán establecerse plazos y programas de reducción de la contaminación para la pro-

gresiva adecuación de las características de los vertidos a los límites que en ella se fijen.

4. La autorización de vertido no exime de cualquier otra que sea necesaria, conforme a otras leyes para la actividad o instalación de que se trate.

Artículo 101. Autorización de vertido.

1. Las autorizaciones de vertidos establecerán las condiciones en que deben realizarse, en la forma que reglamentariamente se determine.

En todo caso, deberán especificar las instalaciones de depuración necesarias y los elementos de control de su funcionamiento, así como los límites cuantitativos y cualitativos que se impongan a la composición del efluente y el importe del canon de control del vertido definido en el artículo 113.

2. Las autorizaciones de vertido tendrán un plazo máximo de vigencia de cinco años, renovables sucesivamente, siempre que cumplan las normas de calidad y objetivos ambientales exigibles en cada momento. En caso contrario, podrán ser modificadas o revocadas de acuerdo con lo dispuesto en los artículos 104 y 105.

3. A efectos del otorgamiento, renovación o modificación de las autorizaciones de vertido el solicitante acreditará ante la Administración hidráulica competente, en los términos que reglamentariamente se establezcan, la adecuación de las instalaciones de depuración y los elementos de control de su funcionamiento, a las normas y objetivos de calidad de las aguas. Asimismo, con la periodicidad y en los plazos que reglamentariamente se establezcan, los titulares de autorizaciones de vertido deberán acreditar ante la Administración hidráulica las condiciones en que vierten.

Los datos a acreditar ante la Administración hidráulica, conforme a este apartado, podrán ser certificados por las entidades que se homologuen a tal efecto, conforme a lo que reglamentariamente se determine.

4. Las solicitudes de autorizaciones de vertido de las Entidades locales contendrán, en todo caso, un plan de saneamiento y control de vertidos a colectores municipales. Las Entidades locales estarán obligadas a informar a la Administración hidráulica sobre la existencia de vertidos en los colectores locales de sustancias tóxicas y peligrosas reguladas por la normativa sobre calidad de las aguas.

Artículo 102. Autorización de vertido en acuíferos y aguas subterráneas.

Cuando el vertido pueda dar lugar a la infiltración o almacenamiento de sustancias susceptibles de contaminar los acuíferos o las aguas subterráneas, sólo podrá autorizarse si el estudio hidrogeológico previo demostrase su inocuidad.

Artículo 103. Limitaciones a las actuaciones industriales contaminantes.

Las autorizaciones administrativas sobre establecimiento, modificación o traslado de instalaciones o industrias que originen o puedan originar vertidos, se otorgarán condicionadas a la obtención de la correspondiente autorización de vertido.

El Gobierno podrá prohibir, en zonas concretas, aquellas actividades y procesos industriales cuyos efluentes, a pesar del tratamiento a que sean sometidos, puedan constituir riesgo de contaminación grave para las aguas, bien sea en su funcionamiento normal o en caso de situaciones excepcionales previsibles.

Artículo 104. Revisión de las autorizaciones de vertido.

1. El Organismo de cuenca podrá revisar las autorizaciones de vertido en los siguientes casos:

- a) Cuando sobrevengan circunstancias que, de haber existido anteriormente, habrían justificado su denegación o el otorgamiento en términos distintos.
- b) Cuando se produzca una mejora en las características del vertido y así lo solicite el interesado.
- c) Para adecuar el vertido a las normas y objetivos de calidad de las aguas que sean aplicables en cada momento y, en particular, a las que para cada río, tramo de río, acuífero o masa de agua dispongan los Planes Hidrológicos de cuenca.

2. En casos excepcionales, por razones de sequía o en situaciones hidrológicas extremas, los Organismos de cuenca podrán modificar, con carácter general, las condiciones de vertido a fin de garantizar los objetivos de calidad.

Artículo 105. Vertidos no autorizados.

1. Comprobada la existencia de un vertido no autorizado, o que no cumpla las condiciones de la autorización, el Organismo de cuenca realizará las siguientes actuaciones:

- a) Incoar un procedimiento sancionador y de determinación del daño causado a la calidad de las aguas.
- b) Liquidará el canon de control de vertido, de conformidad con lo establecido en el artículo 113.

2. Complementariamente, el Organismo de cuenca podrá acordar la iniciación de los siguientes procedimientos:

- a) De revocación de la autorización de vertido, cuando la hubiera, para el caso de incumplimiento de alguna de sus condiciones.
- b) De autorización del vertido, si no la hubiera, cuando éste sea susceptible de legalización.
- c) De declaración de caducidad de la concesión de aguas en los casos especialmente cualificados de incumplimiento de las condiciones o de inexistencia de autorización, de los que resulten daños muy graves en el dominio público hidráulico.

3. Las revocaciones y declaraciones de caducidad acordadas conforme al apartado anterior no darán derecho a indemnización.

Artículo 106. Suspensión de actividades que originan vertidos no autorizados.

El Gobierno, en el ámbito de sus competencias, podrá ordenar la suspensión de las actividades que den origen a vertidos no autorizados, de no estimar más procedente adoptar las medidas precisas para su corrección, sin perjuicio de la responsabilidad civil, penal o administrativa en que hubieran podido incurrir los causantes de los mismos.

Artículo 107. Explotación de depuradoras por el Organismo de cuenca.

El Organismo de cuenca podrá hacerse cargo directa o indirectamente, por razones de interés general y con carácter temporal, de la explotación de las instalaciones de depuración de aguas residuales, cuando no fuera procedente la paralización de las actividades que producen el vertido y se derivasen graves inconvenientes del incumplimiento de las condiciones autorizadas.

En este supuesto, el Organismo de cuenca reclamará del titular de la autorización, incluso por vía de apremio:

- a) Las cantidades necesarias para modificar o acondicionar las instalaciones en los términos previstos en la autorización.
- b) Los gastos de explotación, mantenimiento y conservación de las instalaciones.

Artículo 108. Empresas de vertido.

Podrán constituirse empresas de vertido para conducir, tratar y verter aguas residuales de terceros. Las autorizaciones de vertido que a su favor se otorguen, incluirán, además de las condiciones exigidas con carácter general, las siguientes:

- a) Las de admisibilidad de los vertidos que van a ser tratados por la empresa.
- b) Las tarifas máximas y el procedimiento de su actualización periódica.
- c) La obligación de constituir una fianza para responder de la continuidad y eficacia de los tratamientos.

La cuantía de la fianza y los efectos que se deriven de la revocación de la autorización se determinarán reglamentariamente.

CAPÍTULO III**De la reutilización de aguas depuradas****Artículo 109. Régimen jurídico de la reutilización.**

1. El Gobierno establecerá las condiciones básicas para la reutilización de las aguas, precisando la calidad exigible a las aguas depuradas según los usos previstos.

2. La reutilización de las aguas procedentes de un aprovechamiento requerirá concesión administrativa como norma general. Sin embargo, en el caso de que la reutilización fuese solicitada por el titular de una autorización de vertido de aguas ya depuradas, se requerirá solamente una autorización administrativa, en la cual se establecerán las condiciones necesarias complementarias de las recogidas en la previa autorización de vertido.

3. Cualquier persona física o jurídica que haya obtenido una concesión de reutilización de aguas, podrá subrogarse por vía contractual en la titularidad de la autorización de vertido de aquellas aguas, con asunción de las obligaciones que ésta conlleva, incluidas la depuración y la satisfacción del canon de control de vertido. Estos contratos deberán ser autorizados por el correspondiente Organismo de cuenca, a los efectos del cambio de titular de la autorización de vertido. En el caso de que la concesión se haya otorgado respecto a aguas efluentes de una planta de depuración, las relaciones entre el titular de ésta y el de aquella concesión serán reguladas igualmente mediante un contrato que deberá ser autorizado por el correspondiente Organismo de cuenca.

4. Las personas físicas o jurídicas que asuman las obligaciones a que se refiere el apartado anterior, podrán solicitar la modificación de la autorización de vertido previamente existente, a fin de adaptarla a las nuevas condiciones de vertido. Para su revisión se tendrá en consideración el volumen y la calidad del efluente que se vierta al dominio público hidráulico tras la reutilización.

5. En todo caso, el vertido final de las aguas reutilizadas se acomodará a lo previsto en la presente Ley.

A1.4. DIRECTIVA 91/271/CEE, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas (DOCE nº L-135 de 30/05/1991)

Nº L 135/40

Diario Oficial de las Comunidades Europeas

30. 5. 91

II

(Actos cuya publicación no es una condición para su aplicabilidad)

CONSEJO

DIRECTIVA DEL CONSEJO

de 21 de mayo de 1991

sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas

(91/271/CEE)

EL CONSEJO DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea y, en particular, su artículo 130 S,

Vista la propuesta de la Comisión (¹),

Visto el dictamen del Parlamento Europeo (²),

Visto el dictamen del Comité Económico y Social (³),

Considerando que, en su Resolución de 28 de junio de 1988 (⁴) sobre la protección del Mar del Norte y de otras aguas de la Comunidad, el Consejo solicitó a la Comisión que presentara propuestas con las medidas necesarias a nivel comunitario para el tratamiento de las aguas residuales urbanas;

Considerando que la contaminación debida a un tratamiento insuficiente de las aguas residuales de un Estado miembro repercute a menudo en las de otros Estados miembros y que, por tanto, es necesaria una acción comunitaria, con arreglo al artículo 130 R;

Considerando que es necesario un tratamiento secundario de las aguas residuales urbanas para evitar que la evacuación de dichas aguas tratadas de manera insuficiente tenga repercusiones negativas en el medio ambiente;

Considerando que es necesario exigir un tratamiento más riguroso en las zonas sensibles mientras que un tratamiento primario puede ser adecuado en algunas zonas menos sensibles;

Considerando que los sistemas colectores de entrada de aguas residuales industriales así como la evacuación de aguas residuales y lodo procedentes de las instalaciones de

tratamiento de aguas residuales urbanas deberían ser objeto de normas generales, reglamentaciones y/o autorizaciones específicas;

Considerando que deben someterse a requisitos adecuados los vertidos de aguas residuales industriales biodegradables, procedentes de determinados sectores industriales, que no entran en las plantas de tratamiento de las aguas residuales urbanas antes del vertido a las aguas receptoras;

Considerando que debe fomentarse el reciclado de los lodos producidos por el tratamiento de las aguas residuales; que debe suprimirse progresivamente la evacuación de lodos a las de aguas superficiales;

Considerando que es necesario controlar las instalaciones de tratamiento, las aguas receptoras y la evacuación de lodos para garantizar la protección del medio ambiente de las repercusiones negativas de los vertidos de aguas residuales;

Considerando que es importante garantizar la información al público, mediante la publicación de informes periódicos, sobre la evacuación de aguas residuales urbanas y lodos;

Considerando que los Estados miembros deberán elaborar y presentar a la Comisión programas nacionales para la aplicación de la presente Directiva;

Considerando que debería crearse un comité que colabore con la Comisión en los temas relacionados con la aplicación de la presente Directiva y con su adaptación al progreso técnico,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

La presente Directiva tiene por objeto la recogida, el tratamiento y el vertido de las aguas residuales urbanas y el tratamiento y vertido de las aguas residuales procedentes de determinados sectores industriales.

(¹) DO nº C 1 de 4. 1. 1990, p. 20; y

DO nº C 287 de 15. 11. 1990, p. 11.

(²) DO nº C 260 de 15. 10. 1990, p. 185.

(³) DO nº C 168 de 10. 7. 1990, p. 36.

(⁴) DO nº C 209 de 9. 8. 1988, p. 3.

El objetivo de la Directiva es proteger al medio ambiente de los efectos negativos de los vertidos de las mencionadas aguas residuales.

Artículo 2

A efectos de la presente Directiva, se entenderá por:

- 1) «Aguas residuales urbanas»: las aguas residuales domésticas o la mezcla de las mismas con aguas residuales industriales y/o aguas de corriente pluvial.
- 2) «Aguas residuales domésticas»: las aguas residuales procedentes de zonas de vivienda y de servicios y generadas principalmente por el metabolismo humano y las actividades domésticas.
- 3) «Aguas residuales industriales»: todas las aguas residuales vertidas desde locales utilizados para efectuar cualquier actividad comercial o industrial, que no sean aguas residuales domésticas ni aguas de corriente pluvial.
- 4) «Aglomeración urbana»: la zona cuya población y/o actividades económicas presenten concentración suficiente para la recogida y conducción de las aguas residuales urbanas a una instalación de tratamiento de dichas aguas o a un punto de vertido final.
- 5) «Sistema colector»: un sistema de conductos que recoja y conduzca las aguas residuales urbanas.
- 6) «1 e-h (equivalente habitante)»: la carga orgánica biodegradable con una demanda bioquímica de oxígeno de 5 días (DBO 5) de 60 g de oxígeno por día.
- 7) «Tratamiento primario»: el tratamiento de aguas residuales urbanas mediante un proceso físico y/o químico que incluya la sedimentación de sólidos en suspensión, u otros procesos en los que la DBO 5 de las aguas residuales que entren se reduzca por lo menos en un 20 % antes del vertido y el total de sólidos en suspensión en las aguas residuales de entrada se reduzca por lo menos en un 50 %.
- 8) «Tratamiento secundario»: el tratamiento de aguas residuales urbanas mediante un proceso que incluya, por lo general, un tratamiento biológico con sedimentación secundaria, u otro proceso en el que se respeten los requisitos del cuadro 1 del Anexo I.
- 9) «Tratamiento adecuado»: el tratamiento de las aguas residuales urbanas mediante cualquier proceso y/o sistema de eliminación en virtud del cual, después del vertido de dichas aguas, las aguas receptoras cumplan los objetivos de calidad pertinentes y las disposiciones pertinentes de la presente y de las restantes Directivas comunitarias.
- 10) «Lodos»: los lodos residuales, tratados o no, procedentes de las instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas.
- 11) «Eutrofización»: el aumento de nutrientes en el agua, especialmente de los compuestos de nitrógeno y/o fósforo, que provoca un crecimiento acelerado de

algas y especies vegetales superiores, con el resultado de trastornos no deseados en el equilibrio entre organismos presentes en el agua y en la calidad del agua a la que afecta.

- 12) «Estuario»: la zona de transición, en la desembocadura de un río, entre las aguas dulces y las aguas costeras. Cada Estado miembro determinará los límites exteriores (orientados hacia el mar) de los estuarios a efectos de la presente Directiva, dentro del programa para su aplicación a que se refieren los apartados 1 y 2 del artículo 17.
- 13) «Aguas costeras»: las aguas situadas fuera de la línea de bajamar o del límite exterior de un estuario.

Artículo 3

1. Los Estados miembros velarán por que todas las aglomeraciones urbanas dispongan de sistemas colectores para las aguas residuales urbanas:

- a más tardar, el 31 de diciembre del año 2000 en el caso de las aglomeraciones con más de 15 000 equivalentes habitante («e-h»), y
- a más tardar, el 31 de diciembre del año 2005 en el caso de las aglomeraciones que tengan entre 2 000 y 15 000 e-h.

Cuando se trate de aguas residuales urbanas vertidas en aguas receptoras que se consideren «zonas sensibles» con arreglo a la definición del artículo 5, los Estados miembros velarán por que se instalen sistemas colectores, a más tardar, el 31 de diciembre de 1998 en las aglomeraciones con más de 10 000 e-h.

Cuando no se justifique la instalación de un sistema colector, bien por no suponer ventaja alguna para el medio ambiente o bien porque su instalación implique un coste excesivo, se utilizarán sistemas individuales u otros sistemas adecuados que consigan un nivel igual de protección medioambiental.

2. Los sistemas colectores mencionados en el apartado 1 cumplirán los requisitos establecidos en la letra A del Anexo I. Dichos requisitos podrán modificarse según el procedimiento establecido en el artículo 18.

Artículo 4

1. Los Estados miembros velarán por que las aguas residuales urbanas que entren en los sistemas colectores sean objeto, antes de verterse, de un tratamiento secundario o de un proceso equivalente, en las siguientes circunstancias:

- a más tardar el 31 de diciembre del año 2000 para todos los vertidos que procedan de aglomeraciones que representen más de 15 000 e-h;
- a más tardar el 31 de diciembre del año 2005 para todos los vertidos que procedan de aglomeraciones que representen entre 10 000 y 15 000 e-h;
- a más tardar el 31 de diciembre del año 2005 para los vertidos en aguas dulces o estuarios que procedan de aglomeraciones que representen entre 2 000 y 10 000 e-h.

2. Los vertidos de aguas residuales urbanas en aguas situadas en regiones de alta montaña (más 1 500 m sobre el nivel del mar) en las que resulte difícil la aplicación de un tratamiento biológico eficaz debido a las bajas temperaturas, podrán someterse a un tratamiento menos riguroso que el que determina el apartado 1 siempre y cuando existan estudios detallados que indiquen que tales vertidos no perjudican al medio ambiente.

3. Los vertidos procedentes de las instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas mencionados en los apartados 1 y 2 cumplirán los requisitos pertinentes de la letra B del Anexo I. Dichos requisitos podrán modificarse según el procedimiento establecido en el artículo 18.

4. La carga expresada en e-h se calculará a partir del máximo registrado de la carga semanal media que entre en una instalación de tratamiento durante el año, sin tener en cuenta situaciones excepcionales como, por ejemplo, las producidas por una lluvia intensa.

Artículo 5

1. A efectos del apartado 2, los Estados miembros determinarán, a más tardar el 31 de diciembre de 1993, las zonas sensibles según los criterios establecidos en el Anexo II.

2. A más tardar el 31 de diciembre de 1998, los Estados miembros velarán por que las aguas residuales urbanas que entren en los sistemas colectores sean objeto, antes de ser vertidas en zonas sensibles, de un tratamiento más riguroso que el descrito en el artículo 4, cuando se trate de vertidos procedentes de aglomeraciones urbanas que representen más de 10 000 e-h.

3. Los vertidos de las instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas que se mencionan en el apartado 2 cumplirán los requisitos pertinentes de la letra B del Anexo I. Dichos requisitos podrán fijarse o modificarse según el procedimiento establecido en el artículo 18.

4. No obstante, los requisitos para instalaciones individuales indicados en los anteriores apartados 2 y 3 no deberán necesariamente aplicarse en zonas sensibles cuando se pueda demostrar que el porcentaje mínimo de reducción de la carga referido a todas las instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas de dicha zona alcanza al menos el 75 % del total del fósforo y al menos el 75 % del total del nitrógeno.

5. Los vertidos procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas que estén situadas en las zonas de captación de zonas sensibles y que contribuyan a la contaminación de dichas zonas quedarán sujetos a lo dispuesto en los apartados 2, 3 y 4.

Las disposiciones del artículo 9 se aplicarán en los casos en que las zonas de captación contempladas en el párrafo primero estén situadas total o parcialmente en otro Estado miembro.

6. Los Estados miembros velarán por que la designación de las zonas sensibles se revise al menos cada cuatro años.

7. Los Estados miembros velarán por que las zonas identificadas como sensibles como resultado de la revisión

a que se refiere el apartado 6 cumplan los requisitos anteriormente citados en un plazo de siete años.

8. A efectos de la presente Directiva, un Estado miembro no deberá designar zonas sensibles cuando aplique en la totalidad de su territorio el tratamiento establecido en los apartados 2, 3 y 4.

Artículo 6

1. A efectos del apartado 2, los Estados miembros podrán determinar, a más tardar el 31 de diciembre de 1993, zonas menos sensibles según los criterios expuestos en el Anexo II.

2. Los vertidos de aguas residuales urbanas procedentes de aglomeraciones urbanas que representen entre 10 000 y 150 000 e-h en aguas costeras y de las aglomeraciones de entre 2 000 y 10 000 e-h en estuarios situados en las zonas a que se refiere el apartado 1 podrán ser objeto de un tratamiento menos riguroso que el establecido en el artículo 4 cuando:

- dichos vertidos reciban, al menos, un tratamiento primario con arreglo a la definición del apartado 7 del artículo 2 y de conformidad con los procedimientos de control que se establecen en la letra D del Anexo I;
- existan estudios globales que indiquen que dichos vertidos no tendrán efectos negativos sobre el medio ambiente.

Los Estados miembros facilitarán a la Comisión cualquier información importante relativa a los citados estudios.

3. Si la Comisión considerase que no se cumplen las condiciones establecidas en el apartado 2, presentará al Consejo una propuesta adecuada.

4. Los Estados miembros velarán por que la lista de zonas menos sensibles se revise al menos cada 4 años.

5. Los Estados miembros velarán por que las zonas que hayan dejado de ser consideradas zonas menos sensibles cumplan los requisitos de los artículos 4 y 5, según proceda, en un plazo de siete años.

Artículo 7

Los Estados miembros velarán por que, el 31 de diciembre del año 2005 a más tardar, las aguas residuales urbanas que entren en los sistemas colectores sean objeto de un tratamiento adecuado tal como se define en el punto 9) del artículo 2, antes de ser vertidas, en los siguientes casos:

- cuando procedan de aglomeraciones urbanas que representen menos de 2 000 e-h y se viertan en aguas dulces y estuarios;
- cuando procedan de aglomeraciones urbanas que representen menos de 10 000 e-h y se viertan en aguas costeras.

Artículo 8

1. En casos excepcionales debidos a problemas técnicos y para grupos de población geográficamente definidos, los Estados miembros podrán presentar a la Comisión una solicitud especial de ampliación del plazo para dar cumplimiento a lo dispuesto en el artículo 4.
2. En esta solicitud, que deberá ser debidamente justificada, se expondrán las dificultades técnicas experimentadas y se propondrá un programa de acción con un calendario apropiado que deberá llevarse a cabo para alcanzar el objetivo de la presente Directiva. Dicho calendario se incluirá en el programa para la aplicación contemplado en el artículo 17.
3. Sólo se aceptarán razones técnicas y el aplazamiento no podrá exceder del 31 de diciembre del año 2005.
4. La Comisión examinará esta solicitud y tomará las medidas apropiadas con arreglo al procedimiento establecido en el artículo 18.
5. En circunstancias excepcionales en las que se demuestre que un tratamiento más avanzado no redundará en ventajas para el medio ambiente, podrán someterse los vertidos en zonas menos sensibles de aguas residuales procedentes de aglomeraciones urbanas con más de 150 000 e-h al tratamiento contemplado en el artículo 6 para las aguas residuales procedentes de aglomeraciones urbanas que representen entre 10 000 y 150 000 e-h.

En tales circunstancias, los Estados miembros presentarán previamente a la Comisión un expediente. La Comisión estudiará la situación y tomará las medidas pertinentes de acuerdo con el procedimiento previsto en el artículo 18.

Artículo 9

Cuando los vertidos de aguas residuales urbanas de un Estado miembro tengan efectos negativos para aguas comprendidas en la zona de jurisdicción de otro Estado miembro, el Estado miembro cuyas aguas resulten afectadas podrá notificar los hechos correspondientes al otro Estado miembro y a la Comisión.

Los Estados miembros implicados organizarán la concertación necesaria para identificar los vertidos de que se trate, con intervención de la Comisión cuando proceda, y dispondrán las medidas necesarias en origen para proteger las aguas afectadas, a fin de velar por el cumplimiento de las disposiciones de la presente Directiva.

Artículo 10

Los Estados miembros velarán por que las instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas construidas a fin de cumplir los requisitos de los artículos 4, 5, 6 y 7 sean diseñadas, construidas, utilizadas y mantenidas de manera que en todas las condiciones climáticas normales

de la zona tengan un rendimiento suficiente. En el diseño de las instalaciones se tendrán en cuenta las variaciones de la carga propias de cada estación.

Artículo 11

1. Los Estados miembros velarán por que, a más tardar el 31 de diciembre de 1993, el vertido de aguas residuales industriales en sistemas colectores e instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas se someta a la normativa previa y/o a autorizaciones específicas por parte de la autoridad competente o de los organismos adecuados.
2. Las normativas y/o autorizaciones específicas cumplirán los requisitos expuestos en la letra C del Anexo I. Dichos requisitos podrán modificarse según el procedimiento establecido en el artículo 18.
3. Las normativas y autorizaciones específicas se revisarán y, en su caso, adaptarán a intervalos regulares.

Artículo 12

1. Las aguas residuales tratadas se reutilizarán cuando proceda. Las vías de evacuación reducirán al mínimo los efectos adversos sobre el medio ambiente.
2. Las autoridades competentes o los organismos adecuados velarán por que los vertidos de aguas residuales procedentes de las instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas estén sujetos a normativas preexistentes y/o a autorizaciones específicas.
3. Las normativas preexistentes y/o las autorizaciones específicas relativas a vertidos procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas, concedidas en aplicación del apartado 2 en aglomeraciones urbanas de 2 000 a 10 000 e-h cuando se trate de vertidos en aguas dulces y estuarios, y en aglomeraciones urbanas de 10 000 e-h o más para todo tipo de vertidos, incluirán las condiciones necesarias para cumplir los requisitos correspondientes de la letra B del Anexo I. Dichos requisitos podrán modificarse según el procedimiento establecido en el artículo 18.
4. Las normativas y/o autorizaciones se revisarán, y en caso necesario se adaptarán, a intervalos regulares.

Artículo 13

1. Los Estados miembros velarán por que, a más tardar el 31 de diciembre del año 2000, las aguas residuales industriales biodegradables procedentes de instalaciones que procedan de los sectores industriales enumerados en el Anexo III y que no penetren en las instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas antes de ser vertidas en las aguas receptoras se sometan antes del vertido a las condiciones establecidas en la normativa previa y/o a autorización específica por parte de la autoridad competente o del organismo que corresponda, para todos los vertidos procedentes de instalaciones que presenten 4 000 e-h o más.

2. El 31 de diciembre de 1993 a más tardar, las autoridades competentes o los organismos correspondientes de cada Estado miembro establecerán los requisitos para el vertido de dichas aguas residuales adecuados a la índole de la industria de que se trate.

3. La Comisión efectuará un estudio comparativo de los requisitos de los Estados miembros a más tardar el 31 de diciembre de 1994. Publicará en un informe el resultado de ese estudio y en caso necesario presentará una propuesta adecuada.

Artículo 14

1. Los lodos que se originen en el tratamiento de las aguas residuales se reutilizarán cuando proceda. Las vías de evacuación reducirán al mínimo los efectos adversos sobre el medio ambiente.

2. Las autoridades competentes u organismos correspondientes velarán por que a más tardar el 31 de diciembre de 1998 la evacuación de lodos procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas esté sometida a normas generales, a registro o a autorización.

3. Los Estados miembros velarán por que, a más tardar el 31 de diciembre de 1998, se suprima progresivamente la evacuación de lodos a aguas de superficie, ya sea mediante vertido desde barcos, conducción por tuberías o cualquier otro medio.

4. Hasta la supresión de las formas de evacuación que se mencionan en el apartado 3, los Estados miembros velarán por que medie autorización para la evacuación de la cantidad total de materiales tóxicos, persistentes o bioacumulables presentes en los lodos evacuados a aguas de superficie y por que dicha cantidad se reduzca progresivamente.

Artículo 15

1. Las autoridades competentes u organismos correspondientes controlarán:

- los vertidos de las instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas para verificar el cumplimiento de los requisitos de la letra B del Anexo I con arreglo a los procedimientos de control establecidos en la letra D del Anexo I;
- las cantidades y composición de los lodos vertidos en aguas de superficie.

2. Las autoridades competentes u organismos correspondientes controlarán las aguas sometidas a vertidos desde las instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas y a vertidos directos, con arreglo a lo dispuesto en el artículo 13, en los casos en los que pueda preverse que produzcan efectos importantes sobre el medio ambiente.

3. Cuando se trate de un vertido según lo dispuesto en el artículo 6 y en el caso de una evacuación de lodos a aguas de superficie, los Estados miembros realizarán los controles y los estudios pertinentes para verificar que los vertidos o evacuaciones no tienen efectos negativos sobre el medio ambiente.

4. La información que recojan las autoridades competentes o los organismos correspondientes de conformidad con los apartados 1, 2 y 3 se conservará en los Estados miembros y se facilitará a la Comisión dentro de los 6 meses posteriores a la recepción de una petición en este sentido.

5. Las directrices sobre control contemplado en los apartados 1, 2 y 3 podrán fijarse según el procedimiento establecido en el artículo 18.

Artículo 16

Sin perjuicio de la aplicación de lo dispuesto en la Directiva 90/313/CEE del Consejo, de 7 de junio de 1990, sobre libertad de acceso a la información en materia de medio ambiente⁽¹⁾, los Estados miembros velarán por que las autoridades u organismos correspondientes publiquen cada dos años un informe de situación sobre el vertido de aguas residuales urbanas y de lodos en su zona. Los Estados miembros cursarán dichos informes a la Comisión tan pronto como se publiquen.

Artículo 17

1. Los Estados miembros elaborarán, a más tardar el 31 de diciembre de 1993, un programa para la aplicación de la presente Directiva.

2. Los Estados miembros proporcionarán a la Comisión la información sobre el programa a más tardar el 30 de junio de 1994.

3. Si fuere necesario, los Estados miembros proporcionarán a la Comisión, a más tardar el 30 de junio cada dos años, una actualización de la información contemplada en el apartado 2.

4. Los métodos y modelos de presentación que deban adoptar los informes sobre los programas nacionales se establecerán de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 18. Toda modificación de dichos métodos y modelos se adoptará de conformidad con el mismo procedimiento.

5. La Comisión revisará y valorará cada dos años la información que reciba en virtud de lo dispuesto en los apartados 2 y 3 y publicará un informe al respecto.

Artículo 18

1. La Comisión estará asistida por un Comité compuesto por representantes de los Estados miembros y presidido por el representante de la Comisión.

2. El representante de la Comisión presentará al comité un proyecto de medidas. El Comité emitirá su dictamen sobre dicho proyecto en un plazo que el presidente podrá determinar en función de la urgencia de la cuestión. El dictamen se emitirá según la mayoría prevista en el apartado 2 del artículo 148 del Tratado para adoptar aquellas decisiones que el Consejo deba tomar a propuesta de la Comisión. Los votos de los representantes de los Estados miembros en el Comité se ponderarán de la manera definida en el mencionado artículo. El presidente no tomará parte en la votación.

⁽¹⁾ DO nº L 158 de 23. 6. 1990, p. 56.

3. a) La Comisión adoptará las medidas previstas cuando sean conformes al dictamen del Comité.
- b) Cuando las medidas previstas no sean conformes al dictamen del Comité o en caso de ausencia de dictamen, la Comisión someterá sin demora al Consejo una propuesta relativa a las medidas que deban tomarse. El Consejo se pronunciará por mayoría cualificada.

Si transcurrido un plazo de tres meses a partir del momento en que la propuesta se haya sometido al Consejo, éste no se hubiere pronunciado, la Comisión adoptará las medidas propuestas, excepto en el caso en que el Consejo se haya pronunciado por mayoría simple contra dichas medidas.

Artículo 19

1. Los Estados miembros pondrán en vigor las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para dar cumplimiento a la presente Directiva a más tardar el 30 de junio de 1993. Informarán de ello inmediatamente a la Comisión.

2. Cuando los Estados miembros adopten las disposiciones contempladas en el apartado 1, éstas harán referencia a la presente Directiva o irán acompañadas de una referencia a la misma en su publicación oficial. Los Estados miembros establecerán las modalidades de la mencionada referencia.

3. Los Estados miembros comunicarán a la Comisión el texto de las disposiciones esenciales de Derecho interno que adopten en el ámbito regulado por la presente Directiva.

Artículo 20

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 21 de mayo de 1991.

Por el Consejo

El Presidente

R. STEICHEN

ANEXO I

REQUISITOS DE LAS AGUAS RESIDUALES URBANAS

A. Sistemas colectores (*)

Los sistemas colectores deberán tener en cuenta los requisitos para el tratamiento de aguas residuales.

El diseño, construcción y mantenimiento de los sistemas colectores deberá realizarse de acuerdo con los mejores conocimientos técnicos que no redunden en costes excesivos, en especial por lo que respecta:

- al volumen y características de las aguas residuales urbanas,
- a la prevención de escapes,
- a la restricción de la contaminación de las aguas receptoras por el desbordamiento de las aguas de tormenta.

B. Vertidos de las instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas a aguas receptoras (*)

1. Las instalaciones de tratamiento de aguas residuales se diseñarán o modificarán de manera que se puedan obtener muestras representativas de las aguas residuales que lleguen y del efluente tratado antes de efectuar el vertido en las aguas receptoras.
2. Los vertidos de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas sujetos a tratamiento según lo dispuesto en los artículos 4 y 5 de la presente Directiva deberán cumplir los requisitos que figuran en el cuadro 1.
3. Los vertidos de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas realizados en zonas sensibles propensas a eutrofización tal como se identifican en el punto A a) del Anexo II deberán cumplir además los requisitos que figuran en el cuadro 2 del presente Anexo.
4. Se podrán aplicar requisitos más rigurosos que los que se recogen en los cuadros 1 y/o 2 cuando sea necesario para garantizar que las aguas receptoras cumplen con cualquier otra Directiva en la materia.
5. En la medida de lo posible, los puntos de evacuación de las aguas residuales urbanas se elegirán de forma que se reduzcan al mínimo los efectos sobre las aguas receptoras.

C. Aguas residuales industriales

Las aguas residuales industriales que entren en los sistemas colectores y en las instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas serán objeto del tratamiento previo que sea necesario para:

- proteger la salud del personal que trabaje en los sistemas colectores y en las instalaciones de tratamiento;
- garantizar que los sistemas colectores, las instalaciones de tratamiento de aguas residuales y los equipos correspondientes no se deterioren;
- garantizar que no se obstaculice el funcionamiento de las instalaciones de tratamiento de aguas residuales y de lodos;
- garantizar que los vertidos de las instalaciones de tratamiento no tengan efectos nocivos sobre el medio ambiente y no impidan que las aguas receptoras cumplan otras Directivas comunitarias;
- garantizar que los lodos puedan evacuarse con completa seguridad de forma aceptable desde la perspectiva medioambiental.

D. Métodos de referencia para el seguimiento y evaluación de resultados

1. Los Estados miembros velarán por que se aplique un método de control que corresponda al menos al nivel de los requisitos que se indican a continuación.

Podrán utilizarse métodos alternativos respecto a los indicados en los apartados 2, 3 y 4 siempre que pueda demostrarse que se obtienen resultados equivalentes.

Los Estados miembros facilitarán a la Comisión toda la información pertinente relativa al método aplicado. En caso de que la Comisión considere que no se cumplen los requisitos indicados en los apartados 2, 3 y 4, presentará al Consejo una propuesta adecuada.

(*) Dado que en la práctica no es posible construir los sistemas colectores y las instalaciones de tratamiento de manera que se puedan someter a tratamiento la totalidad de las aguas residuales en circunstancias tales como lluvias torrenciales inusuales, los Estados miembros decidirán medidas para limitar la contaminación por desbordamiento de aguas de tormenta. Tales medidas podrían basarse en coeficientes de dilución, capacidad en relación con el caudal en época seca o podrán especificar un determinado número aceptable de desbordamientos al año.

2. Se tomarán muestras durante un período de 24 horas, proporcionalmente al caudal o a intervalos regulares, en el mismo punto claramente definido de la salida de la instalación de tratamiento, y de ser necesario en su entrada, para vigilar el cumplimiento de los requisitos aplicables a los vertidos de aguas residuales en virtud de la presente Directiva.

Se aplicarán prácticas internacionales de laboratorio correctas con objeto de que se reduzca al mínimo el deterioro de las muestras en el período que media entre la recogida y el análisis.

3. El número mínimo anual de muestras se establecerá según el tamaño de la instalación de tratamiento y se recogerá a intervalos regulares durante el año:

— de 2 000 a 9 999 e-h.:	12 muestras durante el primer año. 4 muestras los siguientes años, siempre que pueda demostrarse que el agua del primer año cumple las disposiciones de la presente Directiva; si una de las 4 muestras no resultara conforme, se tomarán 12 muestras el año siguiente.
— de 10 000 a 49 999 e-h.:	12 muestras.
— 50 000 e-h. o más:	24 muestras.

4. Se considerará que las aguas residuales tratadas se ajustan a los parámetros correspondientes cuando, para cada uno de los parámetros pertinentes, las muestras de dichas aguas indiquen que éstas respetan los valores paramétricos de que se trate de la siguiente forma:

- para los parámetros especificados en el cuadro 1 y en el punto 7) del artículo 2, un número máximo de muestras que pueden no cumplir los requisitos expresados en reducciones de porcentajes y/o concentraciones del cuadro 1 y del punto 7) del artículo 2 se especifican en el cuadro 3;
- respecto de los parámetros del cuadro 1 expresados en concentración, las muestras no conformes tomadas en condiciones normales de funcionamiento no deberán desviarse de los valores paramétricos en más del 100 %. Por lo que se refiere a los valores paramétricos de concentración relativos al total de sólidos en suspensión, se podrán aceptar desviaciones de hasta un 150 %;
- por lo que se refiere a los parámetros fijados en el cuadro 2, la media anual de las muestras deberá respetar los valores correspondientes para cada uno de los parámetros.

5. No se tendrán en cuenta los valores extremos para la calidad del agua de que se trate cuando éstos sean consecuencia de situaciones inusuales, como las ocasionadas por lluvias intensas.

Cuadro 1: Requisitos por los vertidos procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas sujetos a lo dispuesto en los artículos 4 y 5 de la presente Directiva. Se aplicará el valor de concentración o el porcentaje de reducción.

Parámetros	Concentración	Porcentaje mínimo de reducción ⁽¹⁾	Método de medida de referencia
Demanda bioquímica de oxígeno (DBO 5 a 20 °C) sin nitrificación ⁽²⁾	25 mg/l O ₂	70-90 40 de conformidad con el apartado 2 del artículo 4	Muestra homogeneizada, sin filtrar ni decantar. Determinación del oxígeno disuelto antes y después de 5 días de incubación a 20 °C ± 1 °C, en completa oscuridad. Aplicación de un inhibidor de la nitrificación
Demanda química de oxígeno (DQO)	125 mg/l O ₂	75	Muestra homogeneizada, sin filtrar ni decantar. Dicromato potásico
Total de sólidos en suspensión	35 mg/l ⁽³⁾ 35 de conformidad con el apartado 2 del artículo 4 (más de 10 000 e-h) 60 de conformidad con el apartado 2 del artículo 4 (de 2 000 a 10 000 e-h)	90 ⁽³⁾ 90 de conformidad con el apartado 2 del artículo 4 (más de 10 000 e-h) 70 de conformidad con el apartado 2 del artículo 4 (de 2 000 a 10 000 e-h)	— Filtración de una muestra representativa a través de una membrana de filtración de 0,45 micras. Secado a 105 °C y pesaje — Centrifugación de una muestra representativa (durante 5 minutos como mínimo, con una aceleración media de 2 800 a 3 200 g), secado a 105 °C y pesaje.

(1) Reducción relacionada con la carga del caudal de entrada.

(2) Este parámetro puede sustituirse por otro: carbono orgánico total (COT) o demanda total de oxígeno (DTO), si puede establecerse una correlación entre DBO 5 y el parámetro sustitutivo.

(3) Este requisito es optativo.

Los análisis de vertidos procedentes de fosos de fermentación se llevarán a cabo sobre muestras filtradas; no obstante, la concentración de sólidos totales en suspensión en las muestras de aguas sin filtrar no deberán superar los 150 mg/l.

Cuadro 2: Requisitos para los vertidos procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas realizados en zonas sensibles propensas a eutrofización tal como se identifican en el punto A a) del Anexo II. Según la situación local, se podrá aplicar uno a los dos parámetros. Se aplicarán el valor de concentración o el porcentaje de reducción.

Parámetros	Concentración	Porcentaje mínimo de reducción (%)	Método de medida de referencia
Fósforo total	2 mg/l P (de 10 000 a 100 000 e-h) 1 mg/l P (más de 100 000 e-h)	80	Espectrofotometría de absorción molecular
Nitrógeno total (*)	15 mg/l N (de 10 000 a 100 000 e-h) 10 mg/l N (más de 100 000 e-h) (*)	70-80	Espectrofotometría de absorción molecular

(*) Reducción relacionada con la carga del caudal de entrada.

(*) Nitrógeno total equivale a la suma de nitrógeno Kjeldahl total (N orgánico + NH₃), nitrógeno en forma de nitrato (NO₃) y nitrógeno en forma de nitrito (NO₂).

(*) Alternativamente el promedio diario no deberá superar los 20 mg/l N. Este requisito se refiere a una temperatura del agua de 12° C o más durante el funcionamiento del reactor biológico de la instalación de tratamiento de aguas residuales. En sustitución del requisito relativo a la temperatura, se podrá aplicar una limitación del tiempo de funcionamiento que tenga en cuenta las condiciones climáticas regionales. Se aplicará esta alternativa en caso de que pueda demostrarse que se cumple el apartado 1 de la letra D del presente Anexo.

Cuadro 3

Serías de muestras tomadas en un año	Número máximo permitido de muestras no conformes
4-7	1
8-16	2
17-28	3
29-40	4
41-53	5
54-67	6
68-81	7
82-95	8
96-110	9
111-125	10
126-140	11
141-155	12
156-171	13
172-187	14
188-203	15
204-219	16
220-235	17
236-251	18
252-268	19
269-284	20
285-300	21
301-317	22
318-334	23
335-350	24
351-365	25

ANEXO II

CRITERIOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ZONAS SENSIBLES Y MENOS SENSIBLES

A. Zonas sensibles

Se considerará que un medio acuático es zona sensible si puede incluirse en uno de los siguientes grupos :

- a) Lagos de agua dulce naturales, otros medios de agua dulce, estuarios y aguas costeras que sean eutróficos o que podrían llegar a ser eutróficos en un futuro próximo si no se adoptan medidas de protección.

Podrán tenerse en cuenta los siguientes elementos en la consideración del nutriente que deba ser reducido con un tratamiento adicional :

- i) Lagos y arroyos que desembocuen en lagos/embalses/bahías cerradas que tengan un intercambio de aguas escaso y en los que, por lo tanto, puede producirse una acumulación. En dichas zonas conviene prever la eliminación de fósforo a no ser que se demuestre que dicha eliminación no tendrá consecuencias sobre el nivel de eutrofización. También podrá considerarse la eliminación de nitrógeno cuando se realicen vertidos de grandes aglomeraciones urbanas.

- ii) Estuarios, bahías y otras aguas costeras que tengan un intercambio de aguas escaso o que reciban gran cantidad de nutrientes. Los vertidos de aglomeraciones pequeñas tienen normalmente poca importancia en dichas zonas, pero para las grandes aglomeraciones deberá incluirse la eliminación de fósforo y/o nitrógeno a menos que se demuestre que su eliminación no tendrá consecuencias sobre el nivel de eutrofización.

- b) Aguas dulces de superficie destinadas a la obtención de agua potable que podrían contener una concentración de nitratos superior a la que establecen las disposiciones pertinentes de la Directiva 75/440/CEE del Consejo, de 16 de junio de 1975, relativa a la calidad requerida para las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable en los Estados miembros (¹), si no se toman medidas de protección.

- c) Zonas en las que sea necesario un tratamiento adicional al establecido en el artículo 4 para cumplir las directivas del Consejo.

B. Zonas menos sensibles

Un medio o zona de agua marina podrá catalogarse como zona menos sensible cuando el vertido de aguas residuales no tenga efectos negativos sobre el medio ambiente debido a la morfología, hidrología o condiciones hidráulicas específicas existentes en esa zona.

Al determinar las zonas menos sensibles, los Estados miembros tomarán en consideración el riesgo de que la carga vertida pueda desplazarse a zonas adyacentes y ser perjudicial para el medio ambiente. Los Estados miembros reconocerán la existencia de zonas sensibles fuera de su jurisdicción nacional.

Para determinar las zonas menos sensibles se tendrán en cuenta los siguientes elementos :

Bahías abiertas, estuarios y otras aguas costeras con un intercambio de agua bueno y que no tengan eutrofización o agotamiento del oxígeno, o en las que se considere que es improbable que lleguen a desarrollarse fenómenos de eutrofización o de agotamiento del oxígeno por el vertido de aguas residuales urbanas.

(¹) DO nº L 194 de 25. 7. 1975, p. 26, Directiva modificada por la Directiva 79/869/CEE (DO nº L 271 de 29. 10. 1979, p. 44).

ANEXO III

SECTORES INDUSTRIALES

1. Industrialización de la leche
 2. Productos elaborados del sector hortofrutícola
 3. Elaboración y embotellado de bebidas sin alcohol
 4. Industrialización de la patata
 5. Industria cárnica
 6. Industria cervecera
 7. Producción de alcohol y de bebidas alcohólicas
 8. Fabricación de piensos a partir de productos vegetales
 9. Fabricación de gelatina y de cola a partir de cueros, pieles y huesos
 10. Almacenes de malta
 11. Industrialización del pescado
-

A1.5. REAL DECRETO-LEY 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas (BOE nº 312, de 30/12/1995)

BOE núm. 312

Sábado 30 diciembre 1995

37617

I. Disposiciones generales

JEFATURA DEL ESTADO

27963 REAL DECRETO-LEY 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas.

La Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas, y la Ley 22/1988, de 28 de julio, de Costas, establecen diferentes medidas para conseguir una mejor calidad de las aguas continentales y marítimas respectivamente, entre las que cabe destacar el sometimiento a autorización previa de las actividades susceptibles de provocar la contaminación del dominio público hidráulico o del dominio público marítimo-terrestre y, en especial, los vertidos.

Ahora bien, una adecuada protección de la calidad de las aguas exigiría completar las medidas establecidas en las leyes citadas, con otras que sometan los vertidos de las aguas residuales urbanas, previamente a su evacuación, a una serie de tratamientos en instalaciones adecuadas, para limitar los efectos contaminantes de dichas aguas residuales, con el fin último de garantizar la protección del medio ambiente.

Con este objetivo, la Unión Europea aprobó la Directiva 91/271/CEE, del Consejo, de 21 de mayo, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas, en la cual se establece que los Estados miembros adoptarán las medidas necesarias para garantizar que dichas aguas son tratadas correctamente antes de su vertido.

Para ello, la norma comunitaria impone la obligación de someter dichas aguas residuales a tratamientos, más o menos rigurosos, en diferentes plazos. Los criterios que utiliza la Directiva para fijar estas obligaciones son el número de «habitantes-equivalentes», concepto definido en función de la carga contaminante tanto de personas, como de animales e industrias y las «aglomeraciones urbanas», que son las zonas que presentan una concentración suficiente para la recogida y conducción de las aguas residuales; asimismo, también se toma en consideración la mayor o menor sensibilidad de la zona en la que van a realizarse los vertidos.

Con carácter general, la Directiva establece dos obligaciones claramente diferenciadas: En primer lugar, las «aglomeraciones urbanas» deberán disponer, según los casos, de sistemas colectores para la recogida y conducción de las aguas residuales y, en segundo lugar, se prevén distintos tratamientos a los que deberán someterse dichas aguas antes de su vertido a las aguas continentales o marítimas.

En la determinación de los tratamientos a que deberán ser sometidas las aguas residuales urbanas antes

de su vertido, se tiene en cuenta si dichos vertidos se efectúan en «zonas sensibles» o «zonas menos sensibles», lo cual determinará un tratamiento más o menos riguroso.

El presente Real Decreto-ley tiene por objeto la transposición al ordenamiento interno la Directiva 91/271/CEE. De acuerdo con la finalidad de protección del medio ambiente que constituye el objeto de la presente disposición, la misma constituye legislación básica, dictada al amparo del artículo 149.1.23.ª de la Constitución, correspondiendo su ejecución a las Comunidades Autónomas, en virtud de las competencias estatutarias atribuidas a éstas, en el marco del artículo 148.1.9.ª de la Constitución. Ahora bien, junto a este marco competencial general, la disposición final primera tiene en cuenta la incidencia de otras habilitaciones constitucionales: De una parte, las competencias que, en virtud de lo dispuesto en el artículo 149.1.22.ª de la Constitución, corresponden a la Administración General del Estado, en las cuencas hidrográficas que exceden el ámbito territorial de una Comunidad Autónoma, respecto de las cuales, el régimen aquí establecido constituye un complemento de lo dispuesto en el capítulo segundo del título V de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas, y normas de desarrollo. Y, de otra parte, se menciona el título competencial recogido en el artículo 149.1.18.ª de la Constitución, lo que obedece a la modificación que esta norma introduce en los criterios establecidos en el artículo 26 de la Ley 7/1985, de 2 de abril, reguladora de las Bases del Régimen Local, al cambiar el criterio de número de habitantes por el número de «habitantes-equivalentes» y deferir a las Comunidades Autónomas la delimitación de las aglomeraciones urbanas, con las consecuencias que tal delimitación tiene en el cumplimiento de las obligaciones establecidas en este Real Decreto-ley.

Esta modificación de los criterios establecidos en la Ley 7/1985, junto con las circunstancias de extraordinaria y urgente necesidad que al respecto exige el artículo 86 de la Constitución española, imponen que la transposición de esta normativa comunitaria se efectúe mediante Real Decreto-ley.

En el procedimiento de elaboración de la presente disposición han sido consultadas las Comunidades Autónomas y la Comisión Nacional de Administración Local.

En su virtud, en uso de la autorización contenida en el artículo 86 de la Constitución, a propuesta del Ministro de Obras Públicas, Transportes y Medio Ambiente, de acuerdo con el Consejo de Estado y previa deliberación del Consejo de Ministros en su reunión del día 28 de diciembre de 1995,

DISPONGO:

Artículo 1. Objeto.

Este Real Decreto-ley tiene por objeto complementar el régimen jurídico establecido en el título V de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas, y en el título III de la Ley 22/1988, de 28 de julio, de Costas, con el fin de proteger la calidad de las aguas continentales y marítimas de los efectos negativos de los vertidos de las aguas residuales urbanas.

Artículo 2. Definiciones.

A los efectos de este Real Decreto-ley se entiende por:

a) «Aguas residuales urbanas»: Las aguas residuales domésticas o la mezcla de éstas con aguas residuales industriales o con aguas de escorrentía pluvial.

b) «Aguas residuales domésticas»: Las aguas residuales procedentes de zonas de vivienda y de servicios, generadas principalmente por el metabolismo humano y las actividades domésticas.

c) «Aguas residuales industriales»: Todas las aguas residuales vertidas desde locales utilizados para cualquier actividad comercial o industrial, que no sean aguas residuales domésticas ni aguas de escorrentía pluvial.

d) «Aglomeración urbana»: Zona geográfica formada por uno o varios municipios, o por parte de uno o varios de ellos, que por su población o actividad económica constituya un foco de generación de aguas residuales que justifique su recogida y conducción a una instalación de tratamiento o a un punto de vertido final.

e) «Sistema colector»: Todo sistema de conductos que recoga y conduzca las aguas residuales urbanas, desde las redes de alcantarillado de titularidad municipal, a las estaciones de tratamiento.

f) «1 h-e (habitante equivalente)»: La carga orgánica biodegradable con una demanda bioquímica de oxígeno de cinco días (DBO 5), de 60 gramos de oxígeno por día.

g) «Tratamiento primario»: El tratamiento de aguas residuales urbanas mediante un proceso físico o físico-químico que incluya la sedimentación de sólidos en suspensión, u otros procesos en los que la DBO 5 de las aguas residuales que entren, se reduzca, por lo menos, en un 20 por 100 antes del vertido, y el total de sólidos en suspensión en las aguas residuales de entrada se reduzca, por lo menos, en un 50 por 100.

h) «Tratamiento secundario»: El tratamiento de aguas residuales urbanas mediante un proceso que incluya un tratamiento biológico con sedimentación secundaria u otro proceso, en el que se respeten los requisitos que se establecerán reglamentariamente.

i) «Tratamiento adecuado»: El tratamiento de las aguas residuales urbanas mediante cualquier proceso o sistema de eliminación, en virtud del cual las aguas receptoras cumplan después del vertido, los objetivos de calidad previstos en el ordenamiento jurídico aplicable.

j) «Fangos»: Los lodos residuales, tratados o no, procedentes de las instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas.

k) «Zona sensible»: Medio o zona de aguas declaradas expresamente con los criterios que se establecerán reglamentariamente.

l) «Zona menos sensible»: Medio o zona de aguas marinas declaradas expresamente con los criterios que se establecerán reglamentariamente.

m) «Estuario»: La zona de transición, en la desembocadura de un río, entre las aguas dulces y las aguas costeras.

Artículo 3. Aglomeraciones urbanas.

Las Comunidades Autónomas fijarán, previa audiencia de los Ayuntamientos afectados, las aglomeraciones urbanas en que se estructura su territorio, estableciendo el ente público representativo de los municipios a los que corresponda, en cada caso, el cumplimiento de las obligaciones establecidas en este Real Decreto-ley.

Artículo 4. Sistemas colectores.

1. Las aglomeraciones urbanas que se indican a continuación deberán disponer de sistemas colectores para las aguas residuales urbanas, en los siguientes plazos:

a) Antes del 1 de enero del año 2001, aquellas que cuenten con más de 15.000 habitantes-equivalentes.

b) Antes del 1 de enero del año 2006, aquellas que tengan entre 2.000 y 15.000 habitantes-equivalentes.

c) Antes del 1 de enero del año 1999, aquellas que cuenten con más de 10.000 habitantes-equivalentes y viertan en una «zona sensible», declarada de acuerdo con lo establecido en el artículo 7 de este Real Decreto-ley.

2. No obstante, en los supuestos en que no se estime justificada la instalación de un sistema colector, bien por no suponer ventaja alguna para el medio ambiente, o bien porque su instalación implique un coste excesivo, en relación a la utilización de sistemas individuales, las Comunidades Autónomas podrán establecer que las aglomeraciones urbanas utilicen sistemas individuales u otros sistemas adecuados que impliquen un análogo nivel de protección ambiental.

Artículo 5. Tratamiento secundario de las aguas residuales urbanas.

1. Las aglomeraciones urbanas que se indican a continuación deberán aplicar a las aguas residuales que entren en los sistemas colectores un tratamiento secundario o proceso equivalente, en los siguientes plazos:

a) Antes del 1 de enero del año 2001, aquellas que cuenten con más de 15.000 habitantes-equivalentes.

b) Antes del 1 de enero del año 2006, aquellas que cuenten entre 10.000 y 15.000 habitantes-equivalentes.

c) Antes del 1 de enero del año 2006, aquellas que cuenten entre 2.000 y 10.000 habitantes-equivalentes y viertan en aguas continentales o estuarios.

2. Para las aglomeraciones urbanas contempladas en el párrafo a) del apartado anterior, se podrá solicitar a la Comisión Europea, excepcionalmente y por problemas técnicos, una ampliación del plazo, que tendrá como límite el 31 de diciembre del año 2005. En tales supuestos, las Comunidades Autónomas justificarán debidamente las dificultades técnicas y propondrán un programa de acción, que formará parte integrante del programa de aplicación regulado en el artículo 9 de este Real Decreto-ley. Las Comunidades Autónomas comunicarán estos programas de acción a la Administración General del Estado para su traslado a la Comisión Europea.

3. Las Comunidades Autónomas podrán determinar que las aglomeraciones urbanas situadas en regiones de alta montaña, a más de 1.500 metros sobre el nivel

del mar, en las que resulte difícil la aplicación de un tratamiento biológico eficaz debido a las bajas temperaturas, apliquen a las aguas residuales urbanas un tratamiento menos riguroso que el que determina el apartado 1 de este artículo, siempre y cuando estudios detallados justifiquen que tales vertidos no perjudican al medio ambiente.

Artículo 6. Tratamiento adecuado de las aguas residuales urbanas.

Las aglomeraciones urbanas que se indican a continuación dispondrán de un tratamiento adecuado para sus aguas residuales, antes del día 1 de enero del año 2006, en las siguientes circunstancias:

- a) Aquellas que cuenten con menos de 2.000 habitantes-equivalentes y viertan en aguas continentales y estuarios.
- b) Aquellas que cuenten con menos de 10.000 habitantes-equivalentes y viertan en aguas marítimas.

Artículo 7. Tratamiento de aguas residuales urbanas en «zonas sensibles» y «menos sensibles».

1. Las aglomeraciones urbanas que cuenten con más de 10.000 habitantes-equivalentes y que viertan las aguas residuales urbanas en «zonas sensibles» deberán disponer, antes del 1 de enero de 1999, de instalaciones adecuadas para que dichas aguas sean sometidas, antes de su vertido, a un tratamiento más riguroso que el tratamiento secundario establecido en el artículo 5, cuyos requisitos se establecerán reglamentariamente.

2. Las aglomeraciones urbanas que viertan en «zonas menos sensibles» podrán someter las aguas residuales urbanas a un tratamiento menos riguroso que el secundario, siempre que existan estudios globales que indiquen que dichos vertidos no tendrán efectos negativos sobre el medio ambiente y se les aplique un tratamiento primario, y se encuentren entre las siguientes:

- a) Aquellas que cuenten entre 10.000 y 150.000 habitantes-equivalentes y viertan en aguas marítimas.
- b) Aquellas que cuenten entre 2.000 y 10.000 habitantes-equivalentes y viertan en estuarios.
- c) En casos excepcionales, aquellas que cuenten con más de 150.000 habitantes-equivalentes, cuando se demuestre que un tratamiento más avanzado no implicaría ventajas para el medio ambiente.

3. La Administración General del Estado, previa audiencia de las Comunidades Autónomas y de las entidades locales afectadas, declarará las «zonas sensibles» en las cuencas hidrográficas que excedan del ámbito territorial de una Comunidad Autónoma. Las Comunidades Autónomas efectuarán dicha declaración en los restantes casos y determinarán las «zonas menos sensibles» en las aguas marítimas.

Estas declaraciones se efectuarán de acuerdo con lo que se establezca reglamentariamente y serán publicadas en los diarios oficiales correspondientes.

Artículo 8. Prohibición de vertidos de fangos.

Queda prohibido el vertido de fangos procedentes de las instalaciones de tratamiento de aguas residuales a las aguas marítimas, a partir del día 1 de enero de 1999. Su evacuación a aguas continentales queda prohibida a partir de la entrada en vigor del presente Real Decreto-ley.

Artículo 9. Programa de aplicación.

Las Comunidades Autónomas, en el ámbito de sus competencias, elaborarán, para la aplicación de lo establecido en este Real Decreto-ley, un plan o programa que deberá notificarse a la Administración General del Estado antes del 31 de diciembre de 1996, a efectos de comunicar a la Comisión Europea el cumplimiento de las medidas establecidas en esta norma en todo el territorio nacional.

Disposición final primera. Habilitación competencial.

Los preceptos de este Real Decreto-ley tienen naturaleza de legislación básica, dictada al amparo del artículo 149.1.18.ª y 23.ª de la Constitución. En lo que afecta a las cuencas hidrográficas que excedan el ámbito territorial de una Comunidad Autónoma, se dicta, asimismo, al amparo de lo dispuesto en el artículo 149.1.22.ª de la Constitución.

Disposición final tercera. Entrada en vigor.

Este Real Decreto-ley entrará en vigor el mismo día de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Disposición final segunda. Desarrollo reglamentario.

El Gobierno dictará las disposiciones reglamentarias que sean precisas para el desarrollo y aplicación de este Real Decreto-ley.

Dado en Madrid a 28 de diciembre de 1995.

JUAN CARLOS R.

El Presidente del Gobierno,
FELIPE GONZALEZ MARQUEZ

27964 REAL DECRETO-LEY 12/1995, de 28 de diciembre, sobre medidas urgentes en materia presupuestaria, tributaria y financiera.

La devolución al Gobierno del Proyecto de Ley de Presupuestos Generales del Estado para 1996 ha traído como consecuencia la aplicación de la previsión contenida en el artículo 134.4 de la Constitución sobre la prórroga de los Presupuestos Generales del Estado.

En los Presupuestos Generales del Estado, por ministerio de la Constitución, se integran los estados de gastos e ingresos del sector público estatal y el importe de los beneficios fiscales. Asimismo, forman parte de los Presupuestos Generales del Estado un conjunto de normas que guardan conexión directa con el ingreso y con el gasto o con los beneficios fiscales y que, por consiguiente, sirven de soporte a las obligaciones y derechos del Estado en el correspondiente ejercicio económico. En consecuencia, la prórroga automática constitucionalmente prevista afecta tanto a los estados de gastos e ingresos como a las normas incluidas en la Ley de Presupuestos Generales del Estado para 1995.

La anterior afirmación hay que matizarla al tener en cuenta lo dispuesto en el artículo 56.2 de la Ley General Presupuestaria, a cuyo tenor «la prórroga no afectará a los créditos para gastos correspondientes a servicios o programas que deban terminar en el ejercicio cuyos presupuestos se prorrogan». Por ello, la prórroga de los Presupuestos no afecta a los créditos para gastos coyunturales.

Tampoco afectará la prórroga a las normas de vigencia indefinida que excepcionalmente se hubieran incluido

A1.6. REAL DECRETO 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas (BOE nº 77, de 29/03/1996)

12038

Viernes 29 marzo 1996

BOE núm. 77

MINISTERIO DE OBRAS PUBLICAS, TRANSPORTES Y MEDIO AMBIENTE

7159 REAL DECRETO 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas.

El Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establece las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas, ha incorporado al ordenamiento jurídico interno de los preceptos de la Directiva 91/271/CEE, de 21 de mayo, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas, cuyo contenido no estaba ya incluido en el Título V de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas, o en el Título III de la Ley 22/1988, de 28 de julio, de Costas.

En dicho Real Decreto-Ley se impone a determinadas aglomeraciones urbanas la obligación de disponer de sistemas colectores para la recogida y conducción de las aguas residuales, y de aplicar a éstas distintos tratamientos antes de su vertido a las aguas continentales o marítimas. En la determinación de estos tratamientos se tiene en cuenta si los vertidos se efectúan en «zonas sensibles» o en «zonas menos sensibles», lo que determinará un tratamiento más o menos riguroso.

Este Real Decreto completa la incorporación de la citada Directiva, desarrollando lo dispuesto en el Real Decreto-Ley, para lo cual fija los requisitos técnicos que deberán cumplir los sistemas colectores y las instalaciones de tratamiento de las aguas residuales, los requisitos de los vertidos procedentes de instalaciones secundarias o de aquellos que vayan a realizarse en zonas sensibles y regula el tratamiento previo de los vertidos de las aguas residuales industriales cuando éstos se realicen a sistemas colectores o a instalaciones de depuración de aguas residuales urbanas.

Asimismo, se determinan los criterios que deberán tomarse en consideración para la declaración de las «zonas sensibles» y «zonas menos sensibles», que corresponderá efectuar bien a la Administración General del Estado o a las Comunidades Autónomas.

Por último, se establece que las Administraciones públicas, en el ámbito de sus respectivas competencias, deberán efectuar el seguimiento y los controles precisos para garantizar el cumplimiento de las obligaciones contempladas tanto en el Real Decreto-Ley como en este Real Decreto y se fijan los métodos de referencia para el seguimiento y evaluación de los resultados de dichos controles.

En su virtud, a propuesta del Ministro de Obras Públicas, Transportes y Medio Ambiente, de acuerdo con el Consejo de Estado y previa deliberación del Consejo de Ministros en su reunión del día 15 de marzo de 1996,

DISPONGO:

Artículo 1. Objeto.

Este Real Decreto tiene por objeto desarrollar lo dispuesto en el Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establece las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas, complementando las normas sobre recogida, depuración y vertido de dichas aguas.

Artículo 2. Condiciones técnicas de los sistemas colectores.

El proyecto, construcción y mantenimiento de los sistemas colectores a que hace referencia el artículo 4 del Real Decreto-Ley, deberá realizarse teniendo presente el volumen y características de las aguas residuales urbanas y utilizando técnicas adecuadas que garanticen la estanqueidad de los sistemas e impidan la contaminación de las aguas receptoras por el desbordamiento de las aguas procedentes de la lluvia.

Artículo 3. Condiciones técnicas de las instalaciones de tratamiento.

El proyecto, construcción, utilización y mantenimiento de las instalaciones para los tratamientos de aguas residuales urbanas, contemplados en los artículos 5, 6 y 7 del Real Decreto-Ley, deberá realizarse teniendo presente todas las condiciones climáticas normales de la zona, así como las variaciones estacionales de carga.

Asimismo, dichas instalaciones deberán estar proyectadas y construidas de manera que permitan la obtención de muestras representativas de las aguas residuales de entrada y del efluente tratado antes de efectuar el vertido.

Artículo 4. Determinación de los habitantes-equivalentes.

A efectos de lo establecido en el citado Real Decreto-Ley, los habitantes-equivalentes se calcularán a partir del valor medio diario de carga orgánica biodegradable, correspondiente a la semana de máxima carga del año, sin tener en consideración situaciones producidas por lluvias intensas u otras circunstancias excepcionales.

Artículo 5. Requisitos de los vertidos procedentes de las instalaciones de tratamiento secundario.

Los vertidos procedentes de las instalaciones de tratamiento secundario o de un proceso equivalente, a las que hace referencia el artículo 5 del Real Decreto-Ley, deberán cumplir los requisitos que figuran en el cuadro 1 del anexo I de este Real Decreto.

No obstante, las autorizaciones de vertidos podrán imponer requisitos más rigurosos cuando ello sea necesario para garantizar que las aguas receptoras cumplan con los objetivos de calidad fijados en la normativa vigente.

Artículo 6. Requisitos de los vertidos procedentes de instalaciones de tratamiento realizados en zonas sensibles.

1. Los vertidos de las instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas realizados en zonas sensibles, deberán cumplir los requisitos que figuran en los cuadros 1 y 2 del anexo I de este Real Decreto.

No obstante, las autorizaciones de vertidos podrán imponer requisitos más rigurosos cuando ello sea necesario para garantizar que las aguas receptoras cumplan con los objetivos de calidad fijados en la normativa vigente. Asimismo, se podrá eximir en dichas autorizaciones a las instalaciones individuales de tratamiento del cumplimiento de los requisitos del cuadro 2 del anexo I, siempre que se demuestre que el porcentaje mínimo global de reducción de la carga referido a todas las instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas de dicha zona sensible, alcanza al menos el 75 por 100 del total del fósforo y del total del nitrógeno.

2. Los vertidos procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas que, sin realizarse directamente en zonas sensibles, contribuyan a la con-

taminación de dichas zonas, quedarán asimismo sujetos a lo dispuesto en el apartado anterior de este artículo.

Artículo 7. Declaración de «zona sensible» y «zona menos sensible».

1. Serán declaradas «zonas sensibles» y «zonas menos sensibles», de acuerdo con lo dispuesto en el artículo 7.3 del Real Decreto-ley, las masas de agua incluidas en alguno de los supuestos establecidos en los apartados I y II, respectivamente, del anexo II de este Real Decreto.

2. La declaración de dichas zonas se revisará al menos cada cuatro años.

3. En las «zonas sensibles» que pudieran declararse como consecuencia de la revisión prevista en el apartado anterior, se deberán cumplir las especificaciones del artículo 7.1 del Real Decreto-ley y las del artículo 6 de este Real Decreto, en el plazo máximo de siete años contados a partir de la citada revisión.

4. Asimismo, en las zonas que hayan dejado de ser consideradas menos sensibles y que no sean declaradas «zonas sensibles» como consecuencia de la antedicha revisión, se deberán cumplir las especificaciones contenidas en el artículo 5 del Real Decreto-ley y en el artículo 5 de este Real Decreto, en el plazo máximo de siete años contados a partir de la citada revisión.

Artículo 8. Necesidad de tratamiento previo del vertido de las aguas residuales industriales.

Los vertidos de las aguas residuales industriales en los sistemas de alcantarillado, sistemas colectoras o en las instalaciones de depuración de aguas residuales urbanas serán objeto del tratamiento previo que sea necesario para:

- a) Proteger la salud del personal que trabaje en los sistemas colectores y en las instalaciones de tratamiento.
- b) Garantizar que los sistemas colectores, las instalaciones de tratamiento y los equipos correspondientes no se deterioren.
- c) Garantizar que no se obstaculice el funcionamiento de las instalaciones de tratamiento de aguas residuales.
- d) Garantizar que los vertidos de las instalaciones de tratamiento no tengan efectos nocivos sobre el medio ambiente y no impidan que las aguas receptoras cumplan los objetivos de calidad de la normativa vigente.
- e) Garantizar que los fangos puedan evacuarse con completa seguridad de forma aceptable desde la perspectiva medioambiental. En ningún caso se autorizará su evacuación al alcantarillado o al sistema colector.

Artículo 9. Seguimiento del cumplimiento de los requisitos.

1. Las Administraciones públicas, en el ámbito de sus respectivas competencias, efectuarán el seguimiento correspondiente y los controles periódicos precisos para garantizar el cumplimiento adecuado de las obligaciones establecidas en el Real Decreto-ley y en este Real Decreto.

2. El control del cumplimiento de los requisitos establecidos respecto de los vertidos de las instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas, se efectuará con arreglo a los métodos de referencia establecidos en el anexo III de este Real Decreto.

3. Las Administraciones públicas competentes deberán elaborar y publicar cada dos años un informe de situación sobre el vertido de aguas residuales urbanas y de fangos en sus respectivos ámbitos.

4. Se notificará a la Secretaría de Estado de Medio Ambiente y Vivienda el resultado de la realización de los controles señalados en el apartado 1, el método de referencia previsto en el apartado 2 y el informe de situación del apartado 3, a efectos de su comunicación a la Comisión Europea.

Disposición transitoria única. Adaptación de las instalaciones de tratamiento.

Las instalaciones de tratamiento de aguas residuales, a que hacen referencia los artículos 5, 6 y 7 del Real Decreto-ley, existentes en el momento de la entrada en vigor de este Real Decreto, deberán ser modificadas de modo que permitan obtener muestras representativas de las aguas residuales de entrada y del efluente tratado antes de efectuar el vertido.

Disposición final primera. Normativa básica.

Los preceptos de este Real Decreto tienen naturaleza de legislación básica en aplicación de lo dispuesto en el artículo 149.1.23.ª de la Constitución.

Disposición final segunda. Entrada en vigor.

Este Real Decreto entrará en vigor el mismo día de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Dado en Madrid a 15 de marzo de 1996.

JUAN CARLOS R.

El Ministro de Obras Públicas,
Transportes y Medio Ambiente,
JOSE BORRELL FONTELLES

ANEXO I

Requisitos de los vertidos de aguas residuales

Cuadro 1

Requisitos para los vertidos procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas. Se aplicará el valor de concentración o el porcentaje de reducción.

Parámetros	Concentración	Porcentaje mínimo de reducción (1)	Método de medida de referencia
Demanda bioquímica de oxígeno (DBO 5 a 20 °C) sin nitrificación (2).	25 mg/l O ₂	70-90 40 de conformidad con el apartado 3 del artículo 5 R.D.L (3).	Muestra homogeneizada, sin filtrar ni decantar. Determinación del oxígeno disuelto antes y después de cinco días de incubación a 20 °C ± 1 °C, en completa oscuridad. Aplicación de un inhibidor de la nitrificación.

Parámetros	Concentración	Porcentaje mínimo de reducción (1)	Método de medida de referencia
Demanda química de oxígeno (DQO).	125 mg/l O ₂	75	Muestra homogeneizada, sin filtrar ni decantar. Dicromato potásico.
Total de sólidos en suspensión.	35 mg/l (4) 35 de conformidad con el apartado 3 del art. 5 R.D.L. (más de 10.000 h-e) (3). 60 de conformidad con el apartado 3 del art. 5 R.D.L. (de 2.000 a 10.000 h-e) (3).	90 (4) 90 de conformidad con el apartado 3 del art. 5 R.D.L. (más de 10.000 h-e) (3). 70 de conformidad con el apartado 3 del art. 5 R.D.L. (de 2.000 a 10.000 h-e) (3).	Filtración de una muestra representativa a través de una membrana de filtración de 0,45 micras. Secado a 105 °C y pesaje. Centrifugación de una muestra representativa (durante cinco minutos como mínimo, con una aceleración media de 2.800 a 3.200 g), secado a 105 °C y pesaje.

- (1) Reducción relacionada con la carga del caudal de entrada.
 (2) Este parámetro puede sustituirse por otro: carbono orgánico total (COT) o demanda total de oxígeno (DTO), si puede establecerse una correlación entre DBO 5 y el parámetro sustituto.
 (3) Se refiere a los supuestos en regiones consideradas de alta montaña contemplada en el apartado 3 del artículo 5 del Real Decreto-ley 11/1995, de 28 de diciembre.
 (4) Este requisito es optativo.
 Los análisis de vertidos procedentes de sistemas de depuración por lagunaje se llevarán a cabo sobre muestras filtradas; no obstante, la concentración de sólidos totales en suspensión en las muestras de aguas sin filtrar no deberá superar los 150 mg/l.

Cuadro 2

Requisitos procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas realizadas en zonas sensibles cuyas aguas sean eutróficas o tengan tendencia a serlo en un futuro próximo. Según la situación local, se podrá aplicar uno o los dos parámetros. Se aplicarán el valor de concentración o el porcentaje de reducción.

Parámetros	Concentración	Porcentaje mínimo de reducción (1)	Método de medida de referencia
Fósforo total.	2 mg/l P (de 10.000 a 100.000 h-e). 1 mg/l P (más de 100.000 h-e).	80	Espectrofotometría de absorción molecular.
Nitrógeno total (2).	15 mg/l N (de 10.000 a 100.000 h-e). 10 mg/l N (más de 100.000 h-e) (3).	70-80	Espectrofotometría de absorción molecular.

- (1) Reducción relacionada con la carga del caudal de entrada.
 (2) Nitrógeno total equivale a la suma del nitrógeno Kjeldahl total (N orgánico + NH₃), nitrógeno en forma de nitrato (NO₃) y nitrógeno en forma de nitrito (NO₂).
 (3) Alternativamente el promedio diario no deberá superar los 20 mg/l N. Este requisito se refiere a una temperatura del agua de 12 °C o más durante el funcionamiento del reactor biológico de la instalación de tratamiento de aguas residuales. En sustitución del requisito relativo a la temperatura, se podrá aplicar una limitación del tiempo de funcionamiento que tenga en cuenta las condiciones climáticas regionales. Se aplicará esta alternativa en caso de que, pueda demostrarse que se cumple el apartado A).1 del anexo III.

ANEXO II

Criterios para la determinación de zonas sensibles y menos sensibles

I. Zonas sensibles

Se considerará que un medio acuático es zona sensible si puede incluirse en uno de los siguientes grupos:

a) Lagos, lagunas, embalses, estuarios y aguas marítimas que sean eutróficas o que podrían llegar a ser eutróficas en un futuro próximo si no se adoptan medidas de protección.

(Se entenderá por «eutrofización»: el aumento de nutrientes en el agua, especialmente de los compuestos de nitrógeno o de fósforo, que provoca un crecimiento acelerado de algas y especies vegetales superiores, con el resultado de trastornos no deseados en el equilibrio entre organismos presentes en el agua y en la calidad del agua a la que afecta.)

Podrán tenerse en cuenta los siguientes elementos en la consideración del nutriente que deba ser reducido con un tratamiento adicional:

1.º Lagos y cursos de agua que desemboquen en lagos, lagunas, embalses, bahías cerradas que tengan

un intercambio de aguas escaso y en los que, por lo tanto, puede producirse una acumulación. En dichas zonas conviene prever la eliminación de fósforo a no ser que se demuestre que dicha eliminación no tendrá consecuencias sobre el nivel de eutrofización. También podrá considerarse la eliminación de nitrógeno cuando se realicen vertidos de grandes aglomeraciones urbanas.

2.º Estuarios, bahías y otras aguas marítimas que tengan un intercambio de aguas escaso o que reciban gran cantidad de nutrientes. Los vertidos de aglomeraciones pequeñas tienen normalmente poca importancia en dichas zonas, pero para las grandes aglomeraciones deberá incluirse la eliminación de fósforo y/o nitrógeno a menos que se demuestre que su eliminación no tendrá consecuencias sobre el nivel de eutrofización.

b) Aguas continentales superficiales destinadas a la obtención de agua potable que podrían contener una concentración de nitratos superior a la que establecen las disposiciones pertinentes del Real Decreto 927/1988, de 29 de julio, por el que se aprueba el Reglamento de la Administración Pública del Agua y de la Planificación Hidrológica.

c) Masas de agua en las que sea necesario un tratamiento adicional al tratamiento secundario establecido en el artículo 5 del Real Decreto-ley y en este Real Decre-

to para cumplir lo establecido en la normativa comunitaria.

II. Zonas menos sensibles

Un medio o zona de agua marina podrá catalogarse como zona menos sensible cuando el vertido de aguas residuales no tenga efectos negativos sobre el medio ambiente debido a la morfología, hidrología o condiciones hidráulicas específicas existentes en esta zona.

Al determinar las zonas menos sensibles, se tomará en consideración el riesgo de que la carga vertida pueda desplazarse a zonas adyacentes y ser perjudicial para el medio ambiente.

Para determinar las zonas menos sensibles se tendrán en cuenta los siguientes elementos:

Bahías abiertas, estuarios y otras aguas marítimas con un intercambio de agua bueno y que no tengan eutrofización o agotamiento del oxígeno, o en las que se considere que es improbable que lleguen a desarrollarse fenómenos de eutrofización o de agotamiento del oxígeno por el vertido de aguas residuales urbanas.

ANEXO III

Métodos de referencia para el seguimiento y evaluación de resultados

A) Criterios generales

1. Se aplicará un método de control que corresponda al menos al nivel de los requisitos que se indican a continuación, teniendo en cuenta que no se computarán los valores extremos para la calidad del agua cuando éstos sean consecuencia de situaciones inusuales, como las ocasionadas por las lluvias intensas.

Podrán utilizarse métodos alternativos respecto a los indicados en el apartado B de este anexo, siempre que pueda demostrarse que se obtienen resultados equivalentes.

2. Se considerará que las aguas residuales tratadas se ajustan a los parámetros correspondientes cuando, para cada uno de los parámetros pertinentes, las muestras de dichas aguas indiquen que éstas respetan los valores paramétricos de que se trate, de la siguiente forma:

1.º El número máximo de muestras que pueden no cumplir los requisitos expresados en reducciones de porcentajes y/o concentraciones del cuadro 1 del anexo I de este Real Decreto y del tratamiento primario regulado en el artículo 2.g) del Real Decreto-ley, es el que se especifica en el apartado C) de este anexo III.

2.º Respecto de los parámetros del cuadro 1 del anexo I, expresados en concentración, las muestras no conformes tomadas en condiciones normales de funcionamiento no deberán desviarse de los valores paramétricos en más del 100 por 100. Por lo que se refiere a los valores paramétricos de concentración relativos al total de sólidos en suspensión, se podrán aceptar desviaciones de hasta un 150 por 100.

3.º Por lo que se refiere a los parámetros fijados en el cuadro 2 del anexo I, la media anual de las muestras deberá respetar los valores correspondientes para cada uno de los parámetros.

B) Métodos de referencia

1. Se tomarán muestras durante un período de veinticuatro horas, proporcionalmente al caudal o a intervalos regulares, en el mismo punto claramente definido de la salida de la instalación de tratamiento, y de ser necesari

en su entrada, para vigilar el cumplimiento de los requisitos aplicables a los vertidos de aguas residuales.

Se aplicarán prácticas internacionales de laboratorio correctas con objeto de que se reduzca al mínimo el deterioro de las muestras en el período que media entre la recogida y el análisis.

2. El número mínimo anual de muestras se establecerá según el tamaño de la instalación de tratamiento y se recogerá a intervalos regulares durante el año:

- a) De 2.000 a 9.999 h-e: 12 muestras durante el primer año, cuatro muestras los siguientes años, siempre que pueda demostrarse que el agua del primer año cumple las disposiciones del presente Real Decreto; si una de las cuatro muestras no resultara conforme, se tomarán 12 muestras el año siguiente.
- b) De 10.000 a 49.999 h-e: 12 muestras.
- c) De 50.000 h-e o más: 24 muestras.

C) Número máximo permitido de muestras no conformes en función de las series de muestras tomadas en un año

Serie de muestras tomadas en un año	Número máximo permitido de muestras no conformes
4-7	1
8-16	2
17-28	3
29-40	4
41-53	5
54-67	6
68-81	7
82-95	8
96-110	9
111-125	10
126-140	11
141-155	12
156-171	13
172-187	14
188-203	15
204-219	16
220-235	17
236-251	18
252-268	19
269-284	20
285-300	21
301-317	22
318-334	23
335-350	24
351-365	25

MINISTERIO DE EDUCACION Y CIENCIA

7160 ORDEN de 20 de marzo de 1996 por la que se modifica el plazo de implantación progresiva del segundo ciclo de la Educación Infantil para los centros privados.

El artículo 5 del Real Decreto 986/1991, de 14 de junio («Boletín Oficial del Estado» del 25), por el que

A1.7. LEY AUTONOMICA 10/1993, de 26 de octubre, de la Comunidad de Madrid, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento (BOCAM nº 269 de 12/11/1993)

37578

Jueves 30 diciembre 1993

BOE núm. 312

Disposición final segunda.

La presente Ley entrará en vigor al día siguiente de su publicación en el «Boletín Oficial de Cantabria».

Palacio de la Diputación, Santander, 18 de noviembre de 1993.

JUAN HORMAECHEA CAZON,
Presidente del Consejo de Gobierno

(Publicada en el «Boletín Oficial de Cantabria» número 241 de 3 de diciembre de 1993)

COMUNIDAD AUTONOMA DE MADRID

31103 LEY 10/1993, de 26 de octubre, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento.

EL PRESIDENTE DE LA COMUNIDAD DE MADRID

Hago saber que la Asamblea de Madrid ha aprobado la siguiente Ley, que yo, en nombre del Rey, promulgo.

PREAMBULO

La Constitución Española establece en su artículo 45 el derecho a disfrutar de un medio ambiente adecuado para el desarrollo de la persona, así como el deber de conservarlo, encomendando a los poderes públicos velar por la utilización racional de los recursos naturales y sancionar su incumplimiento, así como exigir la reparación del daño causado.

El Estatuto de Autonomía de la Comunidad de Madrid atribuye funciones legislativas, plenas o de desarrollo, según los casos, sobre diversas materias que constituyen el entorno físico y el medio natural. Así el artículo 27 en su apartado 10, atribuye a la Comunidad de Madrid la facultad de establecer normas adicionales de protección sobre el medio ambiente, para evitar el deterioro de los equilibrios ecológicos, especialmente en lo relativo al aire, agua, espacios naturales y conservación de la flora, la fauna y los testimonios culturales.

Por otro lado, la Ley 3/1988, de 13 de octubre, para la gestión del Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid, en su artículo 7.2.3 atribuye a la Agencia de Medio Ambiente el ejercicio de las competencias en materia de protección de la calidad y control de la contaminación de las aguas.

La Ley 10/1991, de 4 de abril, de Protección del Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid, configuró un sistema de normas adicionales de protección del medio ambiente, y en su artículo 31.2 se remite a la normativa aplicable sobre la materia para la determinación de las cantidades y condiciones en que se deben autorizar los vertidos o emisiones.

Teniendo en cuenta las singulares características de la Comunidad de Madrid; que une a su alta densidad de población una gran actividad económica y un porcentaje muy elevado de suelo urbano, se hace necesario el desarrollo legislativo específico que, sin perjuicio de la competencia que en esta materia desarrollan las Entidades locales, proporcione las normas adecuadas para regular el vertido de aguas residuales industriales a la red de alcantarillado, con objeto de proteger las instalaciones de saneamiento y depuración, y en consecuencia, los recursos hidráulicos y el medio ambiente en la Comunidad.

La presente Ley se sitúa en el marco de la Directiva 91/271/CEE, de 21 de mayo, relativa al tratamiento de las aguas residuales urbanas, que señala la necesidad de que los vertidos de aguas residuales industriales que entren en los sistemas colectores e instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas sean objeto de un tratamiento previo para garantizar, principalmente, que no tengan efectos nocivos sobre las personas y el medio ambiente y no deterioren las infraestructuras de saneamiento.

Por otro lado, esta norma toma también como punto de referencia la Ley 17/1984, de 20 de diciembre, reguladora del Abastecimiento y Saneamiento de Agua en la Comunidad de Madrid y la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas y Reglamentos que la desarrollan, enmarcando la asignación de competencias a los Ayuntamientos en la Ley 7/1985, de 2 de abril, Reguladora de las Bases de Régimen Local, que en su artículo 25, establece que los municipios ejercerán en todo caso y de acuerdo con la legislación del Estado y de las Comunidades Autónomas, competencias en materia de alcantarillado y tratamiento de aguas residuales.

Asimismo es importante señalar que de la experiencia obtenida en el análisis de la situación actual, se desprende que la repercusión económica de esta Ley, en cuanto a provisión de medidas correctoras es asumible, en términos generales, por los diferentes sectores industriales implicados.

La Ley se estructura en cuatro títulos, dedicados a Disposiciones Generales, Condiciones y Control de los Vertidos al Sistema Integral de Saneamiento, Inspección y Vigilancia y Disciplina de Vertido, completándose con una disposición adicional, cuatro transitorias, una derogatoria, siete finales y cinco anexos.

TITULO I

Disposiciones generales

Artículo 1. *Objeto.*

La presente Ley tiene por objeto regular los vertidos líquidos industriales al Sistema Integral de Saneamiento, con el fin de proteger las instalaciones de saneamiento, los recursos hidráulicos, y por tanto el medio ambiente y la salud de las personas en la Comunidad de Madrid.

Artículo 2. *Glosario de términos.*

A efectos de la presente Ley, se entiende por:

Ente gestor. Entidad u organización de carácter público, privado o mixto que tenga encomendada la responsabilidad de las operaciones de mantenimiento y explotación de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales.

Estación depuradora de aguas residuales. Unidad compuesta por instalaciones, estructuras o mecanismos que permitan una depuración por métodos físicos, físico-químicos, biológicos o alternativas tecnológicas similares del agua residual.

Instalaciones industriales e industrias. Establecimientos utilizados para cualquier actividad comercial o industrial.

Pretratamiento. Operaciones de depuración, procesos unitarios o encadenados, de cualquier tipo, que sean utilizados para reducir o neutralizar la carga contaminante de forma parcial en calidad o cantidad de la misma.

Sistema integral de Saneamiento. Conjunto de infraestructuras públicas de saneamiento que comprendan alguno de los elementos siguientes: red de alcantarillado, colectores, emisarios, instalaciones correctoras de contaminación o estaciones Depuradoras de Aguas Residuales, cualquiera que sea el tipo de tecnología utilizada y cuyo objetivo sea recoger, transportar y depurar

las aguas residuales para devolverlas a los cauces públicos en las mejores condiciones, compatibles con el mantenimiento del medio ambiente, particularmente en lo que se refiere al recurso hidráulico.

Usuario. Persona natural o jurídica titular de una actividad industrial que utilice el Sistema Integral de Saneamiento para verter sus efluentes industriales.

Vertidos líquidos industriales. Las aguas residuales procedentes de los procesos propios de la actividad de las instalaciones industriales e industrias con presencia de sustancias disueltas o en suspensión.

Artículo 3. *Ambito.*

1. Quedan sometidos a lo establecido en la presente Ley, todos los vertidos líquidos industriales susceptibles de ser evacuados al Sistema Integral de Saneamiento en el ámbito territorial de la Comunidad de Madrid.

2. Se excluyen del ámbito de aplicación de la presente Ley, los vertidos radiactivos, a los que les será de aplicación la normativa específica sobre la materia.

Artículo 4. *Depuración.*

Las aguas residuales procedentes de vertidos industriales que no se ajusten a las características reguladas en la presente Ley, deberán ser depuradas o corregidas antes de su incorporación a la red de alcantarillado mediante la instalación de unidades de pretratamiento, plantas depuradoras específicas o, incluso, modificando sus procesos de fabricación.

TITULO II

De las condiciones y control de los vertidos al sistema integral de saneamiento

CAPITULO I

De los vertidos prohibidos y tolerados

Artículo 5. *Vertidos prohibidos.*

Quedan prohibidos los vertidos al Sistema Integral de Saneamiento de todos los compuestos y materias que de forma enumerativa quedan agrupados, por similitud de efectos, en el anexo 1.

Artículo 6. *Vertidos tolerados.*

1. Se consideran vertidos tolerados todos los que no estén incluidos en el artículo anterior.

2. Atendiendo a la capacidad y utilización de las instalaciones de saneamiento y depuración, se establecen unas limitaciones generales, cuyos valores máximos instantáneos de los parámetros de contaminación son los que se incluyen en la tabla del anexo 2. Queda prohibida la dilución para conseguir niveles de concentración que posibiliten su evacuación al Sistema Integral de Saneamiento.

CAPITULO II

De la identificación industrial, solicitud y autorización de vertidos

Artículo 7. *Identificación Industrial.*

Toda instalación industrial, que utilice el Sistema Integral de Saneamiento para evacuar sus vertidos deberá presentar en el Ayuntamiento donde esté ubicada la actividad, la correspondiente identificación industrial.

Artículo 8. *Solicitud de vertido.*

1. Las instalaciones industriales que viertan aguas residuales al Sistema Integral de Saneamiento y estén comprendidas en el anexo 3 deberán presentar junto con la identificación industrial la correspondiente solicitud de vertido, en el Ayuntamiento donde esté ubicada la actividad.

2. Cuando una instalación industrial desee efectuar algún cambio en la composición del vertido respecto a los datos declarados en la solicitud de vertido comprendidos en los anexos 2 y 3 de la presente Ley, deberá presentar en el mismo Ayuntamiento, con carácter previo, una nueva solicitud de vertido en la que se haga constar los datos correspondientes a aquel para el que se solicita la nueva autorización.

Artículo 9. *Acreditación de datos.*

1. Los datos consignados en la solicitud de vertido deberán estar debidamente justificados.

2. El Ayuntamiento motivadamente, podrá requerir al solicitante, un análisis del vertido, realizado por un laboratorio homologado, cuando existan indicios racionales de anomalías en los datos presentados.

Artículo 10. *Autorización de vertido.*

1. El Ayuntamiento autorizará el vertido o lo denegará por no ajustarse a las disposiciones de la presente Ley y a las normas técnicas medioambientales vigentes. El plazo máximo para resolver las solicitudes de autorización de vertido que se formulen por los interesados será de tres meses. Transcurrido dicho plazo sin que la autorización se hubiera producido, se entenderá denegada la misma.

2. En aquellos supuestos en los que por aplicación de lo establecido en la Ley 10/1991, de 4 de abril, de Protección del Medio Ambiente, no haya existido un pronunciamiento previo de la Agencia de Medio Ambiente sobre la actividad objeto de autorización, será preceptivo un informe previo de dicha Agencia, que será emitido en el plazo de un mes y tendrá carácter vinculante.

3. La autorización de vertido podrá establecer limitaciones y condiciones mediante la inclusión de los siguientes apartados:

a) Valores máximos y medios permitidos en las concentraciones de contaminantes y características físico-químicas de las aguas residuales vertidas.

b) Límites sobre el caudal y el horario de las descargas.

c) Exigencias de instalaciones de adecuación de los vertidos e inspección, muestreo y medición, en caso de que sea necesario.

d) Exigencias respecto al mantenimiento, informes técnicos y registros de la planta en relación con el vertido. Para ello, cada industria llevará un libro de registro en el que se anoten las características e incidencias de los vertidos.

e) Programas de ejecución de las instalaciones de depuración.

f) Condiciones complementarias que garanticen el cumplimiento de la presente Ley.

4. Las autorizaciones se revisarán y, en su caso, se adaptarán cada cinco años.

Artículo 11. *Modificación o suspensión de la autorización.*

1. El Ayuntamiento, cumplimentado en su caso lo dispuesto en el artículo 8.2, podrá modificar las con-

diciones de la autorización de vertido cuando las circunstancias que motivaron su otorgamiento se hubieran alterado o sobrevinieran otras que, de haber existido anteriormente, habrían justificado su denegación o el otorgamiento en términos distintos, pudiendo en su caso decretar la suspensión temporal hasta que se superen dichas circunstancias.

2. El usuario será informado con suficiente antelación de las posibles modificaciones y dispondrá del tiempo adecuado para adaptarse a su cumplimiento.

Artículo 12. *Información.*

Los Ayuntamientos informarán periódicamente al Organismo competente de la Comunidad de Madrid de todas las autorizaciones de vertido concedidas, así como de sus modificaciones.

CAPITULO III

Del pretratamiento de los vertidos

Artículo 13. *Instalaciones de pretratamiento.*

1. En el caso de que los vertidos no reunieran las condiciones exigidas para su incorporación al Sistema Integral de Saneamiento, el usuario estará obligado a presentar en el Ayuntamiento correspondiente el proyecto de una instalación de pretratamiento o depuradora específica, que incluya información complementaria para su estudio y aprobación. No podrán alterarse posteriormente los términos y especificaciones del proyecto aprobado.

2. El usuario estará obligado a la construcción, explotación y mantenimiento de las instalaciones necesarias en cumplimiento de lo establecido en la presente Ley.

3. El Ayuntamiento podrá exigir la instalación de medidores de caudal vertido y otros instrumentos y medidas de control de contaminación, en los casos en que no exista fiabilidad respecto a los datos o estimaciones aportados por el usuario.

Artículo 14. *Asociación de usuarios.*

Cuando varios usuarios se unieran para efectuar conjuntamente el pretratamiento de sus vertidos, deberán obtener una Autorización de Vertido para el efluente final conjunto, con declaración de todos los usuarios que lo componen y de sus efluentes. La responsabilidad del cumplimiento de las condiciones de vertido será tanto de la comunidad de usuarios como de cada uno de ellos solidariamente.

Artículo 15. *Autorización condicionada.*

En cualquier caso, la Autorización de Vertido quedará condicionada a la eficacia del pretratamiento de tal forma que si el mismo no consiguiera los resultados previstos, quedaría sin efecto dicha autorización.

CAPITULO IV

De las descargas accidentales

Artículo 16. *Comunicación.*

1. Cada usuario deberá tomar las medidas adecuadas para evitar las descargas accidentales de vertidos que puedan ser potencialmente peligrosas para la seguridad física de las personas, instalaciones, Estación Depuradora de Aguas Residuales o bien de la propia red de alcantarillado.

2. Cuando por accidente, fallo de funcionamiento o de la explotación de las instalaciones del usuario, se

produzca un vertido que esté prohibido y como consecuencia sea capaz de originar una situación de emergencia y peligro, tanto para las personas como para el Sistema Integral de Saneamiento, el usuario deberá comunicar urgentemente la circunstancia producida al Ente Gestor de la explotación de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales, al Ayuntamiento correspondiente y a la Agencia de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid, con objeto de evitar o reducir al mínimo los daños que pudieran causarse. La comunicación se efectuará utilizando el medio más rápido.

Artículo 17. *Adopción de medidas.*

1. Una vez producida la situación de emergencia, el usuario utilizará todos los medios a su alcance para reducir al máximo los efectos de la descarga accidental.

2. El usuario deberá remitir al Ente Gestor de la explotación de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales, en el plazo máximo de cuarenta y ocho horas, un informe detallado del accidente, en el que deberán figurar los siguientes datos: identificación de la Empresa, caudal y materias vertidas, causa del accidente, hora en que se produjo, medidas correctoras tomadas «in situ», hora y forma en que se comunicó el suceso al Ente Gestor y a la Administración. Ambas Entidades podrán recabar del usuario los datos necesarios para la correcta valoración del accidente.

Artículo 18. *Valoración y abono de daños.*

1. La valoración de los daños será realizada por la Administración competente teniendo en cuenta el informe que emitirá el Ente Gestor.

2. Los costes de las operaciones a que den lugar los accidentes que ocasionen situaciones de emergencia o peligro, así como los de limpieza, remoción, reparación o modificación del Sistema Integral de Saneamiento, deberán ser abonados por el usuario causante, con independencia de otras responsabilidades en las que pudiera haber incurrido.

Artículo 19. *Accidentes mayores.*

Cuando las situaciones de emergencia, a las que se hace referencia en los artículos anteriores, puedan ser calificadas de accidentes mayores, además de las normas establecidas en la presente Ley, será de aplicación el Real Decreto 886/1988, de 15 de julio, y demás disposiciones reglamentarias.

CAPITULO V

Del muestreo, análisis y autocontrol de los vertidos

Artículo 20. *Muestreo.*

El muestreo se realizará por personal oficialmente designado por la Administración correspondiente en presencia del usuario o representante, salvo que el mismo renunciara a ello, en cuyo caso se hará constar en el acta levantada al efecto.

Artículo 21. *Muestras.*

1. Las determinaciones analíticas se realizarán sobre muestras simples recogidas en el momento más representativo del vertido, el cual será señalado por la Administración actuante.

2. Cuando durante un determinado intervalo de tiempo se permitan vertidos con valores máximos de contaminación, los controles se efectuarán sobre mues-

tras compuestas. Estas serán obtenidas por mezcla y homogeneización de muestras simples recogidas en el mismo punto y en diferentes tiempos, siendo el volumen de cada muestra simple proporcional al volumen del caudal vertido.

Artículo 22. *Distribución de la muestra.*

Cada muestra se fraccionará en tres partes, dejando una a disposición del usuario, otra en poder de la Administración actuante y la tercera, debidamente precintada, acompañará al acta levantada.

Artículo 23. *Métodos analíticos.*

Los métodos analíticos seleccionados para la determinación de los diferentes parámetros de los vertidos, son los enumerados en el anexo 4.

Artículo 24. *Análisis de la muestra.*

1. Los análisis de las muestras podrán realizarse en las instalaciones homologadas o designadas por la Administración actuante, en las de una Empresa colaboradora, al menos del Grupo 2, del Ministerio de Obras Públicas, Transportes y Medio Ambiente, o en las de una Empresa colaboradora en materia de medio ambiente industrial del Ministerio de Industria y Energía.

2. Las muestras que vayan a ser analizadas no llevarán identificación o señal alguna que permita determinar su origen o procedencia, ni la identidad de la instalación industrial de que procedan.

Artículo 25. *Autocontrol.*

El titular de la Autorización de Vertidos tomará las muestras y realizará los análisis que se especifiquen en la propia Autorización para verificar que los vertidos no sobrepasan las limitaciones establecidas en la presente Ley.

Los resultados de los análisis deberán conservarse al menos durante tres años.

Artículo 26. *Información de la Administración.*

1. Las determinaciones y los resultados de los análisis del autocontrol podrán ser requeridos por la Administración. Esta información estará siempre a disposición del personal encargado de la inspección y control de los vertidos en el momento de su actuación.

2. La Administración competente podrá requerir al usuario para que presente periódicamente un informe sobre el efluente.

Artículo 27. *Registro de efluentes.*

1. Las instalaciones industriales que viertan aguas residuales dispondrán, para la toma de muestra y mediciones de caudales u otros parámetros, de una arqueta o registro de libre acceso desde el exterior y de acuerdo con el diseño indicado en el anexo 5, situada aguas abajo del último vertido y de tal forma ubicada que el flujo del efluente no pueda variarse.

2. En determinados casos específicos el usuario podrá redactar un proyecto detallado de otro tipo de arqueta o elemento sustitutorio que proponga y someterlo a la autorización de la Administración.

Artículo 28. *Registro del pretratamiento.*

Las agrupaciones industriales u otros usuarios que mejoren la calidad de sus efluentes dispondrán, a la salida de su instalación de pretratamiento, de la correspondiente arqueta o registro de libre acceso, sin exclusión de la establecida por el artículo anterior.

Artículo 29. *Control individual.*

Con independencia de que varios usuarios pudieran verter sus aguas residuales en una arqueta común, las instalaciones industriales que, de entre aquéllas, reúnan las características que se detallan en el anexo 2 de la presente Ley, vendrán obligadas a instalar antes de la confluencia de sus vertidos en la arqueta común, arquetas o registros individuales, de acuerdo con lo establecido en el artículo 27.1 de la presente Ley.

Artículo 30. *Mantenimiento.*

Las instalaciones industriales que viertan aguas residuales al Sistema Integral de Saneamiento deberán conservar en perfecto estado de funcionamiento todos los equipos de medición, muestreo y control necesarios para realizar la vigilancia de la calidad de sus efluentes.

TITULO III

De la inspección y vigilancia

Artículo 31. *Administración competente.*

1. Corresponde a los Ayuntamientos y a la Comunidad de Madrid, a través de la Agencia de Medio Ambiente, sin perjuicio de las atribuciones de la Administración del Estado, ejercer las funciones de inspección y vigilancia de todos los vertidos que se realicen al Sistema Integral de Saneamiento, así como de las instalaciones de adecuación, pretratamiento o depuración del vertido instaladas por el usuario.

2. Ambas Administraciones coordinarán sus actuaciones en orden a la máxima eficacia, pudiendo establecer convenios para tal fin.

Artículo 32. *Acceso a las instalaciones.*

Para el desempeño de estas funciones de inspección y vigilancia el usuario facilitará a los inspectores que les ejerzan, debidamente acreditados por la Administración correspondiente, el acceso a las instalaciones que generen efluentes industriales. No será necesaria la notificación previa de la inspección cuando se efectúe en horas de actividad industrial.

Artículo 33. *Inspección.*

La inspección y vigilancia consistirá, entre otras, en las siguientes funciones:

a) Comprobación del estado de la instalación y del funcionamiento de los instrumentos que para el control de los efluentes se hubieran establecido en la Autorización de Vertido.

b) Muestreo de los vertidos en cualquier punto de las instalaciones que los originan.

c) Medida de los caudales vertidos al Sistema Integral de Saneamiento y de parámetros de calidad medibles «in situ».

d) Comprobación de los caudales de abastecimiento y autoabastecimiento.

e) Comprobación del cumplimiento del usuario de los compromisos detallados en la Autorización de Vertido.

f) Comprobación del cumplimiento de las restantes obligaciones en materia de vertidos, contemplados en la presente Ley.

g) Cualquier otra que resulte necesaria para el correcto desarrollo de la labor inspectora.

TITULO IV

De la Disciplina de Vertido

CAPITULO I

Del procedimiento de suspensión de vertidos

Artículo 34. *Acta de inspección.*

De cada inspección se levantará acta por triplicado. El acta será firmada conjuntamente por el inspector competente y el usuario o persona delegada al que se hará entrega de una copia de la misma, sin que esta firma implique necesariamente conformidad con el contenido del acta.

Artículo 35. *Suspensión inmediata.*

1. El Alcalde o el órgano competente de la Comunidad de Madrid podrán ordenar motivadamente la suspensión inmediata del vertido de una instalación industrial cuando se dé alguna de las siguientes circunstancias:

- a) No haber presentado la identificación industrial en los términos establecidos en el artículo 7.º
- b) Carecer de la Autorización de Vertido.
- c) No adecuarse el vertido a las limitaciones y condiciones establecidas en la Autorización de Vertido.

2. Aunque no se den supuestos del apartado anterior pero puedan producirse situaciones de inminente gravedad como consecuencia de los vertidos, el Alcalde o el órgano competente de la Comunidad de Madrid podrán ordenar motivadamente la suspensión inmediata del vertido.

Artículo 36. *Aseguramiento de la suspensión.*

La Administración que ordenó la suspensión podrá precintar o adoptar cualquier otra medida que considere adecuada, encaminada a asegurar la efectividad de la suspensión.

Artículo 37. *Adecuación del vertido.*

En el plazo de dos meses, contados desde la notificación de la suspensión de vertido, el usuario deberá presentar en el Ayuntamiento donde esté ubicada la actividad, la identificación industrial y la solicitud de vertido o, en su caso, adecuar el vertido a las limitaciones y condiciones establecidas en la Autorización de Vertido.

Artículo 38. *Resolución definitiva.*

Si transcurrido el plazo regulado en el artículo anterior, el usuario no hubiera cumplido lo establecido en el mismo, el órgano competente podrá ordenar, previa audiencia del interesado, la suspensión definitiva del vertido al Sistema Integral de Saneamiento.

Artículo 39. *Reparación del daño e indemnizaciones.*

Sin perjuicio de la regularización de su actuación, el usuario procederá a la reparación del daño causado y a la indemnización con arreglo a lo establecido en el artículo 46.

CAPITULO II

De las infracciones y sanciones

Artículo 40. *Clasificación de las infracciones.*

Las infracciones se clasifican en leves, graves y muy graves.

Artículo 41. *Infracciones leves.*

Se consideran infracciones leves:

a) Las acciones y omisiones que contraviniendo lo establecido en la presente Ley causen daño a los bienes de dominio o uso público hidráulico o a los del Ente Gestor afectos a la explotación de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales y cuya valoración no supere las 500.000 pesetas.

b) La no aportación de la información periódica que deba entregarse a la Administración competente sobre características del efluente o cambios introducidos en el proceso que puedan afectar al mismo.

c) El incumplimiento de cualquier prohibición establecida en la presente Ley o la omisión de los actos a que obliga, siempre que no estén consideradas como infracciones graves o muy graves.

Artículo 42. *Infracciones graves.*

Se consideran infracciones graves:

a) Las acciones y omisiones que contraviniendo lo establecido en la presente Ley causen daño a los bienes de dominio o uso público hidráulico o a los del Ente Gestor afectos a las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales y cuya valoración estuviera comprendida entre 500.001 y 5.000.000 de pesetas.

b) Los vertidos efectuados sin la autorización correspondiente.

c) La ocultación o el falseamiento de los datos exigidos en la solicitud de vertido.

d) El incumplimiento de las condiciones impuestas en la autorización de vertido.

e) El incumplimiento de las acciones exigidas para las situaciones de emergencia establecidas en la presente Ley.

f) La no existencia de las instalaciones y equipos necesarios para la realización de los controles requeridos o mantenerlos en condiciones no operativas.

g) La evacuación de vertidos sin tratamiento previo, cuando éstos lo requieran, o sin respetar las limitaciones especificadas en esta Ley.

h) La obstrucción a la labor inspectora de la Administración en el acceso a las instalaciones o a la negativa a facilitar la información requerida.

i) La reincidencia en dos faltas leves en el plazo máximo de un año.

Artículo 43. *Infracciones muy graves.*

Se consideran infracciones muy graves:

a) Las infracciones calificadas como graves en el artículo anterior, cuando por la cantidad o calidad del vertido se derive la existencia de un riesgo muy grave para las personas, los recursos naturales o el medio ambiente.

b) Las acciones y omisiones que contraviniendo lo establecido en la presente Ley causen daño a los bienes de dominio o uso público hidráulico o a los del Ente Gestor afectos a las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales y cuya valoración supere los 5.000.000 de pesetas.

c) El incumplimiento de las órdenes de suspensión de vertidos.

d) La evacuación de vertidos prohibidos.

e) La reincidencia en dos faltas graves en el plazo de tres años.

Artículo 44. *Sanciones.*

Las infracciones enumeradas en los artículos anteriores podrán ser sancionadas con arreglo a la siguiente escala:

1. Infracciones leves: Multa de hasta 1.000.000 de pesetas.

2. Infracciones graves: Multa entre 1.000.001 y 10.000.000 de pesetas. Además, en caso de reincidencia, la Administración competente podrá sancionar con la suspensión de la autorización de vertido por un período no inferior a quince días ni superior a tres meses.

3. Infracciones muy graves: Multa entre 10.000.001 y 50.000.000 de pesetas. Además, en caso de reincidencia, la Administración competente podrá sancionar con la suspensión de la autorización de vertido, por un período no inferior a tres meses ni superior a un año.

Artículo 45. *Gradación de las sanciones.*

Para determinar la cuantía de la sanción se tendrá en cuenta la naturaleza de la infracción, la gravedad del daño producido, la reincidencia, la intencionalidad, el beneficio obtenido y las demás circunstancias concurrentes.

Artículo 46. *Reparación del daño e indemnizaciones.*

1. Sin perjuicio de la sanción que en cada caso proceda, el infractor deberá reparar el daño causado. La reparación tendrá como objeto la restauración de los bienes alterados a la situación anterior a la infracción. El órgano que hubiera impuesto la sanción será competente para exigir la reparación.

Cuando el daño producido afecte al Sistema Integral de Saneamiento, la reparación será realizada por la Administración a costa del infractor.

2. Si el infractor no procediese a reparar el daño causado en el plazo señalado en el expediente sancionador, la Administración procederá a la imposición de multas sucesivas. La cuantía de cada multa no superará, en ningún caso, el 10 por 100 de la sanción máxima fijada para la infracción cometida.

3. Cuando los bienes alterados no puedan ser repuestos a su estado anterior, el infractor deberá indemnizar los daños y perjuicios ocasionados. La valoración de los mismos se hará por la Administración.

Artículo 47. *Prescripción.*

La acción para iniciar el expediente sancionador de las infracciones previstas en esta Ley prescribirá a los seis meses contados desde la comisión del hecho o desde la detección del daño causado, si éste no fuera inmediato.

Artículo 48. *Procedimiento.*

La imposición de sanciones y la exigencia de responsabilidades con arreglo a esta Ley se realizará mediante la instrucción del correspondiente expediente sancionador y con arreglo a lo previsto en la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común.

Artículo 49. *Incoación, instrucción y resolución.*

Corresponde a los Ayuntamientos o a la Comunidad de Madrid, en el ámbito de sus respectivas competencias, establecidas en la presente Ley, la incoación, instrucción y resolución del expediente sancionador por las infracciones cometidas.

Artículo 50. *Competencia resolutoria.*

La competencia para la resolución de los expedientes sancionadores incoados por la Comunidad de Madrid corresponderá a los siguientes órganos:

a) A la Agencia de Medio Ambiente, si se trata de infracciones leves y graves.

b) Al Consejo de Gobierno de la Comunidad de Madrid, si se trata de infracciones muy graves.

Artículo 51. *Recursos.*

1. Contra las resoluciones del Director de la Agencia de Medio Ambiente podrá interponerse recurso ordinario ante el Consejero de Cooperación de la Comunidad de Madrid.

2. Los acuerdos del Consejo de Gobierno de la Comunidad de Madrid pondrán fin a la vía administrativa.

Artículo 52. *Vía de apremio.*

Cuando proceda la ejecución subsidiaria, el órgano ejecutor valorará el coste de las actuaciones que deban realizarse, cuyo importe será exigible cautelarmente, asimismo, en vía de apremio, conforme al artículo 97 de la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común.

Artículo 53. *Resoluciones municipales.*

Las resoluciones municipales deberán ser comunicadas a la Agencia de Medio Ambiente en el plazo de quince días.

Cuando la Agencia de Medio Ambiente considere que una resolución municipal infringe lo establecido en la presente Ley, podrá proceder de acuerdo con las previsiones establecidas en el artículo 65 de la Ley 7/1985, de 2 de abril, Reguladora de las Bases de Régimen Local.

Disposición adicional única.

El Consejo de Gobierno de la Comunidad de Madrid podrá actualizar la cuantía de las multas para adecuarlas a las variaciones que se estimen oportunas de acuerdo con la política ambiental.

Disposición transitoria primera.

En el plazo de seis meses, a partir de la publicación de la disposición reglamentaria que apruebe los modelos de documentos a los que hace referencia la presente Ley, los titulares de las actividades industriales ya existentes deberán presentar en el Ayuntamiento correspondiente la siguiente documentación:

- a) La identificación industrial, exigida en el artículo 7.
- b) La solicitud de vertido, exigida en el artículo 8.

Disposición transitoria segunda.

Las industrias que originen vertidos regulados en el artículo 13 deberán presentar el proyecto técnico de corrección del vertido junto con el plan de ejecución de la obra en el Ayuntamiento, en el plazo de seis meses a partir de la entrada en vigor de la presente Ley.

Disposición transitoria tercera.

Cuando el Ayuntamiento no autorice el vertido, los titulares de las actividades deberán suspender inmediatamente la evaluación del mismo.

Disposición transitoria cuarta.

El Consejero de Hacienda de la Comunidad de Madrid realizará las modificaciones presupuestarias oportunas para la adaptación del programa presupuestario 167 de los Presupuestos Generales del año 1993 para el cumplimiento de los objetivos de la presente Ley.

Disposición derogatoria única.

Queda derogada cualquier disposición de la Comunidad de Madrid que se oponga a lo establecido en la presente Ley.

Disposición final primera.

Todos los Ayuntamientos de la Comunidad de Madrid deberán proceder a la adaptación de sus Ordenanzas Municipales a lo dispuesto en la presente Ley, en el plazo de seis meses, desde su entrada en vigor.

Disposición final segunda.

Se autoriza al Consejo de Gobierno de la Comunidad de Madrid para que en el plazo máximo de tres meses apruebe los modelos de la documentación necesaria para cumplimentar lo establecido en la presente Ley.

Disposición final tercera.

Se autoriza al Consejo de Gobierno de la Comunidad de Madrid para dictar las disposiciones que requiera el desarrollo y la ejecución de la presente Ley.

Disposición final cuarta.

El Consejo de Gobierno de la Comunidad de Madrid, oída la Federación de Municipios de Madrid, podrá modificar, mediante Decreto, los anexos de la presente Ley, dando cuenta a la Comisión correspondiente de la Asamblea de Madrid.

Disposición final quinta.

El Consejo de Gobierno de la Comunidad de Madrid determinará las cuantías que habrán de ser abonadas por los usuarios, como consecuencia de los vertidos líquidos industriales que efectúen. Asimismo, especificará los órganos de la Comunidad Autónoma que asuman la gestión y recaudación de los importes que correspondan por tal concepto.

Disposición final sexta.

Las funciones de gestión, inspección, vigilancia y control sobre los vertidos industriales que correspondan a la Comunidad de Madrid podrán ser encomendadas por el Consejo de Gobierno de la Comunidad de Madrid al Canal de Isabel II.

Disposición final séptima.

La presente Ley entrará en vigor el día de su publicación en el «Boletín Oficial de la Comunidad de Madrid», debiendo ser también publicada en el «Boletín Oficial del Estado».

Por tanto, ordeno a todos los ciudadanos a los que sea de aplicación esta Ley que la cumplan y a los Tribunales y autoridades que corresponda la guarden y la hagan guardar.

Madrid, 26 de octubre de 1993.

JOAQUIN LEGUINA,
Presidente

(Publicada en el «Boletín Oficial de la Comunidad de Madrid» número, 269, de 12 de noviembre de 1993)

ANEXO 1**Vertidos prohibidos**

1. Mezclas explosivas: Se entenderán como tales aquellos sólidos, líquidos, gases o vapores que por razón de su naturaleza o cantidad sean o puedan ser suficientes, por sí mismos o en presencia de otras sustancias, de provocar ignición o explosiones. En ningún momento mediciones sucesivas efectuadas con un explosímetro en el punto de descarga del vertido al Sistema Integral de Saneamiento, deberán indicar valores superiores al 5 por 100 del límite inferior de explosividad, así como una medida realizada de forma aislada, no deberá superar en un 10 por 100 al citado límite. Se prohíben expresamente: los gases procedentes de motores de explosión, gasolina, keroseno, nafta, benceno, tolueno, xileno, éteres, tricloroetileno, aldehídos, cetonas, peróxidos, cloratos, percloratos, bromuros, carburos, hidruros, nitruros, sulfuros, disolventes orgánicos inmiscibles en agua y aceites volátiles.

2. Residuos sólidos o viscosos: Se entenderán como tales aquellos residuos que provoquen o puedan provocar obstrucciones en el flujo del Sistema Integral de Saneamiento o que puedan interferir en el transporte de las aguas residuales. Se incluyen los siguientes: Grasas, tripas, tejidos animales, estiércol, huesos, pelos, pieles, carnazas, entrañas, sangre, plumas, cenizas, escorias, arenas, cal apagada, residuos de hormigones y lechadas de cemento o aglomerantes hidráulicos, fragmentos de piedras, mármol, metales, vidrio, paja, virutas, recortes de césped, trapos, lúpulo, desechos de papel, maderas, plástico, alquitrán, así como residuos y productos alquitranados procedentes de operaciones de refinado y destilación, residuos asfálticos y de procesos de combustiones, aceites lubricantes usados, minerales o sintéticos, incluyendo agua-aceite, emulsiones, agentes espumantes y en general todos aquellos sólidos de cualquier procedencia con tamaño superior a 1,5 centímetros en cualquiera de sus tres dimensiones.

3. Materias colorantes: Se entenderán como materias colorantes aquellos sólidos, líquidos o gases, tales como: tintas, barnices, lacas, pinturas, pigmentos y demás productos afines que, incorporados a las aguas residuales, las colorea de tal forma que no pueden eliminarse con ninguno de los procesos de tratamiento usuales que se emplean en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales.

4. Residuos corrosivos: Se entenderán como tales aquellos sólidos, líquidos, gases o vapores que provoquen corrosiones a lo largo del Sistema Integral de Saneamiento, tanto en equipos como en instalaciones, capaces de reducir considerablemente la vida útil de éstas o producir averías. Se incluyen los siguientes: ácido clorhídrico, nítrico sulfúrico, carbónico, fórmico, acético, láctico y butírico, lejías de sosa o potasa, hidróxido amónico, carbonato sódico, aguas de muy baja salinidad y gases como el sulfuro de hidrógeno, cloro, fluoruro de hidrógeno, dióxido de carbono, dióxido de azufre, y todas las sustancias que reaccionando con el agua formen soluciones corrosivas, como los sulfatos y cloruros.

5. Residuos tóxicos y peligrosos: Se entenderán como tales aquellos sólidos, líquidos o gaseosos, industriales o comerciales, que por sus características tóxicas o peligrosas requieran un tratamiento específico y/o control periódico de sus potenciales efectos nocivos y, en especial, los siguientes:

1. Acenafteno.
2. Acrilonitrilo.

3. Acroleína (Acrolín).
 4. Aldrina (Aldrín).
 5. Antimonio y compuestos.
 6. Asbestos.
 7. Benceno.
 8. Bencidina.
 9. Berilio y compuestos.
 10. Carbono, tetracloruro.
 11. Clordán (Chlordane).
 12. Crurobenceno.
 13. Cloroetano.
 14. Clorofenoles.
 15. Cloroformo.
 16. Cloronaftaleno.
 17. Cobalto y compuestos.
 18. Dibenzofuranos policlorados.
 19. Diclorodifeniltricoetano y metabolitos (DDT).
 20. Diclorobencenos.
 21. Diclorobencidina.
 22. Dicloroetilenos.
 23. 2,4-Diclorofenol.
 24. Dicloropropano.
 25. Dicloropropeno.
 26. Dieldrina (Dieldrín).
 27. 2,4-Dimetilfenoles o Xilenoles.
 28. Dinitrotolueno.
 29. Endosulfán y metabolitos.
 30. Endrina (Endrín) y metabolitos.
 31. Eteres halogenados.
 32. Etilbenceno.
 33. Fluoranteno.
 34. Ftalatos de éteres.
 35. Halometanos.
 36. Heptacloro y metabolitos.
 37. Hexaclorobenceno (HCB).
 38. Hexaclorobutadieno (HCBD).
 39. Hexaclorociclohexano (HTB, HCCH, HCH, HBT).
 40. Hexaclorociclopentadieno.
 41. Hidrazobenceno (Diphenylhydrazine).
 42. Didrocarburos aromáticos polinucleares (PAH).
 43. Isoforona (Isophorone).
 44. Molibdeno y compuestos.
 45. Naftaleno.
 46. Nitrobenceno.
 47. Nitrosaminas.
 48. Pentaclorofenol (PCP).
 49. Policlorado, bifenilos (PCB's).
 50. Policlorado, trifenilos (PCT's).
 51. 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD).
 52. Tetracloroetileno.
 53. Talio y compuestos.
 54. Teluro y compuestos.
 55. Titanio y compuestos.
 56. Tolueno.
 57. Toxafeno.
 58. Tricloroetileno.
 59. Uranio y compuestos.
 60. Vanadio y compuestos.
 61. Vinilo, cloruro de.
 62. Las sustancias químicas de laboratorio y compuestos farmacéuticos o veterinarios nuevos, identificables o no y cuyos efectos puedan suponer riesgo sobre el medio ambiente o la salud humana.
6. Residuos que produzcan gases nocivos: Se entenderán como tales los residuos que produzcan gases nocivos en la atmósfera del alcantarillado, colectores y/o emisarios en concentraciones superiores a los límites siguientes:
- Monóxido de carbono (CO): 100 cc/m³ de aire.
 - Cloro (Cl₂): 1 cc/m³ de aire.
 - Sulfhídrico (SH₂): 20 cc/m³ de aire.
 - Cianhídrico (CNH): 10 cc/m³ de aire.

ANEXO 2

Valores máximos instantáneos de los parámetros de contaminación

Temperatura	≤ 40° C.
pH (intervalo permisible)	6-9 unidades.
Conductividad	5.000 uScm ⁻¹
Sólidos en suspensión	1.000 mg L ⁻¹
Aceites y grasas	100 mg L ⁻¹
DBO ₅	1.000 mg L ⁻¹
DQO	1.750 mg L ⁻¹
Aluminio	20 mg L ⁻¹
Arsénico	1 mg L ⁻¹
Bario	20 mg L ⁻¹
Boro	3 mg L ⁻¹
Cadmio	0,5 mg L ⁻¹
Cianuros	5 mg L ⁻¹
Cobre	3 mg L ⁻¹
Cromo total	5 mg L ⁻¹
Cromo hexavalente	3 mg L ⁻¹
Estaño	2 mg L ⁻¹
Fenoles totales	3 mg L ⁻¹
Fluoruros	15 mg L ⁻¹
Hierro	10 mg L ⁻¹
Manganeso	2 mg L ⁻¹
Mercurio	0,1 mg L ⁻¹
Níquel	10 mg L ⁻¹
Plata	0,1 mg L ⁻¹
Plomo	1 mg L ⁻¹
Selenio	1 mg L ⁻¹
Sulfuros	5 mg L ⁻¹
Toxicidad	25 Equitox m ⁻³
Zinc	5 mg L ⁻¹

ANEXO 3

Instalaciones industriales obligadas a presentar la solicitud de vertido

Están obligadas a presentar la solicitud de vertido las siguientes industrias:

- a) Todas las instalaciones que superen un caudal de abastecimiento y autoabastecimiento de 22.000 metros cúbicos/año.
- b) Las instalaciones que, superando un caudal de abastecimiento y autoabastecimiento de 3.500 metros cúbicos/año, figuran en la siguiente relación:

Referencia CNAE	Actividad industrial
02	Producción ganadera.
11	Extracción, preparación y aglomeración de combustibles sólidos y coquerías.
13	Refino de petróleo.
15	Producción, transportes y distribución de energía eléctrica, gas, vapor y agua caliente.
21	Extracción y preparación de minerales metálicos.
22	Producción y primera transformación de metales.
23	Extracción de minerales no metálicos ni energéticos; turberas.
24	Industrias de productos minerales no metálicos.
25	Industria química.
31	Fabricación de productos metálicos, excepto máquinas y material de transporte.
32	Construcción de maquinaria y equipo mecánico.
33	Construcción de máquinas de oficina y ordenadores, incluida su instalación.

Referencia CNAE	Actividad industrial
34	Construcción de maquinaria y material eléctrico.
35	Fabricación de material electrónico, excepto ordenadores.
36	Construcción de vehículos automóviles y sus piezas de repuesto.
37	Construcción naval, reparación y mantenimiento de buques.
38	Construcción de otro material de transporte.
39	Fabricación de instrumentos de precisión óptica y similares.
411	Fabricación de aceite de oliva.
412	Fabricación de aceites y grasas, vegetales y animales, excepto aceite de oliva.
413	Sacrificio de ganado, preparación y conservas de carne.
414	Industrias lácteas.
415	Fabricación de jugos y conservas vegetales.
416	Fabricación de conservas de pescado y otros productos marinos.
417	Fabricación de productos de molinería.
418	Fabricación de pastas alimenticias y productos amiláceos.
419	Industrias del pan, bollería, pastelería y galletas.
420	Industria del azúcar.
421.2	Elaboración de productos de confitería.
422	Industrias de productos para la alimentación animal, incluso harinas de pescado.
423	Elaboración de productos alimenticios diversos.
424	Industrias de alcoholes etílicos de fermentación.
425	Industria vinícola.
426	Sidrerías.
427	Fabricación de cerveza y malta cervecera.
428	Industrias de las aguas minerales, aguas gaseosas y otras bebidas analcohólicas.
429	Industria del tabaco.
43	Industria textil.
44	Industria del cuero.
451	Fabricación en serie de calzado, excepto el de caucho y madera.
452	Fabricación de calzado de artesanía y a medida, incluso el calzado ortopédico.
453	Confección en serie de prendas de vestir y complementos del vestido.
455	Confección de otros artículos con materiales textiles.
456	Industria de papelería.
461	Aserrado y preparación industrial de la madera: aserrado, cepillado, pulido, lavado y otros.
462	Fabricación de productos semielaborados de madera: chapas, tableros, maderas mejoradas y otros.
463	Fabricación en serie de piezas de carpintería, parqué y estructuras de madera para la construcción.
465	Fabricación de objetos diversos de madera, excepto muebles.
466	Fabricación de productos de corcho.
467	Fabricación de artículos de junco y caña, cestería, brochas, cepillos y otros.
468	Industrias del mueble de madera.
47	Industria del papel; artes gráficas y edición.
48	Industrias de transformación del caucho y materias plásticas.
49	Otras industrias manufactureras.
937	Investigación científica y técnica.
941	Hospitales, clínicas y sanatorios de medicina humana.
971	Lavanderías, tintorerías y servicios similares.

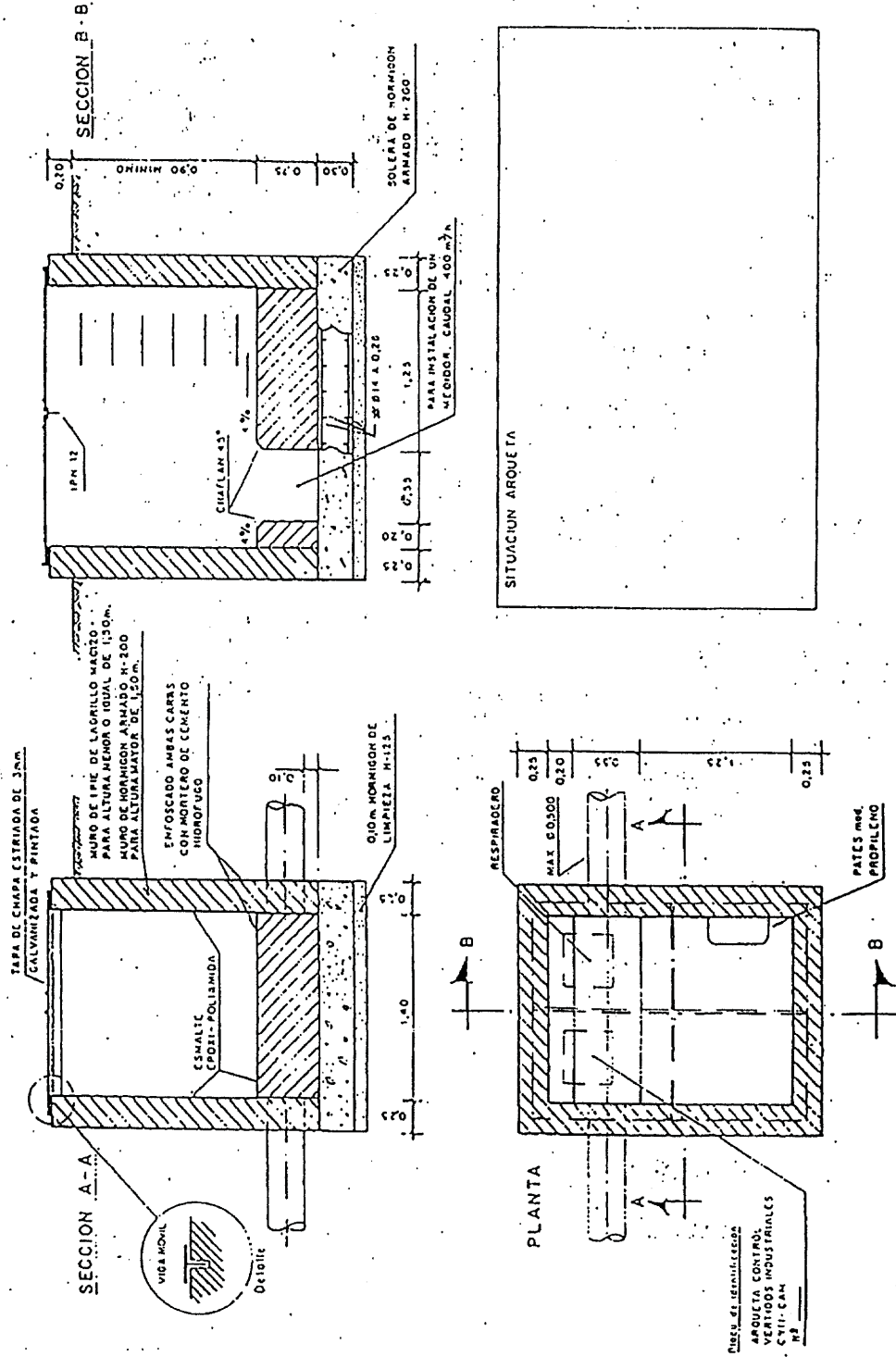
ANEXO 4

Métodos analíticos establecidos para el análisis de los vertidos

Parámetros	Método
1. Temperatura ...	Termometría.
2. pH	Electrometría.
3. Conductividad	Electrometría.
4. Sólidos en suspensión	Gravimetría previa filtración sobre microfiltro de fibra de vidrio Millipore AP/40 o equivalente.
5. Aceite y grasas.	Separación y gravimetría o espectrofotometría de absorción infrarroja.
6. DBO ₅	Incubación, cinco días a 20 °C.
7. DQO	Reflujo con dicromato potásico.
8. Aluminio	Absorción atómica o espectrofotometría de absorción.
9. Arsénico	Absorción atómica o espectrofotometría de absorción.
10. Bario	Absorción atómica.
11. Boro	Absorción atómica o espectrofotometría de absorción.
12. Cadmio	Absorción atómica.
13. Cianuros	Espectrofotometría de absorción.
14. Cobre	Absorción atómica o espectrofotometría de absorción.
15. Cromo	Absorción atómica o espectrofotometría de absorción.
16. Estaño	Absorción atómica o espectrofotometría de absorción.
17. Fenoles	Destilación y espectrofotometría de absorción, método amino-4-antipirina.
18. Fluoruros	Electrodo selectivo o espectrofotometría de absorción.
19. Hierro	Absorción atómica o espectrofotometría de absorción.
20. Manganeso	Absorción atómica o espectrofotometría de absorción.
21. Mercurio	Absorción atómica.
22. Níquel	Absorción atómica.
23. Plata	Absorción atómica.
24. Plomo	Absorción atómica.
25. Selenio	Absorción atómica.
26. Sulfuro	Espectrofotometría de absorción.
27. Toxicidad	Bioensayo de luminiscencia. Ensayo de inhibición del crecimiento de algas. Ensayo de toxicidad aguda en daphnias. Test de la OCDE 209. Inhibición de la respiración de lodos activos. Ensayo de toxicidad aguda en rotíferos. Ensayo de toxicidad aguda en tyamnocephlus.
28. Zinc	Absorción atómica o espectrofotometría de absorción.

ANEXO 5

ARQUETA TIPO PARA EL CONTROL DE EFLUENTES INDUSTRIALES



A1.8. LEY AUTONÓMICA 5/2003, de 20 de marzo, de Residuos de la Comunidad de Madrid (BOCAM nº 76 de 31/03/2003): Disposición adicional segunda. Modificación de la Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento

Pág. 4

LUNES 31 DE MARZO DE 2003

B.O.C.M. Núm. 76

I. COMUNIDAD DE MADRID

A) Disposiciones Generales

Presidencia de la Comunidad

1123 LEY 5/2003, de 20 de marzo, de Residuos de la Comunidad de Madrid.

El Presidente de la Comunidad de Madrid.
Hago saber que la Asamblea de Madrid ha aprobado la presente Ley, que yo, en nombre del Rey, promulgo.

PREÁMBULO

La Constitución Española, en su artículo 45, reconoce el derecho de todos los españoles a disfrutar de un medio ambiente adecuado para el desarrollo de la persona, estableciendo el correlativo deber de conservarlo. Asimismo, en su apartado segundo, encomienda a las Administraciones Públicas la función de velar por el uso racional de los recursos naturales, con el fin de proteger y mejorar la calidad de vida y defender y restaurar el medio ambiente.

Por otra parte, la Unión Europea, en materia de medio ambiente, y concretamente en su política de residuos, a través de la Directiva comunitaria 91/156/CEE, del Consejo, de 18 de marzo de 1991, por la que se modifica la Directiva 75/442/CEE, del Consejo, de 15 de julio de 1975, incorpora a esta política la concepción única, estableciendo una norma común para todo tipo de residuos, sin perjuicio de que en determinados casos sea necesaria una regulación específica debido a las características especiales de ciertos residuos.

La Ley 10/1998, de 21 de abril, de Residuos, incorpora al ordenamiento jurídico español la concepción única en la política de residuos, estableciendo el régimen jurídico y las competencias de las distintas Administraciones Públicas en esta materia. La regulación hasta entonces venía dada por la Ley 42/1975, de 19 de noviembre, sobre Desechos y Residuos Sólidos Urbanos, así como por la Ley 20/1986, de 14 de mayo, básica de Residuos Tóxicos y Peligrosos y su Reglamento de Ejecución, aprobado mediante el Real Decreto 833/1988, de 20 de julio. Se añade asimismo la regulación básica sobre suelos contaminados, materia no contemplada hasta el momento en la normativa estatal.

La Comunidad de Madrid, en el ejercicio de las competencias que le atribuye el Estatuto de Autonomía en su artículo 27.7, que comprende el desarrollo legislativo, la potestad reglamentaria y la ejecución en materia de protección del medio ambiente, pudiendo establecer normas adicionales de protección, ha venido dictando normas específicas sobre la producción y la gestión de residuos.

En este sentido, se dictaron varias normas, entre ellas, el Decreto 83/1999, de 3 de junio, por el que se regulan las actividades de producción y gestión de los residuos biosanitarios y citotóxicos en la Comunidad de Madrid; la Orden 2188/1996, de 15 de octubre, del Consejero de Medio Ambiente y Desarrollo Regional, por la que se crea el Registro de Productores de Residuos Biosanitarios y Citotóxicos; la Orden 917/1996, de 4 junio, del Consejero de Medio Ambiente y Desarrollo Regional, por la que se regula la gestión de los aceites usados en la Comunidad de Madrid; así como el Decreto 4/1991, de 10 de enero, por el que se crea el Registro de Pequeños Productores de Residuos Tóxicos y Peligrosos. En este mismo marco, y como norma complementaria de la Ley 10/1998, de 21 de abril, de Residuos, se aprobó el Decre-

to 326/1999, de 18 de noviembre, por el que se regula el régimen jurídico de los suelos contaminados de la Comunidad de Madrid.

La presente Ley viene a completar el marco jurídico ya existente con el fin de regular en el ámbito territorial de la Comunidad de Madrid la producción y gestión de residuos, de acuerdo con las peculiaridades que caracterizan a nuestra Comunidad. En este sentido, hay que recordar que la Región alberga en sus ocho mil kilómetros cuadrados una población de más de cinco millones de habitantes, lo que supone la generación de una ingente cantidad de residuos en un ámbito territorial reducido, situación que exige afrontar con carácter inmediato la solución de los problemas ambientales que todo ello lleva implícito.

Dentro de la regulación que aborda la Ley se destaca la implantación en determinados casos de servicios públicos, tanto de competencia autonómica como de las Entidades Locales, cuando se ha considerado precisa la intervención pública para la correcta consecución de los objetivos de la misma.

La Ley incorpora los principios contemplados en los Programas Comunitarios de Acción en materia de medio ambiente y en la Ley 10/1998, entre cuyos objetivos figuran la prevención de la producción de residuos y el fomento, por este orden, de su reducción, reutilización, reciclado y otras formas de valorización. En este sentido, la Comunidad de Madrid apuesta por la minimización y el reciclaje de residuos. La incineración, en sintonía con la jerarquía europea en materia de gestión de residuos, será la última de las opciones de valorización contempladas en los planes autonómicos de residuos. Se incluyen asimismo los principios de "quien contamina paga" y de "responsabilidad del productor", el cual habrá de asumir los costes de la adecuada gestión de los residuos que genera en cada caso.

Destaca asimismo la introducción en los instrumentos de planificación urbanística de elementos de planificación en materia de residuos, como herramienta fundamental para el desarrollo sostenible.

La Ley consta de 88 artículos estructurados en 10 títulos, 7 disposiciones adicionales, 7 disposiciones transitorias, 1 disposición derogatoria y 4 finales.

El Título I establece las disposiciones generales que permiten la correcta interpretación de la Ley, regulando su objeto y ámbito de aplicación, los objetivos, definiciones que aclaran el sentido de los preceptos incluidos en la Ley, así como la distribución de competencias dentro del territorio autonómico. El Título II aborda un aspecto fundamental en toda política ambiental, como es la planificación de las actuaciones de las Administraciones Públicas. Los Planes de residuos se configuran como la herramienta básica para la gestión de los mismos, constituyendo un instrumento jurídicamente vinculante. El Título III establece las medidas económicas y financieras, que se concretan en la posibilidad de exigir una fianza a los que realicen actividades de gestión y producción de residuos, como garantía de su correcta actuación. El Título IV, orientado a la prevención, concreta la responsabilidad de los agentes económicos que ponen productos en el mercado, estableciendo un catálogo de obligaciones así como los distintos modos de llevarlas a cabo.

Los Títulos V y VI desarrollan el régimen jurídico, en particular en lo que a intervención administrativa y obligaciones se refiere, de la producción y la gestión de residuos. Ambos Títulos se estructuran en capítulos dedicados a normas comunes y normas relativas a los distintos tipos de residuos.

Artículo 388*Hecho imponible*

Constituye el hecho imponible de la tasa la realización por parte de la Comunidad de Madrid de las actividades previas tendentes a la preceptiva inscripción del sujeto pasivo en los Registros de Pequeños Productores, Intermediarios y Agentes de Residuos, Transportistas de Residuos y Gestores de Residuos de la Comunidad de Madrid, así como las modificaciones sustanciales.

A efectos de esta Ley, se entenderá por modificación sustancial la inclusión de nuevas operaciones de gestión o de nuevos residuos en el correspondiente Registro.

Artículo 389*Sujetos pasivos*

Son sujetos pasivos de la tasa las personas físicas o jurídicas, así como las Entidades a que se refiere el artículo 33 de la Ley General Tributaria que soliciten la inscripción en los correspondientes Registros.

Artículo 390*Tarifa*

Tarifa 77.01.—Inscripción en el Registro.

Por cada inscripción: 36,18 euros.

Artículo 391*Devengo*

“La tasa se devenga cuando se presente la solicitud que inicie la actuación administrativa, que no se realizará o tramitará sin que se haya efectuado el pago correspondiente.”

Segunda

Modificación de la Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre Vertidos Líquidos Industriales al Sistema Integral de Saneamiento de la Comunidad de Madrid

Se modifican los preceptos que a continuación se indican de la Ley 10/1993, de 26 de octubre, de Vertidos Líquidos Industriales al Sistema Integral de Saneamiento de la Comunidad de Madrid.

Uno. Se adiciona un apartado 2 al artículo 7, con el siguiente tenor literal:

“2. Las instalaciones industriales que estén comprendidas entre las categorías relacionadas en el Anejo 1 de la Ley 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrados de la contaminación, deberán presentar la correspondiente Identificación Industrial en la Consejería competente en materia de medio ambiente.”

Dos. Se adiciona un apartado 3 al artículo 8, con el siguiente tenor literal:

“3. Las instalaciones industriales que se refieren en el apartado 1, y que además estén comprendidas entre las categorías relacionadas en el Anejo 1 de la Ley 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrados de la contaminación, deberán presentar la correspondiente Solicitud de Vertido en la Consejería con competencias en materia de medio ambiente en los dos casos considerados en los apartados 1 y 2 anteriores.”

Tres. Se modifica el apartado 2 del artículo 9, que queda redactado en los siguientes términos:

“2. El Ayuntamiento y la Consejería competente en materia de medio ambiente en el caso de las actividades industriales que se refieren en el apartado 2 del artículo 7, podrán requerir, motivadamente, al solicitante un análisis del vertido, realizado por un laboratorio homologado, cuando existan indicios racionales de anomalías en los datos presentados.”

Cuatro. Se añade al final del apartado 2 del artículo 10 el siguiente texto:

“Dicho informe preceptivo y vinculante quedará incluido dentro de la Autorización Ambiental Integrada regulada en la Ley 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrados de la contaminación, para aquellas instalaciones industriales que estén comprendidas entre las categorías relacionadas en el Anejo 1 de dicha Ley y con los plazos establecidos en la misma.”

Cinco. Se modifica el artículo 37, que queda redactado en los siguientes términos:

Donde dice: “... el usuario deberá presentar en el Ayuntamiento donde está ubicada la actividad, la Identificación Industrial...”.

Debe decir: “... el usuario deberá presentar en la Administración competente, la Identificación industrial...”.

Tercera*Modificaciones presupuestarias*

El Consejero de Hacienda realizará las modificaciones presupuestarias oportunas para la adaptación del programa presupuestario de los Presupuestos Generales de la Comunidad de Madrid al cumplimiento de los objetivos de esta Ley.

Cuarta*Entrada en vigor*

Esta Ley entrará en vigor al día siguiente de su publicación en el BOLETÍN OFICIAL DE LA COMUNIDAD DE MADRID, salvo en lo referente a las declaraciones de servicio público contenidas en las disposiciones adicionales segunda y tercera, que entrarán en vigor el 1 de enero de 2004, y a las autorizaciones previstas en el apartado 4 del artículo 44, que entrarán en vigor el 1 de julio de 2004.

Y en lo referente a las tasas en materia de autorizaciones, inscripciones registrales y por Eliminación de RSU previstas en la Disposición Final Primera, entrarán en vigor el primer día del mes de siguiente al de la entrada en vigor de la Ley.

Por lo tanto, ordeno a todos los ciudadanos a los que sea de aplicación esta Ley que la cumplan, y a los Tribunales y Autoridades que corresponda, la guarden y la hagan guardar.

Madrid, a 20 de marzo de 2003.

El Presidente,
ALBERTO RUIZ-GALLARDÓN
(03/8.409/03)

A1.9. DECRETO 57/2005, de 30 de junio, de la Comunidad de Madrid, por el que se revisan los Anexos de la Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento (BOCAM nº 159 de 06/07/2005)



B.O.C.M. Núm. 159

MIÉRCOLES 6 DE JULIO DE 2005

Pág. 11

Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio

2251 *DECRETO 57/2005, de 30 de junio, por el que se revisan los Anexos de la Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre Vertidos Líquidos Industriales al Sistema Integral de Saneamiento.*

Uno de los recursos más comprometidos en la Comunidad de Madrid es el agua, que se aprovecha de forma intensiva y se deteriora gravemente durante su uso, produciendo la contaminación de los ríos que atraviesan la región. De hecho, la contaminación ambiental de ríos y embalses ha venido constituyendo uno de los principales problemas ambientales de esta Comunidad Autónoma.

En este sentido, la Comunidad de Madrid, en el ejercicio de las competencias que le atribuye el Estatuto de Autonomía, aprobó una serie de normas en esta materia. Así, en el marco de la Directiva 91/271/CEE, de 21 de mayo, relativa al tratamiento de aguas residuales urbanas, y de la Ley 17/1984, de 20 de diciembre, Reguladora del Abastecimiento y Saneamiento de Agua en la Comunidad de Madrid, aprobó la Ley 10/1993, de 26 de octubre, de Vertidos Líquidos al Sistema Integral de Saneamiento, y una amplia normativa de desarrollo, la cual vino a proporcionar las normas adecuadas para regular el vertido de aguas residuales industriales a la red de alcantarillado, con objeto de proteger las instalaciones de saneamiento y depuración, y en consecuencia, los recursos hidráulicos y el medio ambiente en la región.

Sin embargo, las crecientes exigencias de la sociedad en lo relativo a la protección del medio ambiente y a la mejora de la calidad de vida, los significativos avances tecnológicos, la experiencia adquirida durante los años transcurridos desde la entrada en vigor de la citada Ley 10/1993 y su normativa de desarrollo, y los nuevos instrumentos incorporados por la política ambiental comunitaria, en particular la Directiva 96/61/CE, del Consejo, de 24 de septiembre, relativa a la prevención y control integrados de la contaminación, aconsejan una actualización de los Anexos de la Ley 10/1993, con el objeto de reforzar la actividad preventiva que, en materia de vertidos, es la mejor y más eficaz de las soluciones a los problemas que se plantean.

En el Anexo 1 se realizan algunas modificaciones parciales tendentes a concretar las afecciones que pueden producir las sustancias catalogadas como vertidos prohibidos, se incorpora la modificación introducida en la redacción del Anexo mediante el Decreto 83/1999, de 3 de junio, por el que se regulan las actividades de producción y gestión de residuos biosanitarios y citotóxicos

en la Comunidad de Madrid y, por último, el apartado de “residuos tóxicos y peligrosos” se modifica para adaptarlo a la nueva clasificación de residuos peligrosos establecida en la Ley 10/1998, de 21 de abril, de Residuos, y sus desarrollos normativos de forma que se puedan incluir en este apartado las nuevas sustancias que derivadas del desarrollo tecnológico se vienen empleando por la industria.

Por otra parte, la experiencia obtenida durante la aplicación de la reiterada Ley 10/1993, ha demostrado la utilidad del establecimiento de valores límite de emisión de vertidos instantáneos, que sirven como referencia general de los valores tolerados. Por todo ello, se ha ampliado el Anexo 2, incorporando algunas sustancias que antes no se contemplaban, tales como los compuestos organohalogenados, los hidrocarburos persistentes y sustancias orgánicas tóxicas y bioacumulables, o las sustancias que contribuyen a la eutrofización.

En relación con el Anexo 3, relativo a las instalaciones industriales obligadas a presentar la solicitud de vertido, y teniendo en cuenta que la clasificación de actividades que aparece en el mismo se ha visto afectada por el Real Decreto 1560/1992, de 18 de diciembre, por el que se aprueba la Clasificación Nacional de Actividades Económicas, y posteriormente por el Real Decreto 330/2003, de 14 de marzo, por el que se modifica el anterior, se hace necesario adecuar la relación de las actividades a dicha norma, así como revisar las actividades que en función del consumo deben presentar la Solicitud de Vertido. Asimismo, la modificación introduce un apartado según el cual están obligadas a presentar Solicitud de Vertido todas aquellas instalaciones que, con independencia de su actividad y de su caudal de abastecimiento y autoabastecimiento, produzcan vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento que, por sus especiales características, se considere necesario que estén sometidas a autorización, previo requerimiento del Ayuntamiento correspondiente, a instancias de la Comunidad de Madrid.

El Anexo 4 actualiza y completa las técnicas analíticas y los procedimientos establecidos para la determinación de los parámetros de contaminación, adaptándolos a los nuevos avances científicos en este campo.

El Anexo 5 no experimenta modificación.

Por ello, y de conformidad con lo dispuesto en la Disposición Final Cuarta de la Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre Vertidos Líquidos al Sistema Integral de Saneamiento, previa audiencia de la Federación de Municipios de Madrid, a propuesta del Consejero de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, y previa deliberación del Consejo de Gobierno en su reunión del día 30 de junio de 2005,

DISPONGO

Artículo único

Modificación de los Anexos de la Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre Vertidos Líquidos Industriales al Sistema Integral de Saneamiento

Uno. Se modifica el Anexo 1, que quedará redactado de la siguiente forma:

“ANEXO 1

VERTIDOS PROHIBIDOS

Se entiende como prohibido el vertido al sistema integral de saneamiento de cualquier elemento sólido, pastoso, líquido o gaseoso que, incorporado en las aguas como consecuencia de los procesos o actividades de las instalaciones industriales, en razón de su naturaleza, propiedades, concentración y cantidad, cause o pueda causar, por sí solo o por interacción con otros, alguno de los siguientes efectos:

1. Mezclas explosivas: Se entenderán como tales aquellos compuestos que por razón de su naturaleza o cantidad sean o puedan ser suficientes, por sí mismos o en presencia de otras sustancias, de provocar igniciones o explosiones. En ningún momento medi-

ciones sucesivas efectuadas con un explosímetro en el punto de descarga del vertido al Sistema Integral de Saneamiento deberán indicar valores superiores al 5 por 100 del límite inferior de explosividad, así como una medida realizada de forma aislada, no deberá superar en un 10 por 100 al citado límite. Se incluyen: Los gases procedentes de motores de explosión, gasolina, queroseno, nafta, éteres, aldehídos, cetonas, peróxidos, cloratos, percloratos, bromuros, carburos, hidruros, nitruros, disolventes orgánicos inmiscibles en agua y aceites volátiles, así como cualquier otra sustancia que pueda provocar mezclas explosivas.

2. Residuos sólidos o viscosos: Se entenderán como tales aquellos residuos que provoquen o puedan provocar obstrucciones con el flujo del Sistema Integral de Saneamiento o que puedan interferir en el transporte de aguas residuales. Se incluyen los siguientes: Grasas, salvo los residuos de liposucción previstos en el Decreto 83/1999, de 3 de junio, por el que se regulan las actividades de producción y gestión de los residuos biosanitarios y citotóxicos en la Comunidad de Madrid, tripas, tejidos animales, estiércol, huesos, pelos, pieles, carnazas, entrañas, sangre salvo la procedentes de los centros y establecimientos regulados en el citado Decreto 83/1999, plumas, cenizas, escorias, arenas, cal apagada, residuos de hormigones y lechadas de cemento o aglomerantes hidráulicos, fragmentos de piedras, mármol, metales, vidrio, paja, virutas, recortes de césped, trapos, lúpulo, deshecho de papel, maderas, plástico, alquitrán, así como residuos y productos alquitranados procedentes de operaciones de refino y destilación, residuos asfálticos y de procesos de combustiones, aceites lubricantes usados, minerales o sintéticos, incluyendo agua-aceite, emulsiones, agentes espumantes y en general todos aquellos sólidos de cualquier procedencia con tamaño superior a 1,5 centímetros en cualquiera de sus tres dimensiones.

3. Materias colorantes: Se entenderán como materias colorantes aquellos sólidos, líquidos o gases, tales como: Tintas, barnices, lacas, pinturas, pigmentos y demás productos afines, que incorporados a las aguas residuales, las colorea de tal forma que no pueden eliminarse por ninguno de los procesos de tratamiento usuales que se emplean en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales.

4. Residuos corrosivos: Se entenderán como tales aquellos compuestos que provoquen corrosiones a lo largo del Sistema Integral de Saneamiento, tanto en equipos como en instalaciones, capaces de reducir considerablemente la vida útil de éstas o producir averías. Se incluyen los siguientes: Ácidos clorhídrico, nítrico, sulfúrico, carbónico, fórmico, acético, láctico y butírico, lejías de sosa o potasa, hidróxido amónico, carbonato sódico, aguas de muy baja salinidad y gases como el sulfuro de hidrógeno, cloro, fluoruro de hidrógeno, dióxido de carbono, dióxido de azufre, y todas las sustancias que reaccionando con el agua formen soluciones corrosivas.

5. Residuos peligrosos: Se entenderán aquellos productos o compuestos que, de acuerdo con lo establecido en la Ley 5/2003, de 20 de marzo, de Residuos de la Comunidad de Madrid:

- Figuren en la lista de residuos peligrosos aprobada en la legislación estatal.
- Los que, sin estar incluidos en la lista citada, tengan tal consideración de conformidad con lo establecido en la normativa estatal.
- Los que hayan sido calificados como peligrosos por la normativa comunitaria y los que pueda aprobar el Gobierno de conformidad con lo establecido en la normativa europea o en convenios internacionales de los que España sea parte.

6. Residuos que produzcan gases nocivos: Se entenderán como tales los residuos que produzcan gases nocivos en la atmósfera del alcantarillado, colectores y/o emisarios en concentraciones superiores a los límites siguientes:

- Monóxido de carbono (CO): 100 cc/m³ de aire.
- Cloro (Cl₂): 1 cc/m³ de aire.
- Sulfuro de hidrógeno (SH₂): 20 cc/m³ de aire.
- Cianhídrico (CNH): 10 cc/m³ de aire.”

Dos. Se modifica el Anexo 2, que quedará redactado de la siguiente forma:

“ANEXO 2

VALORES MÁXIMOS INSTANTÁNEOS DE LOS PARÁMETROS DE CONTAMINACIÓN

PARÁMETRO	Unidades	Valores máximos instantáneos
Temperatura	°C	40
pH (intervalo permisible)	unid. de pH	6-10
DBO ₅	mg/l	1000
DDO	mg/l	1750
Sólidos en suspensión	mg/l	1000
Acetres y grasas ¹	mg/l	100
Cianuros totales	mg/l	5
Cloruros	mg/l	2000
Conductividad	µS/cm ²	7500
Detergentes totales	mg/l	30
Fluoruros	mg/l	15
Sulfatos	mg/l	1000
Sulfuros	mg/l	5
Toxicidad	Equitox/m ³	25
COMPUESTOS ORGANOHALOGENADOS Y SUSTANCIAS QUE LOS PUEDAN ORIGINAR EN AGUA		
Organohalogenados adsorbibles (AOX)	mg Cl/l	5
Trihalometanos. Total	mg/l	2,5
HIDROCARBUROS PERSISTENTES Y SUSTANCIAS ORGÁNICAS TÓXICAS Y BIOACUMULABLES		
BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno, xileno) ¹	mg/l	1,5
Fenoles totales	mg/l	2
Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) ^{2, 3}	mg/l	1
Hidrocarburos totales	mg/l	20
METALES Y SUS COMPUESTOS⁴		
Aluminio	mg/l	20
Arsénico	mg/l	1
Bario	mg/l	20
Boro	mg/l	3
Cadmio	mg/l	0,5
Cobre	mg/l	3
Cromo hexavalente	mg/l	1
Cromo total	mg/l	3
Estaño	mg/l	2
Hierro	mg/l	10
Manganeso	mg/l	2
Mercurio	mg/l	0,1
Níquel	mg/l	5
Plata	mg/l	1
Plomo	mg/l	1
Selenio	mg/l	1
Zinc	mg/l	3
Tóxicos metálicos ⁵		5
SUSTANCIAS QUE CONTRIBUYEN A LA EUTROFIZACIÓN		
Fósforo total	mg P/l	40
Nitrógeno total ⁶	mg N/l	125

¹ Individualmente cada uno de los compuestos del grupo BTEX no podrá superar los 0,5 mg/l.

² La concentración de PAH se obtendrá considerando la suma de los siguientes compuestos: Acenafileno, acenafteno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(ghi)perileno, criseno, dibenzo(ah)antraceno, fenantreno, fluoreno, fluoranteno, indeno(1,2,3cd)pireno, naftaleno, pireno.

³ Individualmente cada uno de los compuestos del grupo PAH no podrá superar los 0,1 mg/l.

⁴ La concentración de metales debe entenderse como total: Fracción disuelta más fracción en suspensión

⁵ La suma de las fracciones concentración real/concentración límite exigido, relativa a los elementos tóxicos (arsénico, cadmio, cromo VI, níquel, mercurio, plomo, selenio, cobre y zinc) no superará el valor 5.

⁶ El nitrógeno total equivale a la suma de nitrógeno Kjeldahl total (N orgánico + NH₃), nitrógeno en forma de nitrato y nitrógeno en forma de nitrito.”

Tres. Se modifica el Anexo 3, que quedará redactado de la siguiente forma:

“ANEXO 3

INSTALACIONES INDUSTRIALES OBLIGADAS A PRESENTAR LA SOLICITUD DE VERTIDO

Están obligadas a presentar la Solicitud de Vertido:

- a) Las instalaciones que, superando un caudal de abastecimiento y autoabastecimiento de 3.500 m³/año, desarrollen cualquiera de las actividades recogidas en la tabla.

- b) Todas las instalaciones industriales, con independencia de su actividad, que superen un caudal de abastecimiento y autoabastecimiento de 22.000 m³/año.
- c) Todas aquellas instalaciones que, con independencia de su actividad y de su caudal de abastecimiento y autoabastecimiento, produzcan vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento que, por sus especiales características, se considere necesario que estén sometidas a autorización, previo requerimiento del Ayuntamiento correspondiente, a instancias de la Comunidad de Madrid.

Ref. CNAE	Actividad industrial
01.2	Producción ganadera
01.3	Producción agraria combinada con la producción ganadera
01.42	Actividades de los servicios relacionados con la ganadería, excepto actividades veterinarias
13	Extracción de minerales metálicos
14	Extracción de minerales no metálicos ni energéticos
15	Industria de productos alimenticios y bebidas
16	Industria del tabaco
17	Industria textil
18	Industria de la confección y de la peletería
19	Preparación, curtido y acabado de cuero; fabricación artículos marroquinería y viaje: artículos de guarnicionería, talabartería y zapatería
20	Industria de la madera y del corcho, excepto muebles; cestería y espartería
21	Industria del papel
22	Edición, artes gráficas y reproducción de soportes grabados
23	Coquerías, refino de petróleo y tratamiento de combustibles nucleares
24	Industria química
25	Fabricación de productos de caucho y materias plásticas
26	Fabricación de otros productos minerales no metálicos
27	Metalurgia
28	Fabricación de productos metálicos, excepto maquinaria y equipo
29	Fabricación de máquinas, equipo y material mecánico
30	Fabricación de máquinas de oficina y equipos informáticos
31	Fabricación de maquinaria y material eléctrico
32	Fabricación de material electrónico; fabricación de equipo y aparatos de radio, televisión y comunicaciones
33	Fabricación de equipo e instrumentos médico-quirúrgicos, de precisión, óptica y relojería
34	Fabricación de vehículos de motor, remolques y semirremolques
35	Fabricación de otro material de transporte
36	Fabricación de muebles; otras industrias manufactureras
37	Reciclaje
40	Producción y distribución de energía eléctrica, gas, vapor y agua caliente
50.2	Mantenimiento y reparación de vehículos a motor
50.4	Venta, mantenimiento y reparación de motocicletas y de sus repuestos y accesorios
50.5	Venta al por menor de carburantes para la automoción
51.12	Intermediarios del comercio de combustibles, minerales, metales y productos químicos industriales
51.23	Comercio al por mayor de animales vivos
51.51	Comercio al por mayor de combustibles sólidos, líquidos y gaseosos y productos similares
51.532	Comercio al por mayor de pinturas y barnices
51.551	Comercio al por mayor de fertilizantes y productos químicos para la agricultura
51.553	Comercio al por mayor de productos químicos industriales
51.57	Comercio al por mayor de chatarra y otros productos de desecho
52.111	Hipermercados (más de 2500 m ²)
52.486	Comercio al por menor de combustibles (excepto para vehículos automóviles)
55.52	Provisión de comidas preparadas
63.121	Depósito y almacenamiento frigorífico
63.122	Depósito y almacenamiento de mercancías peligrosas
63.124	Otros depósitos y almacenamientos

Ref. CNAE	Actividad industrial
63.211	Terminales y estaciones de ferrocarril
63.212	Terminales de estaciones de autobuses de viajeros
63.23	Otras actividades anexas al transporte aéreo
73.1	Investigación y desarrollo en ciencias naturales y técnicas
74.3	Ensayos y análisis técnicos
74.81	Actividades de fotografía
74.82	Actividades de envasado y empaquetado por cuenta de terceros
85.1	Actividades sanitarias
85.2	Actividades veterinarias
93.01	Lavado, limpieza y teñido de prendas de tela y de piel
---	Gestión de residuos **

Cuatro. Se modifica el Anexo 4, que quedará redactado de la siguiente forma:

“ANEXO 4

MÉTODOS ANALÍTICOS ESTABLECIDOS PARA EL ANÁLISIS DE LOS VERTIDOS

En la tabla 1 se reflejan las técnicas a utilizar para la determinación analítica de los parámetros a considerar en el vertido de aguas residuales al sistema integral de saneamiento. No obstante, podrán utilizarse otras técnicas distintas a las que figuran en esta tabla siempre que se encuentren recogidas en cualquiera de los procedimientos analíticos especificados en la tabla 2 del presente Anexo ajustándose a las limitaciones establecidas en cuanto a límites de detección, precisión y exactitud.

TABLA 1

Técnicas analíticas

PARÁMETRO	TÉCNICA	Límite de detección ⁽¹⁾ %	Precisión ⁽²⁾ %	Exactitud ⁽³⁾ %
1. Temperatura	- Termometría	---	---	---
2. pH	- Electrometría	---	2	2
3. DBO ₅	- Incubación, cinco días a 20°C	---	20	20
4. DQO	- Reflujo con dicromato potásico	---	10	10
5. Sólidos en suspensión	- Gravimetría previa filtración sobre membrana de 0,45 micras	---	10	10
6. Aceites y grasas	- Extracción y gravimetría - Espectrofotometría de absorción infrarroja	---	10	10
7. Cianuros totales	- Destilación y espectrofotometría de absorción molecular	10	10	10
8. Cloruros	- Cromatografía iónica - Espectrometría de absorción molecular - Potenciometría - Titulación	10	10	10
9. Conductividad	- Electrometría	10	10	10
10. Detergentes totales	- Espectrofotometría de absorción molecular	10	10	10
11. Fluoruros	- Cromatografía iónica - Electrodo selectivo - Espectrofotometría de absorción molecular	10	10	10
12. Sulfatos	- Espectrofotometría de absorción molecular	10	10	10
13. Sulfuros	- Espectrofotometría de absorción molecular	10	10	10
14. Toxicidad	- Ensayo de toxicidad aguda en Daphnia	---	---	---
15. Compuestos Organohalogenados adsorbibles (AOX)	- Culombimetría	10	20	20
16. Trihalometanos total	- Cromatografía de gases	10	20	20
17. BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno, xileno)	- Cromatografía de gases con detector cromatográfico específico o detector de espectrometría de masas - Sistema de inyección específico para sustancias volátiles	10	25	25

PARÁMETRO	TÉCNICA	Límite de detección ⁽¹⁾ %	Precisión ⁽²⁾ %	Exactitud ⁽³⁾ %
18. Fenoles totales	- Cromatografía de gases - Destilación y espectrofotometría de absorción molecular, método amino-4-antipirina	10	10	10
19. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH)	- Cromatografía de líquidos de alta resolución - Cromatografía de gases	10	20	20
20. Hidrocarburos totales	- Espectrofotometría de absorción infrarroja	10	20	20
21. Aluminio	- Absorción atómica - Espectrofotometría de absorción molecular	10	10	10
22. Arsénico total	- Espectrofotometría de emisión por plasma- ICP - Absorción atómica	10	10	10
23. Bario	- Absorción atómica	10	10	10
24. Boro	- Absorción atómica - Espectrofotometría de absorción molecular	10	10	10
25. Cadmio	- Espectrofotometría de emisión por plasma- ICP - Absorción atómica	10	10	10
26. Cobre	- Espectrofotometría de emisión por plasma- ICP - Absorción atómica	10	10	10
27. Cromo hexavalente	- Espectrofotometría de absorción molecular	10	10	10
28. Cromo total	- Espectrofotometría de emisión por plasma- ICP - Absorción atómica	10	10	10
29. Estaño	- Absorción atómica - Espectrometría de absorción molecular	10	10	10
30. Hierro	- Absorción atómica - Espectrometría de absorción molecular	10	10	10
31. Manganeseo	- Absorción atómica - Espectrometría de absorción molecular	10	10	10
32. Mercurio	- Absorción atómica	10	10	10
33. Niquel	- Espectrofotometría de emisión por plasma-ICP - Absorción atómica	10	10	10
34. Plata	- Absorción atómica	10	10	10
35. Plomo	- Espectrofotometría de emisión por plasma -ICP - Absorción atómica	10	10	10
36. Selenio	- Espectrofotometría de emisión por plasma-ICP - Absorción atómica	10	10	10
37. Zinc	- Espectrofotometría de emisión por plasma-ICP - Absorción atómica	10	10	10
38. Fósforo total	- Espectrofotometría de absorción molecular	10	10	10
39. Nitrógeno total	- Espectrofotometría de absorción molecular	10	10	10

(1) Se entiende por límite de detección el triple de la desviación típica relativa dentro del lote de una muestra natural que contenga una baja concentración del parámetro, o bien el quintuplo de la desviación típica relativa dentro del lote de una muestra en blanco.

(2) Se entiende por precisión el error aleatorio y se expresa habitualmente como la desviación típica (dentro de cada lote y entre lotes) de la dispersión de resultados en torno a la media. Se considera una precisión aceptable el doble de la desviación típica relativa.

(3) Se entiende por exactitud el error sistemático y representa la diferencia entre el valor medio de un gran número de mediciones reiteradas y el valor exacto.

En la tabla 1, tanto el límite de detección como la exactitud o precisión requeridas para cada uno de los parámetros considerados se expresan como porcentaje del valor límite establecido en la tabla del Anexo 2 para cada uno de ellos."

TABLA 2

Procedimientos analíticos

Procedimientos	Organismo elaborador
Normas españolas UNE	AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación)
Normas francesas NF	AFNOR (Association Française de Normalisation)
Normas alemanas DIN	DIN (Deutsches Institut für Normung)

Procedimientos	Organismo elaborador
Normas europeas EN	CEN (Comité Europeo de Normalización)
Normas norteamericanas ANS	ANSI (American National Standards Institute)
Normas internacionales ISO	ISO (International Organization for Standardization)
APHA-AWWA-WPCF Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater	APHA-AWWA-WPCF (American Public Health Association- American Water Works Association- Water Pollution Control Federation)
OECD Guidelines for Testing of Chemicals	OECD (Organization for Economic Cooperation and Development)
US-EPA Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes	US-EPA (United States Environmental Protection Agency)
ASTM Standards. Section 11: Water and Environmental Technology	ASTM (American Society for Testing and Materials)

DISPOSICIONES TRANSITORIAS

Primera

Autorización de Vertido

Se establece un período transitorio de un año desde la entrada en vigor de este Decreto, para la obtención de la Autorización de Vertido por parte de aquellas empresas que antes no la requerían.

Segunda

Adecuación de los Vertidos

Se establece un período transitorio de un año desde la entrada en vigor de este Decreto, para la adecuación de los vertidos procedentes de empresas que actualmente cuentan con Autorización, a los límites y condiciones establecidos en este Decreto.

DISPOSICIÓN FINAL ÚNICA

Entrada en vigor

Este Decreto entrará en vigor el día siguiente al de su publicación en el BOLETÍN OFICIAL DE LA COMUNIDAD DE MADRID. Acordado en Madrid, a 30 de junio de 2005.

El Consejero de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio,
MARIANO ZABÍA LASALA

La Presidenta,
ESPERANZA AGUIRRE GIL DE BIEDMA

(03/18.099/05)

A1.10. ORDENANZA GENERAL PARA LA PROTECCIÓN DEL MEDIO AMBIENTE DEL MUNICIPIO DE GETAFE (BOCAM nº 154 de 30/06/2004, suplemento): Título I, Capítulo I: Normas Generales y Título IV: Normas particulares aguas

BOLETIN OFICIAL DE LA COMUNIDAD DE MADRID

Suplemento al número 154, correspondiente al día 30 de junio de 2004

Fascículo I

SUMARIO

III. ADMINISTRACIÓN LOCAL

AYUNTAMIENTOS

— Getafe (Otros anuncios)	1
---------------------------------	---

IV. ADMINISTRACIÓN DE JUSTICIA

— Tribunal Superior de Justicia de Madrid:	
• Secretaría de Gobierno	61
• Sala de lo Contencioso-Administrativo	61
• Sala de lo Social	61
— Tribunal Superior de Justicia de Navarra	64
— Audiencia Provincial de Madrid	64
— Juzgados de Madrid (Decanato)	65
— Juzgados de Primera Instancia	66
— Juzgados de Instrucción	70
— Juzgados de Primera Instancia e Instrucción	75
— Juzgados de lo Contencioso-Administrativo	78
— Juzgados de lo Social	79

III. ADMINISTRACIÓN LOCAL

AYUNTAMIENTOS

GETAFE

OTROS ANUNCIOS

El Ayuntamiento Pleno de Getafe, en sesión ordinaria celebrada el día 3 de junio de 2004, adoptó, entre otros, el siguiente acuerdo:

“7. Proposición conjunta de la concejala-delegada de Medio Ambiente y del concejal-delegado de Urbanismo sobre aprobación definitiva de la ordenanza general de protección del medio ambiente del municipio de Getafe.

Visto el dictamen favorable de la Comisión Informativa Permanente de Urbanismo, Desarrollo Industrial y Medio Ambiente de fecha 27 de mayo de 2004, vista la proposición de referencia de 24 de mayo de 2004, así como el informe de la jefa de Sección de Medio Ambiente de fecha 21 de mayo de 2004; el escrito de enmiendas presentado por los Grupos Municipales del PSOE e IU, con entrada en el Registro General del Ayuntamiento el 26 de abril de 2004; el escrito de alegaciones presentado por el Servicio de Salud Pública, Área 10, con entrada en el Registro General del Ayuntamiento el 27 de abril de 2004; el escrito de alegaciones presentado por la Asociación de Vecinos Nuevo Perales, con entra-

da en el Registro del Ayuntamiento de Getafe el 3 de mayo de 2004; el escrito de alegaciones del Grupo Municipal Partido Popular, con entrada en el Registro General del Ayuntamiento con fecha 10 de mayo de 2004; el escrito de alegaciones presentado por la Asociación de Vecinos Ciudad Nuevo Getafe, con entrada en el Registro General del Ayuntamiento de Getafe el 14 de mayo de 2004, y demás antecedentes documentales obrantes en el expediente, (...)

Sometido el asunto a votación por mayoría de diecisiete votos a favor: trece votos de los concejales del PSOE; cuatro votos de los concejales de IU, y diez votos en contra de los concejales del PP, se adopta el siguiente acuerdo:

Primero.—Estimar en su totalidad las alegaciones presentadas conjuntamente por los Grupos Municipales PSOE e IU y las presentadas por el Servicio de Salud Pública del Área 10.

Segundo.—Estimar parcialmente las alegaciones presentadas por la Asociación de Vecinos Nuevo Perales, la relativa al artículo 176 presentada por el Grupo Municipal del PP y las alegaciones de la Asociación de Vecinos Nuevo Getafe.

Tercero.—Aprobar definitivamente la ordenanza general para la protección del medio ambiente del municipio de Getafe, y publicar el texto íntegro de la misma en el BOLETÍN OFICIAL DE LA COMUNIDAD DE MADRID, entrando en vigor cuando se produzca.”

- d) Utilización de la energía, el agua y las materias primas de forma racional, eficaz y eficiente.
- e) Establecimiento inicial y durante el desarrollo de la actividad de las medidas complementarias necesarias para evitar cualquier riesgo de contaminación al suelo durante el ejercicio de la actividad. El traslado o desmantelamiento de la actividad garantizará la descontaminación y acondicionamiento del suelo mediante informe justificativo emitido por técnico cualificado.

Artículo 5. Derecho de acceso a la información sobre el medio ambiente.

Todas las personas, físicas o jurídicas, tienen derecho a acceder a la información sobre el estado de las aguas, el aire, el suelo y las tierras, la fauna, la flora y los espacios naturales comprendidos dentro del término municipal de Getafe. El ejercicio de dicho derecho se ajustará a los límites y condiciones legalmente establecidos por la normativa estatal y autonómica.

CAPÍTULO II

EVALUACIÓN DE IMPACTO AMBIENTAL

Artículo 6. Concepto, clases y ámbito de aplicación.

1. La evaluación de impacto ambiental es el procedimiento que incluye el conjunto de estudios e informes técnicos y de consultas que permite estimar los efectos que la ejecución de un determinado proyecto o actividad causa sobre el medio ambiente, con el fin de prevenir, evitar y corregir dichos efectos.
2. Están sometidas al procedimiento de evaluación de impacto ambiental ordinario las actividades y proyectos del Anexo II de la Ley 2/2002, de 19 de junio de Evaluación Ambiental de la Comunidad de Madrid.
3. Están sometidas al procedimiento de evaluación de impacto ambiental abreviado las actividades y proyectos enumerados en el Anexo III de la Ley 2/2002, de 19 de junio, de Evaluación Ambiental de la Comunidad de Madrid.

Artículo 7. Procedimiento ordinario.

1. El procedimiento de evaluación de impacto ambiental ordinario se iniciará a partir de la fecha de recepción en la Consejería competente en materia de Medio Ambiente de la memoria-resumen que el promotor de la actividad o proyecto deberá presentar en el Ayuntamiento junto con la solicitud de autorización. La citada Memoria será remitida a la Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental de la citada Consejería en el plazo máximo de quince días por el Ayuntamiento.
2. La memoria-resumen deberá incluir necesariamente el Certificado de viabilidad urbanística emitido por el Ayuntamiento de Getafe y contemplará los siguientes aspectos mínimos:
 - a) Objeto, justificación y características de las instalaciones.
 - b) Infraestructuras, servidumbres y servicios que conlleve la actuación de referencia.
 - c) Representación cartográfica de la localización a escala adecuada.
 - d) Planos de planta y alzado de las construcciones que en su caso se pretendan.
 - e) Determinaciones del planeamiento urbanístico vigente en el ámbito de implantación del proyecto o actividad.
3. En un plazo de treinta días desde la recepción de la memoria-resumen, la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio remitirá al promotor el listado de las personas, instituciones y administraciones previsiblemente afectadas por el proyecto a las que deberá consultar.

TÍTULO I
NORMAS GENERALES DE
PREVENCIÓN Y CONTROL AMBIENTAL

CAPÍTULO I
NORMAS GENERALES

Artículo 1. Objeto.

1. El objeto de la presente Ordenanza es establecer el sistema de intervención administrativa de todas las actividades susceptibles de afectar al medio ambiente y la salud de las personas, en el ámbito territorial del Municipio de Getafe.
2. Las normas de este Título son de aplicación general a todos los demás títulos de esta Ordenanza.

Artículo 2. Objetivos.

Los objetivos de la presente Ordenanza son:

- a) Alcanzar un alto nivel de protección de las personas y del medio ambiente en conjunto, para garantizar la calidad de vida y desarrollo de la persona mediante la utilización de los instrumentos necesarios que permitan prevenir, minimizar, corregir y controlar los impactos que las actividades sometidas a la presente Ordenanza originan.
- b) Favorecer un desarrollo sostenible mediante un sistema de intervención administrativa ambiental que armonice el desarrollo económico con la protección del medio ambiente.
- c) Garantizar el acceso a la información ambiental de los ciudadanos y fomentar su participación y responsabilidad compartida en la definición y gestión del medio ambiente que desean tener.

Artículo 3. Ámbito de aplicación.

1. Quedan sometidas a la presente Ordenanza todas las actividades, de titularidad pública o privada, susceptibles de afectar al medio ambiente y la salud y bienestar de las personas. Con carácter general se considera que todas las actividades son susceptibles de afectar al medio ambiente. Sólo tienen la consideración de inocuas las relacionadas en el Anexo I de esta Ordenanza.
2. Quedan afectadas al cumplimiento de la presente Ordenanza tanto las instalaciones y actividades existentes en el momento de su aprobación como las de nueva implantación o uso.

Artículo 4. Condiciones generales de funcionamiento de las actividades.

- Las actividades comprendidas en el ámbito de aplicación de la presente Ordenanza, se instalarán y ejercerán la actividad de acuerdo con los siguientes principios:
- a) Prevención de la contaminación, mediante la aplicación de las medidas adecuadas y, en especial, de las mejores técnicas disponibles.
 - b) Prevención de la transferencia de la contaminación de un medio a otro.
 - c) Reducción de la producción de residuos mediante técnicas de minimización y valorización cuando sea posible, procurando en todo caso su correcta gestión de acuerdo con lo establecido por la legislación vigente.

TÍTULO IV

NORMAS PARTICULARES SOBRE AGUAS

CAPÍTULO I

NORMAS GENERALES

Artículo 112. Objeto y ámbito de aplicación.

El objeto de este título es intervenir en el marco de las competencias municipales, los vertidos a la red de saneamiento municipal y a los cauces que discurren por el término del municipio así como el aprovechamiento y ahorro del agua. Quedan sometidas a las prescripciones de este título todas las instalaciones, construcciones, actos y actividades de uso personal o industrial que puedan ocasionar vertidos de aguas residuales. Este título se aplicará tanto a las actividades de nueva instalación como a las ya existentes o en funcionamiento, ejercicio o uso, ya sean públicas o privadas, salvo que se indique otra cosa.

Art. 113. Planes urbanísticos.

Sin perjuicio de lo establecido en este Título los dispositivos de evacuación de vertidos, acometidas a la Red de Saneamiento e instalaciones en general se ajustarán a las normas del Plan General de Ordenación Urbana, así como a las que regulan las condiciones sanitarias de los mismos. Todos los proyectos o actuaciones de alcantarillado que se desarrollen en el municipio como consecuencia de nuevos desarrollos urbanísticos deberán ajustarse al Plan Director de Saneamiento del municipio de Getafe.

Los proyectos y actuaciones urbanísticas en espacios tanto públicos como privados valorarán las características de las áreas soladas o asfaltadas en cuanto a la superficie y los materiales con el objetivo de permitir la recarga del acuífero. Serán los materiales porosos los de elección en aceras y paseos peatonales.

Artículo 114. Vertidos prohibidos.

Quedan prohibidos los vertidos al Sistema Integral de Saneamiento de todos los compuestos y materias que de forma enumerativa quedan agrupados, por similitud de efectos, en el Anexo X.

Queda prohibida la dilución para conseguir niveles de concentración que posibiliten su evacuación al Sistema Integral de Saneamiento.

Quedan prohibidos los vertidos directos al medio tales como las infiltraciones e inyecciones al subsuelo, ya sean directas o con tratamiento previo (fosas sépticas, tanques Imhoff, filtros bacterianos, neutralización, precipitaciones, etc.) y los realizados a lagunas, canales o acequias de riego.

2. Las sanciones se impondrán atendiendo a:

- a) Las circunstancias del responsable.
- b) La importancia del daño o deterioro causado.
- c) La mayor o menor importancia o molestia causada a las personas, a los bienes o al medio ambiente.
- d) La intencionalidad o la negligencia.
- e) La reincidencia y la participación.

El Ayuntamiento concederá la Autorización de Vertido siempre y cuando se cumpla con la normativa legal vigente

Las actividades que viertan directamente al cauce deberán acreditar en el momento de solicitar la licencia de actividad que disponen de autorización de vertido expedido por la Confederación Hidrográfica del Tajo o autoridad competente.

La autorización de vertido para usuarios domésticos se entenderá implícita en la licencia de primera ocupación.

El Ayuntamiento, motivadamente, podrá requerir en cualquier momento un análisis de vertido realizado por un laboratorio homologado cuando existan indicios racionales de anomalías en los datos presentados en la Solicitud de Vertido.

Artículo 121. Procedimiento para la obtención de autorización de vertido.

Para la tramitación de la autorización de vertido se deberá presentar además de los modelos de documentos de Identificación Industrial y de Solicitud de Vertido aprobados en el Decreto 40/1994, de 21 de Abril de la Comunidad de Madrid, la siguiente documentación:

- Descripción del proceso productivo de la actividad, así como sus corrientes de vertido y si existe algún tipo de vertido puntual. Frecuencia o periodos de dichos vertidos y procedencia.
- Informe de ensayo emitido por un laboratorio homologado, Organismo o Empresa Colaboradora, al menos del Grupo 2 del Ministerio de Medio Ambiente, correspondiente a la caracterización del vertido. Dicho informe cumplirá con lo establecido en el Decreto 62/1994, de 16 de junio, por el que se establecen normas complementarias para la caracterización de los vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento.
- Plano de la red de saneamiento de la actividad, indicándose en el mismo la ubicación de la arqueta toma de muestras (dimensión de la arqueta, profundidad y diámetro del colector o colectores de entrada y salida de la arqueta), separadora de grasas, etc.

Si la actividad dispone de un sistema de pretratamiento de sus vertidos:

- Descripción y características del sistema.
- Plan de mantenimiento del mismo.

Si la actividad genera residuos peligrosos, deberá justificar la gestión de los mismos.

Artículo 122. Renovación y modificación total o parcial de la autorización.

Las autorizaciones de vertidos se revisarán y en su caso se adaptarán cada cinco años. Si hay modificaciones sustanciales en las características del efluente declarado en la solicitud de autorización de vertido, deberá presentarse en el Ayuntamiento una nueva solicitud de vertido. Se considera que existe modificación sustancial de las características del efluente autorizado cuando de los análisis de autocontroles, o de los llevados a cabo por la Administración competente, se obtenga la constatación de que más de la mitad de los parámetros que el titular debe controlar periódicamente superan el 40 por 100 de la contaminación característica media, declarada por el titular en la Solicitud de vertido, para cada uno de ellos.

El Ayuntamiento, podrá modificar las condiciones de la autorización de vertido cuando las circunstancias que motivaron su otorgamiento se hubieran alterado o sobrevinieran otras que, de haber existido anteriormente, habrían justificado su denegación o el otorgamiento en términos distintos, pudiendo en su caso decretar la suspensión temporal hasta que se superen dichas circunstancias.

Artículo 115. Vertidos procedentes de riego.

Con el fin de evitar la contaminación de los acuíferos del municipio por nitratos procedentes de la agricultura, los agricultores estarán obligados a observar el Código de Buenas Prácticas Agrarias aprobado por la Dirección General de agricultura y Alimentación de la Comunidad de Madrid en Resolución de 4 febrero 1999, de conformidad a las exigencias comunitarias recogidas en la Directiva del Consejo 91/676/CEE, de 12 de diciembre de 1991.

Artículo 116. Vertidos a cauces públicos.

Los vertidos directos a cauces públicos tales como ríos, arroyos, canales, acequias de riego están prohibidos. Solo estarán permitidos aquellos que cuenten con la preceptiva autorización de la Confederación Hidrográfica del Tajo o autorización ambiental integrada.

CAPÍTULO II

SISTEMA INTEGRAL DE SANEAMIENTO

Artículo 117 . Valores máximos de los parámetros de contaminación en los vertidos.

Atendiendo a la capacidad y utilización de las instalaciones de saneamiento y depuración, se establecen unas limitaciones generales, cuyos valores máximos instantáneos de los parámetros de contaminación son los que se incluyen en el Anexo 2 de la Ley 10/1993, de 26 de octubre sobre Vertidos industriales al sistema integral de saneamiento

Cuando las actividades viertan al Sistema Integral de Saneamiento sustancias distintas a las especificadas en el Anexo X que puedan alterar los procesos de tratamiento o sean potencialmente contaminadoras, el Ayuntamiento procederá a señalar las condiciones y limitaciones para el vertido de cada uno de sus componentes.

Artículo 118. Uso del Sistema Integral de Saneamiento.

Será obligatorio el uso del Sistema Integral de Saneamiento, en adelante SIS, para la evacuación de aguas residuales domésticas o asimiladas e industriales cuyo establecimiento esté en suelo urbano.

Artículo 119. Conservación del Sistema Integral de Saneamiento.

La conservación y mantenimiento del Sistema Integral de Saneamiento será a cargo del Ayuntamiento.

La conservación y mantenimiento de la red de alcantarillado privado serán de cuenta de las personas que las utilicen para la evacuación de sus aguas residuales quienes responderán solidariamente frente al Ayuntamiento de la conservación de la misma.

El mantenimiento del pozo de registro, arqueta de toma de muestras y/o arqueta separadora de grasas con sus elementos y accesos adecuados será responsabilidad del productor del vertido.

CAPÍTULO III

AUTORIZACIÓN DE VERTIDOS

Artículo 120. Obligación de solicitud.

Todos los establecimientos con actividad industrial o comercial que viertan sus aguas al SIS y estén comprendidos en el Anexo XI de esta Ordenanza, deberán presentar la correspondiente Solicitud de Vertido en el Ayuntamiento de Getafe.

Artículo 127. Comunidad de usuarios.

Cuando varios usuarios se unieran para efectuar conjuntamente un pretratamiento previo de sus vertidos, deberán obtener una autorización de vertido para el efluente final conjunto, en la que se hará constar los datos relativos a cada uno de los usuarios y sus efluentes.

La responsabilidad derivada del cumplimiento o incumplimiento de las condiciones de la autorización de vertido y de las normas de este título será solidaria de la comunidad de usuarios y de cada uno de sus componentes.

Artículo 128. Autorización condicionada de vertido.

En cualquier caso se entenderá que la autorización queda condicionada a la eficacia del tratamiento previo, de suerte que si el mismo no produjera los resultados previstos el Ayuntamiento podrá decretar la suspensión temporal del vertido hasta que se superen las circunstancias que dieron lugar a dicho resultado.

Artículo 129. Arquetas de registro de efluentes.

Las instalaciones industriales que viertan aguas residuales dispondrán, para la toma de muestras y mediciones de caudales u otros parámetros, de una arqueta o registro de libre acceso desde el exterior conforme a las características establecidas en el Anexo XII situada aguas abajo del último vertido y de tal forma ubicada que el flujo del efluente no pueda variarse. Si la red de saneamiento municipal es unitaria, antes de la arqueta de registro confluirán las aguas industriales, fecales y pluviales; en caso contrario, con red de saneamiento separativa, antes de la arqueta de registro confluirán las aguas fecales e industriales.

Las agrupaciones industriales u otros usuarios que mejoren la calidad de sus efluentes dispondrán, a la salida de su instalación de pretratamiento, de la correspondiente arqueta o registro de libre acceso, sin exclusión de la establecida en el punto anterior.

Con independencia de que varios usuarios pudieran verter sus aguas residuales en una arqueta común, las instalaciones industriales que, de entre aquéllas, efectúen vertidos cuyos parámetros de contaminación superen los establecidos en el Anexo XIII estarán obligadas a instalar antes de la confluencia de sus vertidos en la arqueta común, arquetas o registros individuales.

El Ayuntamiento podrá exigir la instalación de medidores de caudal vertido y otros instrumentos y medidas de control de contaminación, en los casos en que no exista fiabilidad respecto a los datos o estimaciones aportados por el usuario.

Artículo 130. Autocontrol.

El titular de la autorización de vertido realizará periódicamente los análisis que se especifiquen en la propia autorización, a fin de verificar que los vertidos no sobrepasen las limitaciones establecidas.

Los resultados de los análisis deberán remitirse al Departamento de Medio Ambiente del Ayuntamiento y deberán conservarse por los titulares al menos durante tres años.

A criterio razonado de los Servicios Técnicos del Departamento de Medio Ambiente del Ayuntamiento las actividades no incluidas en el anexo XI podrán ser obligadas a realizar análisis periódicos de sus vertidos.

Artículo 131. Aparatos de medición.

El Ayuntamiento podrá requerir a aquellas actividades que bien por sus antecedentes o por que haya indicios de vertidos que no se ajusten a la normativa vigente, la instalación de medidores de caudal y aparatos automáticos de toma de muestras con el fin de

Artículo 123. Contenido de la autorización de vertido.

La autorización de vertido podrá establecer limitaciones y condiciones mediante la inclusión de los siguientes apartados:

- Valores máximos y medios permitidos en las concentraciones de contaminantes y características físico-químicas de las aguas residuales vertidas.
- Límites sobre el caudal y el horario de las descargas.
- Exigencias de instalaciones de adecuación de los vertidos e inspección, muestreo y mediación, en caso de que sea necesario.
- Exigencias respecto al mantenimiento, informes técnicos y registros de la planta en relación con el vertido.
- Autocontroles periódicos.
- Programas de ejecución de las instalaciones de depuración.
- Condiciones complementarias que garanticen el cumplimiento de la presente Ordenanza.

En cualquier caso, la Autorización quedará condicionada a la eficacia del pretratamiento de tal forma que si el mismo no consiguiera los resultados previstos, quedaría sin efecto dicha autorización.

Artículo 124. Denegación de la autorización de vertido por silencio administrativo.

Las autorizaciones de vertido nunca podrán ser consideradas como otorgadas por silencio administrativo o acto presunto, siendo imprescindible para su existencia que el Ayuntamiento se pronuncie a favor de su concesión.

Artículo 125. Censo e información de vertidos.

Los servicios técnicos del Departamento de Medio Ambiente elaborarán un Censo de Vertidos líquidos industriales al SIS donde se registrarán todos los datos referentes a las actividades tales como datos identificativos, autorizaciones de vertidos, inspecciones, analíticas, medidas correctoras instaladas, etc.

El Ayuntamiento informará periódicamente al Órgano competente de la Comunidad de Madrid de todas las Autorizaciones concedidas, así como de sus modificaciones.

CAPÍTULO IV**CONTROL EN ORIGEN DEL VERTIDO****Artículo 126. Instalaciones de pretratamiento.**

Las instalaciones cuyos vertidos a la Red Integral de Saneamiento superen los límites establecidos en la Ley 10/1993 estarán obligados a adoptar medidas correctoras o de pretratamiento preventivas, de forma que el vertido pueda ser realizado en las condiciones exigidas.

En todo caso y a criterio de los técnicos del Departamento de Medio Ambiente, se deberán establecer las medidas correctoras o de pretratamiento cuando los vertidos puedan suponer una amenaza para la calidad de las aguas receptoras.

Las instalaciones necesarias para el pretratamiento de estas aguas residuales formarán parte de la red de alcantarillado privada y se definirán suficientemente en la información y documentación que se presente ante el Ayuntamiento y en la solicitud de la autorización de vertido y de actividad.

La valoración de los daños será realizada por el Ayuntamiento teniendo en cuenta el informe que emitirán los técnicos del Ayuntamiento o del Ente Gestor.

CAPÍTULO VI
INSPECCIÓN DE VERTIDOS

Artículo 138. Actuaciones de inspección.
El servicio de inspección y personal técnico del Departamento de Medio Ambiente del Ayuntamiento realizarán periódicamente la inspección y vigilancia de las instalaciones de vertido al Sistema Integral de Saneamiento y al cauce, con el objeto de comprobar el cumplimiento de las disposiciones de este título y demás disposiciones legales de aplicación.
Podrán también inspeccionar una instalación cuando lo consideren oportuno o a petición de interesado o denuncia.

Artículo 139. Objeto de la inspección.
Durante el acto de control o inspección se podrán llevar a cabo las siguientes actuaciones por el personal oficialmente designado a tal fin:

- Comprobación del estado de la instalación y del funcionamiento de los instrumentos que para el control de los efluentes se hubieran establecido en la Autorización de vertido.
- Muestreo de los vertidos en cualquier punto de las instalaciones que los originan.
- Medida de los caudales vertidos y de parámetros de calidad medibles «in situ».
- Comprobación de los caudales de abastecimiento y autoabastecimiento.
- Comprobación del cumplimiento del usuario de los compromisos detallados en la autorización de vertido.
- Comprobación del cumplimiento de las restantes obligaciones, en materia de vertidos, contempladas en la presente Ordenanza.
- Informar a los usuarios sobre la adopción de las medidas que consideren oportunas para el correcto funcionamiento de las instalaciones o que de cualquier modo sean relevantes para el vertido.
- Levantar acta conforme a las prescripciones del Título I de esta Ordenanza.
- Cualquier otra que resulte necesaria para el correcto desarrollo de la labor inspectora.

Artículo 140. Análisis de vertidos.

1. Las determinaciones analíticas se realizarán sobre muestras simples o compuestas recogidas en el momento más representativo del vertido, el cual será señalado por los técnicos o personal designado del Ayuntamiento.
2. Cada muestra se fraccionará en tres lotes o partes homogéneas que serán precintadas, lacradas y etiquetadas de manera que se identifique la identidad de las muestras con su contenido durante el tiempo de conservación de las mismas. Los códigos de rotulación de las etiquetas no permitirán en ningún caso determinar el origen o procedencia de las muestras.
3. Uno de los lotes será entregado al usuario o industrial conjuntamente con una copia del Acta de inspección. El lote en poder del industrial deberá ser analizado en un laboratorio homologado por un organismo de control autorizado, empresa colaboradora, al menos, del grupo 2 del Ministerio de Medio Ambiente o por empresa

controlar los vertidos que dicha actividad realiza a lo largo de una jornada laboral. El titular de la actividad será el responsable del correcto mantenimiento de las instalaciones.

Artículo 132. Información sobre análisis de vertidos.

Las determinaciones y los resultados de los análisis del autocontrol estarán a disposición del personal encargado de la inspección y control de los vertidos en el momento de su actuación.

CAPÍTULO V
DESCARGAS ACCIDENTALES

Artículo 133. Adopción de medidas preventivas de accidentes.
Cada usuario deberá tomar las medidas adecuadas para evitar las descargas accidentales de vertidos que puedan ser potencialmente peligrosas para la seguridad física de las personas, bienes, instalaciones, cauce, Estación Depuradora de Aguas Residuales o la Red del Sistema Integral de Saneamiento en general.

Artículo 134. Aviso de descarga accidental.
Cuando por accidente, fallo de funcionamiento o de la explotación de las instalaciones del usuario, se produzca un vertido que esté prohibido y como consecuencia sea capaz de originar una situación de emergencia y peligro, tanto para las personas como para el cauce o Sistema Integral de Saneamiento, el usuario deberá comunicar urgentemente la circunstancia producida al Ayuntamiento con objeto de evitar o reducir al mínimo los daños que pudieran causarse. La comunicación se efectuará utilizando el medio más rápido.

Artículo 135. Adopción de medidas.
Una vez producida la situación de emergencia, el usuario utilizará todos los medios a su alcance para reducir al máximo los efectos de la descarga accidental.
El usuario deberá remitir al Ayuntamiento, en el plazo máximo de cuarenta y ocho horas, un informe detallado del accidente, en el que deberán figurar los siguientes datos: identificación de la empresa, caudal y materias vertidas, causa del accidente, hora en que se produjo, medidas correctoras tomadas «in situ», hora y forma en que se comunicó el suceso al Ayuntamiento o al Ente Gestor de la Depuradora.

Artículo 136. Accidentes mayores.
Cuando las situaciones de emergencia, a las que se hace referencia en los artículos anteriores, puedan ser calificadas de accidentes mayores, además de las normas establecidas en la presente Ordenanza, será de aplicación el Real Decreto 1254/1999, de 16 de julio, sobre Medidas de control de los riesgos inherentes a los accidentes graves en los que intervengan sustancias peligrosas y demás disposiciones reglamentarias.

Artículo 137. Indemnización por daños.
Los costes de las operaciones a que den lugar los accidentes que ocasionen situaciones de emergencia o peligro, así como los de limpieza, remoción, reparación o modificación del Sistema Integral de Saneamiento, deberán ser abonados por el usuario causante, con independencia de otras responsabilidades en las que pudiera haber incurrido.

Artículo 143. Ahorro de agua en actividades industriales, comerciales y hostelería.
Todas las actividades con elevados consumos de agua que vayan desarrollándose en el municipio deberán contar con sistemas adecuados de ahorro de agua y de mecanismos que impidan las fugas. Deberán contar así mismo con programas específicos de reducción de consumo, implantando las mejores técnicas disponibles que vayan surgiendo en el mercado.
Se procurará en todo momento la utilización de aguas recicladas en todas aquellas actividades que no precisen agua potable.

Artículo 144. Ahorro de agua en la agricultura.
El sector agrícola estará obligado a utilizar sistemas de riego que racionalicen y controlen el consumo de agua como son la aspersión, la microirrigación o el goteo.
El sector agrícola estará obligado a reparar y/o revestir las canalizaciones existentes para evitar pérdidas y modernizar sus sistemas de riego con el fin de incorporar las mejores tecnologías disponibles para el ahorro de agua de riego.

CAPÍTULO VIII

RÉGIMEN DISCIPLINARIO Y SANCIONADOR

Artículo 145. Suspensión cautelar del vertido.

El Alcalde o el Concejal en el que se delegue podrán ordenar motivadamente la suspensión inmediata del vertido de una instalación industrial cuando se dé alguna de las siguientes circunstancias:
No haber presentado la Identificación Industrial.
Carecer de la autorización de vertido.
Cuando el vertido infrinja gravemente o no se adapte a las características, limitaciones, y condiciones establecidas en la autorización de vertido.
Cuando el vertido a la Red Integral de Saneamiento o al cauce pueda producir situaciones de inminente gravedad.

Artículo 146. Procedimiento de suspensión de vertido.

No se podrá adoptar la medida cautelar de suspensión sin haber dado audiencia previa al usuario en un plazo de cinco días.
Paralelamente a la adopción por el Ayuntamiento de la orden de suspensión del vertido, si el vertido es al Sistema Integral de Saneamiento se procederá a la incoación del correspondiente procedimiento sancionador conforme a lo regulado en el Título I, Capítulo cinco de esta Ordenanza y las normas estatales y autonómicas reguladoras del procedimiento sancionador, con el fin de esclarecer la posible existencia de infracción administrativa. Si el vertido lo fuere al cauce se dará cuenta al órgano correspondiente para que incoe el procedimiento sancionador.
Se procederá a levantar la orden de suspensión de vertido en el momento en que el causante del vertido acredite la cesación de las causas que dieron lugar a la suspensión.
El Ayuntamiento podrá adoptar las medidas que considere necesarias para garantizar la suspensión del vertido, incluido el precinto de instalaciones.

acreditada por ENAC, para el análisis de aguas residuales, siempre y cuando el tiempo transcurrido desde la toma de muestras y el inicio de los ensayos no supere las veinticuatro horas, manteniendo en todo momento las muestras precintadas y en las debidas condiciones de refrigeración. Los otros dos lotes quedarán en poder del Ayuntamiento, una para la realización de los análisis en el Laboratorio Municipal y el otro para su conservación y custodia para el supuesto de tener que hacerse un análisis dirimente.

4. Los métodos analíticos seleccionados para la determinación de los diferentes parámetros de los vertidos, son los enumerados en el anexo XIV.
5. En el supuesto de no estar conforme el industrial con el resultado de los análisis efectuados por el laboratorio municipal y el realizado por la actividad, se procederá al análisis del dirimente en un laboratorio que cumpla con lo especificado en el punto 3 de este artículo y a propuesta del Ayuntamiento o del propio industrial. Al análisis del dirimente podrá asistir el propio interesado o perito por él designado.

CAPÍTULO VII

MEDIDAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL CONSUMO Y AHORRO DE AGUA

Artículo 141. Ahorro en viviendas.

En las viviendas de nueva construcción, en los puntos de consumo de agua se colocarán los mecanismos adecuados para permitir el máximo de ahorro, y a tal efecto:

- Los grifos de aparatos sanitarios de consumo individual dispondrán de perizadores o economizadores de chorro o similares y mecanismo reductor de caudal de forma que para una presión de 2 kilos y medio por centímetro cuadrado (2,5 kg/cm²) tengan un caudal máximo de 8 litros por minuto (8 l./min.)
- El mecanismo de accionamiento de la descarga de las cisternas de los inodoros limitará el volumen de descarga como máximo a seis (6) litros y dispondrá de la posibilidad de detener la descarga o de doble sistema de descarga.
- El mecanismo de las duchas incluirá economizadores de chorro o similares y mecanismo reductor de caudal de forma que para una presión de dos kilos y medio por centímetro cuadrado (2,5 kg./cm²) tenga un caudal máximo de diez litros por minuto (10 l./min.).

No se otorgará licencia de obras a los proyectos de nueva construcción o rehabilitación de viviendas que no hayan incorporado las prescripciones de este artículo.

Artículo 142. Riego de jardines y espacios comunes públicos y privados.

El diseño de las nuevas zonas verdes y espacios comunes públicos o privados, ha de incluir sistemas efectivos de ahorro de agua y como mínimo:

- Programadores de riego.
- Aspersores de corto alcance en zonas de pradera.
- Riego por goteo en zonas arbustivas y en árboles.
- Siempre que sea posible técnicamente, será obligatorio el uso de aguas recuperadas, pluviales o de pozos no potables para el riego de jardines, calles, plazas, patios y espacios públicos o privados.

Con el fin de limitar el uso del agua, en el diseño de jardines públicos y privados se cumplirán las normas que se establecen en el Título VI dedicado a parques y jardines.

TÍTULO V

NORMAS PARTICULARES SOBRE RESIDUOS

CAPÍTULO I

NORMAS GENERALES

Artículo 147. Infracciones.

1. Se consideran infracciones leves:
 - Las acciones y omisiones que contraviniendo lo establecido en la presente ordenanza o en la autorización de vertido, causen daño a los bienes de dominio que integran el Sistema Integral de Saneamiento por un valor que no exceda de 3.000 euros.
 - La no aportación al Ayuntamiento de la documentación requerida para solicitar la autorización del vertido o la información periódica que deba entregarse sobre características del efluente o cambios introducidos en el proceso que puedan afectar al mismo
 - El no disponer de Libro Registro de Vertidos ni documentación justificativa de los datos que han de hacerse constar en el mismo.
2. Se consideran infracciones graves:
 - Las acciones y omisiones que contraviniendo lo establecido en la presente Ordenanza o en la autorización de vertido causen daño a los bienes de dominio que integran el Sistema Integral de Saneamiento por un valor comprendido entre 3.000,1 y 30.000 euros.
 - Los vertidos efectuados sin la autorización correspondiente.
 - La no solicitud de nueva autorización de vertido por cambios en los datos y demás características hechas constar para la solicitud de autorización de vertido inicial.
 - La ocultación o el falseamiento de los datos exigidos en la solicitud de vertido.
 - El incumplimiento de las condiciones impuestas en la autorización de vertido.
 - El incumplimiento de las acciones exigidas para las situaciones de emergencia establecidas en la presente Ordenanza.
 - La no existencia de las instalaciones y equipos necesarios para la realización de los controles requeridos o mantenidos en condiciones no operativas.
 - La evacuación de vertidos sin tratamiento previo, cuando éstos lo requieran, o sin respetar las limitaciones especificadas en esta Ordenanza.
 - La obstrucción a la labor inspectora del Ayuntamiento en el acceso a las instalaciones o la negativa a facilitar la información requerida.
 - La reincidencia en dos faltas leves.
3. Se consideran infracciones muy graves:
 - Las infracciones calificadas como graves en el artículo anterior, cuando por la cantidad o calidad del vertido se derive la existencia de un riesgo muy grave para las personas, los recursos naturales o el medio ambiente.
 - Las acciones y omisiones que contraviniendo lo establecido en la presente Ordenanza o en la autorización de vertido, causen daño a los bienes de dominio que integran el Sistema Integral de Saneamiento, por un valor superior a 30.000,1 euros.
 - El incumplimiento de las órdenes de suspensión de vertidos.
 - La evacuación de vertidos prohibidos.
 - La reincidencia en dos faltas graves.

Artículo 148. Sanciones.

- Las infracciones enumeradas en el artículo anterior podrán ser sancionadas con arreglo a la siguiente escala:
1. Infracciones leves con multa de hasta 6.010,00 euros.
 2. Infracciones graves con multa desde 6.011,00 hasta 30.050,00 euros.
 3. Infracciones muy graves con multa desde 30.051,00 hasta 60.100,00 euros.

Artículo 149. Objeto.

Este Título tiene por objeto intervenir de forma particular y en el marco de las competencias del Ayuntamiento, las actividades de producción, gestión y eliminación de los residuos urbanos que se generen en el municipio de Getafe así como la limpieza viaria.

Artículo 150. Competencia.

Las normas que integran este título se dictan como desarrollo de las competencias que sobre la recogida, transporte y eliminación de los residuos urbanos, corresponden a las Entidades Locales según la legislación estatal y autonómica y versarán sobre:

- a) Recogida, transporte y eliminación de residuos domiciliarios particulares, de comercios, oficinas y servicios.
- b) Seguimiento y control de los envases que se comercialicen en el municipio, su reducción y gestión.
- c) Uso de las vías públicas, zonas verdes y áreas recreativas en relación con su limpieza y gestión de los residuos que se produzcan en dichos espacios públicos.
- d) Recogida, transporte y eliminación de residuos especiales originados por los particulares como son animales muertos, muebles y enseres y vehículos abandonados.
- e) Recogida y transporte de residuos producidos por obras menores de construcción y reparación domiciliaria.

Artículo 151. Concepto y clases de residuos.

1. Residuo es cualquier sustancia u objeto del cual su poseedor se desprenda o tenga la obligación de desprenderse.
2. Los residuos cuya gestión y tratamiento es competencia del Ayuntamiento se clasifican en las siguientes categorías:
 - a) **Domiciliarios.** Los producidos con la normal actividad doméstica así como los producidos en los establecimientos que por su naturaleza y volumen puedan ser asimilados a los anteriores. A título de ejemplo se pueden citar:
 1. Desechos de alimentación.
 2. Otros restos de consumo doméstico como maderas, tejidos.
 3. Restos de poda y jardinería en pequeñas cantidades.
 4. Envoltorios, envases y embalajes.
 5. Residuos procedentes de barrido de calles y viviendas.
 6. Restos de consumo de bares, restaurantes y actividades similares.
 7. Restos de autoservicios, supermercados y establecimientos análogos.
 - b) **Industriales convencionales:** los producidos con motivo de la actividad industrial que no puedan asimilarse a los domiciliarios y no tengan la consideración de especiales por su volumen, naturaleza o procedencia y dadas sus características puedan resultar perjudiciales para la vida de las personas, animales o plantas. En general se enmarcan dentro de esta categoría todos aquellos que supongan un riesgo potencial de degradación del medio ambiente

ANEXO 2: COLECCIÓN DE BACTERIAS AISLADAS DE LA ZONA FRANCA DE BARCELONA

Tabla A1. Bacterias aisladas de la zona franca de Barcelona. “H”: aisladas de la rizosfera de *Piptatherum miliaceum*; “C”: aisladas de la rizosfera de *Ipomoea indica*; “S”: aisladas de la rizosfera de *Conyza canadensis*; “SL”: aisladas del suelo libre.

Aislamiento	Gram	Morfología bacteria	Morfología colonia
H1 20	Positivo	Corineforme	Mucílago blanquecino - amarillento
H1 22	Positivo	Corineforme	Mucílago blanco
H1 24	Positivo	Corineforme	Mucílago blanco
H1 25	Positivo	Corineforme	Mucílago blanquecino - amarillento
H1 29	Positivo	Corineforme	Mucílago blanco
H1 31	Negativo	Corineforme	Mucílago blanco
H1 32	Negativo	Corineforme	Mucílago blanco
H1 33	Positivo	Corineforme	Mucílago amarillo
H1 35	Positivo	Corineforme	Mucílago blanco
H2 19	Positivo	Corineforme	Mucílago blanco - transparente
H2 20	Positivo	Corineforme	Mucílago transparente - amarillento
H2 22	Positivo	Corineforme	Mucílago blanco
H2 23	Positivo	Cocos unidos	Mucílago blanquecino
H2 26	Positivo	Bacteria mediana	Mucílago blanquecino - anaranjado
H2 29	Positivo	Bacteria <i>Streptomyces</i>	Colonias aisladas
H2 30	Positivo	Corineforme	Mucílago blanco
H2 32	Positivo	Corineforme	Colonias aisladas
H2 33	Positivo	Corineforme	Mucílago anaranjado
H3 22	Negativo	Corineforme	Mucílago transparente - rosado
H3 23	Negativo	Corineforme	Mucílago rosa
H3 25	Negativo	Corineforme	Mucílago blanquecino - anaranjado

Tabla A1. Continuación.

Aislamiento	Gram	Morfología bacteria	Morfología colonia
H3 28	Positivo	Cocos unidos	Mucílago amarillo
H3 29	Negativo	Corineforme	Mucílago anaranjado
H3 30	Positivo	Corineforme	Mucílago blanquecino - amarillento
H3 32	Negativo	Bacterias largas	Mucílago anaranjado
H3 35	Positivo	Corineforme	Mucílago blanco - amarillento
C1 19	Positivo	Cocos	Mucílago anaranjado
C1 20	Negativo	Bacilos	Mucílago blanco - anaranjado
C1 24	Negativo	Corineforme	Mucílago blanco
C1 25	Negativo	Cocos	Mucílago anaranjado
C1 26	Positivo	Bacteria pleomórfica	Mucílago amarillo
C1 27	Positivo	Bacilos. Con espora	Mucílago anaranjado
C1 28	Positivo	Bacilos	Mucílago blanquecino
C1 29	Positivo	Bacilos	Mucílago blanco
C1 32	Positivo	Bacilos	Mucílago rosa
C1 33	Positivo	Cocos unidos	Mucílago blanco - transparente
C1 34	Positivo	Cocos unidos	Mucílago amarillo
C2 19	Positivo	Cocos	Mucílago amarillo
C2 21	Negativo	Cocos	Mucílago anaranjado
C2 22	Positivo	Cocos unidos	Mucílago blanco
C2 23	Positivo	Corineforme. Con espora	Mucílago amarillo
C2 24	Positivo	Corineforme. Con espora	Mucílago amarillento
C2 25	Negativo	Cocos	Mucílago transparente - rosado
C2 27	Positivo	Corineforme formando cadenas	Mucílago blanco

Tabla A1. Continuación.

Aislamiento	Gram	Morfología bacteria	Morfología colonia
C2 28	Positivo	Corineforme. Con espora	Mucílago blanco
C2 29	Positivo	Cocos. Con espora	Mucílago blanquecino - anaranjado
C2 31	Positivo	Corineforme. Con espora	Mucílago amarillo
C2 36	Negativo	Corineforme. Con espora	Mucílago amarillo - anaranjado
C3 19	Negativo	Corineforme	Mucílago amarillo
C3 20	Positivo	Corineforme. Con espora	Mucílago blanco - amarillo
C3 21	Positivo	Corineforme	Mucílago transparente - amarillento
C3 22	Positivo	Corineforme	Mucílago amarillento
C3 24	Positivo	Corineforme	Mucílago transparente
C3 26	Positivo	Cocos. Con espora	Mucílago transparente - amarillento
C3 29	Positivo	Corineforme	Mucílago transparente
C3 30	Positivo	Corineforme	Mucílago transparente
C3 35	Positivo	Corineforme	Mucílago amarillo - anaranjado
C3 36	Positivo	Bacteria pequeña	Mucílago amarillo
S1 19	Positivo	Corineforme formando cadenas	Mucílago blanco
S1 21	Positivo	Corineforme	Mucílago blanco
S1 23	Positivo	Corineforme formando cadenas	Mucílago blanco
S1 24	Positivo	Cocos unidos formando cadenas	Mucílago blanco crema
S1 28	Positivo	Corineforme formando cadenas	Mucílago blanco
S1 29	Positivo	Corineforme	Mucílago blanquecino - anaranjado
S1 32	Positivo	Corineforme formando cadenas	Mucílago blanco crema
S1 34	Positivo	Corineforme	Mucílago blanquecino

Tabla A1. Continuación.

Aislamiento	Gram	Morfología bacteria	Morfología colonia
S1 35	Positivo	Corineforme formando cadenas	Mucílago anaranjado
S2 19	Positivo	Bacteria <i>Streptomyces</i>	Mucílago blanco
S2 22	Positivo	Corineforme	Mucílago amarillo
S2 24	Negativo	Cocos	Mucílago crema
S2 27	Positivo	Corineforme	Mucílago anaranjado
S2 28	Negativo	Corineforme	Mucílago anaranjado
S2 29	Negativo	Corineforme	Mucílago blanco
S2 33	Negativo	Corineforme	Mucílago blanco - transparente
S2 35	Positivo	Bacteria <i>Streptomyces</i>	Mucílago blanco
S2 36	Positivo	Corineforme	Mucílago amarillo
S3 19	Positivo	Corineformes	Mucílago rosa
S3 20	Positivo	Corineforme	Mucílago anaranjado
S3 22	Positivo	Corineforme	Mucílago amarillo
S3 24	Negativo	Bacilos	Mucílago blanco
S3 26	Positivo	Corineforme	Mucílago amarillo
S3 27	Positivo	Corineforme	Mucílago anaranjado
S3 30	Negativo	Corineforme	Mucílago anaranjado
SL1 20	Positivo	Bacteria <i>Streptomyces</i>	Mucílago blanco que parece un hongo
SL1 22	Positivo	Bacteria <i>Streptomyces</i>	Mucílago blanco que parece un hongo
SL1 25	Positivo	Medianas. Con espora	Mucílago transparente
SL1 30	Positivo	Cocos	Mucílago transparente blanco
SL1 32	Negativo	Corineforme	Mucílago anaranjado
SL1 35	Positivo	Corineforme	Mucílago naranja

Tabla A1. Continuación.

Aislamiento	Gram	Morfología bacteria	Morfología colonia
SL1 36	Positivo	Bacterias finas	Mucílago blanquecino
SL2 23	Positivo	Bacterias medianas	Mucílago blanco
SL2 24	Negativo	Corineforme	Mucílago anaranjado
SL2 25	Negativo	Corineforme	Mucílago transparente blanco
SL2 28	Negativo	Corineforme	Mucílago anaranjado
SL2 29	Positivo	Corineforme	Mucílago amarillento
SL2 29 *	Positivo	Cocos	Mucílago amarillo - anaranjado
SL2 31	Positivo	Cocos	Mucílago anaranjado
SL3 20	Negativo	Bacteria mediana	Mucílago naranja
SL3 21	Positivo	Corineforme	Mucílago amarillento
SL3 22	Positivo	Bacteria <i>Streptomycte</i>	Mucílago naranja
SL3 26	Negativo	Corineforme	Mucílago transparente - amarillento
SL3 28	Negativo	Corineforme	Mucílago anaranjado
SL3 33	Positivo	Corineforme	Mucílago transparente blanco
SL3 35	Positivo	Corineforme	Mucílago transparente blanco
SL3 36	Negativo	Corineforme	Mucílago anaranjado

ANEXO 3: MEDIOS DE CULTIVO

A3.1. Medio TPYG

Este medio está compuesto por:

- Peptona -> 1 gr/L
- Triptona -> 1 gr/L
- Extracto de levadura -> 2 gr/L
- Glucosa -> 2 gr/L
- Sulfato magnésico heptahidratado -> 0,6 gr/L
- Cloruro de calcio dihidratado -> 0,07 gr/L
- Agar -> 15 gr/L

Debe ajustarse el pH hasta 7.

A3.2. Medio Hutner (para *Lemna*)

Para una concentración ½ es necesario:

1. Preparar un stock 250X de:

<u>Compuesto</u>	<u>Concentración (mg/L)</u>	
K ₂ HPO ₄	400	
Combinar {	KOH	200
	EDTA (free acid)	500
	NH ₄ NO ₃	200
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	354	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	500	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	24,9	

2. Preparar un stock 125X de:

<u>Compuesto</u>	<u>Concentración (mg/L)</u>
MnCl ₂ ·4H ₂ O	17,9
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	65,9
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	25,2 -> Cantidad máxima, puede precipitar
H ₃ BO ₃	14,2
CuSO ₄ ·5H ₂ O	3,95
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,2

3. Combinar:

- a) 2 mL de la solución 250X
- b) 4 mL de la solución 125X
- c) Enrasar con agua destilada hasta 1 L
- d) Ajustar el pH entre 6,2 y 6,5 con 1 N HCl (mejor pH de 6,4)

Para crecimiento heterotrófico: añadir 1% (p/v) de sacarosa y esterilizar el medio autoclavando 15 minutos.

A3.3. Medio Hoagland's y Arnon (pH 5,5)

1. Preparar solución stock de Macroelementos (solución 1):

<u>Compuesto</u>	<u>g/20L</u>	
KNO ₃	20,4	} Se toman 4 L de la solución de macroelementos
MgSO ₄ ·7H ₂ O	9,8	
NH ₄ H ₂ PO ₄	4,6	
Ca(NO ₃) ₂	26	

2. Preparar solución stock concentrada 4 veces y diluir 5 mL de stock en 495 mL de H₂O destilada (solución 2):

<u>Compuesto</u>	<u>mg/100 mL</u>
HBO ₃	0,286
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,181
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,008
ZnSO ₄ (H ₂ O)	0,022
Na ₂ MoO ₄	0,011

3. Preparar una solución de 0,2013 g/ 20 L de sequestrene (solución 3).

Volumen total = 15 L H₂O destilada + 4 L solución 1 + 0,5 L solución 2 + 0,5 L solución 3 = 20 L

**ANEXO 4: BACTERIAS AISLADAS
DE LA ZONA FRANCA DE
BARCELONA Y DE TALADRINAS
PRETRATADAS CAPACES DE
CRECER EN AGAR CON AGUA DE
TALADRINA**

Tabla A2. Bacterias capaces de crecer en agar para métodos estándar (PCA) con 100% de agua de taladrina. "H": aisladas de la rizosfera de *Piptatherum miliaceum*; "C": aisladas de la rizosfera de *Ipomoea indica*; "S": aisladas de la rizosfera de *Conyza canadensis*; "SL": aisladas del suelo libre, "TP": aisladas de la taladrina pretratada.

Aislamiento	Gram	Morfología bacteria	Morfología colonia	Afiliación taxonómica según GenBank
H1 32	Negativo	Corineforme	Mucílago blanco	<i>Rhizobium huautlense</i> . JN585680.1
H1 33	Positivo	Corineforme	Mucílago amarillo	<i>Microbacterium sp.</i> AB461096.1
H2 23	Positivo	Cocos unidos	Mucílago blanquecino	<i>Agromyces ramosus</i> . X77447.1
H3 23	Negativo	Corineforme	Mucílago rosa	<i>Flavobacterium sp.</i> AY162137.1
H3 28	Positivo	Cocos unidos	Mucílago amarillo	<i>Microbacterium sp.</i> EF010799.1
C1 19	Positivo	Cocos	Mucílago anaranjado	<i>Nocardioides sp.</i> AB461091.1
C1 24	Negativo	Corineforme	Mucílago blanco	<i>Brevundimonas sp.</i> AM988998.1
C1 26	Positivo	Bacteria pleomórfica	Mucílago amarillento	<i>Cellulosimicrobium sp.</i> AY770608.1
C1 28	Positivo	Bacilos	Mucílago blanquecino	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i> . AM284988.1
C1 34	Positivo	Cocos unidos	Mucílago amarillo	<i>Microbacterium sp.</i> AB042078.1
C2 19	Positivo	Cocos	Mucílago amarillo	<i>Microbacterium sp.</i> DQ512485.1
C2 21	Negativo	Cocos	Mucílago anaranjado	<i>Luteimonas sp.</i> HQ874629.3
C2 28	Positivo	Bacilos	Mucílago blanco	<i>Bacillus Subtilis</i> . EU489501.1
C2 36	Negativo	Corineforme	Mucílago amarillo - anaranjado	<i>Stenotrophomonas sp.</i> EU734616.1
C3 19	Negativo	Corineforme	Mucílago amarillo	<i>Stenotrophomonas sp.</i> FJ719363.1
C3 21	Positivo	Corineforme	Mucílago transparente - amarillento	<i>Microbacterium sp.</i> FJ805433.1
C3 35	Positivo	Corineforme	Mucílago anaranjado	<i>Microbacterium sp.</i> FJ866678.1
S1 21	Positivo	Corineforme	Mucílago blanco	<i>Arthrobacter sp.</i> EU600212.1

Tabla A2. Continuación.

Aislamiento	Gram	Morfología bacteria	Morfología colonia	Afiliación taxonómica según GenBank
S1 24	Positivo	Cocos unidos formando cadenas	Mucílago blanco crema	<i>Promicromonospora</i> sp. AM992980.1
S1 28	Positivo	Corineforme formando cadenas	Mucílago blanco	<i>Promicromonospora</i> sp. AM992980.1
S1 29	Positivo	Corineforme	Mucílago blanquecino	<i>Bacillus Cereus</i> . FJ749283.1
S1 32	Positivo	Corineforme formando cadenas	Mucílago blanco crema	<i>Isoptericola</i> sp. FJ237392.1
S2 24	Negativo	Corineforme	Mucílago crema	<i>Variovorax</i> sp. FJ750461.1
S2 29	Negativo	Corineforme	Mucílago blanco	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> . AF508095.1
S2 33	Negativo	Corineforme	Mucílago blanco transparente	<i>Rhizobium alkalisoli</i> . JF496403.1
S3 22	Positivo	Corineforme	Mucílago amarillo	<i>Microbacterium</i> sp. AJ87668.1
S3 26	Positivo	Corineforme	Mucílago amarillo	<i>Microbacterium</i> sp. AM983459.1
SL1 36	Positivo	Bacterias finas	Mucílago blanquecino	<i>Paenibacillus</i> sp. AF395033.1
SL2 23	Positivo	Bacterias medianas	Mucílago blanco	<i>Bacillus subtilis</i> . FJ715744.1
SL2 29	Positivo	Bacilos	Mucílago amarillo - anaranjado	<i>Bacillus pumilus</i> . FJ938166.1
SL3 28	Negativo	Corineforme	Mucílago anaranjado	<i>Pedobacter</i> sp. AB377220.1
SL3 35	Positivo	Corineforme	Mucílago blanco - transparente	<i>Georgenia muralis</i> . AB455495.1
TP1	Positivo	Bacilos formando cadenas	Mucílago blanco	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> . FJ641029.1
TP2	Negativo	Corineforme	Mucílago crema - amarillento	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> . FJ613574.1
TP3	Positivo	Bacilos	Blanquecino, con hilitos en el exterior	<i>Bacillus licheniformis</i> . AB489112.1

Tabla A2. Continuación.

Aislamiento	Gram	Morfología bacteria	Morfología colonia	Afiliación taxonómica según GenBank
TP4	Negativo	Corineforme	Mucílago amarillento	<i>Pseudomonas sp.</i> FJ889638.1
TP5	Positivo	Bacilos	Blanquecino, con hilitos en el exterior	<i>Bacillus licheniformis.</i> DQ979417.1
TP6	Positivo	Bacilos esporulados	Mucílago blanquecino	<i>Bacillus sp.</i> FJ405190.1
TP7	Negativo	Corineforme	Mucílago amarillo	<i>Pseudomonas sp.</i> AM989274.1
TP8	Positivo	Bacilos	Mucílago crema	<i>Bacillus thuringiensis.</i> FJ755919.1
TP9	Positivo	Bacilos pequeños y encadenados	Mucílago blanquecino	<i>Bacillus licheniformis.</i> EF439666.1
TP10	Positivo	Bacilos	Mucílago crema	<i>Brevibacillus sp.</i> FJ71933.1
TP11	Positivo	Bacilos. Forma esporas	Mucílago crema	<i>Bacillus thuringiensis.</i> FJ755919.1
TP12	Positivo	Cocos	Mucílago crema - amarillento	<i>Cellulosimicrobium sp.</i> FJ013324.1
TP13	Positivo	Bacilos con esporas	Mucílago crema	<i>Bacillus thuringiensis.</i> FJ755919.1
TP14	Positivo	Bacilos con esporas	Mucílago crema	<i>Bacillus sp.</i> FJ405190.1
TP15	Positivo	Bacilos con esporas	Mucílago blanquecino	<i>Bacillus pumilus</i> EU244737.1
TP16	Positivo	Bacilos	Mucílago blanquecino	<i>Paenibacillus sp.</i> S000392964.1
TP17	Positivo	Bacilos encadenados	Mucílago blanquecino	<i>Bacillus simplex.</i> FJ595887.1
TP18	Positivo	Bacilos	Mucílago crema	<i>Lysinibacillus sphaericus.</i> EU741101.1
TP19	Positivo	Bacilos con espóra	Mucílago blanquecino	<i>Bacillus sp.</i> FJ848378.1
TP20	Positivo	Bacilos con espóra	Mucílago blanquecino	<i>Bacillus pumilus.</i> FJ705814.1
TP21	Positivo	Bacilos con espóra	Mucílago blanquecino	<i>Bacillus Pumilus.</i> FJ705814

ANEXO 5: ANÁLISIS FÍSICO- QUÍMICOS DE LAS MUESTRAS DE AGUA DE TALADRINA

Tabla A3. Resultados de los análisis fisicoquímicos medidos en las muestras de agua de taladrina.

Fecha	Hora muestreo	Observaciones	Volumen (L)	Conductividad (18°C)	Residuo seco (ppm)	pH (18°C)	DQO (ppm)	DBO (ppm)
7-3-08	11:00	Agua recogida del decantador de agua destilada. En este momento el VacuDest sólo hace ciclos de 8 h max y el agua está ligeramente diluida con agua de lluvia.	1	896,88	661,904059	8,78	4769	0
17-9-08	11:00	Agua recogida a la salida del VacuDest cuando éste destilaba agua de taladrina normal	10	306,36	226,095941	10,93	4729	3
29-10-08	8:00	Agua recogida a la salida del VacuDest cuando éste destilaba taladrina muy diluida por lluvias	10	355,2	262,1402214	10,19	5622	1
27-11-08	8:00	Agua recogida a la salida del VacuDest cuando éste destilaba taladrina. Pleno funcionamiento del equipo		288,6	212,9889299	10,8	5678	0
19-1-09	10:00	Agua recogida a la salida del VacuDest cuando éste destilaba taladrina. Pleno funcionamiento del equipo. Los días anteriores estuvo lloviendo.	20	664,54	490,4354244	9,67	1930	0
28-1-09	10:00	Agua recogida a la salida del VacuDest cuando éste destilaba taladrina. Pleno funcionamiento del equipo. Los días anteriores estuvo lloviendo	20	513	378,597786	10,48	5281	10
5-2-09	10:00	Agua recogida a la salida del VacuDest cuando éste destilaba taladrina. Pleno funcionamiento del equipo.	2	108,225	79,87084871	5,5056	2363	3

Tabla A3. Continuación.

Fecha	Hora muestreo	Observaciones	Volumen (L)	Conductividad (18°C)	Residuo seco (ppm)	pH (18°C)	DQO (ppm)	DBO (ppm)
13-2-09	10:00	Agua recogida a la salida del VacuDest cuando éste destilaba taladrina. Pleno funcionamiento del equipo.	2	343,2	253,2841328	10	4773	10
1-3-09	10:00	Agua recogida a la salida del VacuDest cuando éste destilaba taladrina. Pleno funcionamiento del equipo.	2	250,172	184,6287823	10,5	3508	0
2-3-09	10:00	Agua recogida a la salida del VacuDest cuando éste destilaba taladrina. Pleno funcionamiento del equipo.	2	322,05	237,6752768	13,8528	2319	10
3-3-09	10:00	Agua recogida a la salida del VacuDest cuando éste destilaba taladrina. Pleno funcionamiento del equipo.	2	253,266	186,9121771	10,6	3081	0
30-3-09	10:00	Agua recogida a la salida del VacuDest cuando éste destilaba taladrina. Pleno funcionamiento del equipo.	2	176,64	130,3616236	8,88	3861	10
31-3-09	10:00	Agua recogida a la salida del VacuDest cuando éste destilaba taladrina. Pleno funcionamiento del equipo.	2	167,968	123,9616236	8,99	3444	0
20-4-09	8:00	Agua recogida a la salida del VacuDest cuando éste destilaba taladrina. Pleno funcionamiento del equipo.	1	340	250,9	11,18	6563	0
24-4-09	9:00	Agua recogida a la salida del VacuDest cuando éste destilaba taladrina. Pleno funcionamiento del equipo.	1	609,56	449,86	10,59	6206	0
29-4-09	12:00	Agua recogida a la salida del VacuDest cuando éste destilaba taladrina. Tenemos poca, por lo que la que entra debe estar muy concentrada	1	745,24	549,99	9,93	4367	10

**ANEXO 6: CROMATOGRAMAS
CORRESPONDIENTES AL ANÁLISIS
DE HIDROCARBUROS DE LA
MUESTRA DE JOHN DEERE DEL
19/01/2009**

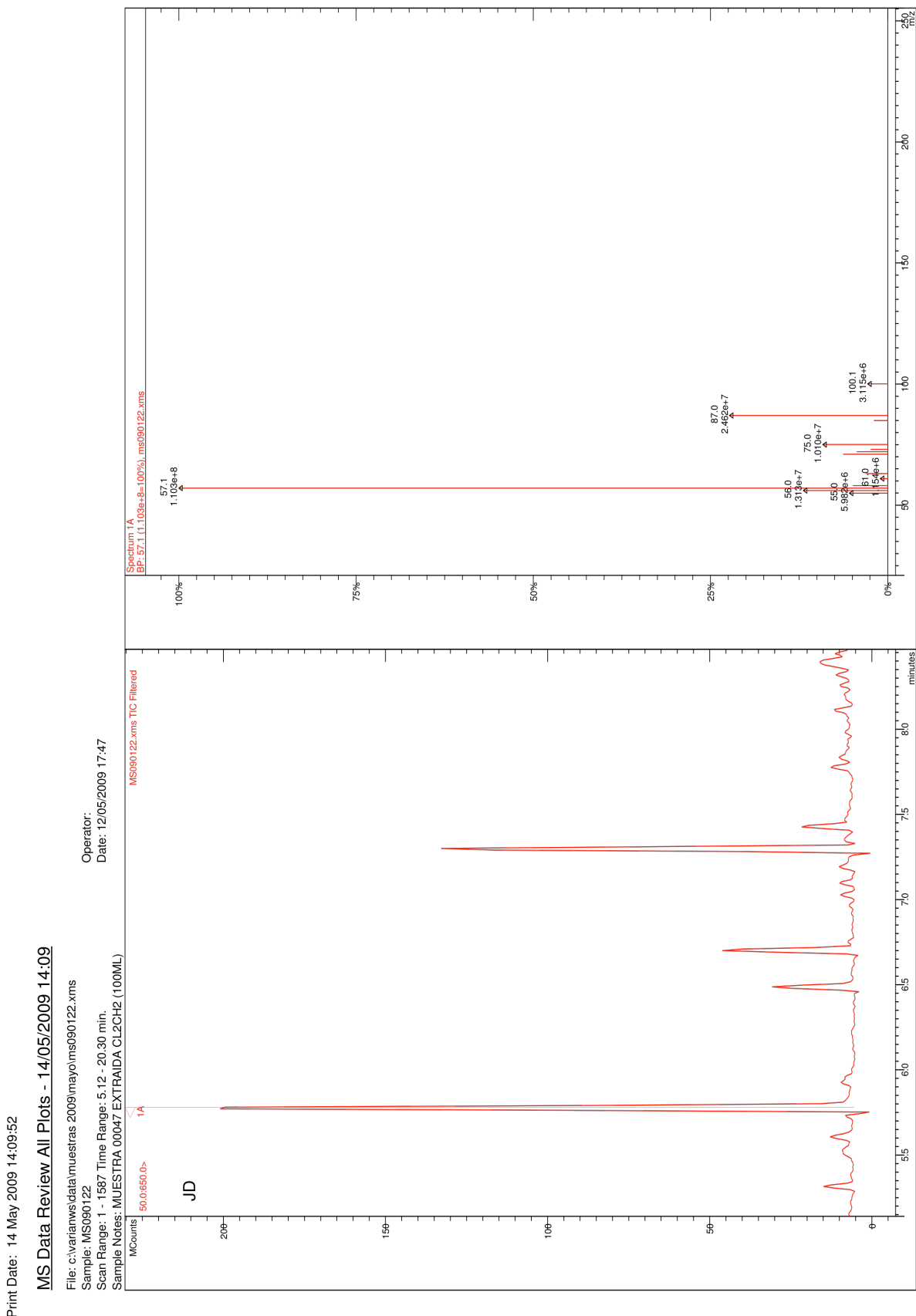


Figura A1. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 5,78 minutos.

Print Date: 14 May 2009 14:10:42

MS Data Review All Plots - 14/05/2009 14:10

File: c:\varianw\ms\data\muestras 2009\mayo\ms090122.xml
 Sample: MS090122
 Scan Range: 1 - 1587 Time Range: 5.12 - 20.30 min.
 Sample Notes: MUESTRA 00047 EXTRAIDA CL2CH2 (100ML)

Operator:
 Date: 12/05/2009 17:47

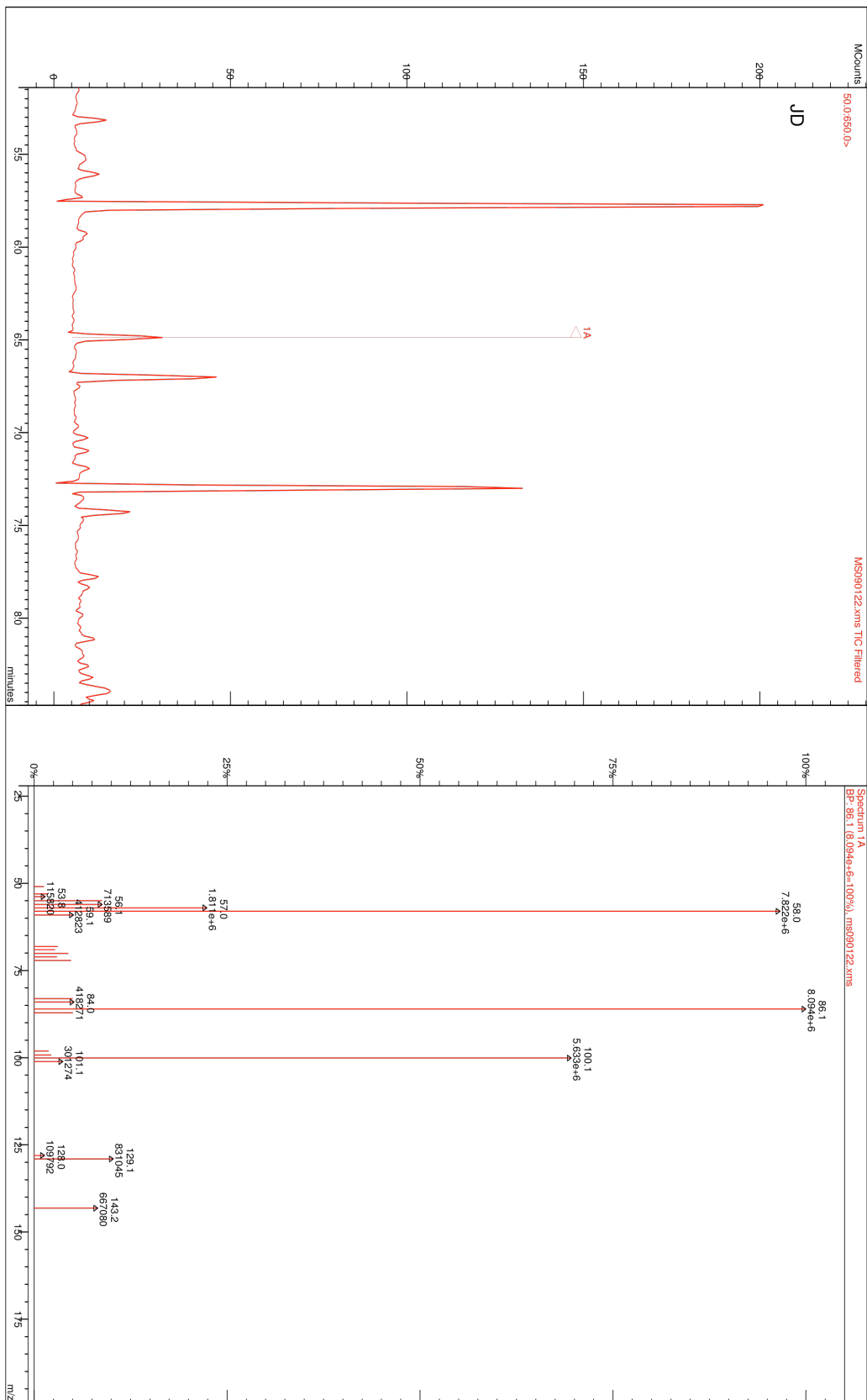


Figura A2. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 6,48 minutos.

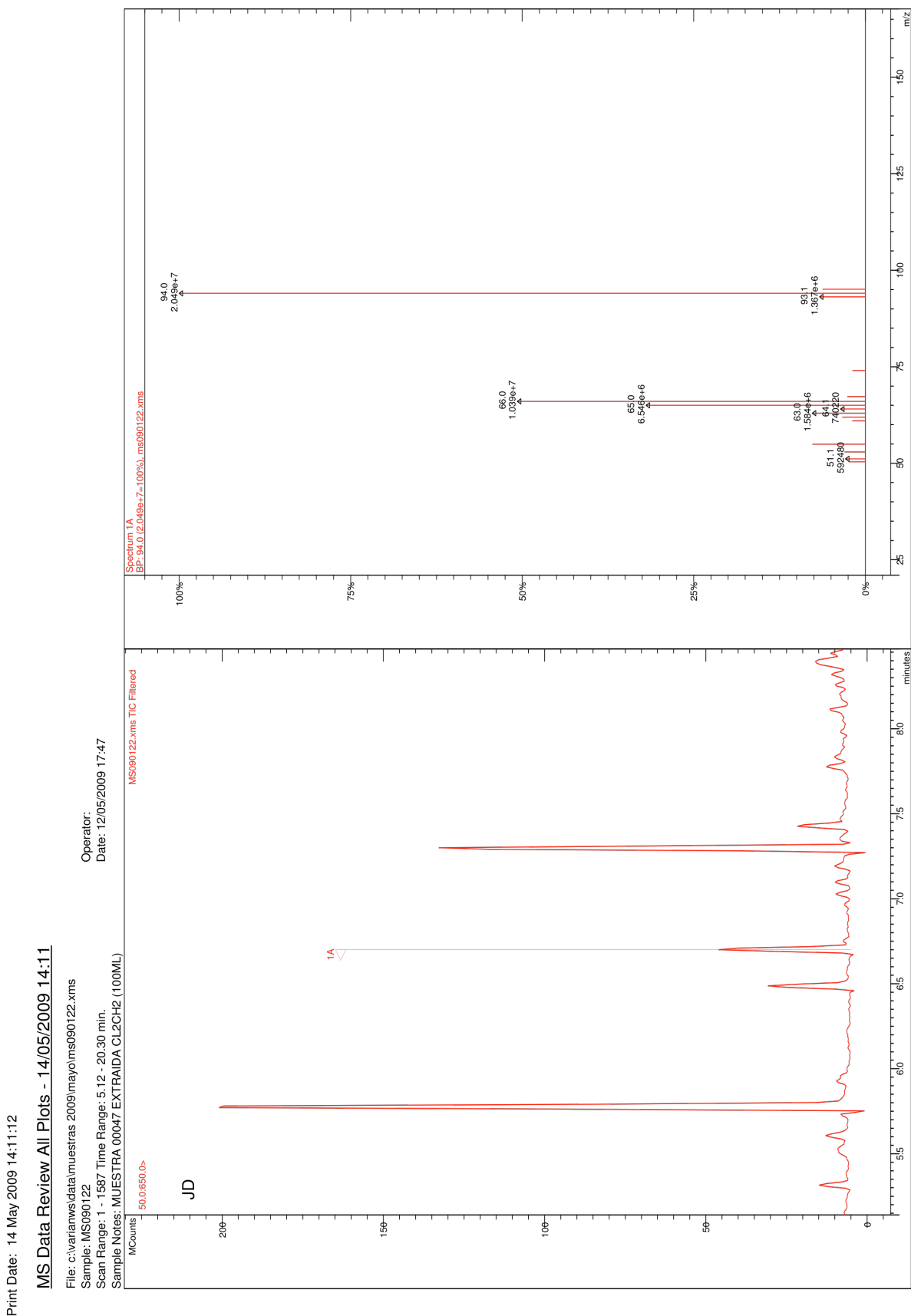


Figura A3. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 6,70 minutos.

Print Date: 14 May 2009 14:11:38

MS Data Review All Plots - 14/05/2009 14:11

File: c:\varianms\data\muestras 2009\mayo\ms90122.xml
 Sample: MS090122
 Scan Range: 1 - 1587 Time Range: 5.12 - 20.30 min.
 Sample Notes: MUESTRA 00047 EXTRAIDA CL2CH2 (100ML)

Operator:
 Date: 12/05/2009 17:47

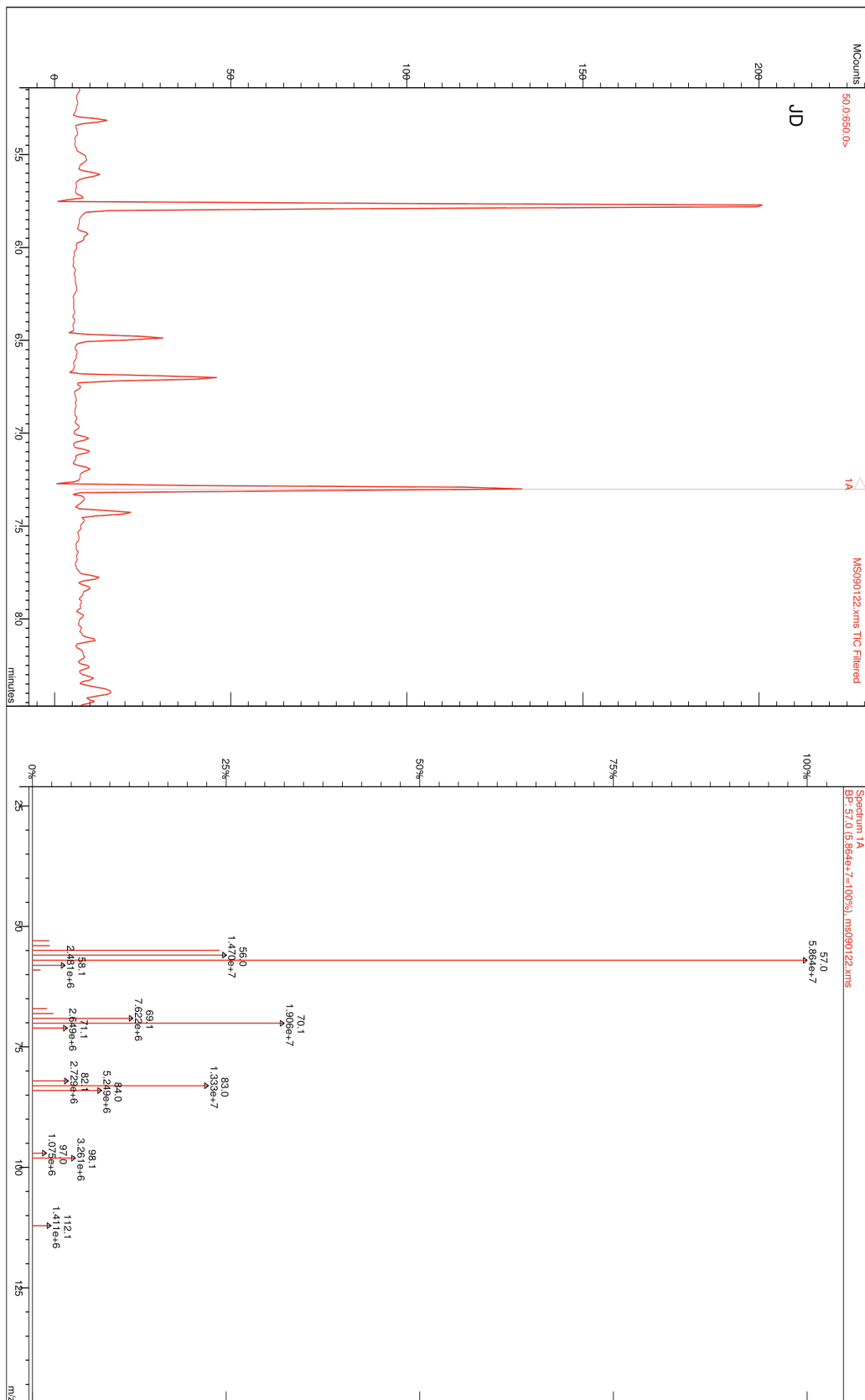


Figura A4. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 7,30 minutos.

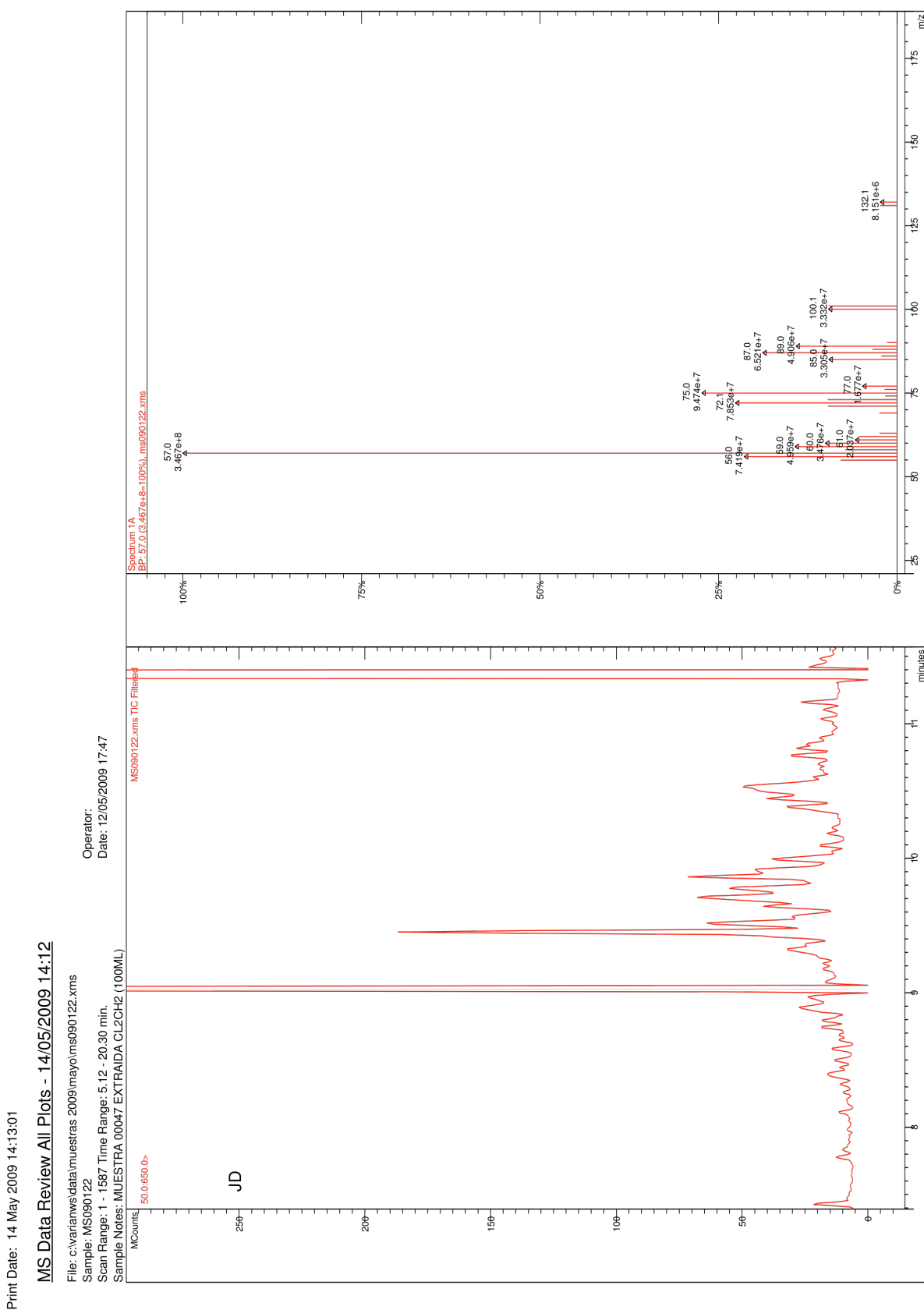


Figura A5. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 9,02 minutos.

Print Date: 14 May 2009 14:13:30

MS Data Review All Plots - 14/05/2009 14:13

File: c:\vartanw\data\muestras 2009\mayo\ms090122.xms
 Sample: MS090122
 Scan Range: 1 - 1587 Time Range: 5.12 - 20.30 min.
 Sample Notes: MUESTRA 00047 EXTRAIDA CL2CH2 (100ML)

Operator:
 Date: 12/05/2009 17:47

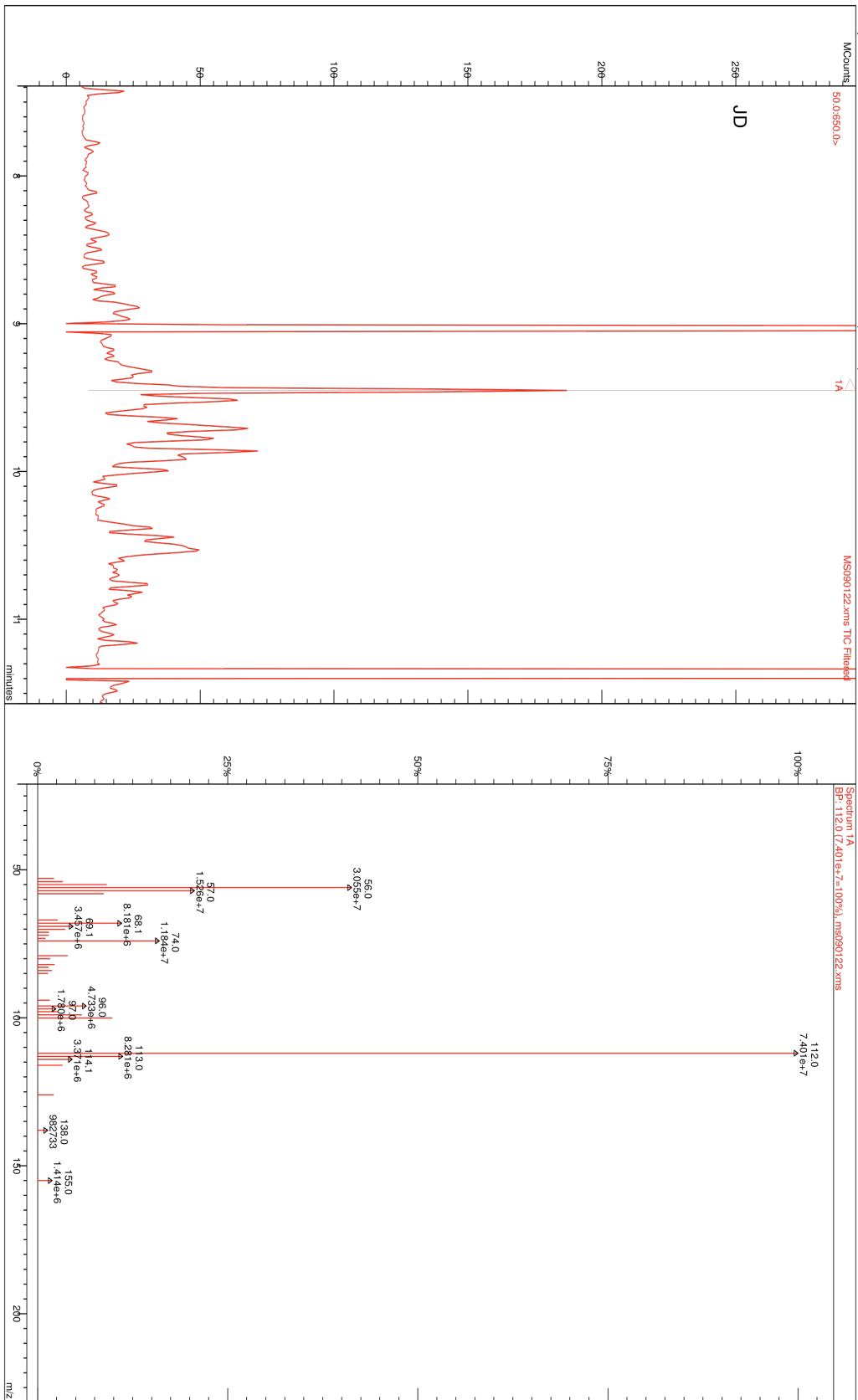


Figura A6. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 9,45 minutos.

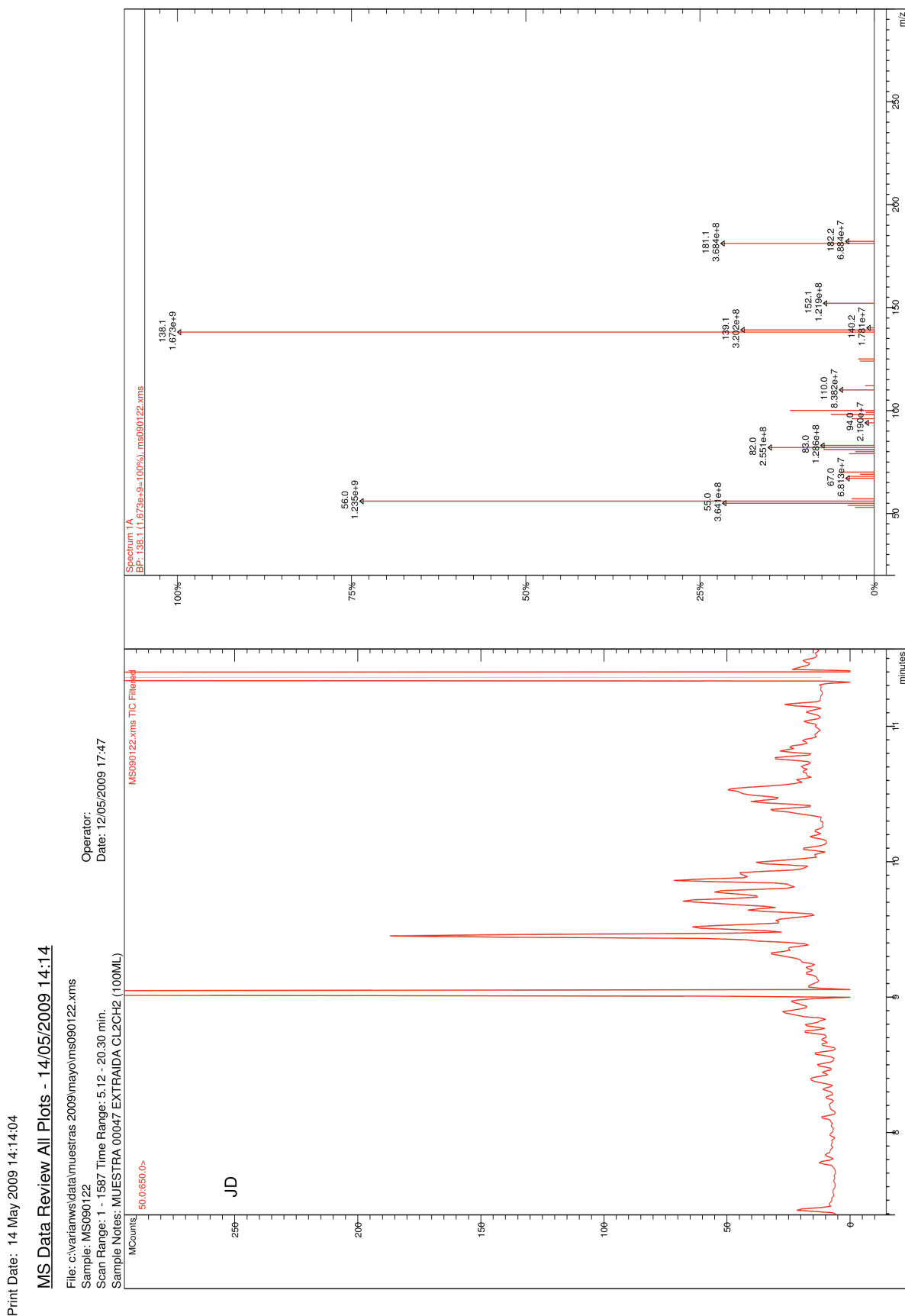


Figura A7. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 11,36 minutos.

Print Date: 14 May 2009 14:15:43

MS Data Review All Plots - 14/05/2009 14:15

File: c:\varianms\data\muestras 2009\mayo\ms90122.xml
 Sample: MS090122
 Scan Range: 1 - 1587 Time Range: 5.12 - 20.30 min.
 Sample Notes: MUESTRA.00047 EXTRAIDA CL2CH2 (100ML)

Operator:
 Date: 12/05/2009 17:47

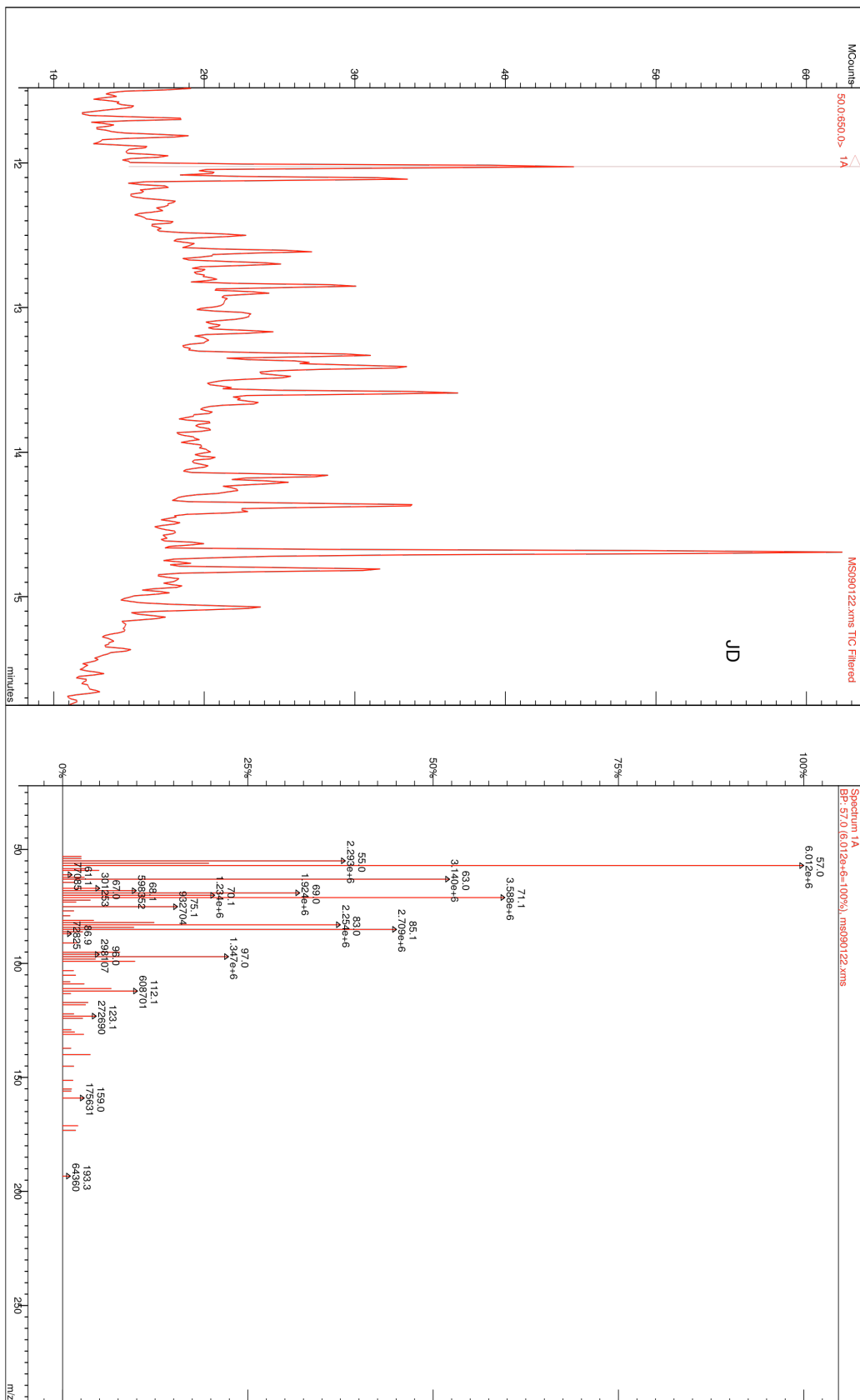


Figura A8. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 12,06 minutos.

Print Date: 14 May 2009 14:22:24

MS Data Review All Plots - 14/05/2009 14:22

File: c:\varian\ms\data\muestras 2009\mayo\ms090122.ms
 Sample: MS090122
 Scan Range: 1 - 1587 Time Range: 5.12 - 20.30 min.
 Sample Notes: MUESTRA 00047 EXTRAIDA CL2GH2 (100ML)

Operator:
 Date: 12/05/2009 17:47

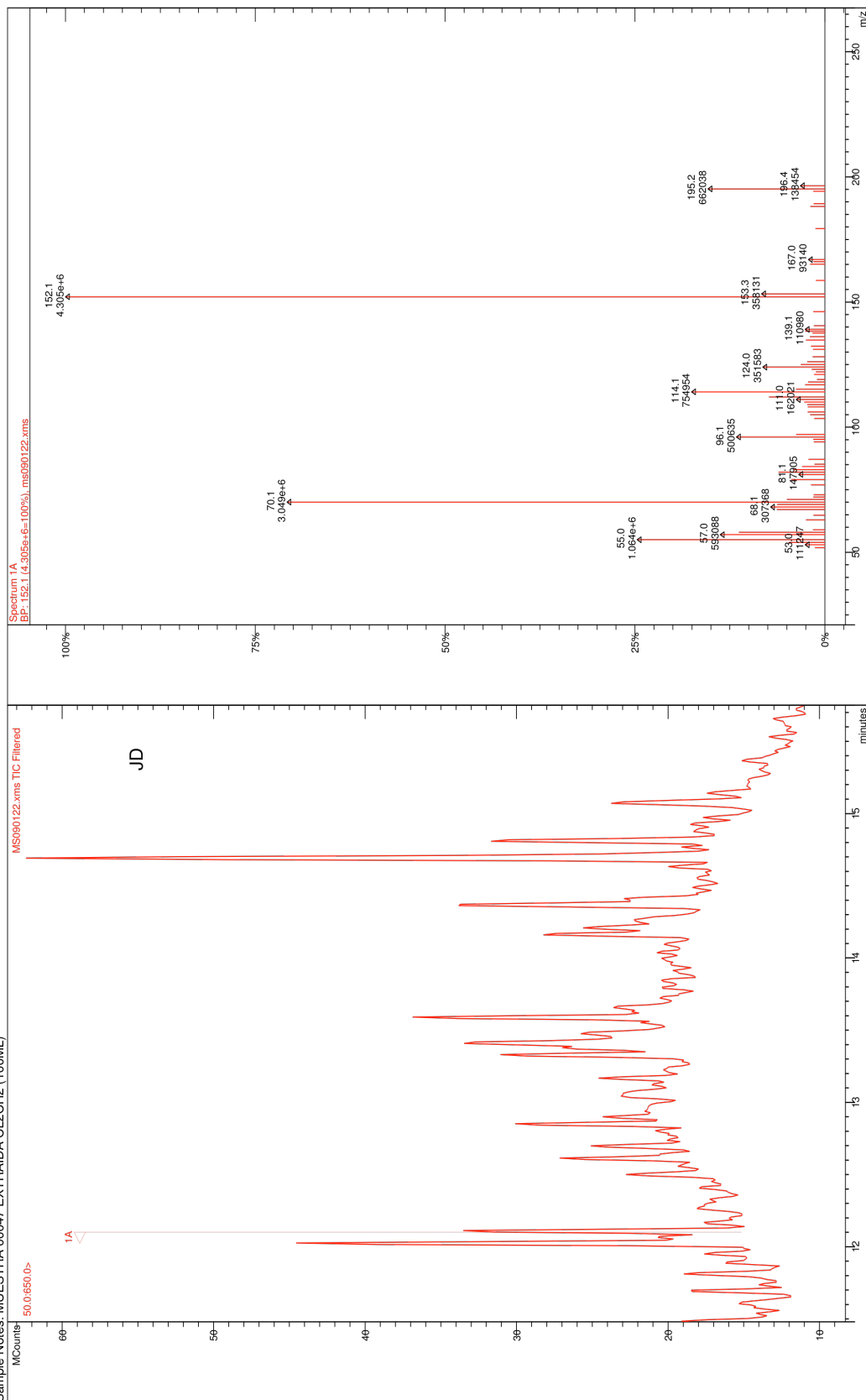


Figura A9. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 12,10 minutos.

Print Date : 14 May 2009 14:23:15

MS Data Review All Plots - 14/05/2009 14:23

File: c:\varian\data\muestras 2009\mayo\ms090122.xml
 Sample: MS090122
 Scan Range: 1 - 1587 Time Range: 5.12 - 20.30 min.
 Sample Notes: MUESTRA 00047 EXTRAIDA CL2CH2 (100ML)

Operator:
 Date: 12/05/2009 17:47

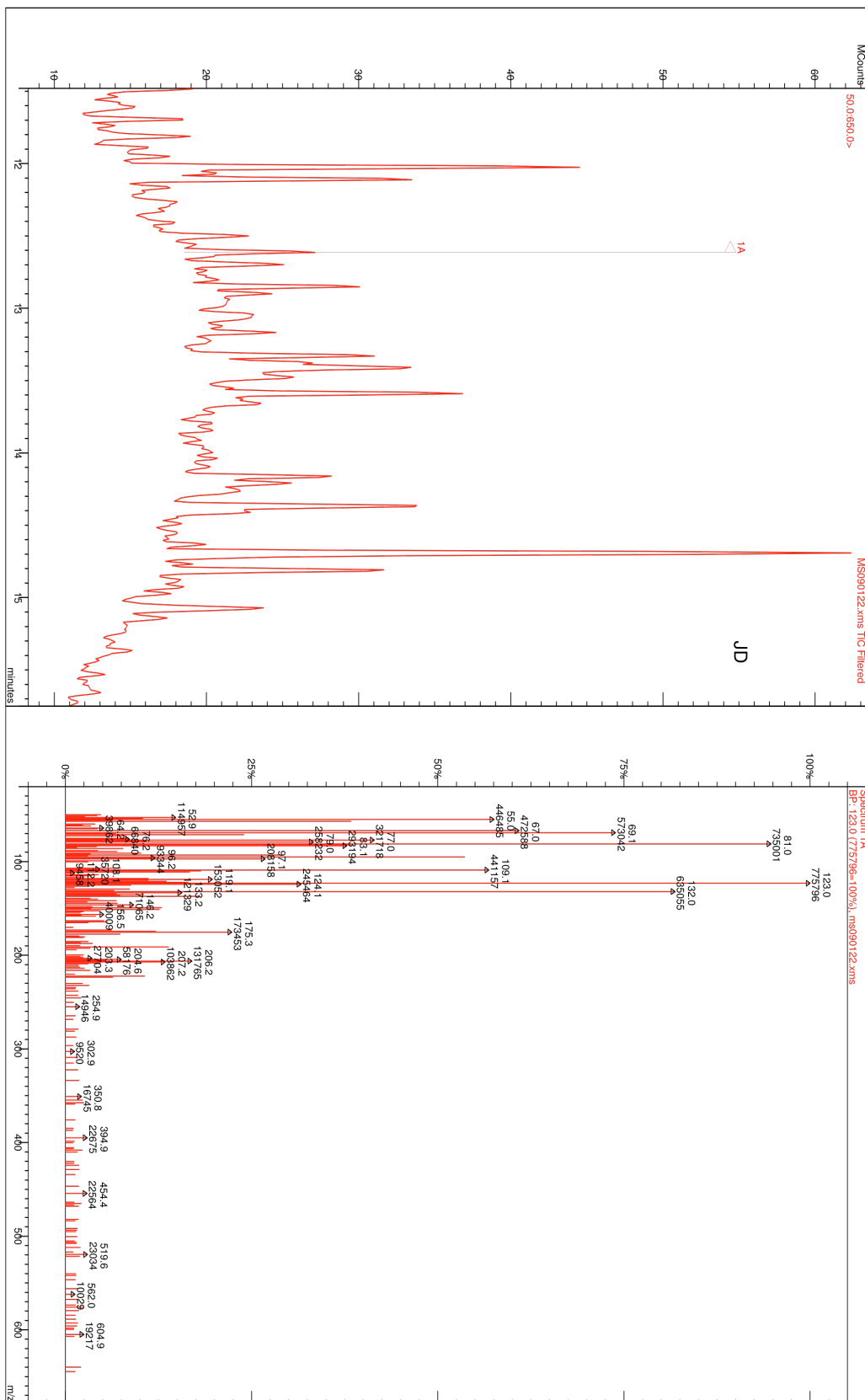


Figura A10. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 12,60 minutos.

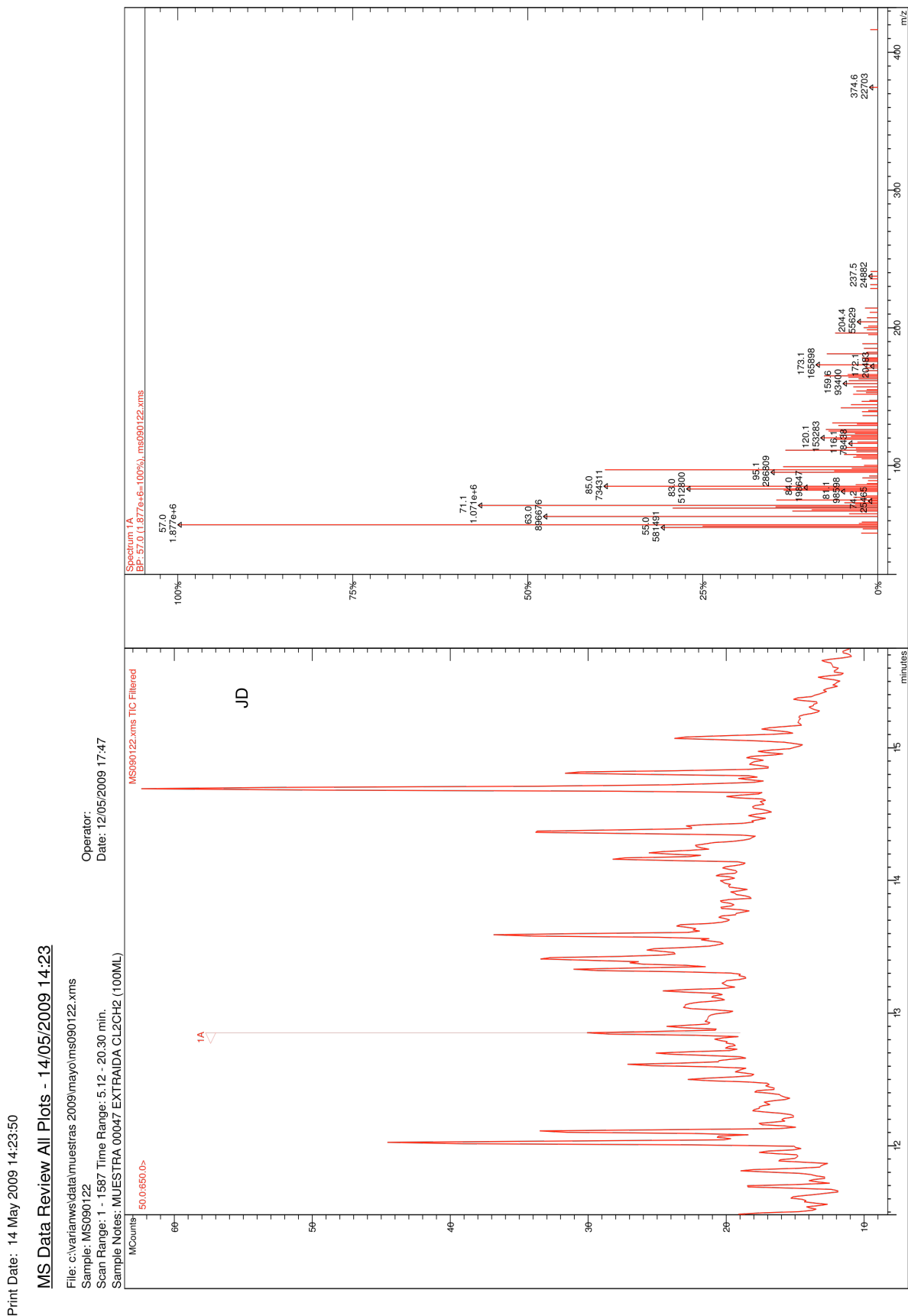


Figura A11. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 12,85 minutos.

Print Date: 14 May 2009 14:24:31

MS Data Review All Plots - 14/05/2009 14:24

File: c:\varianms\data\muestras 2009\mayo\ms090122.xml
 Sample: MS090122
 Scan Range: 1 - 1567 Time Range: 5.12 - 20.30 min.
 Sample Notes: MUESTRA 00047 EXTRAIDA CL2CH2 (100ML)

Operator:
 Date: 12/05/2009 17:47

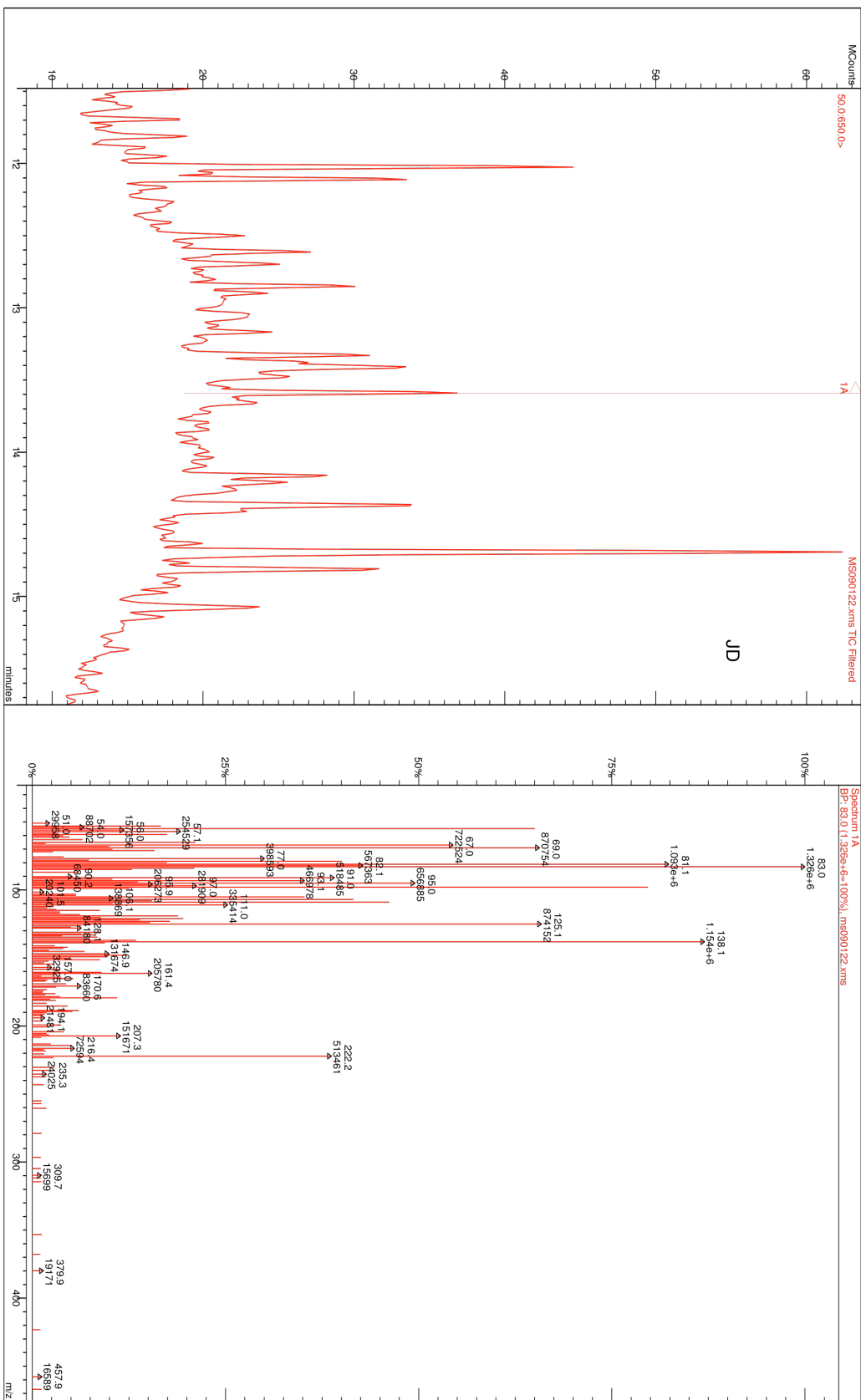


Figura A12. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 13,59 minutos.

Print Date: 14 May 2009 14:25:20

MS Data Review All Plots - 14/05/2009 14:25

File: c:\varian\ms\data\muestras 2009\mayo\ms090122.xms
 Sample: MS090122
 Scan Range: 1 - 1587 Time Range: 5.12 - 20.30 min.
 Sample Notes: MUESTRA 00047 EXTRAIDA CL2GH2 (100ML)

Operator:
 Date: 12/05/2009 17:47

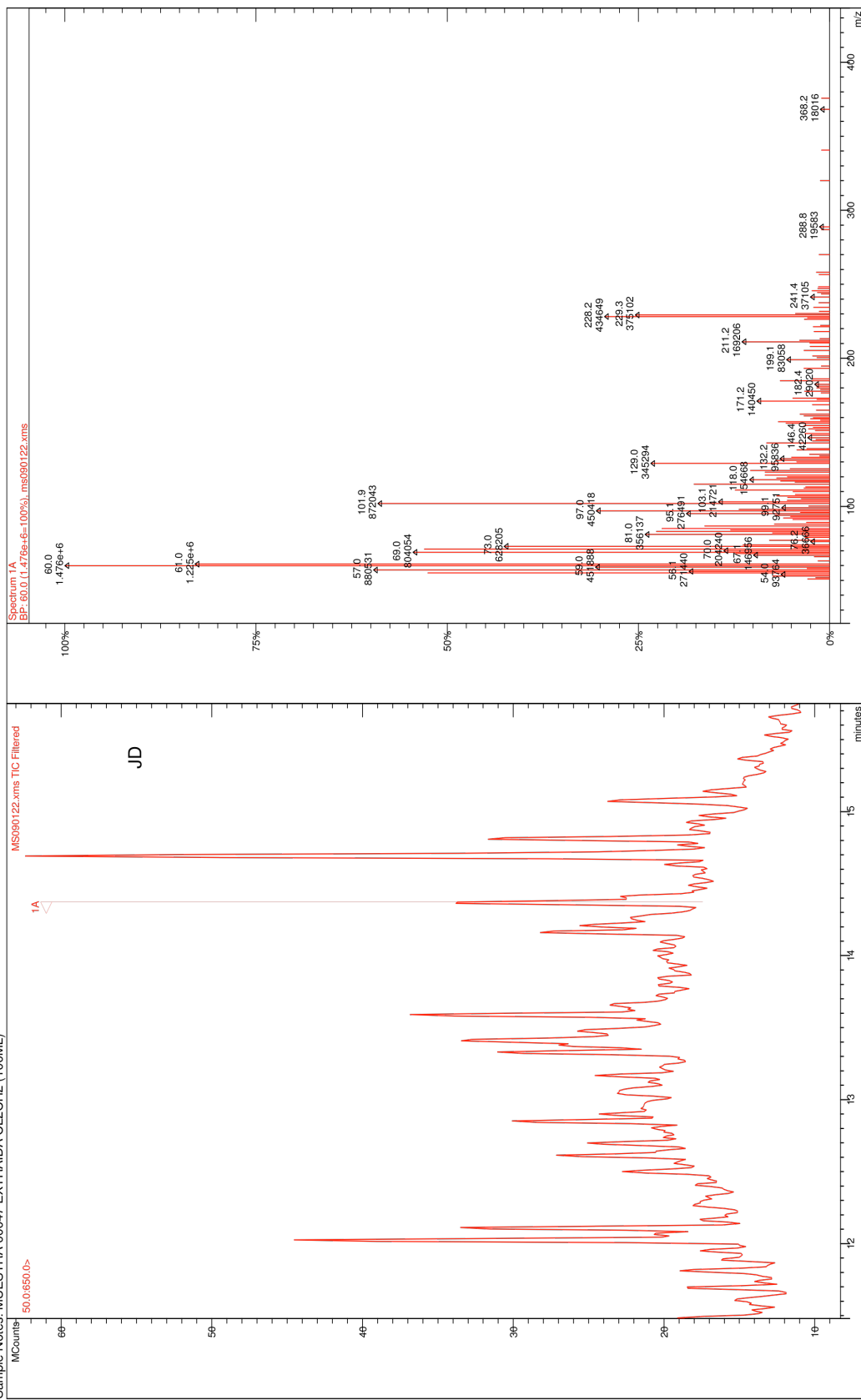


Figura A13. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 14,37 minutos.

Print Date: 14 May 2009 14:25:54

MS Data Review All Plots - 14/05/2009 14:25

File: c:\varianms\data\muestras 2009\mayo\ms90122.xml
 Sample: MS090122
 Scan Range: 1 - 1587 Time Range: 5.12 - 20.30 min.
 Sample Notes: MUESTRA 00047 EXTRAIDA CLZCHZ (100ML)

Operator:
 Date: 12/05/2009 17:47

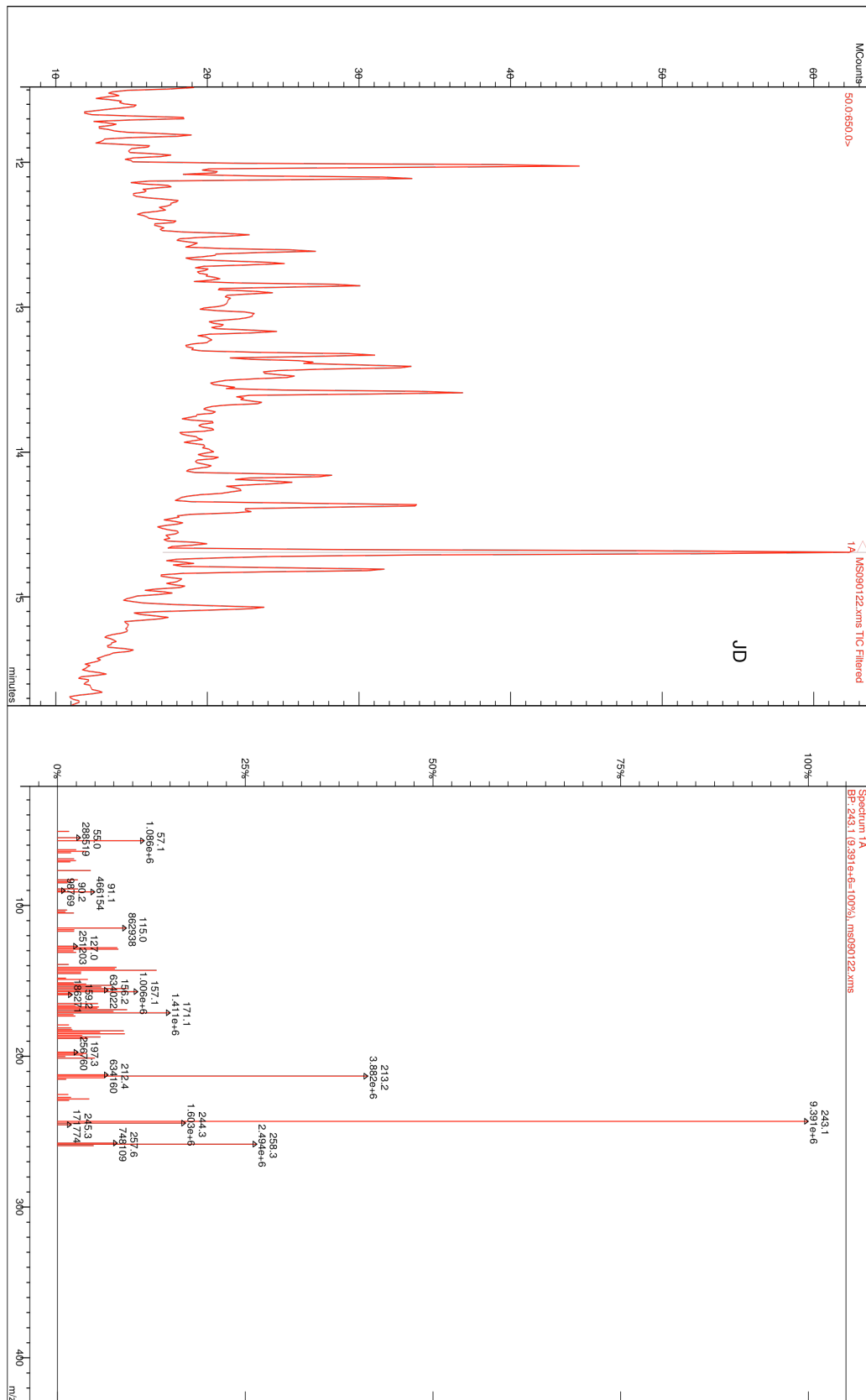


Figura A14. Cromatograma, junto con el espectro de masa, correspondiente al pico con tiempo de retención 14,69 minutos.

ANEXO 7: ANÁLISIS ELEMENTAL DE LAS MUESTRAS DE AGUA DE TALADRINA

File:JD2005091 Label:FE FLS Calibration Posn: 1 20 May ** 10:13

Spectrum : FE FLS Calibration
 Livetime = 50 Input rate = 1409 cps

Energy	FWHM	Area
9.1	80.38	31132
6394.3	149.28	48806

Total area = 70438 GF = 50.026

File:JD2005092 Label:JD 1 Posn: 2 20 May ** 10:15

JD 1 Livetime = 1000

Energy	FWHM	Area
9.4	80.02	624899

Total area = 924566

.....
 Peak at 16.82 keV omitted?
 Peak at 17.40 keV omitted?
 Peak at 18.74 keV omitted?
 Peak at 18.96 keV omitted?
 Peak at 19.08 keV omitted?
 Peak at 19.54 keV omitted?
 Peak at 19.92 keV omitted?
 Fit index = 2.38

Model: EXTRA-II
 Tube target: Mo kV: 50

TXRF with Internal standard

Sample: JD 1

All elements analysed

Livetime: 1000 s Total area: 924566 Rate: 924.6 cps
 Zero at: -9.4 eV Resolution: 80.02 eV Gain: 20 eV/channel
 Fit Index: 2.38

El	L	Std	Element PPM	% RSD	Intensity cps
Al	K	1	.8805	17.35	.42
Si	K	1	48.2385	.73	33.10
P	K	1	.2718	29.54	.26
S	K	1	1.2205	5.34	1.66
Cl	K	1	.2585	14.07	.48

Anexo 7: Análisis elemental de las muestras de agua de taladrina

K	K	1	.8917	3.46	3.06
Ca	K	1	.4103	5.02	1.87
Ti	K	1			n.d.
V	K	1	10.0000	.52	99.49 - Ref
Cr	K	1	< .0328*		.01
Mn	K	1	< .0067*		.08
Fe	K	1	.0113	23.45	.22
Co	K	1	< .0035*		.03
Ni	K	1	< .0028*		.03
Cu	K	1	< .0029*		.07
Zn	K	1	.0089	16.43	.35
Ga	K	1			n.d.
Br	K	1	.0091	26.87	.67
Sr	K	1	< .0078*		.21
Rb	K	1			n.d.
TOTAL			62.2009		142.01

* figure quoted as less than 2 x relative error

Element: Ti -.0091 Cr .0005 Mn .0053 Co .0012
 Element: Ni .0012 Cu .0022 Ga -.0014 Sr .0023
 Element: Rb -.0013

n.d. not detected

File: JD2005093 Label: JD 2 Posn: 3 20 May ** 10:35

JD 2 Livetime = 1000

Energy FWHM Area
 - 9.6 80.88 619829
 Total area = 1783937

.....
 Peak at .98 keV omitted?
 Peak at 16.86 keV omitted?
 Peak at 17.40 keV omitted?
 Peak at 18.90 keV omitted?
 Peak at 19.54 keV omitted?
 Peak at 19.92 keV omitted?
 Fit index = 4.78

Model: EXTRA-II
 Tube target: Mo kV: 50

FXRF with Internal standard

Sample: JD 2

All elements analysed

Livetime: 1000 s Total area: 1783937 Rate: 1783.9 cps
 Zero at: -9.6 eV Resolution: 80.88 eV Gain: 20 eV/channel
 Fit Index: 4.78

El	L	Std	Element PPM	% RSD	Intensity cps
01	K	1	.4992	10.86	.80
02	K	1	17.3383	.67	39.87

Anexo 7: Análisis elemental de las muestras de agua de taladrina

P	K	1	.0806	35.40	.26
S	K	1	1.6048	2.04	7.30
Cl	K	1	.1962	7.76	1.23
K	K	1	.2819	3.54	3.24
Ca	K	1	.1451	4.91	2.22
Ti	K	1	.0293	16.25	.76
V	K	1	10.0000	.28	333.46 - Ref
Cr	K	1			n.d.
Mn	K	1	< .0024*		.09
Fe	K	1	.0443	3.90	2.88
Co	K	1			n.d.
Ni	K	1	.0024	24.74	.22
Cu	K	1	.0035	16.59	.40
Zn	K	1	.0144	5.71	1.92
Ga	K	1	< .0009*		.11
Br	K	1	.0034	30.04	.84
Sr	K	1	< .0033*		.11
Rb	K	1	< .0020*		.02
TOTAL			30.2434		395.74

* figure quoted as less than 2 x relative error

Element: Cr -.0032 Mn .0017 Co -.0011 Ga .0007
 Element: Sr .0004 Rb .0001

n.d. not detected

File: JD2005094 Label: JD 3 Posn: 4 20 May ** 10:57

JD 3 Livetime = 1000

Energy FWHM Area
 - 9.9 80.32 620207
 Total area = 1512167

.....
 Peak at 16.82 keV omitted?
 Peak at 17.40 keV omitted?
 Peak at 18.62 keV omitted?
 Peak at 18.70 keV omitted?
 Peak at 18.88 keV omitted?
 Peak at 19.54 keV omitted?
 Peak at 19.92 keV omitted?
 Fit index = 3.32

Model: EXTRA-II
 Tube target: Mo kV: 50

TXRF with Internal standard

Sample: JD 3

All elements analysed

Livetime: 1000 s Total area: 1512167 Rate: 1512.2 cps
 Zero at: -9.9 eV Resolution: 80.32 eV Gain: 20 eV/channel
 Fit Index: 3.32

L	Std	Element	% RSD	Intensity
		PPM		CPS

Anexo 7: Análisis elemental de las muestras de agua de taladrina

Al	K	1	.5764	12.61	.66
Si	K	1	23.8414	.68	39.02
P	K	1	.1956	19.90	.45
S	K	1	.5934	5.19	1.92
Cl	K	1	.9587	2.93	4.28
K	K	1	1.3852	1.57	11.34
Ca	K	1	.3234	3.60	3.52
Ti	K	1	< .0105*		.05
V	K	1	10.0000	.33	237.31 - Ref
Cr	K	1	< .0191*		.06
Mn	K	1	< .0030*		.07
Fe	K	1	.0042	29.47	.20
Co	K	1	< .0019*		.02
Ni	K	1	< .0016*		.10
Cu	K	1	.0019	38.57	.15
Zn	K	1	.0088	9.58	.83
Ga	K	1	< .0012*		.08
Br	K	1	.0033	39.52	.58
Sr	K	1	< .0043*		.40
Rb	K	1			n.d.
TOTAL			37.8923		301.05

* figure quoted as less than 2 x relative error

Element: Ti .0028 Cr .0021 Mn .0019 Co .0003
 Element: Ni .0015 Ga .0007 Sr .0018 Rb -.0001

n.d. not detected

File: JD2005095 Label: JD 4

Posn: 5 20 May ** 11:19

JD 4 Livetime = 1000

Energy FWHM Area
 - 10.0 80.23 623414
 Total area = 1239379

.....
 Peak at .96 keV omitted?
 Peak at 16.80 keV omitted?
 Peak at 17.40 keV omitted?
 Peak at 18.64 keV omitted?
 Peak at 18.76 keV omitted?
 Peak at 18.98 keV omitted?
 Peak at 19.54 keV omitted?
 Peak at 19.92 keV omitted?
 Fit index = 2.83

Model: EXTRA-II
 Tube target: Mo kV: 50

TXRF with Internal standard

Sample: JD 4

All elements analysed

Livetime: 1000 s Total area: 1239379 Rate: 1239.4 cps
 Zero at: -10.0 eV Resolution: 80.23 eV Gain: 20 eV/channel

Fit Index:		2.83			
El	L	Std	Element PPM	% RSD	Intensity cps
Al	K	1	.4850	11.15	.77
Si	K	1	27.1645	.53	61.79
P	K	1	.0722	37.06	.23
S	K	1	.2597	7.26	1.17
Cl	K	1	.0472	23.67	.29
K	K	1	.2248	4.39	2.56
Ca	K	1	.5721	1.88	8.66
Ti	K	1			n.d.
V	K	1	10.0000	.28	329.83 - Ref
Cr	K	1			n.d.
Mn	K	1	.0057	22.81	.29
Fe	K	1	.0406	4.02	2.61
Co	K	1	<.0014*		.01
Ni	K	1	.0324	3.78	3.06
Cu	K	1	.0078	9.70	.88
Zn	K	1	.0522	2.54	6.87
Ga	K	1	<.0009*		.02
Br	K	1	.0020	37.62	.49
Sr	K	1	.0042	29.24	1.28
Rb	K	1			n.d.
TOTAL			38.9706		420.81

* figure quoted as less than 2 x relative error

Element: Ti -.0166 Cr -.0040 Co .0002 Ga .0001
 Element: Rb -.0003

n.d. not detected

File: JD2005096 Label: JD 5

Posn: 6 20 May ** 11:40

JD 5 Livetime = 1000

Energy FWHM Area
 - 10.2 80.77 619766
 Total area = 1722863

-
- Peak at .98 keV omitted?
- Peak at 16.82 keV omitted?
- Peak at 17.40 keV omitted?
- Peak at 18.84 keV omitted?
- Peak at 19.54 keV omitted?
- Peak at 19.92 keV omitted?
- Fit index = 4.29

Model: EXTRA-II
 Tube target: Mo kV: 50

TXRF with Internal standard

Sample: JD 5

All elements analysed

Anexo 7: Análisis elemental de las muestras de agua de taladrina

Livetime: 1000 s			Total area: 1722863		Rate: 1722.9 cps	
Zero at: -10.2 eV			Resolution: 80.77 eV		Gain: 20 eV/channel	
Fit Index: 4.29						
El	L	Std	Element PPM	% RSD	Intensity cps	
Al	K	1	.5953	10.82	.84	
Si	K	1	26.7466	.57	54.38	
P	K	1	.0823	37.49	.24	
S	K	1	.1814	11.41	.73	
Cl	K	1	.7964	2.83	4.42	
K	K	1	.6814	2.17	6.93	
Ca	K	1	.3115	3.10	4.21	
Ti	K	1			n.d.	
V	K	1	10.0000	.30	294.58	- Ref
Cr	K	1	< .0164*		.08	
Mn	K	1	< .0024*		.02	
Fe	K	1	.0051	20.04	.29	
Co	K	1			n.d.	
Ni	K	1	< .0013*		.11	
Cu	K	1	.0072	10.16	.72	
Zn	K	1	.0055	12.06	.64	
Ga	K	1	< .0010*		.03	
Br	K	1	.0035	31.02	.76	
Sr	K	1	< .0036*		.70	
Rb	K	1	< .0030*		.10	
TOTAL			39.4362		369.78	

* figure quoted as less than 2 x relative error

Element: Ti	- .0187	Cr	.0020	Mn	.0005	Co	-.0003
Element: Ni	.0013	Ga	.0002	Sr	.0026	Rb	.0004

n.d. not detected

- AUTO acquisition completed -

Spectra stored with ROOT filename: JD200509
 Total number of spectra = 6
 Interval between FLS standards = 5

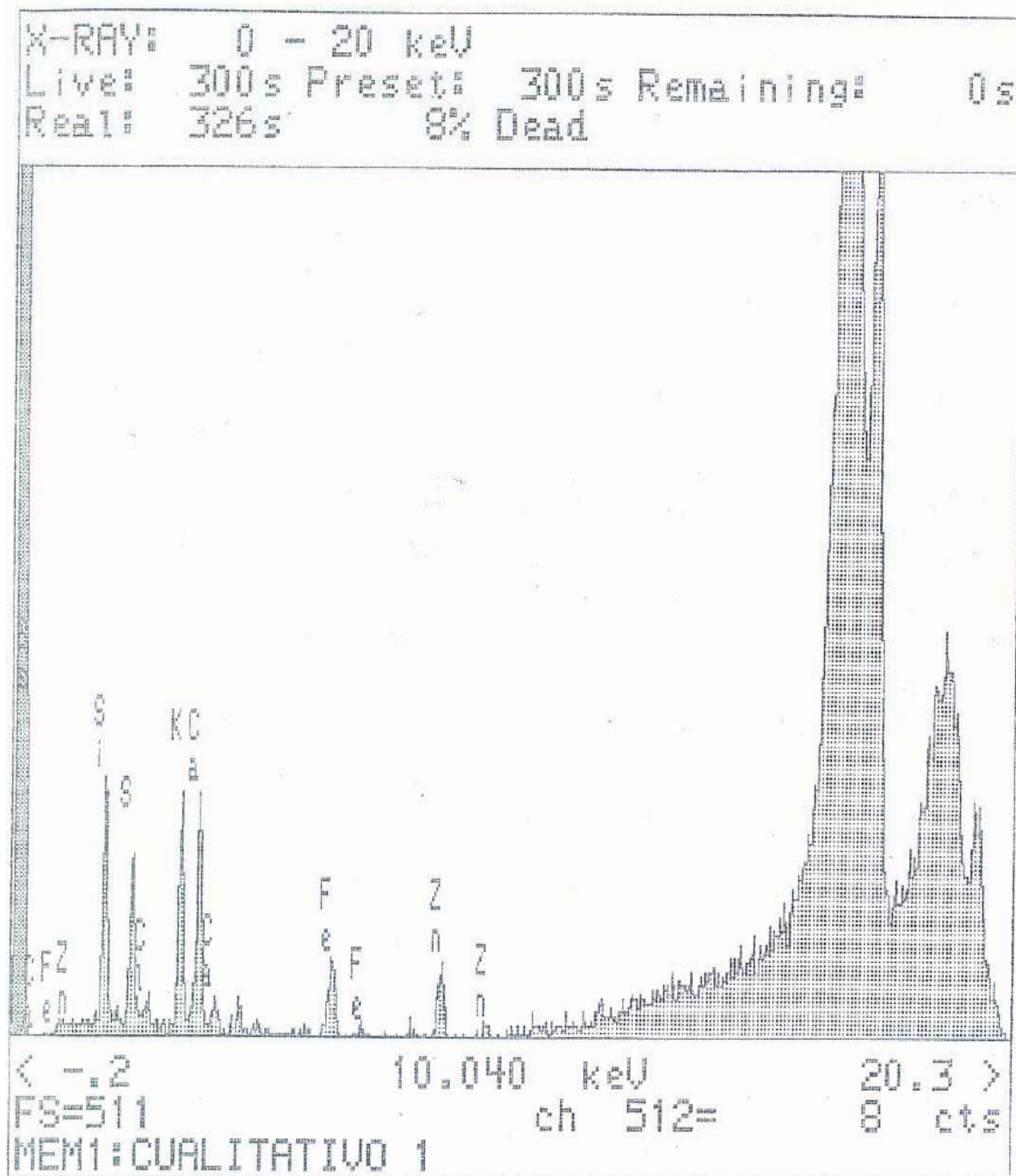


Figura A15. Espectro de TXRF (fluorescencia de rayos X por reflexión total) de la muestra de agua de taladrina del 28/01/2009.

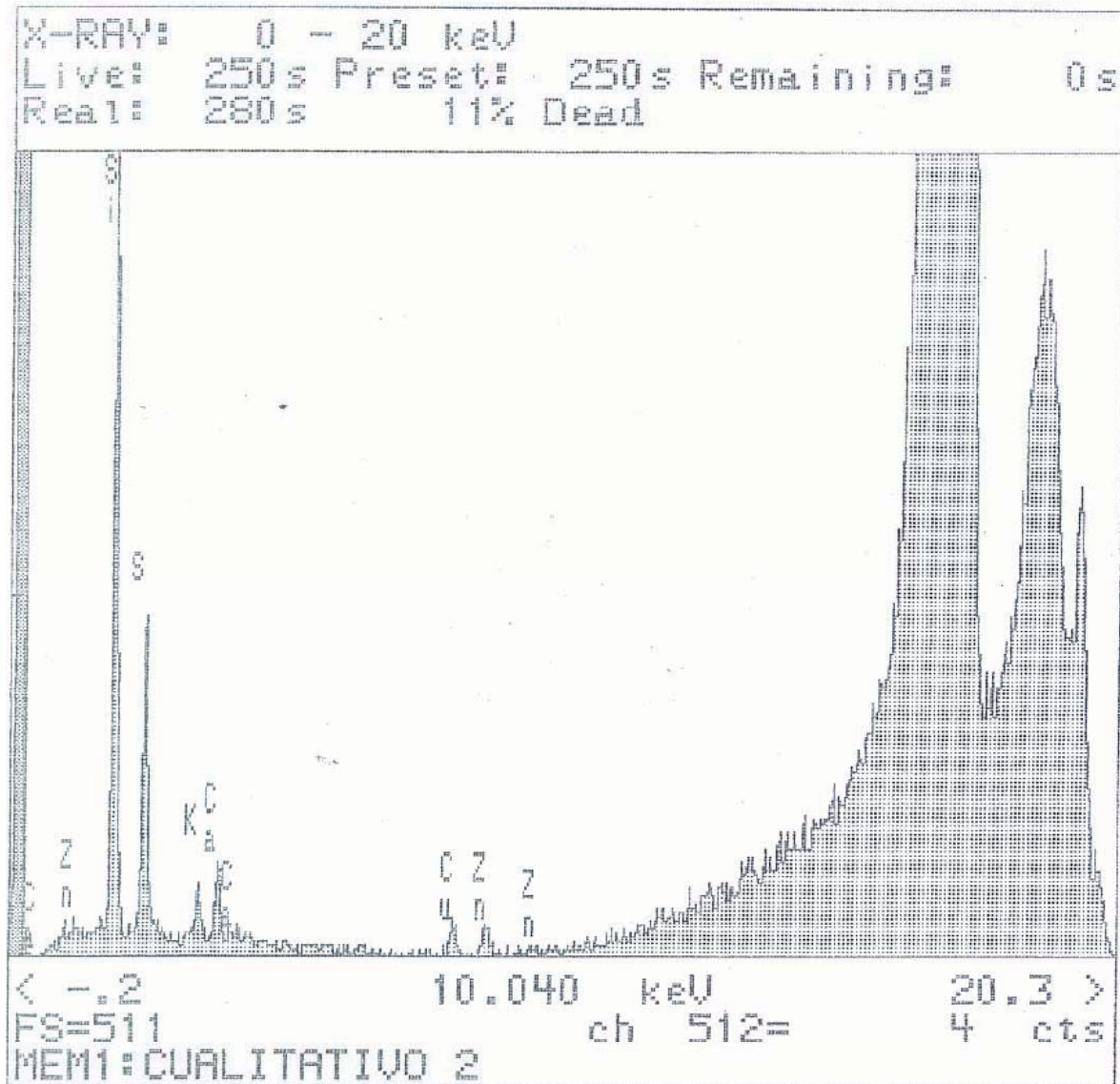


Figura A16. Espectro de TXRF de la muestra de agua de taladrina del 13/02/2009.

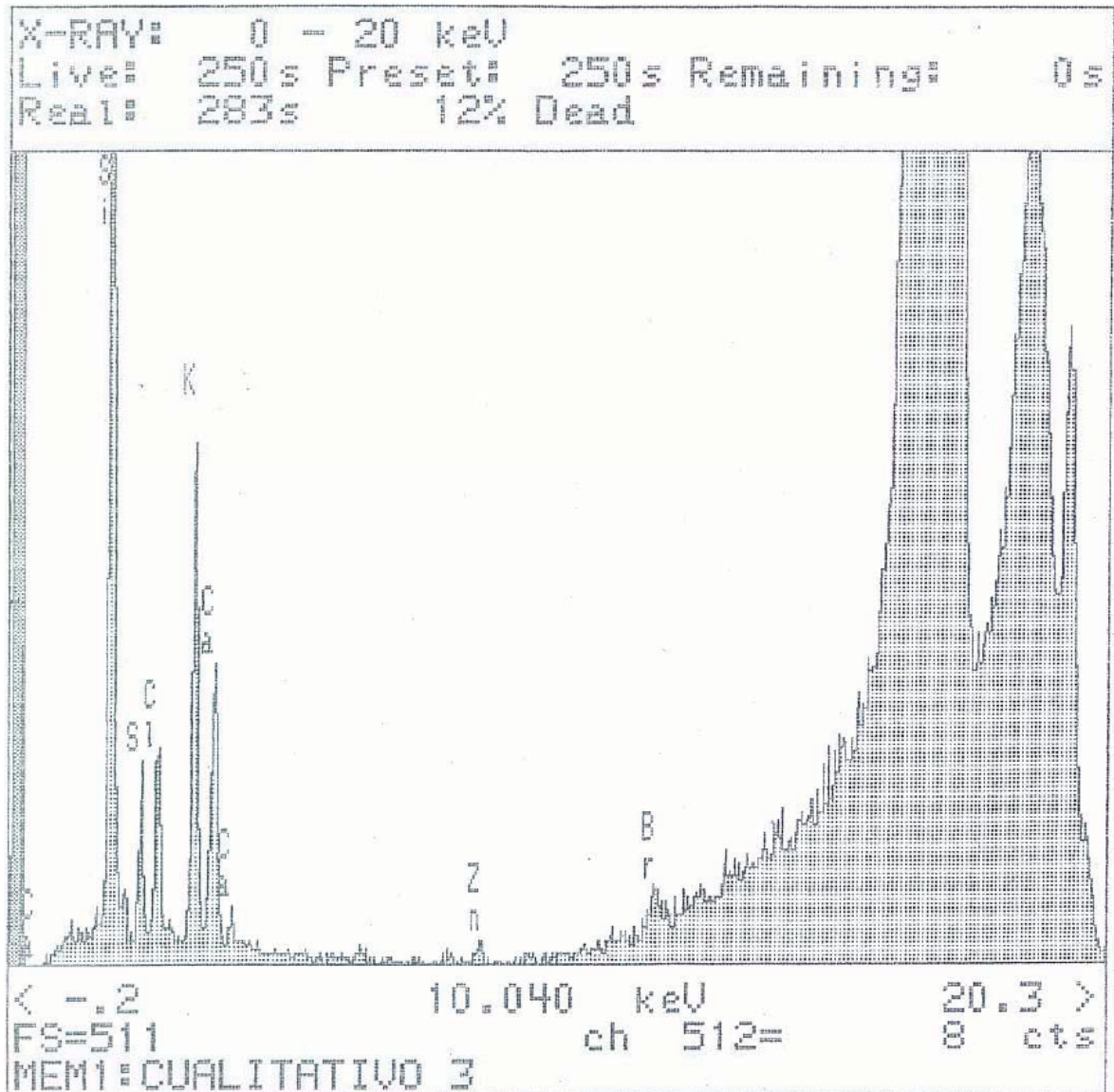


Figura A17. Espectro de TXRF de la muestra de agua de taladrina del 29/10/2008.

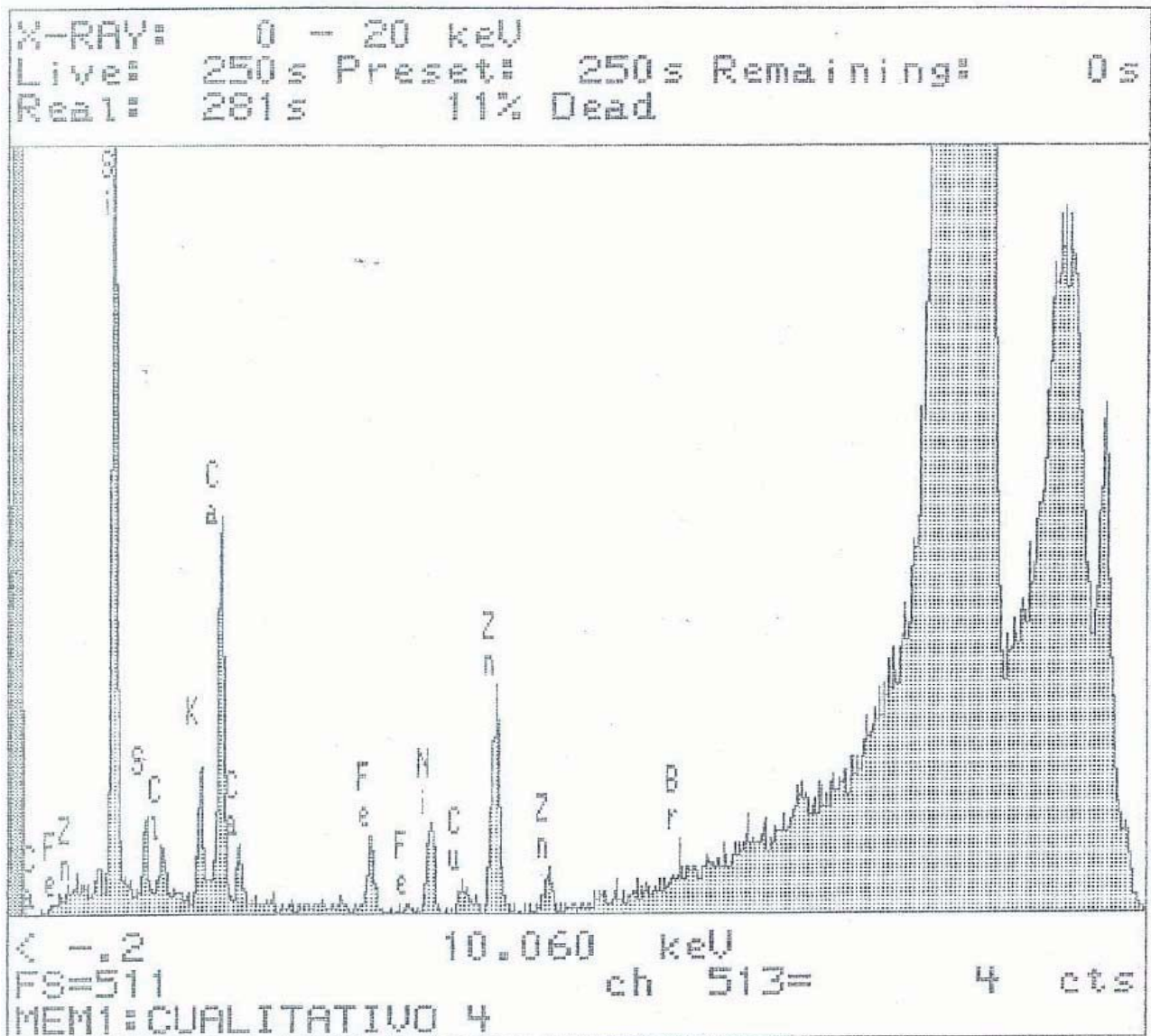


Figura A18. Espectro de TXRF de la muestra de agua de taladrina del 05/02/2009.

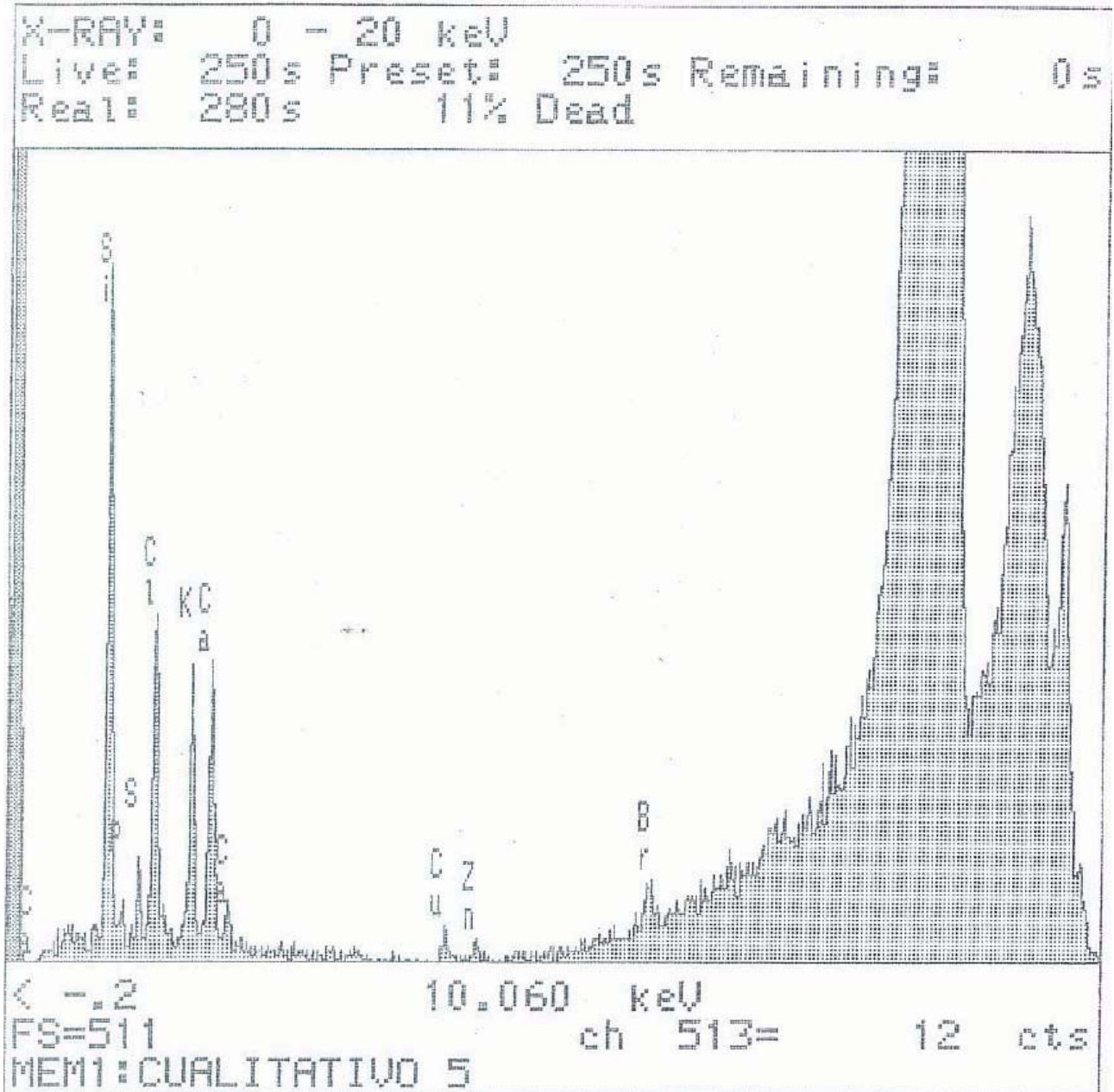


Figura A19. Espectro de TXRF de la muestra de agua de taladrina del 19/01/2009.

**ANEXO 8: CROMATOGRAMAS
CORRESPONDIENTES AL ANÁLISIS
DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS DE
LEMNA MINOR DE LOS TRATAMIENTOS
CONTROL Y 5 DÍAS EN AGUA DE
TALADRINA**

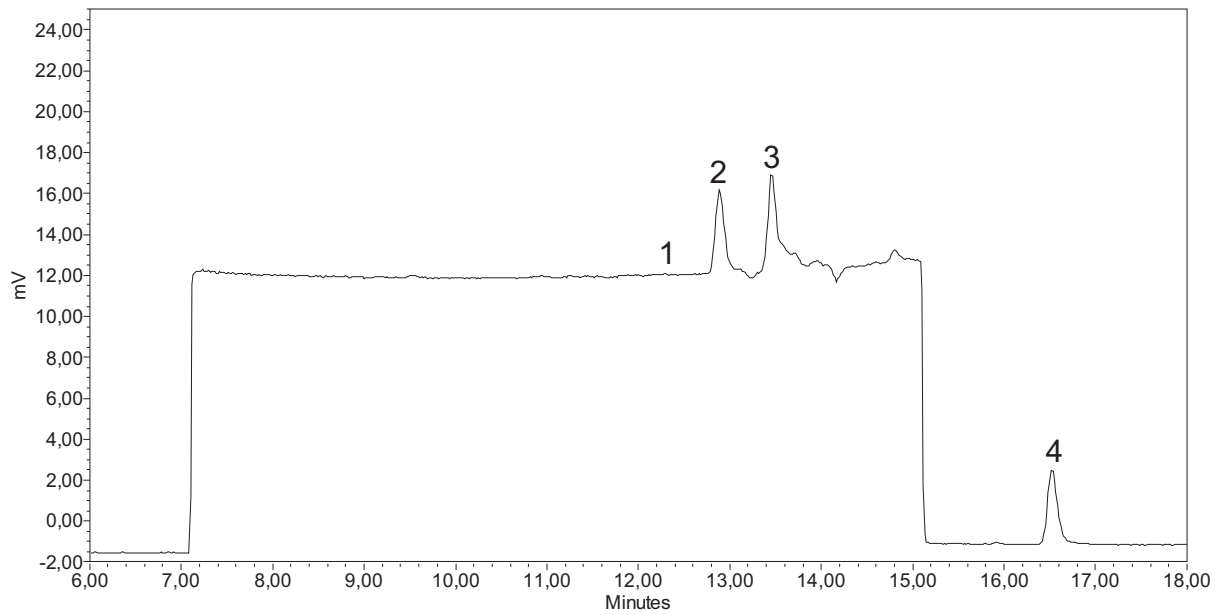


Figura A20. Cromatograma de fluorescencia correspondiente a los antioxidantes lipofílicos de un extracto de *Lemna minor* del tratamiento control. (1) δ -Tocoferol, (2) β + γ -Tocoferol, (3) α -Tocoferol, (4) Feofitina. Unidades eje Y: mV (milivoltios); unidades eje X: minutos.

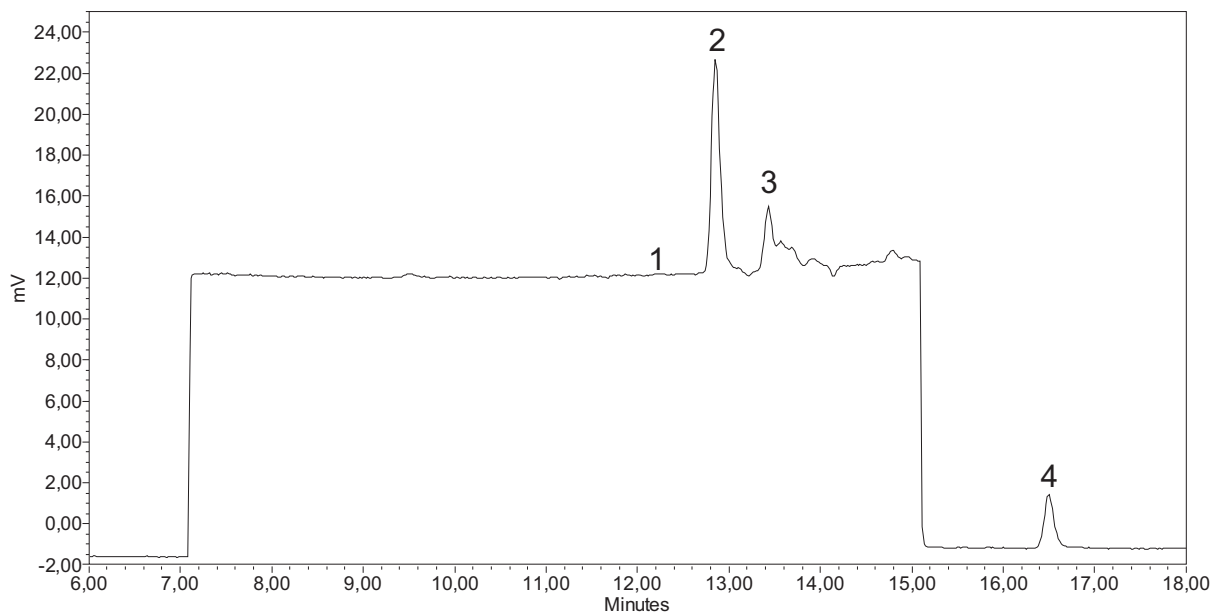


Figura A21. Cromatograma de fluorescencia correspondiente a los antioxidantes lipofílicos de un extracto de *Lemna minor* del tratamiento 5 días en agua de taladrina. (1) δ -Tocoferol, (2) β + γ -Tocoferol, (3) α -Tocoferol, (4) Feofitina. Unidades eje Y: mV (milivoltios); unidades eje X: minutos.

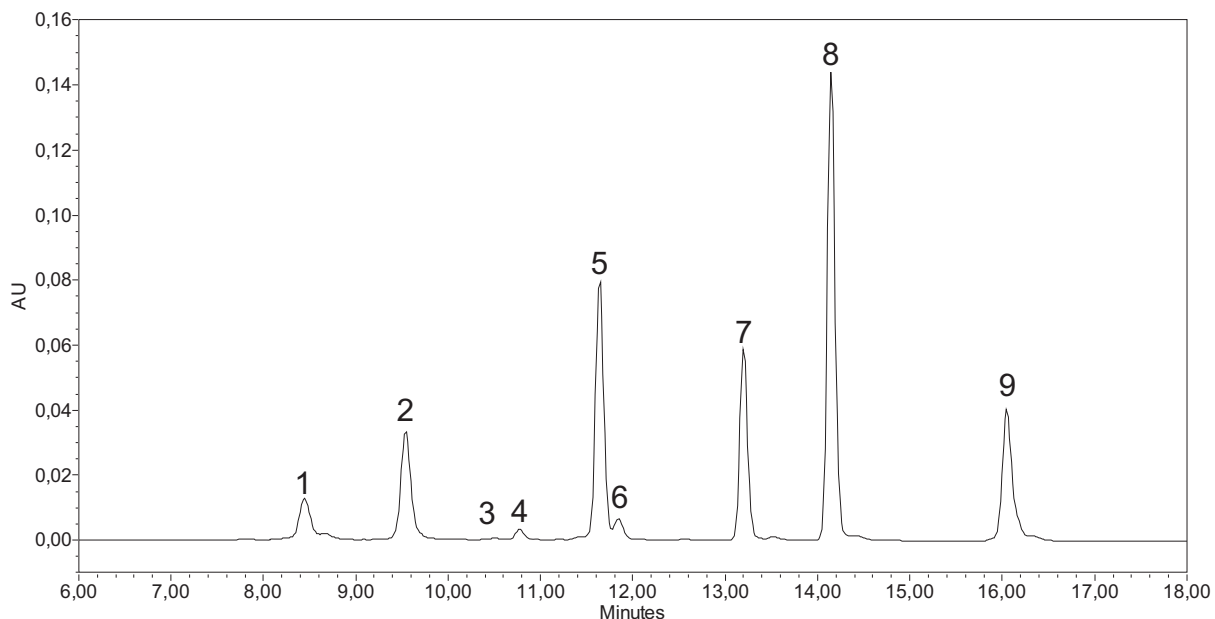


Figura A22. Cromatograma a 445 nm correspondiente a los pigmentos fotosintéticos de un extracto de *Lemna minor* del tratamiento control. (1) Neoxantina, (2) Violaxantina, (3) Luteína epóxido, (4) Anteraxantina, (5) Luteína, (6) Zeaxantina, (7) Clorofila *b*, (8) Clorofila *a*, (9) β -Caroteno. Unidades eje Y: AU (Absorbance Units); unidades eje X: minutos.

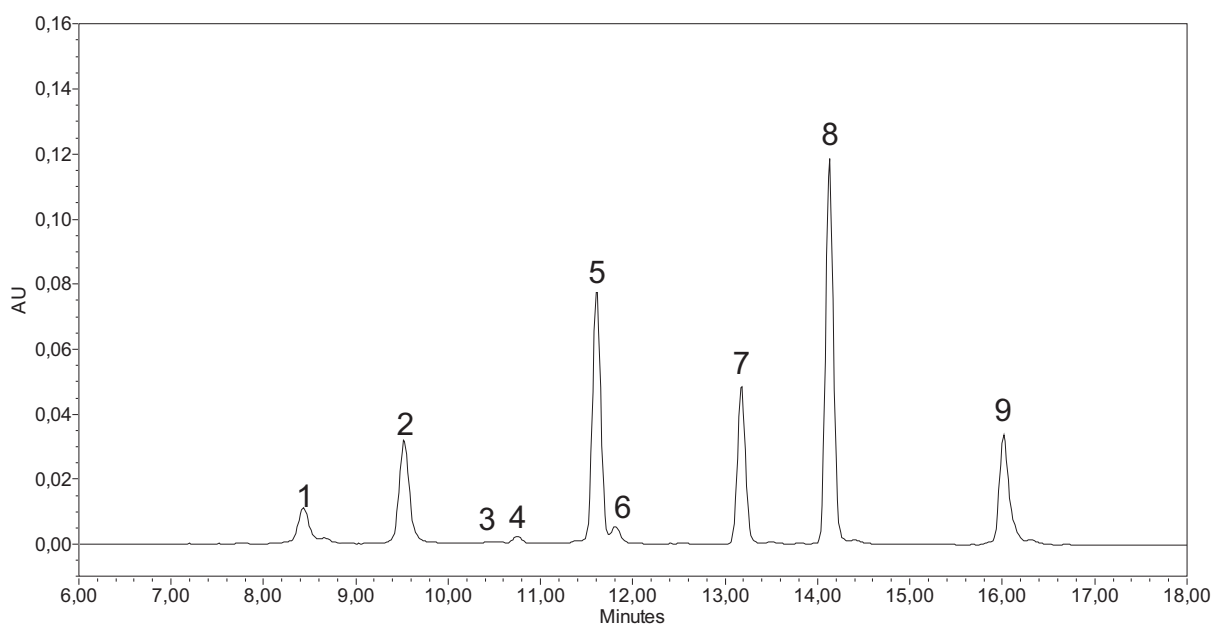


Figura A23: Cromatograma a 445 nm correspondiente a los pigmentos fotosintético de un extracto de *Lemna minor* del tratamiento 5 días en agua de taladrina. (1) Neoxantina, (2) Violaxantina, (3) Luteína epóxido, (4) Anteraxantina, (5) Luteína, (6) Zeaxantina, (7) Clorofila *b*, (8) Clorofila *a*, (9) β -Caroteno. Unidades eje Y: AU (Absorbance Units); unidades eje X: minutos.

**ANEXO 9: CROMATOGRAMAS
CORRESPONDIENTES AL ANÁLISIS
DE HIDROCARBUROS DE
LAS MUESTRAS INICIALES Y
FITORREMEDIADAS**

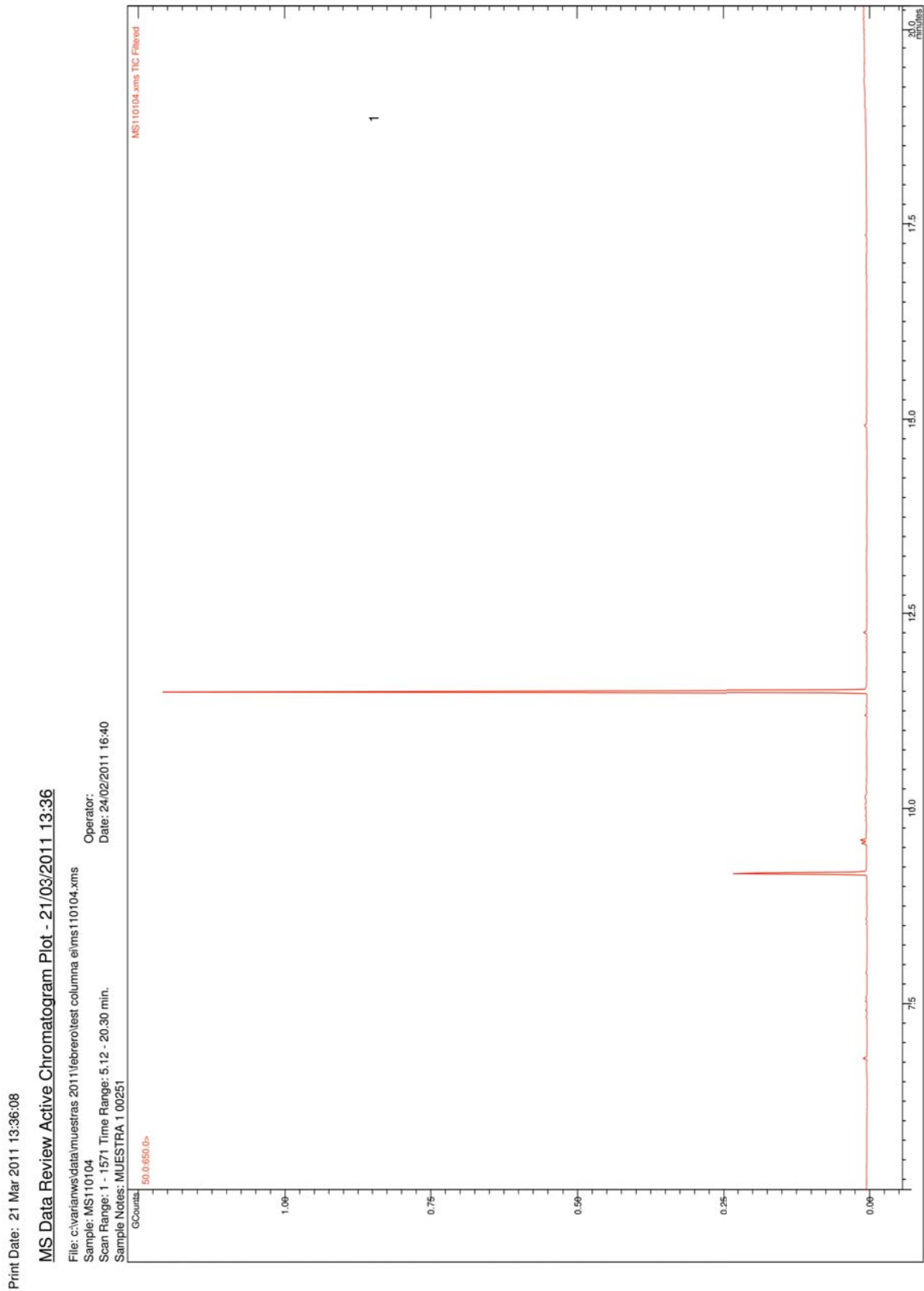


Figura A24. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos de la muestra inicial correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La demanda química de oxígeno (DQO) de esta muestra era de 1.648 ppm.

Print Date: 21 Mar 2011 13:36:24

MS Data Review Active Chromatogram Plot - 21/03/2011 13:36

File: c:\varianms\data\muestras 2011\febrerol\test columna elims110106.ms
Sample: MS110106
Scan Range: 1 - 1585 Time Range: 5.12 - 20.30 min.
Sample Notes: 2 00251
Operator: Date: 24/02/2011 18:30

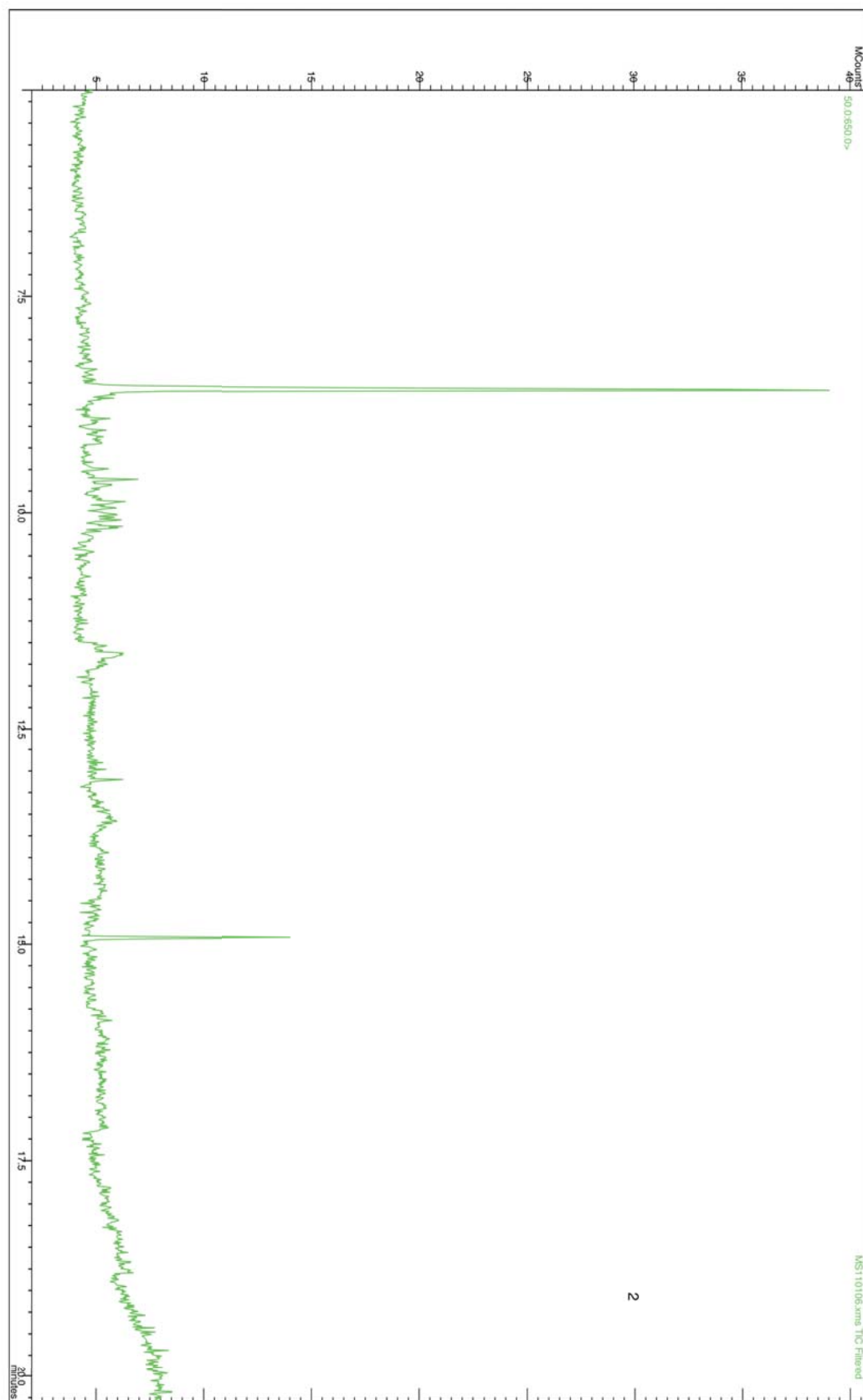


Figura A25. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del tratamiento sin consorcio correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 836 ppm.

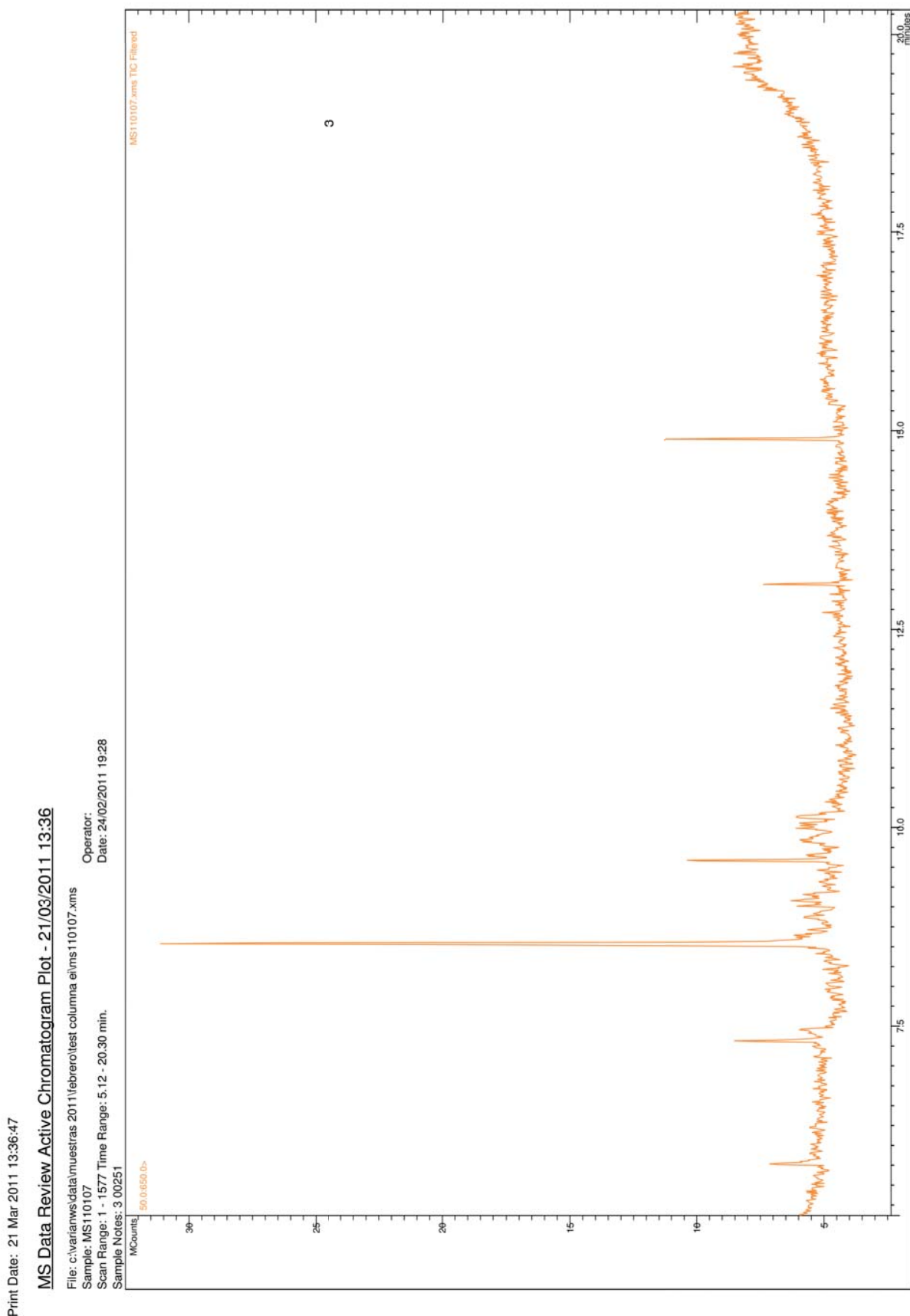


Figura A26. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del tratamiento con consorcio correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 755 ppm.

Print Date: 21 Mar 2011 13:37:03

MS Data Review Active Chromatogram Plot - 21/03/2011 13:37

File: c:\varianms\data\muestras 2011\febrero\test columna e\ms110108.ms
Sample: MS110108
Scan Range: 1 - 1587 Time Range: 5.12 - 20.30 min.
Sample Notes: 4 00251
Operator:
Date: 24/02/2011 20:25

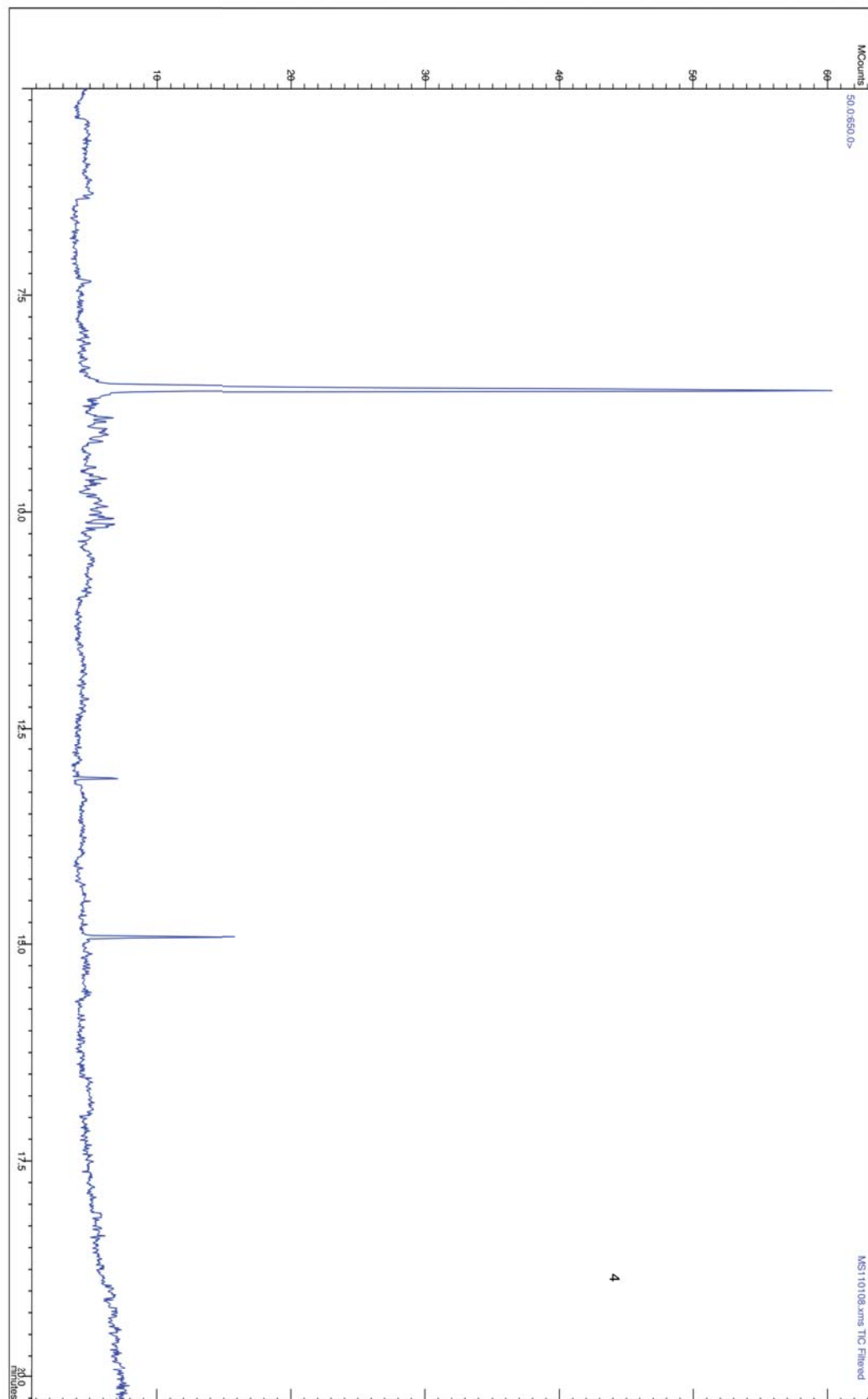


Figura A27. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del tratamiento sin Aur 6 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 809 ppm.

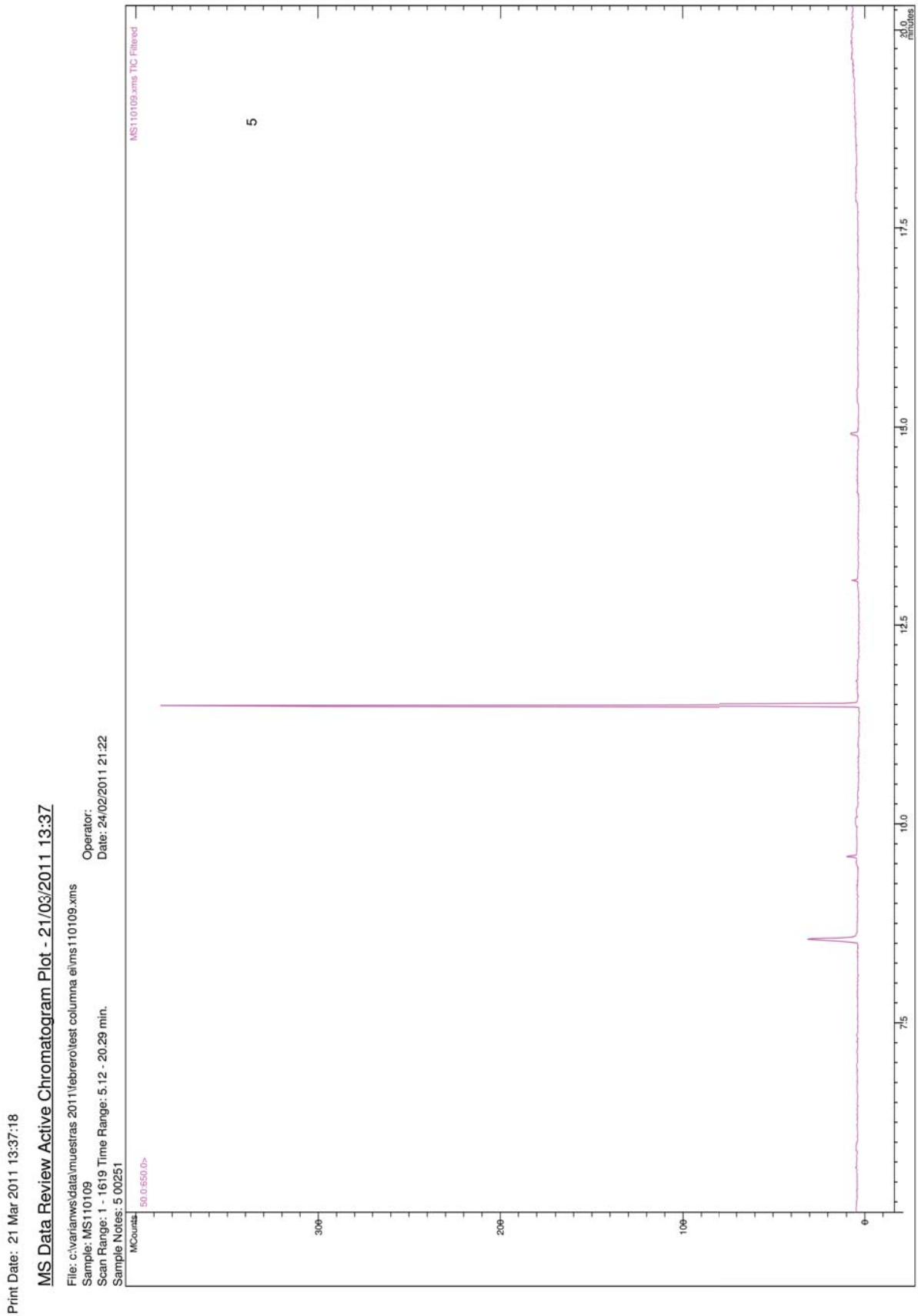


Figura A28. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del tratamiento con Aur 6 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 818 ppm.

Print Date: 21 Mar 2011 13:37:34

MS Data Review Active Chromatogram Plot - 21/03/2011 13:37

File: c:\varian\data\data\muestras 2011\feb\erol\est columna el\ms110110.xmls
Sample: MS110110
Scan Range: 1 - 1565 Time Range: 5.12 - 20.30 min.
Sample Notes: 6 00251
Operator:
Date: 24/02/2011 22:20

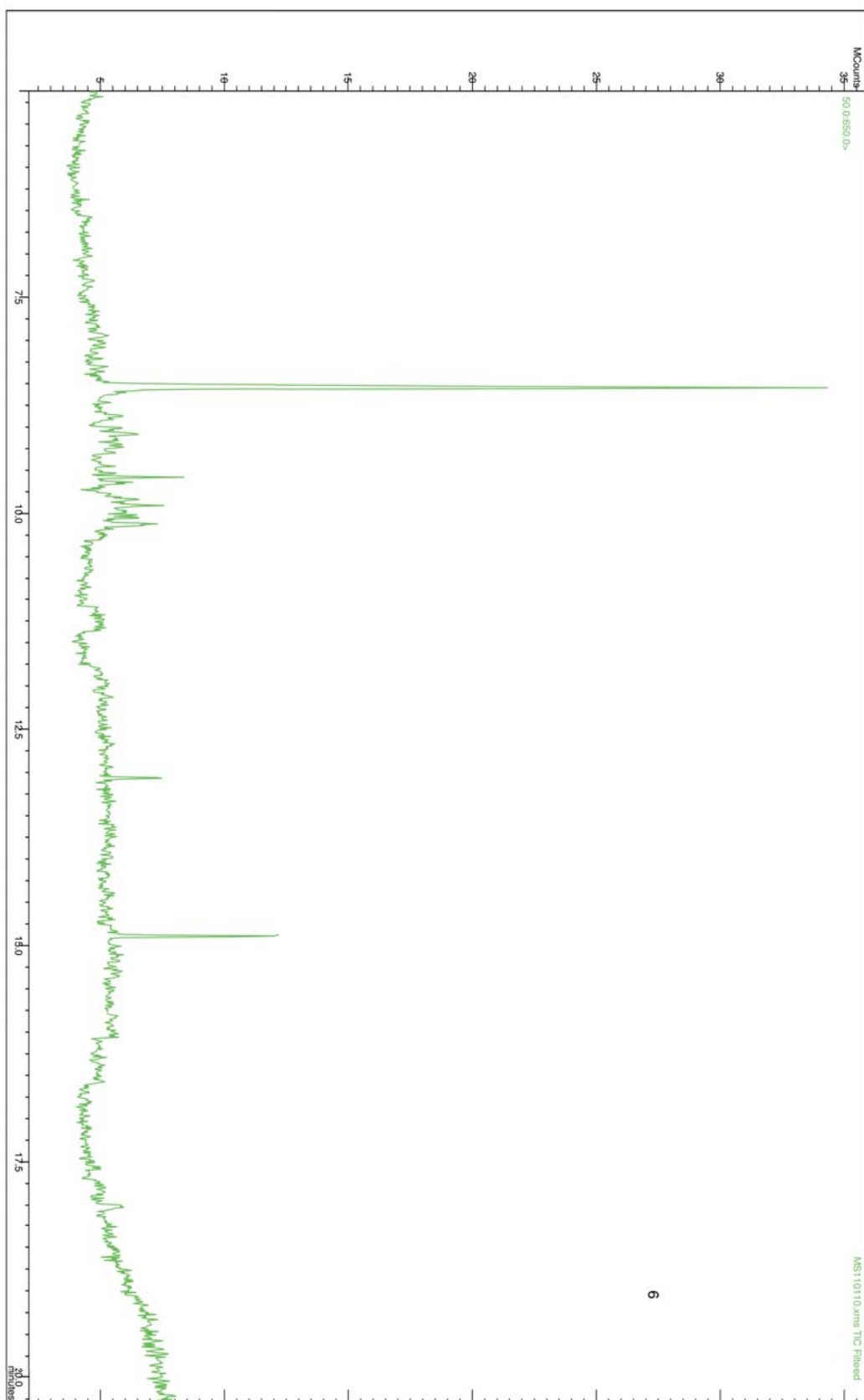


Figura A29. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del tratamiento sin Esp1 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 633 ppm.

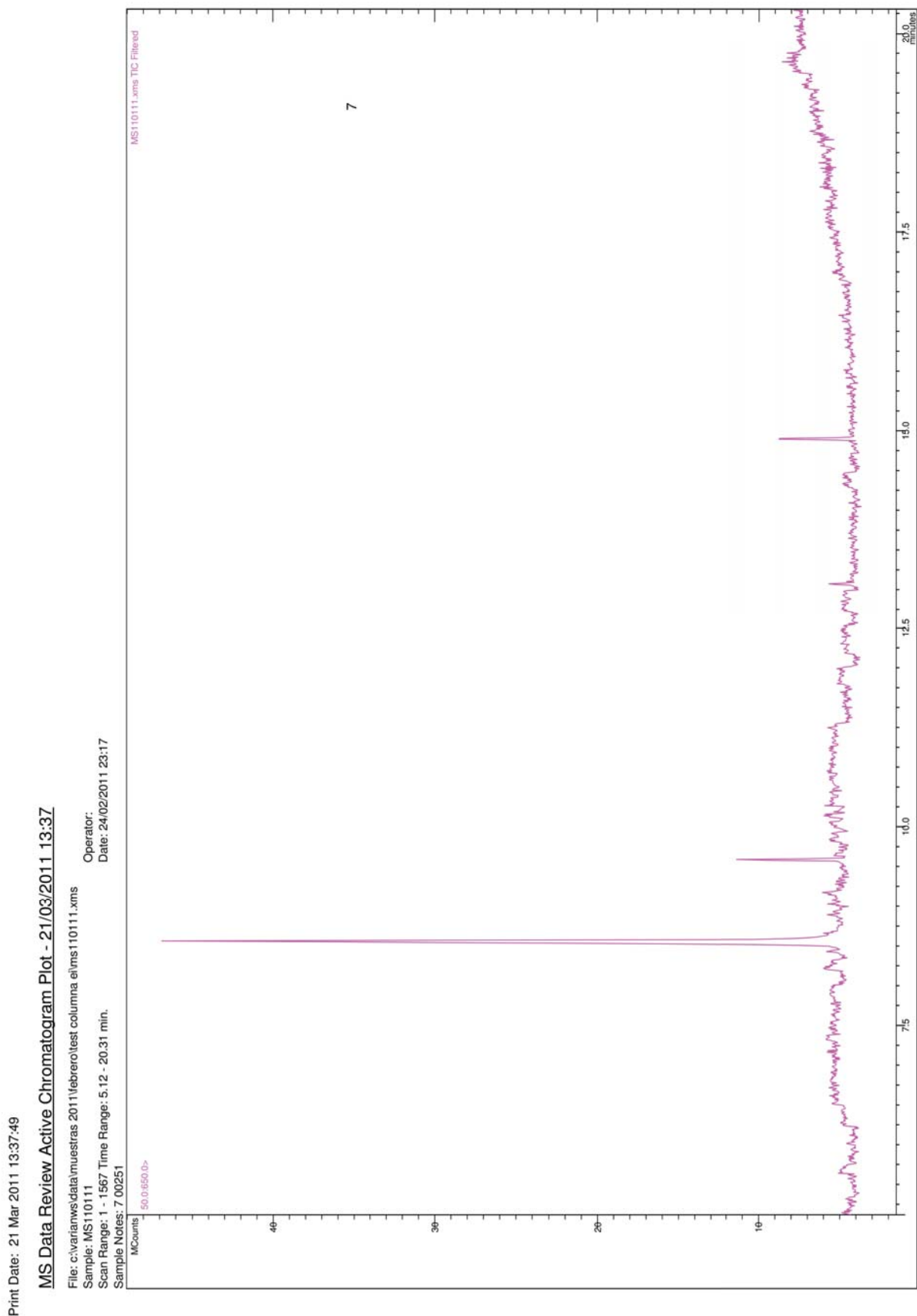


Figura A30. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del tratamiento con Esp1 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra es de 684 ppm.

Print Date: 21 Mar 2011 13:38:02

MS Data Review Active Chromatogram Plot - 21/03/2011 13:38

File: c:\varianms\data\muestras 2011\feb\roltest columna e1ms110112.xmls
Sample: MS110112
Scan Range: 1 - 1573 Time Range: 5.12 - 20.30 min.
Sample Notes: 8 00251
Operator:
Date: 25/02/2011 0:14

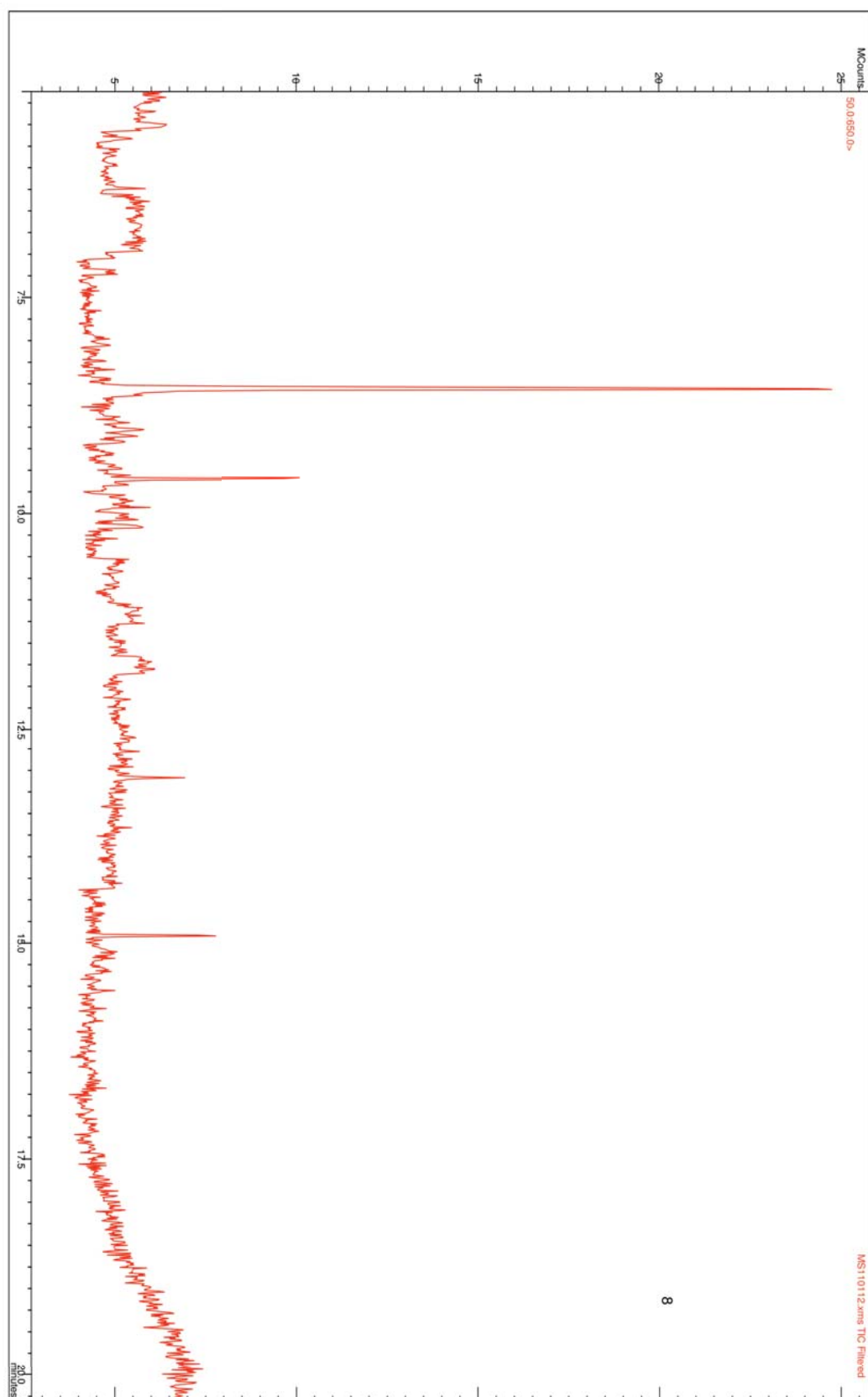


Figura A31. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del tratamiento sin TP9 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 527 ppm.

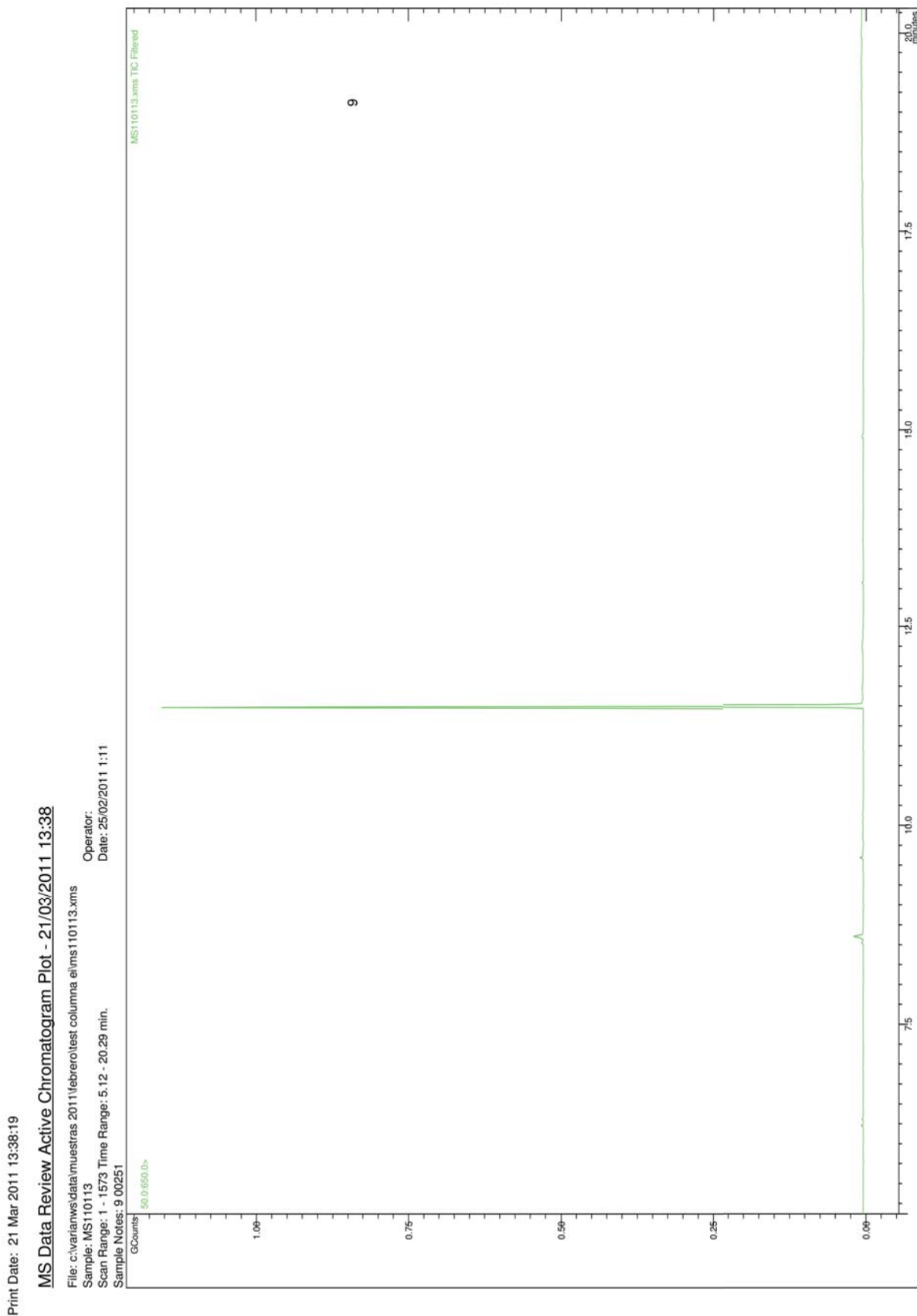


Figura A32. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del tratamiento con TP9 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 634 ppm.

Print Date: 21 Mar 2011 13:38:36

MS Data Review Active Chromatogram Plot - 21/03/2011 13:38

File: c:\varianw\data\muestras 2011\leberroltest columna e\ms110114.xmls
Sample: MS110114
Scan Range: 1 - 1571 Time Range: 5.12 - 20.29 min.
Sample Notes: 10 00251
Operator:
Date: 25/02/2011 2:09

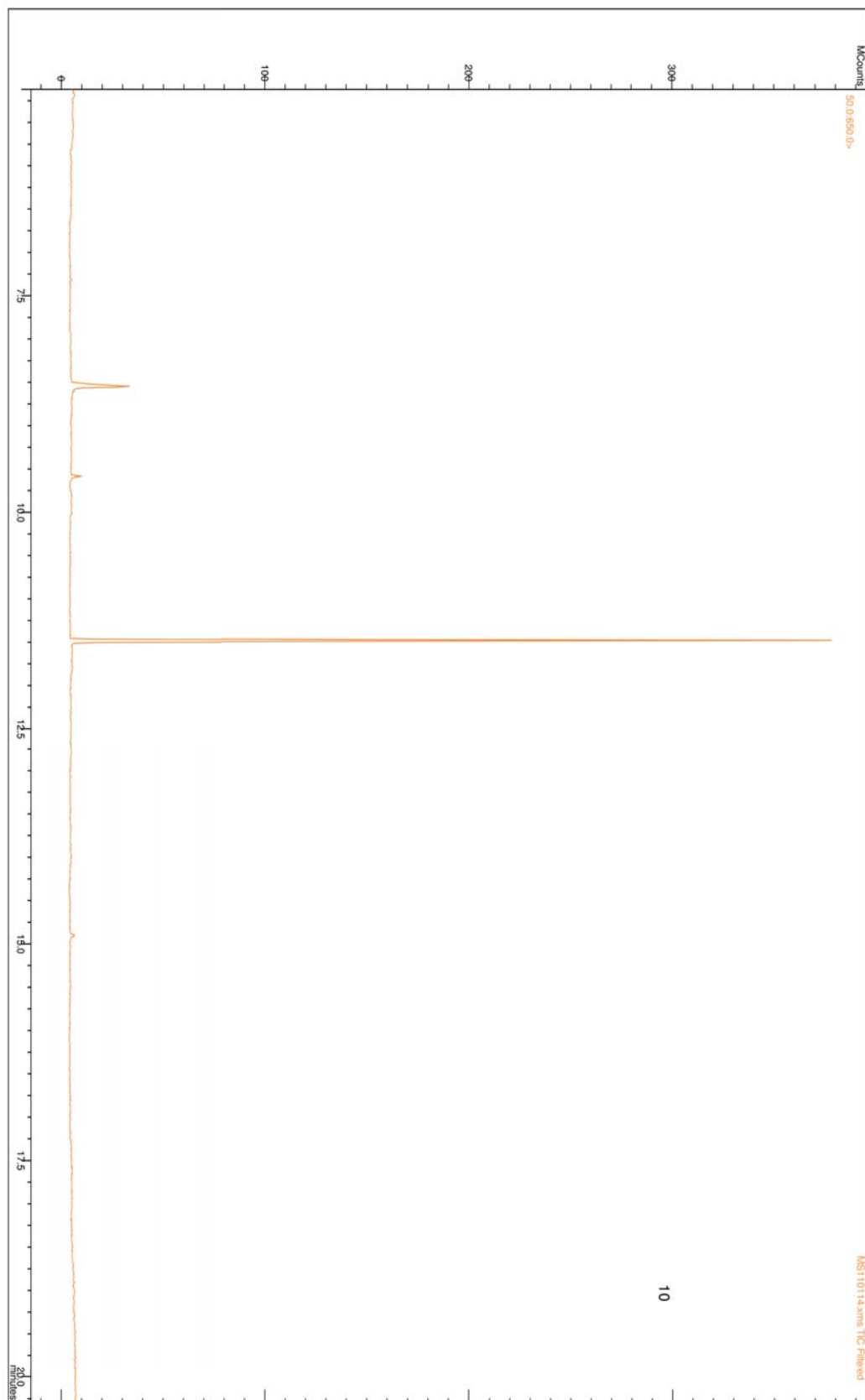


Figura A33. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del tratamiento sin Esp14 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 902 ppm.

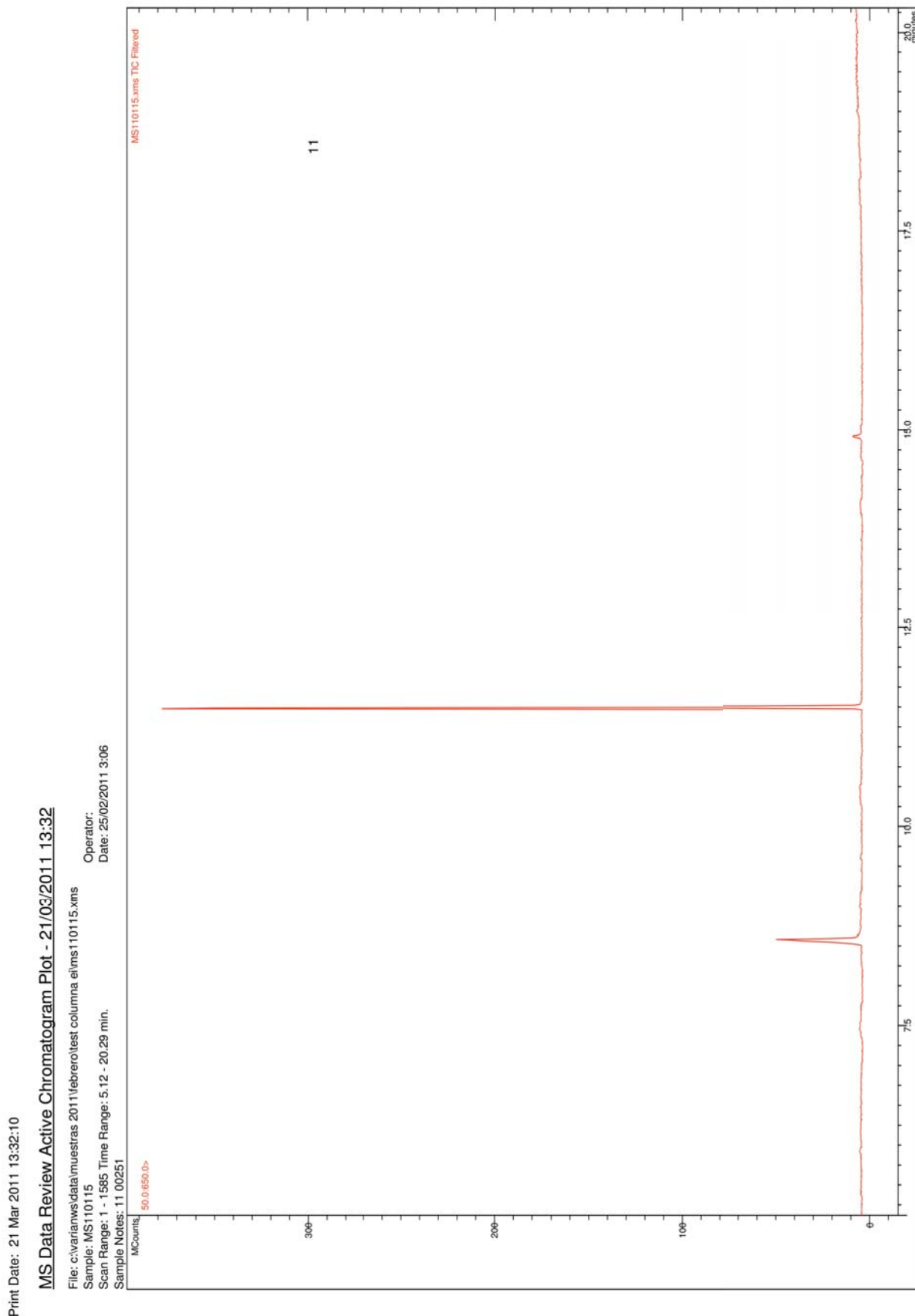


Figura A34. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del tratamiento con Esp14 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 922 ppm.

Print Date: 21 Mar 2011 13:32:26

MS Data Review Active Chromatogram Plot - 21/03/2011 13:32

File: c:\varianms\data\muestras 2011\1ebp\rolist columna e\lms110116.ms
Sample: MS110116
Scan Range: 1 - 1567 Time Range: 5.12 - 20.29 min.
Sample Notes: 12 00251
Operator:
Date: 25/02/2011 4:03

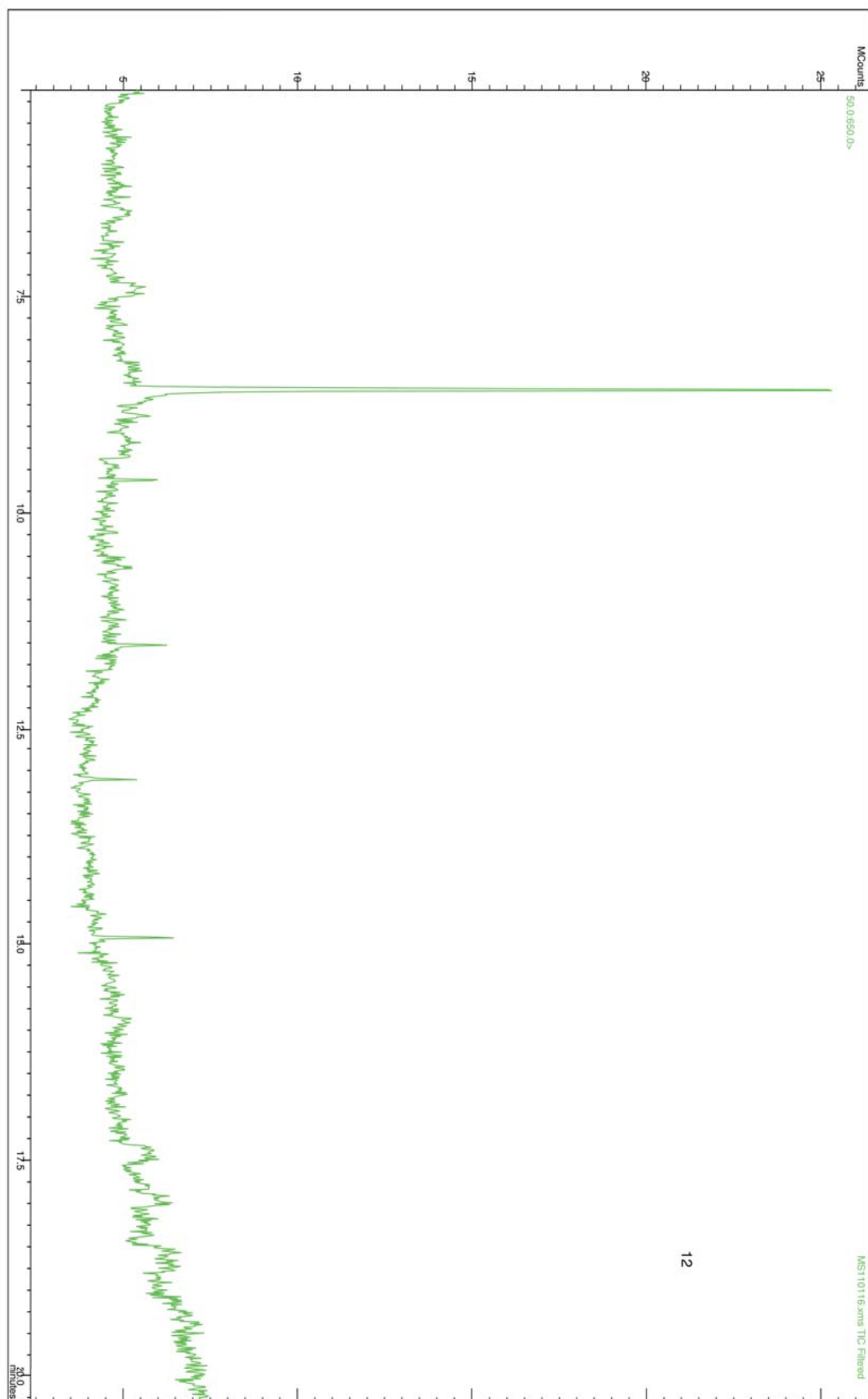


Figura A35. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del proceso de ida del experimento en fases. La DQO de esta muestra era de 561 ppm.

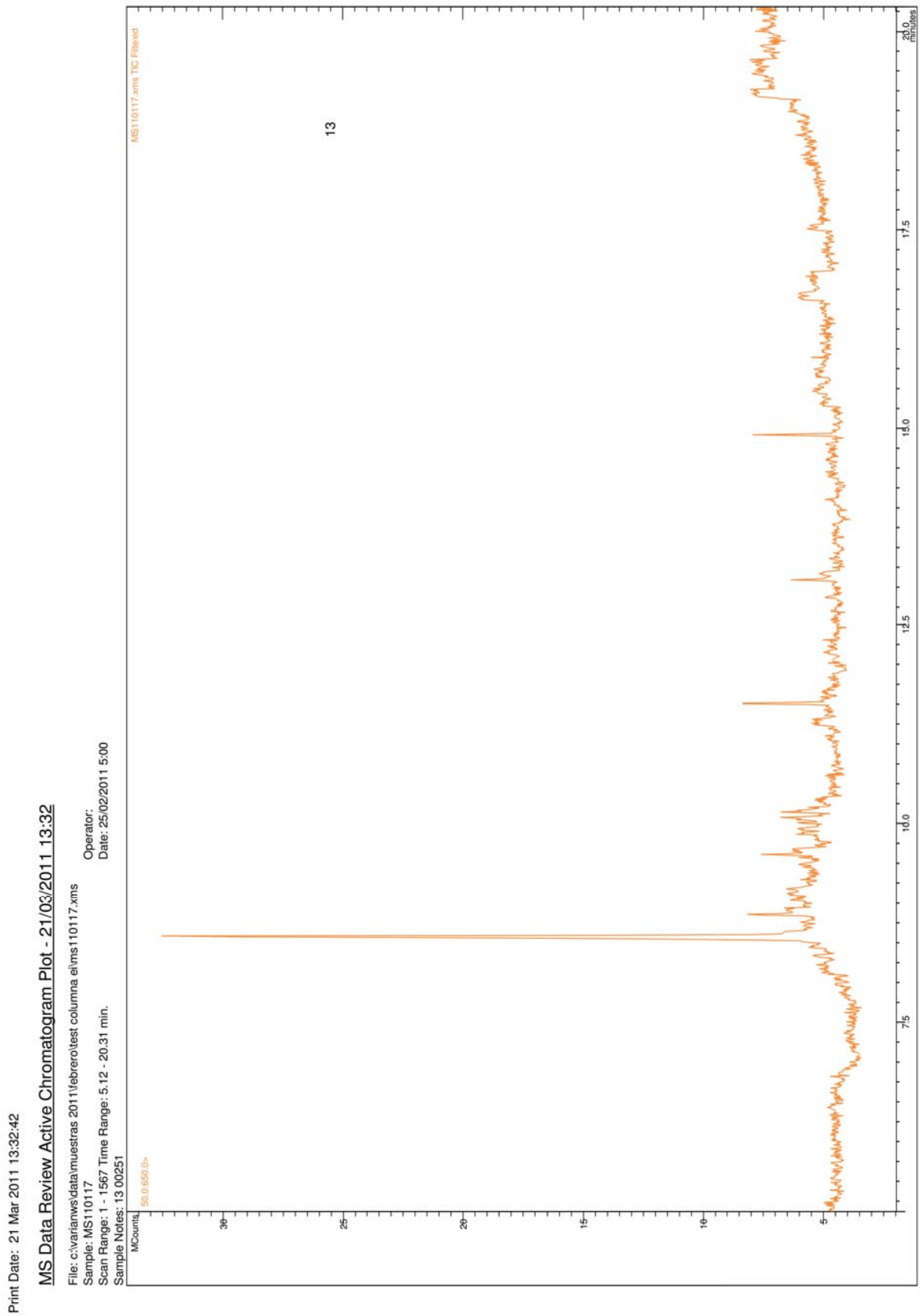


Figura A36. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del tratamiento en continuo del experimento en fases. La DQO de esta muestra era de 680 ppm.

Print Date: 21 Mar 2011 13:32:56

MS Data Review Active Chromatogram Plot - 21/03/2011 13:32

File: c:\varianw\data\muestras 2011\febrero\test columna elms110118.xmls
Sample: MS110118
Scan Range: 1 - 1563 Time Range: 5.12 - 20.30 min.
Sample Notes: 14 00251
Operator:
Date: 25/02/2011 5:58

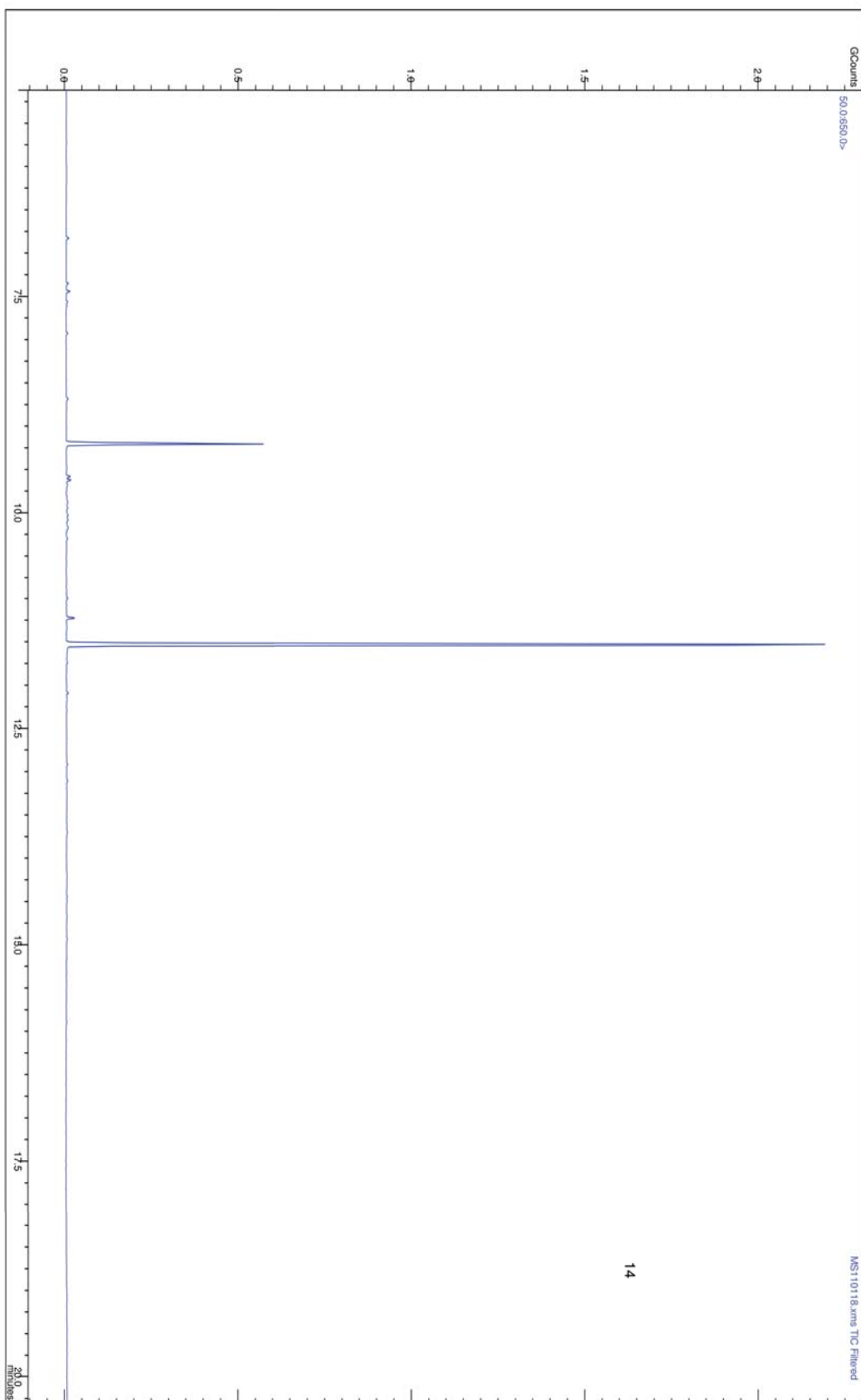


Figura A37. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos de la muestra inicial del experimento en fases. La DQO de esta muestra era de 1742 ppm.

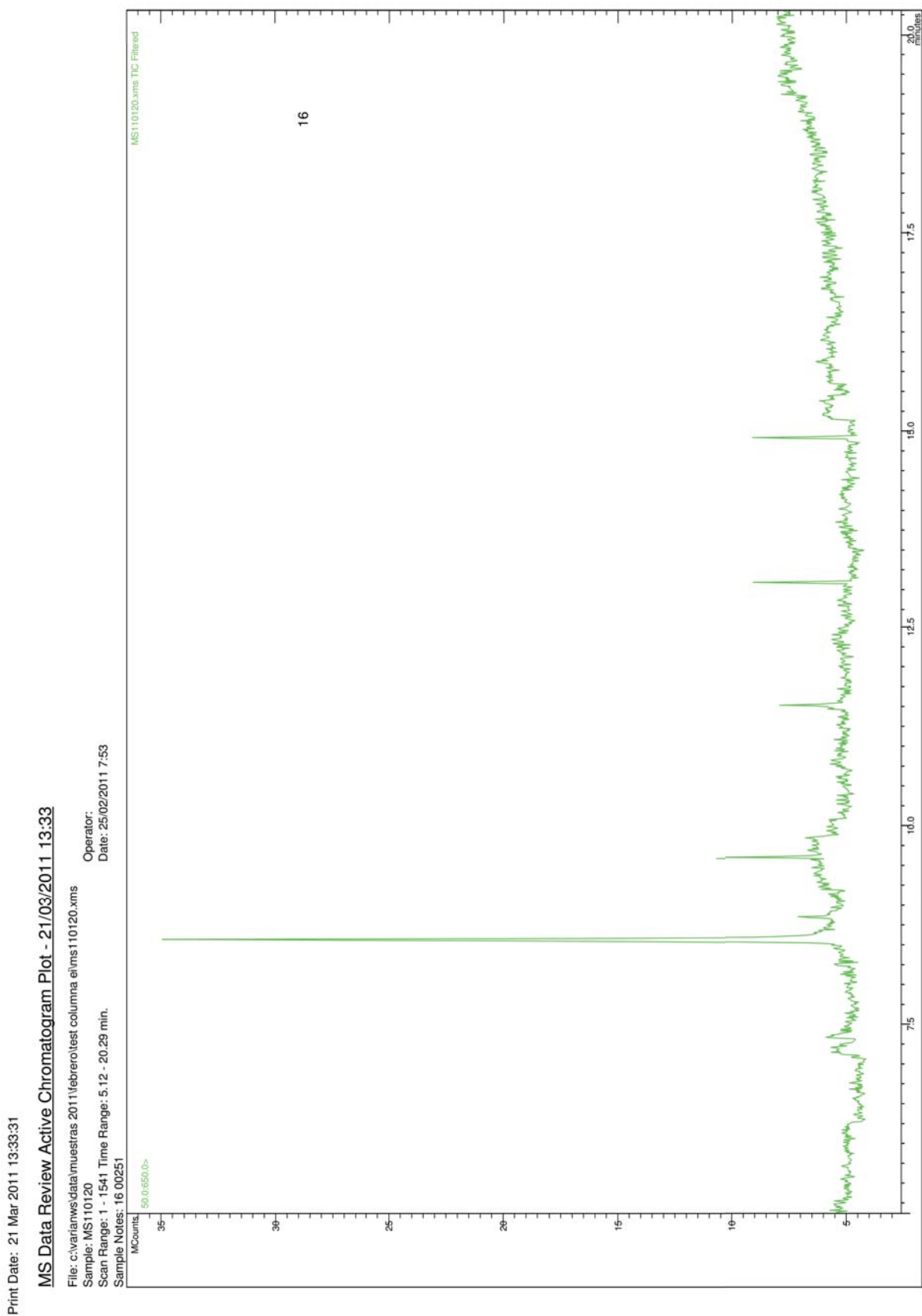


Figura A38. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos del proceso de vuelta a los 9 días del experimento en fases. La DQO de esta muestra era de 447 ppm.

**ANEXO 10: CROMATOGRAMAS
CORRESPONDIENTES AL ANÁLISIS
DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS
POLICÍCLICOS (PAHS)
DE LAS MUESTRAS INICIALES Y
FITORREMEIADAS**

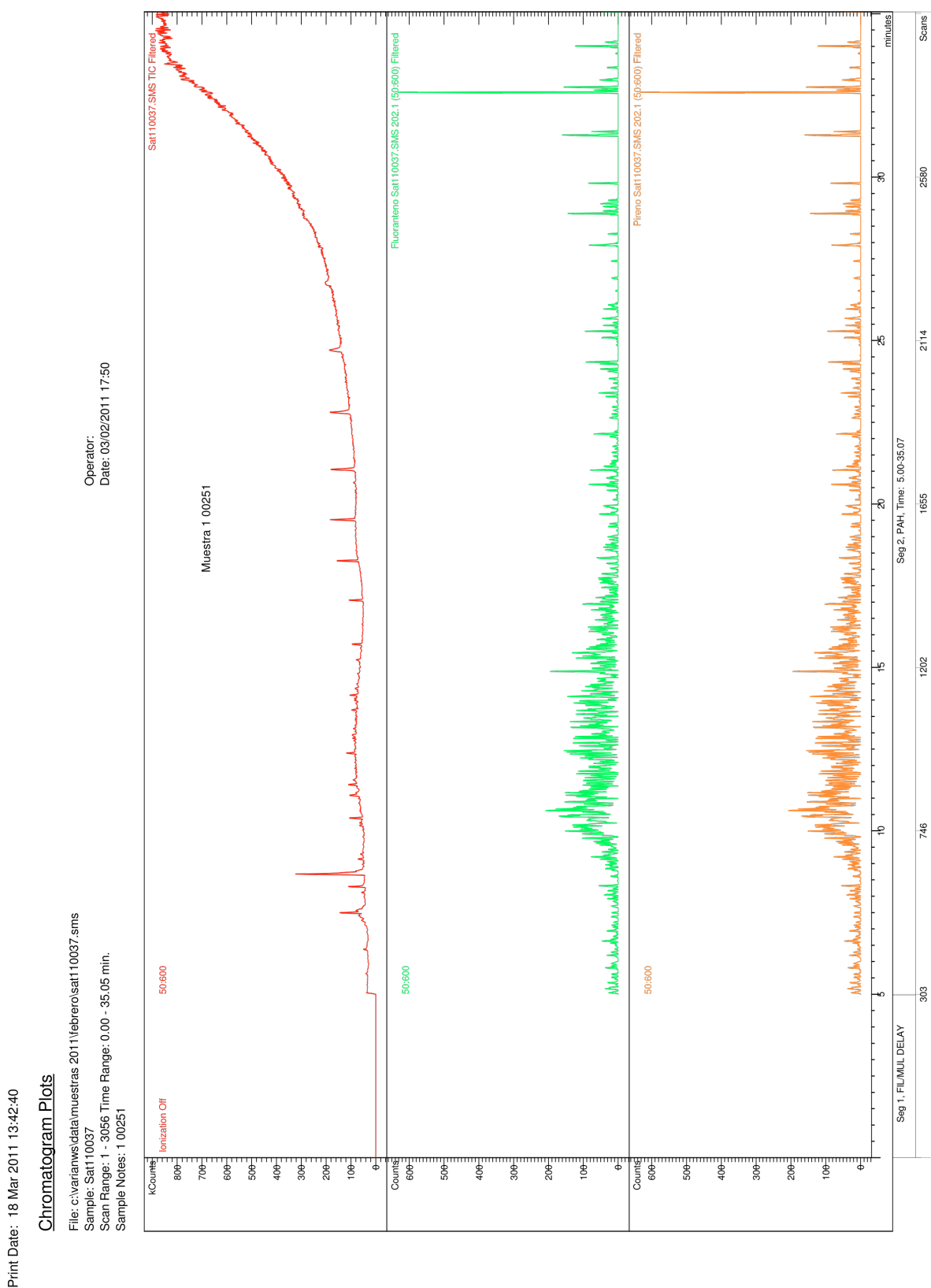


Figura A39. Cromatograma correspondiente al análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) de la muestra inicial correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La demanda química de oxígeno (DQO) de esta muestra era de 1.648 ppm.

Print Date : 18 Mar 2011 13:50:59

Chromatogram Plots

File: c:\varian\sw\data\muestras 2011\feb\ro\sat110038.sms
 Sample: Sat110038
 Scan Range: 1 - 3010 Time Range: 0.00 - 35.05 min.
 Sample Notes: 2 00251

Operator:
 Date: 03/02/2011 19:11

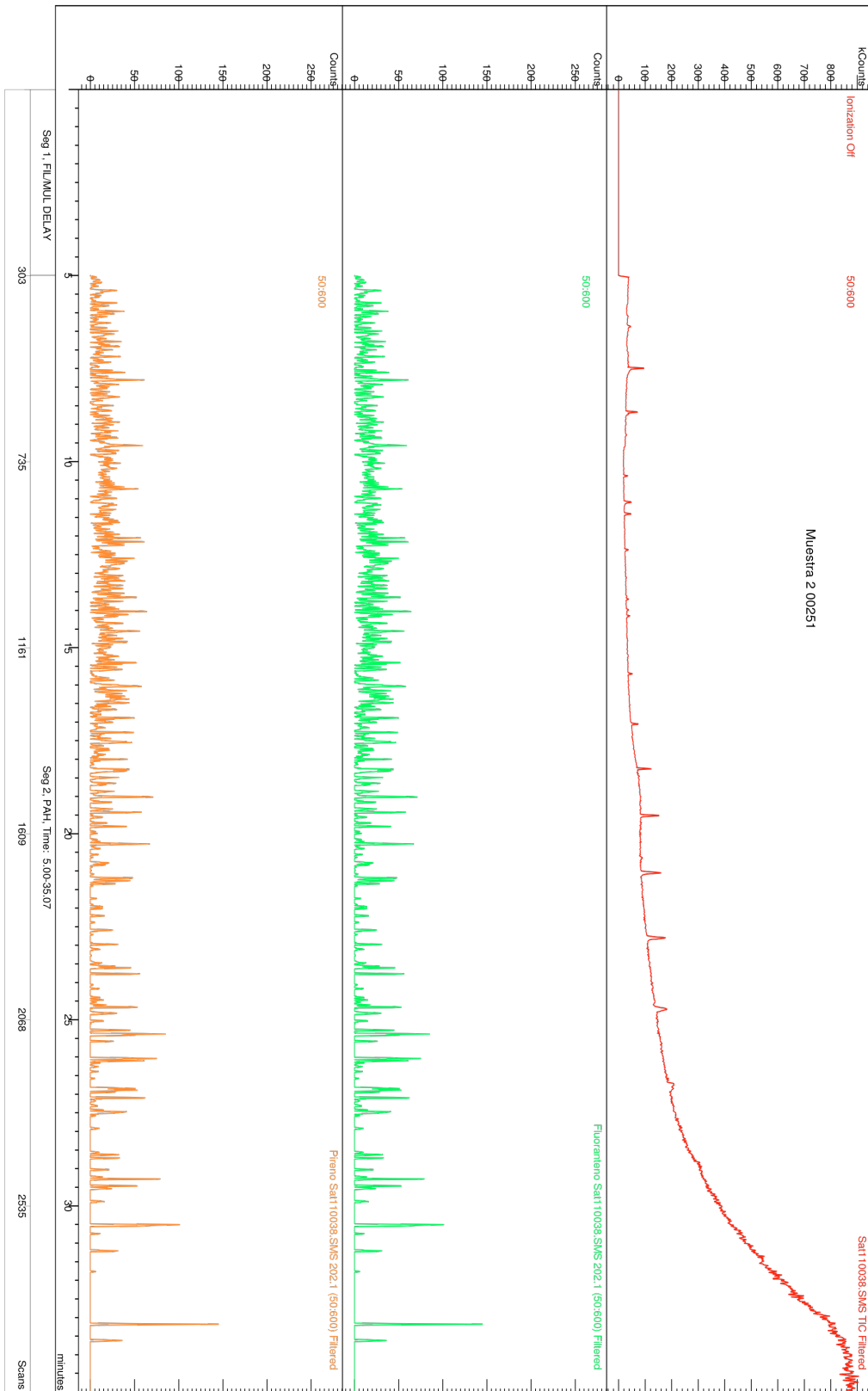


Figura A40. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del tratamiento sin consorcio correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 836 ppm.

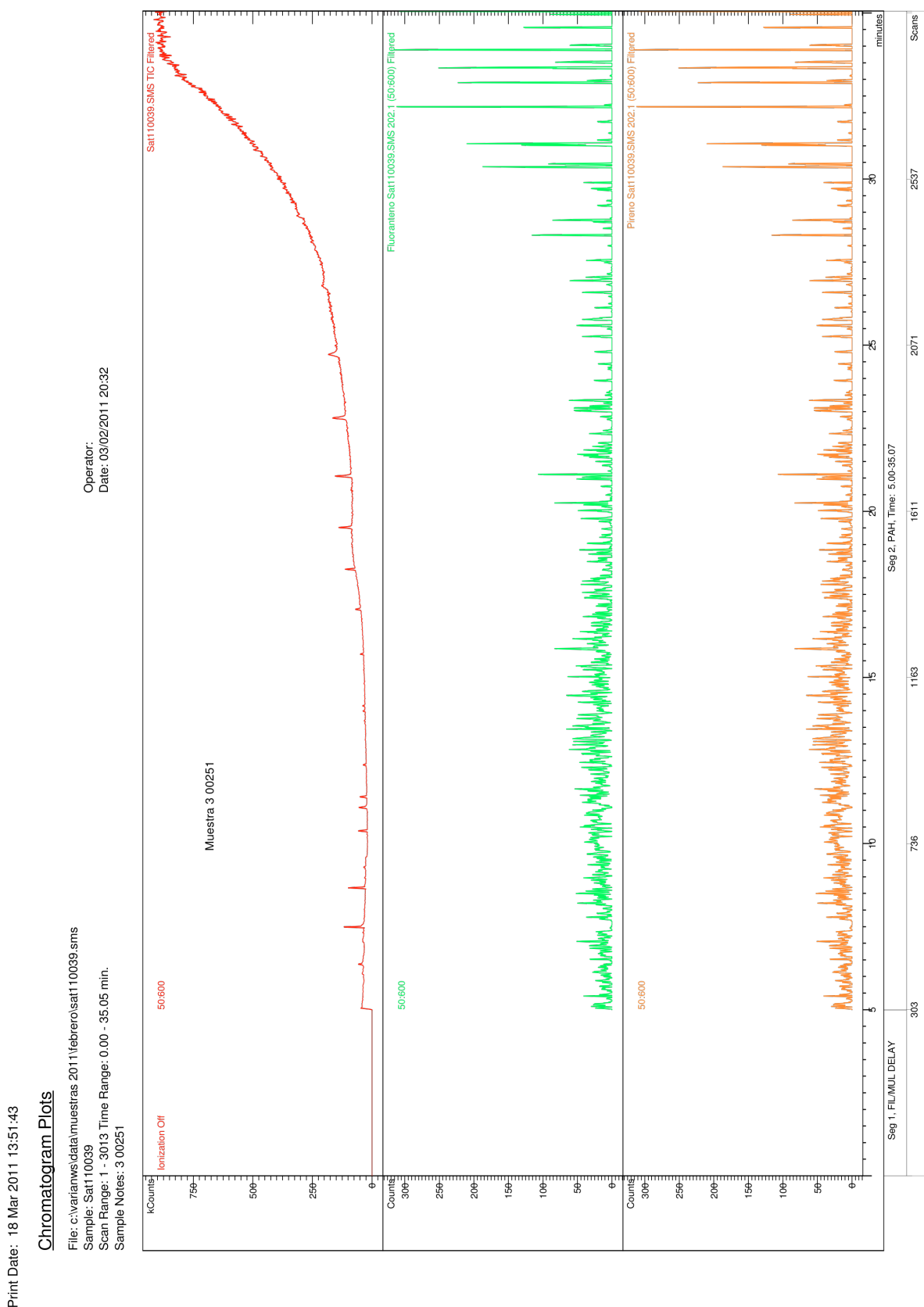


Figura A41. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del tratamiento con consorcio correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 755 ppm.

Print Date: 18 Mar 2011 13:52:19

Chromatogram Plots

File: c:\varianw\data\muestras 2011\febrero\sat110040.sms
 Sample: Sat110040
 Scan Range: 1 - 3003 Time Range: 0.00 - 35.05 min.
 Sample Notes: 4 00251

Operator:
 Date: 03/02/2011 21:53

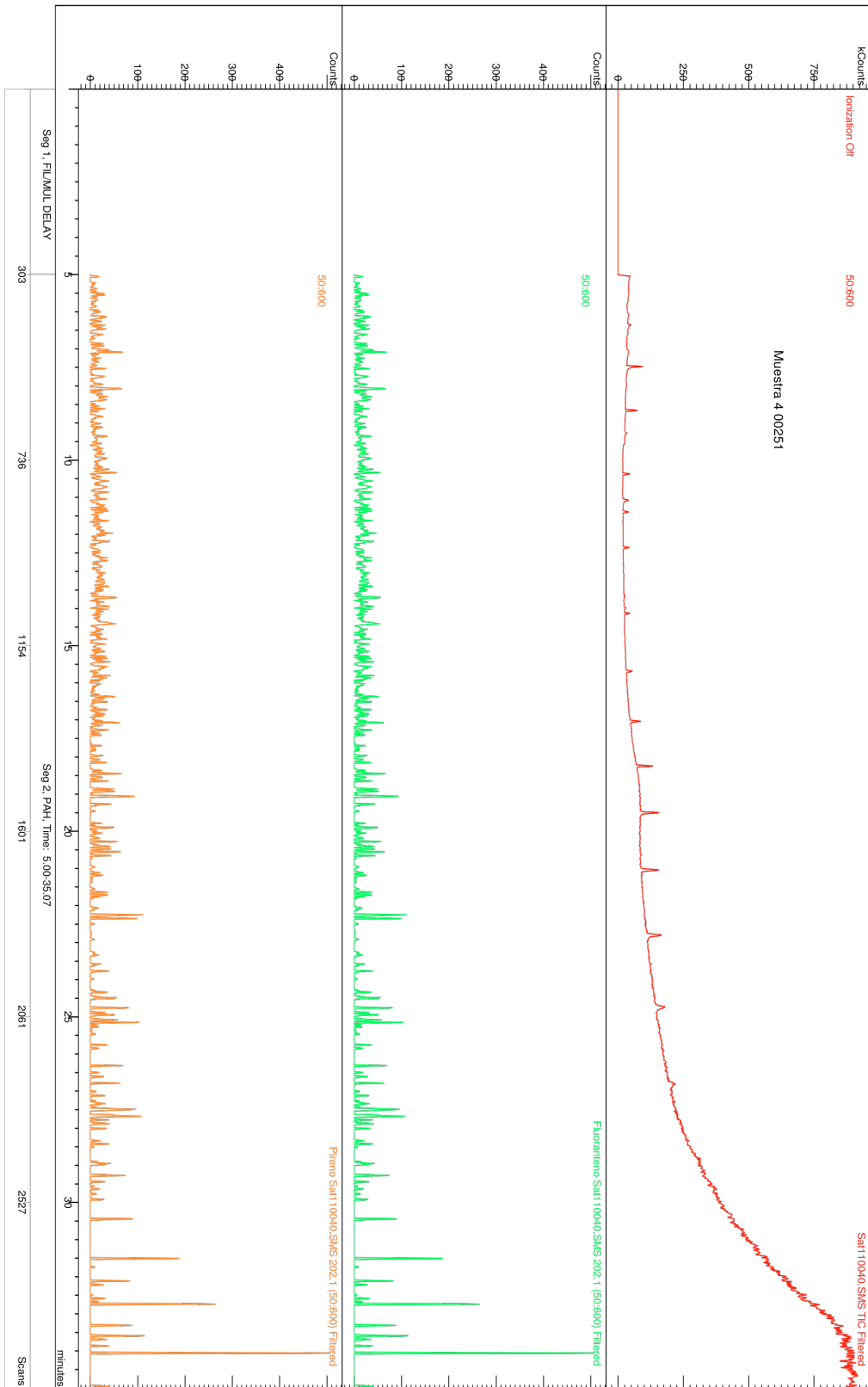


Figura A42. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del tratamiento sin Aur 6 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 809 ppm.

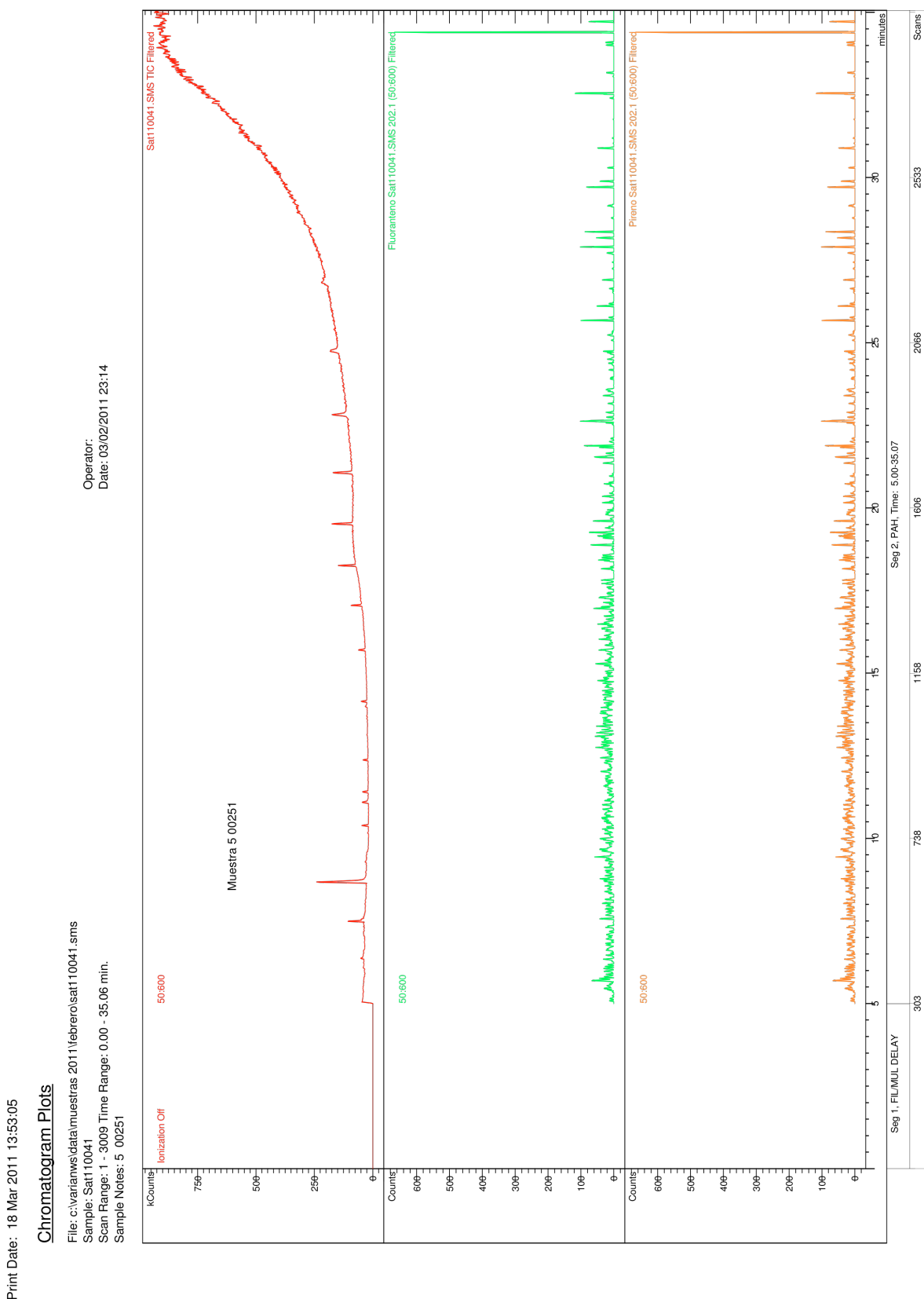


Figura A43. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del tratamiento con Aur 6 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 818 ppm.

Print Date: 18 Mar 2011 13:53:43

Chromatogram Plots

File: c:\varianw\data\muestras 2011\lebreros\sat110042.sms
 Sample: Sat110042
 Scan Range: 1 - 3011 Time Range: 0.00 - 35.05 min.
 Sample Notes: 6 00251

Operator:
 Date: 04/02/2011 0:34

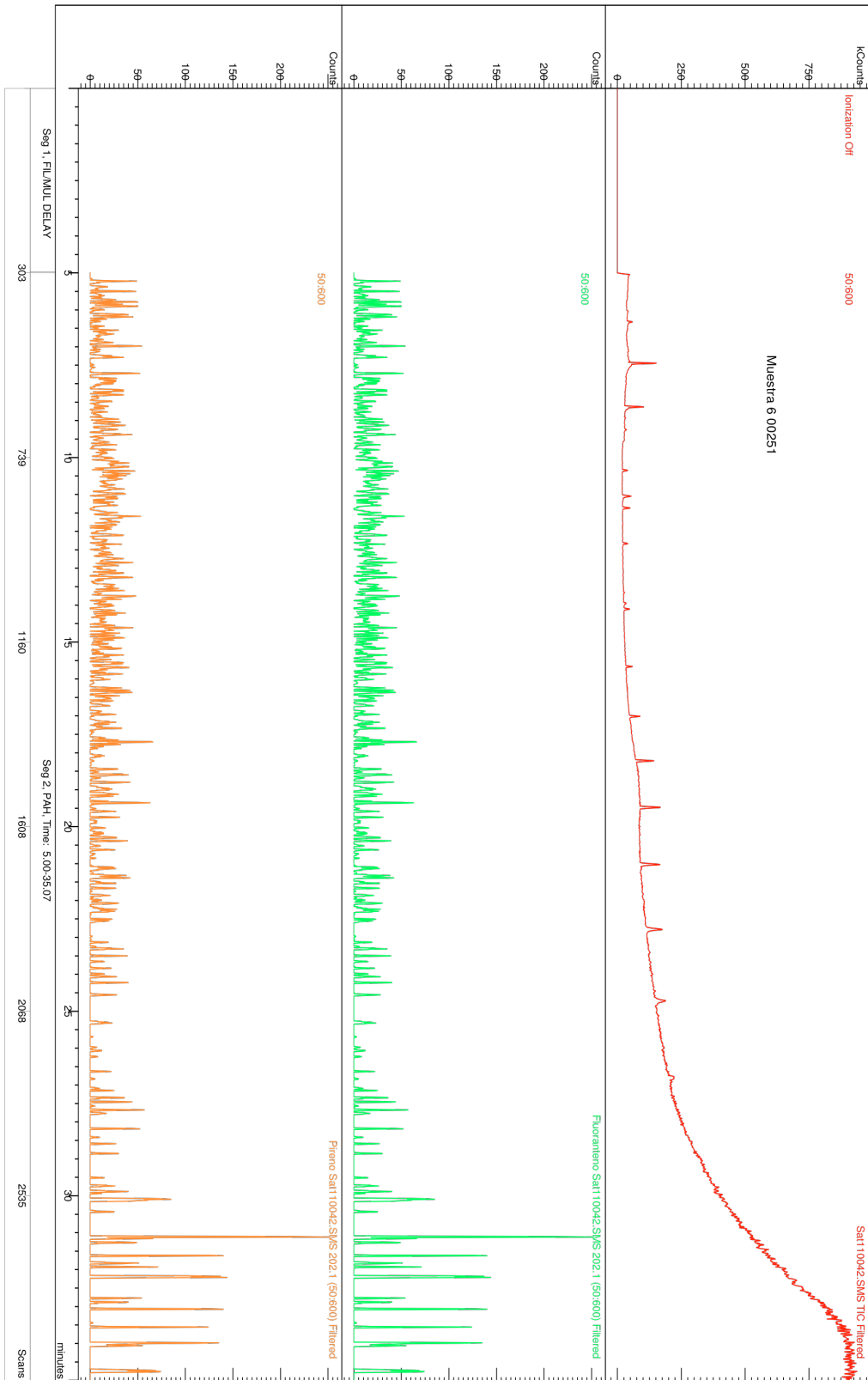


Figura A44. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del tratamiento sin Esp1 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 633 ppm.

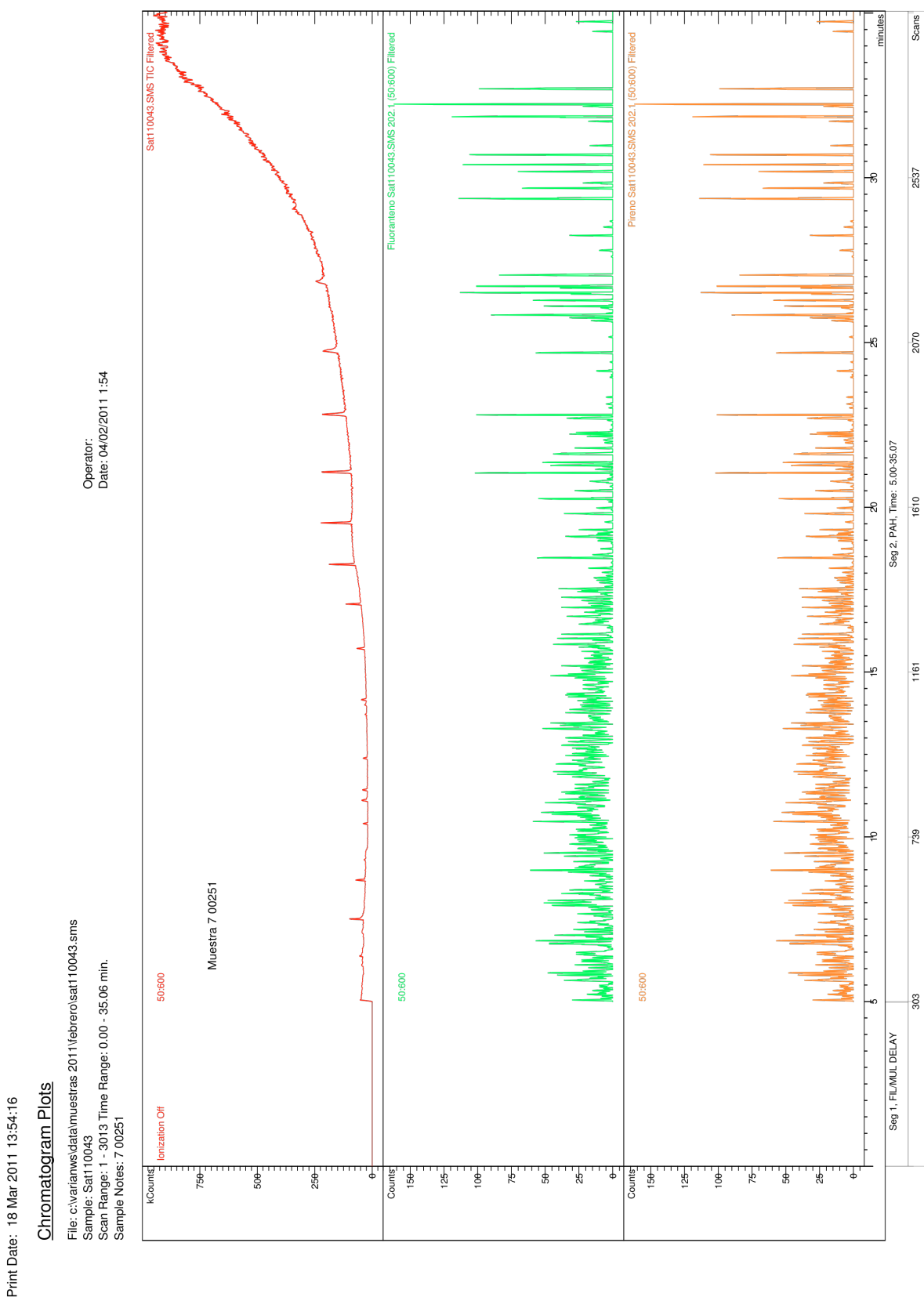


Figura A45. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del tratamiento con Esp1 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra es de 684 ppm.

Print Date: 18 Mar 2011 13:54:57

Chromatogram Plots

File: c:\varianw\data\muestras 2011\lepro/sat110044.sms
 Sample: Sat110044
 Scan Range: 1 - 3019 Time Range: 0.00 - 35.05 min.
 Sample Notes: 8 00251

Operator:
 Date: 04/02/2011 3:15

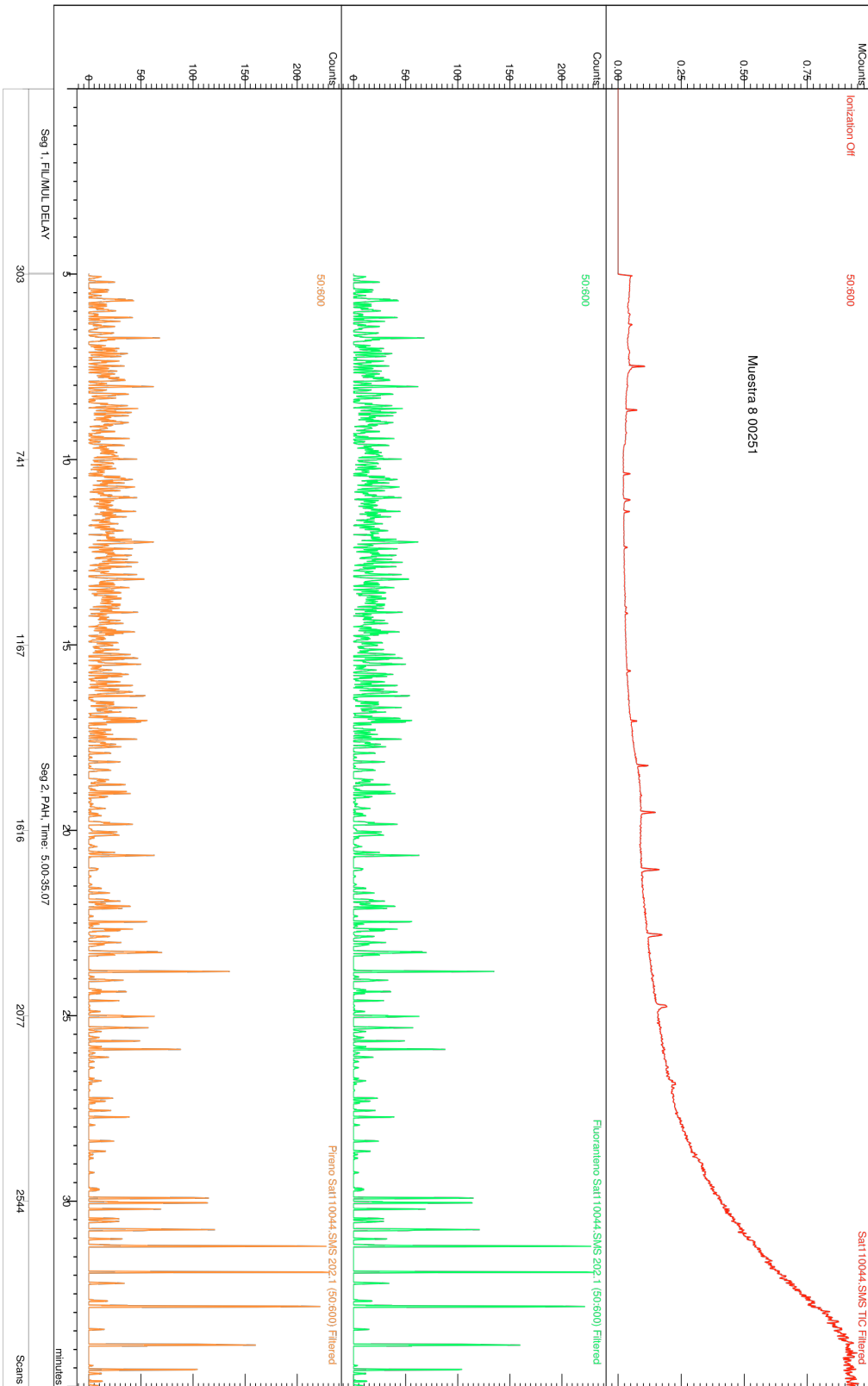


Figura A46. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del tratamiento sin TP9 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 527 ppm.

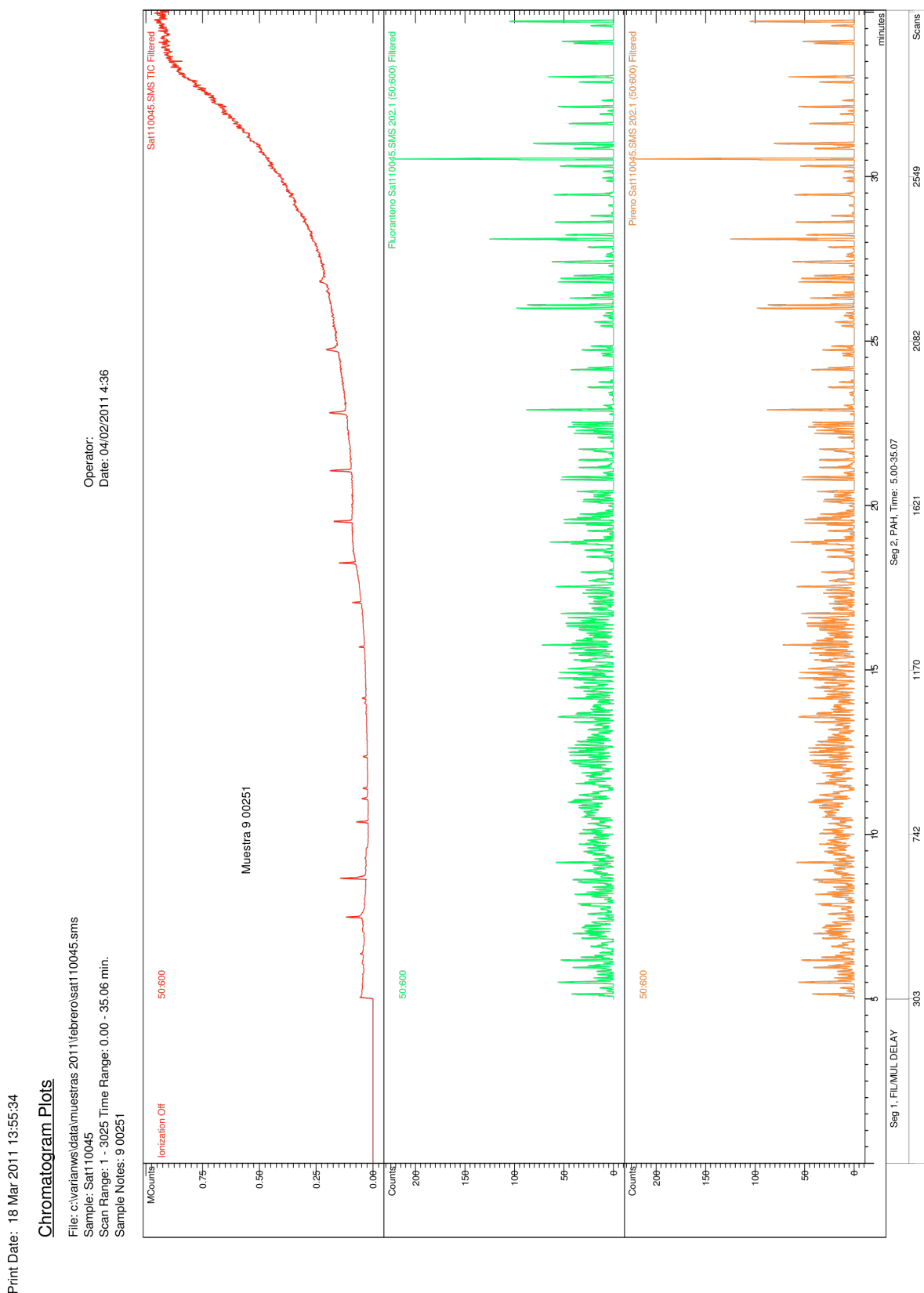


Figura A47. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del tratamiento con TP9 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 634 ppm.

Print Date: 18 Mar 2011 13:59:34

Chromatogram Plots

File: c:\varianms\data\muestras 2011\lebron\sat110046.sms
 Sample: Sat110046
 Scan Range: 1 - 3020 Time Range: 0.00 - 35.05 min.
 Sample Notes: 10 00251

Operator:
 Date: 04/02/2011 5:57

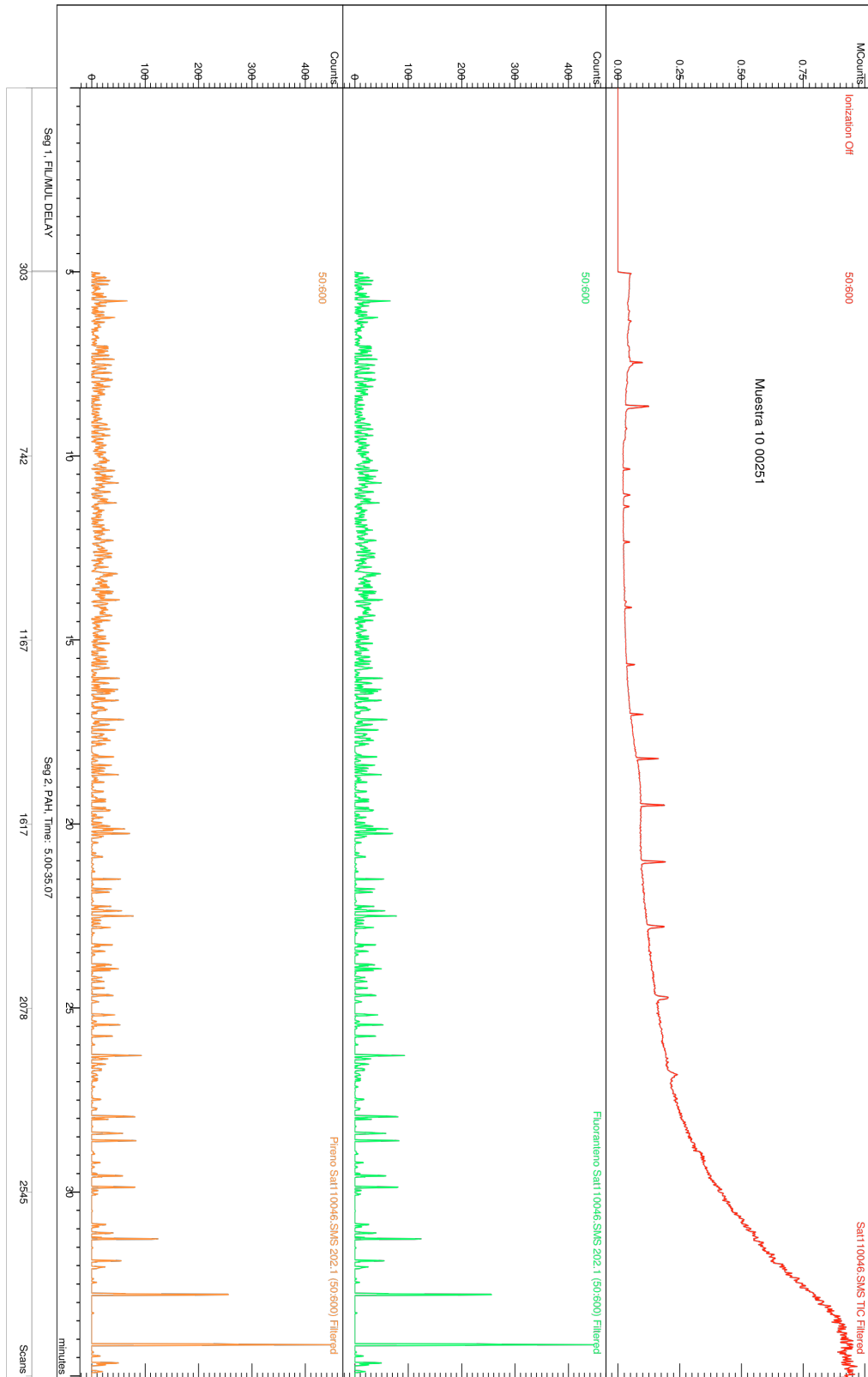


Figura A48. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del tratamiento sin Esp14 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 902 ppm.

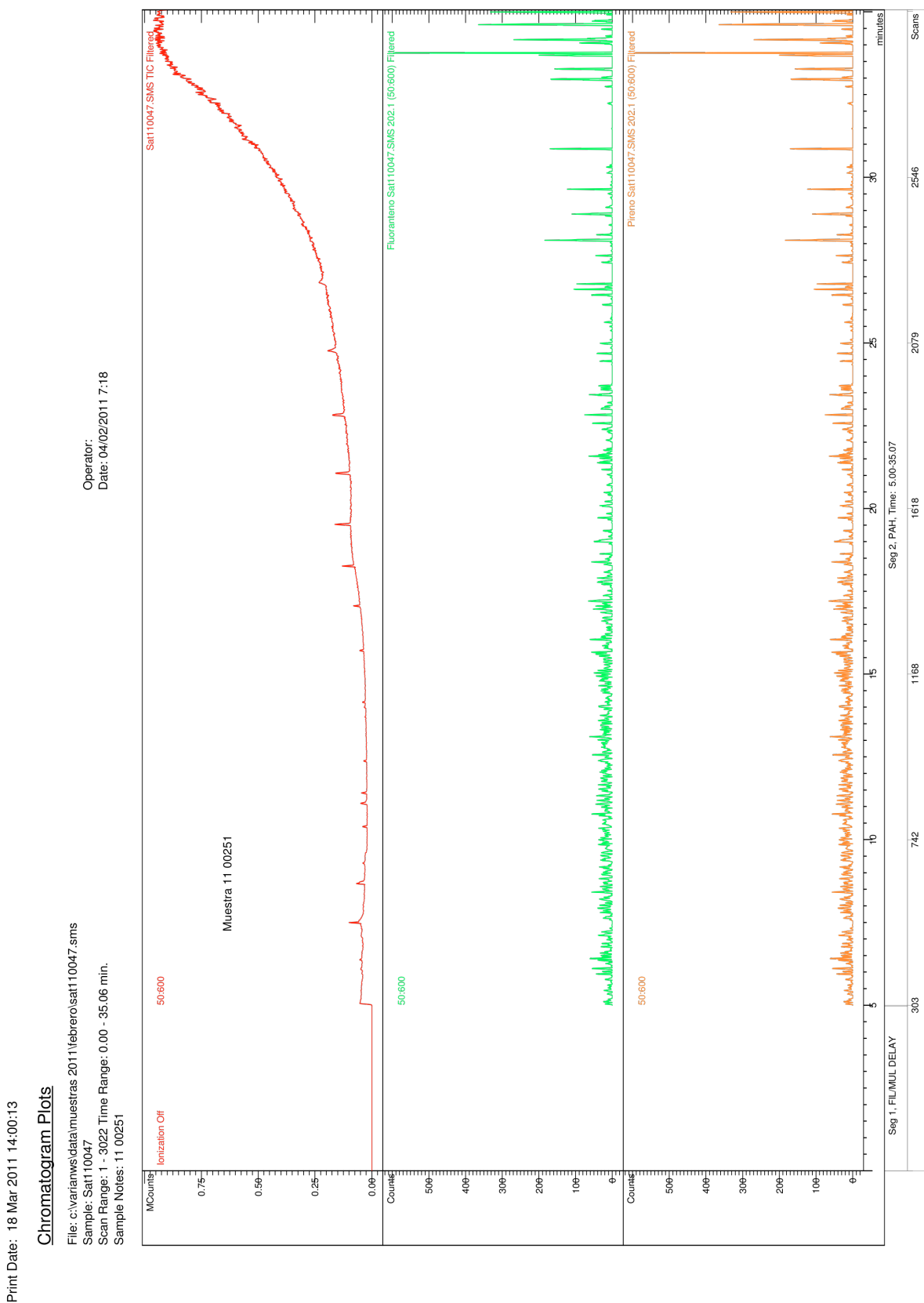


Figura A49. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del tratamiento con Esp14 correspondiente a los experimentos de fitorremediación de 5 días. La DQO de esta muestra era de 922 ppm.

Print Date: 18 Mar 2011 14:09:12

Chromatogram Plots

File: c:\varianw\data\muestras 2011\febrero\sat110048.sms
 Sample: Sat110048
 Scan Range: 1 - 3019 Time Range: 0.00 - 35.06 min.
 Sample Notes: 12 00251

Operator:
 Date: 04/02/2011 8:38

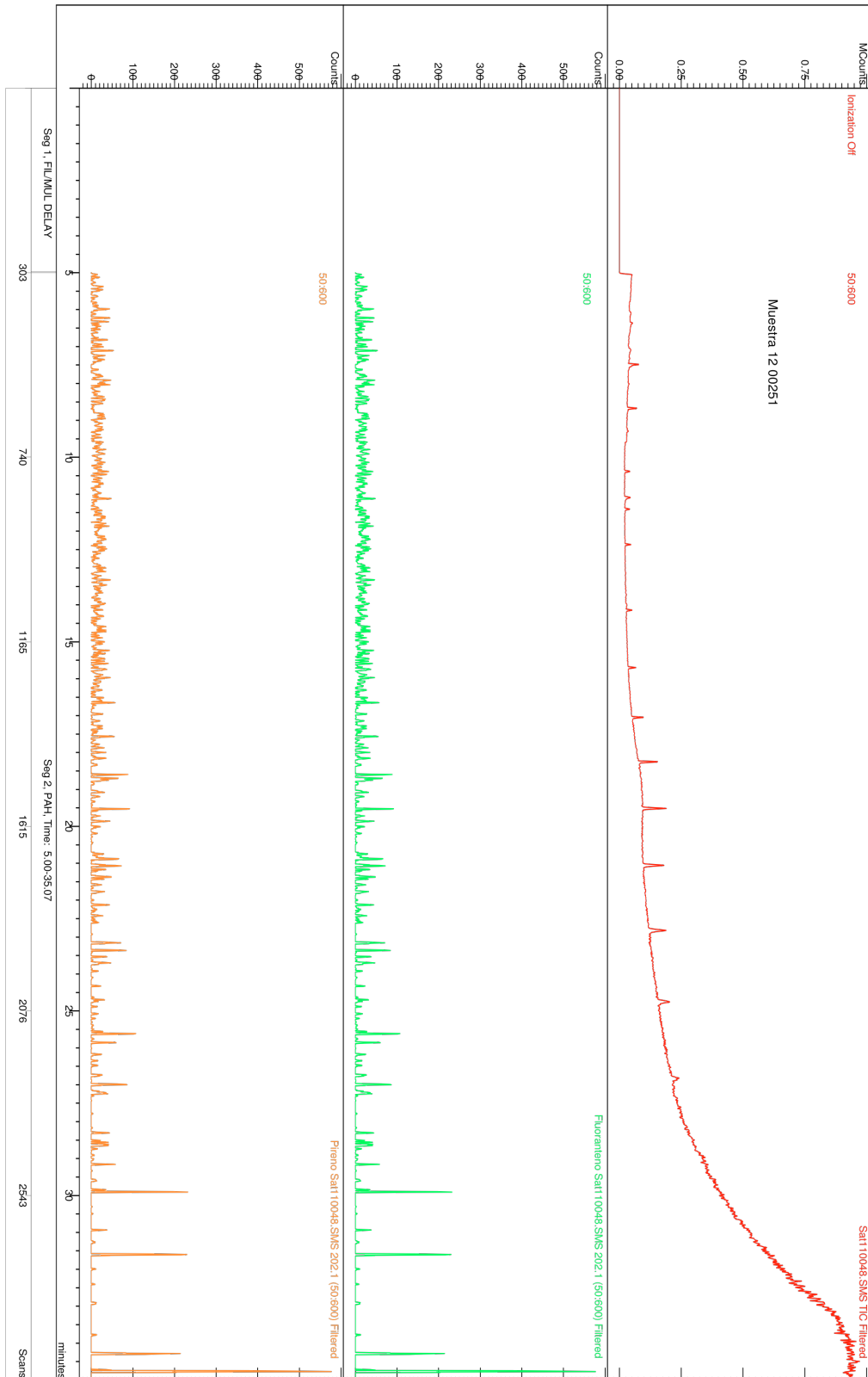


Figura A50. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del proceso de ida del experimento en fases. La DQO de esta muestra era de 561 ppm

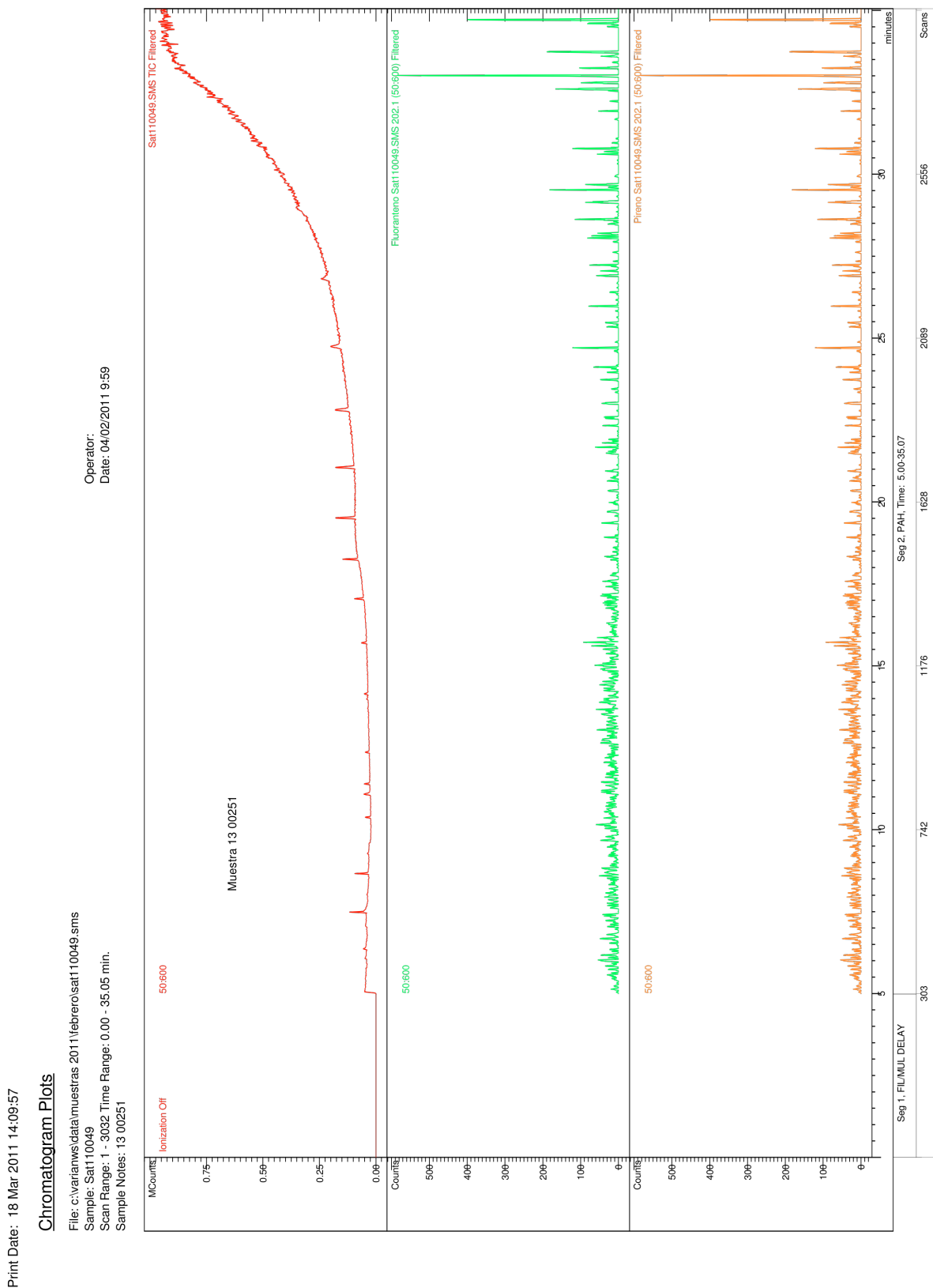


Figura A51. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del tratamiento en continuo del experimento en fases. La DQO de esta muestra era de 680 ppm.

Print Date: 18 Mar 2011 14:11:39

Chromatogram Plots

File: c:\varianw\data\muestras 2011\febrero\sat110050.sms
 Sample: Sat110050
 Scan Range: 1 - 3080 Time Range: 0.00 - 35.06 min.
 Sample Notes: 14 00251

Operator:
 Date: 04/02/2011 11:20

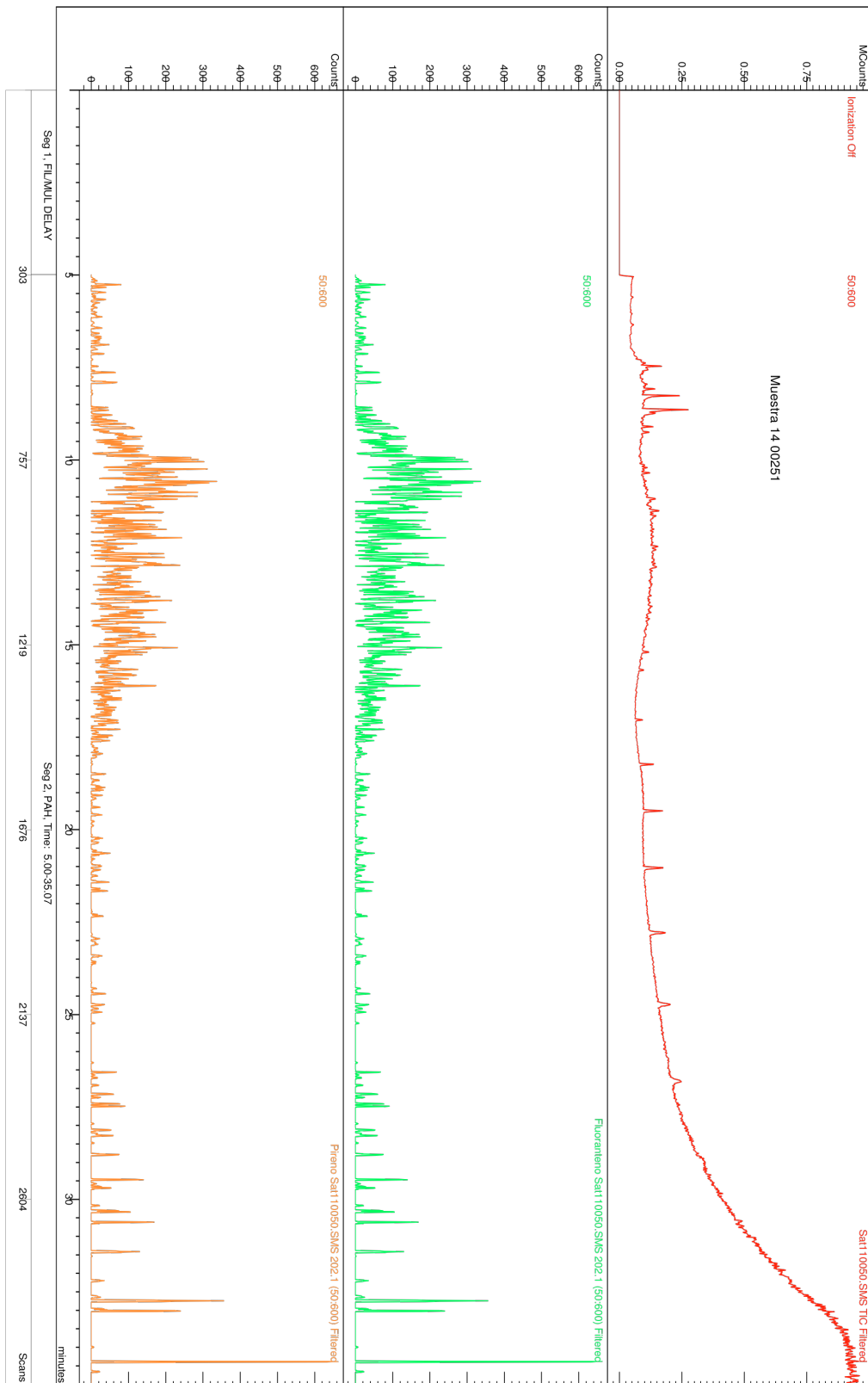


Figura A52. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs de la muestra inicial del experimento en fases. La DQO de esta muestra era de 1742 ppm.

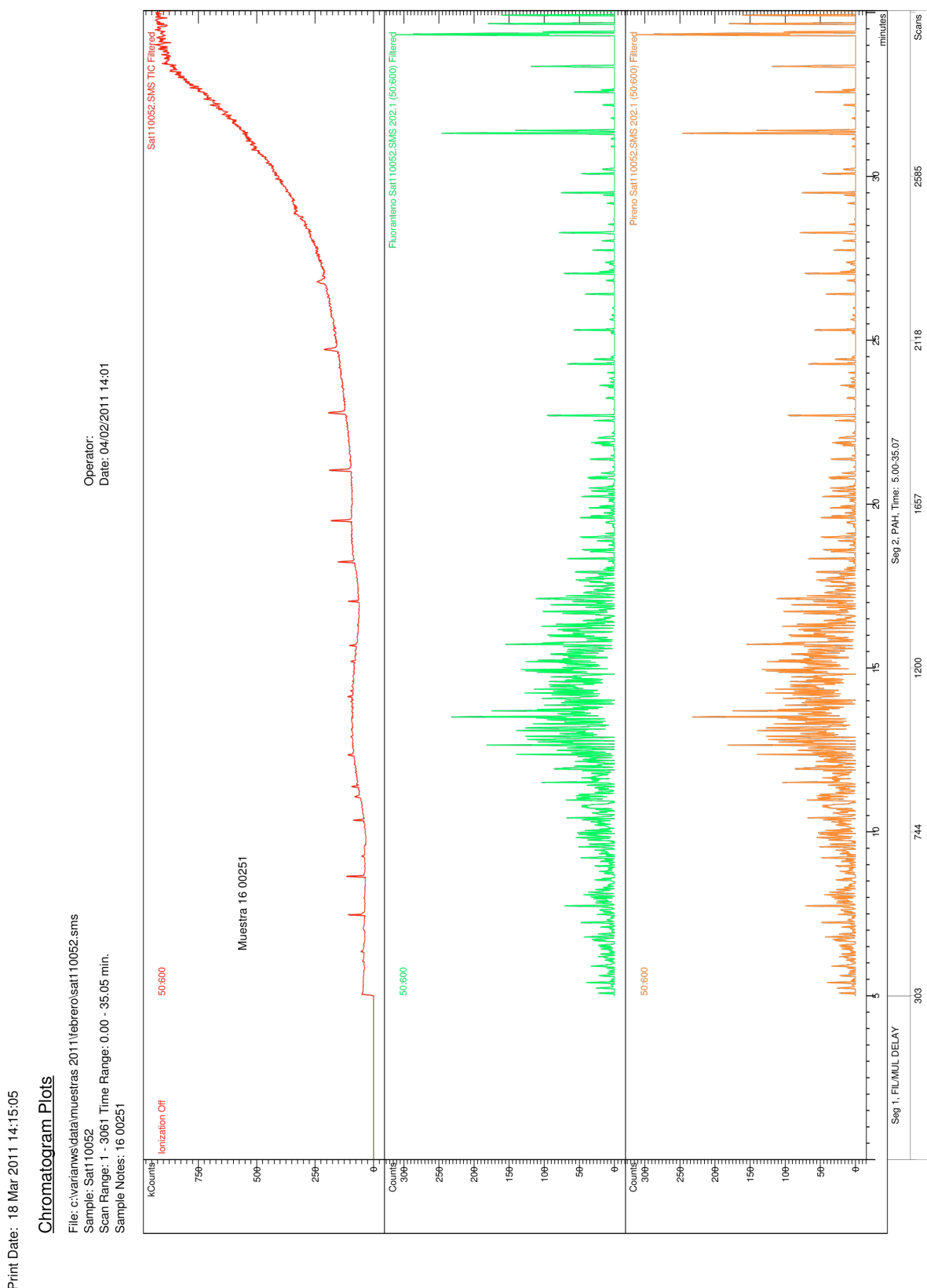


Figura A53. Cromatograma correspondiente al análisis de PAHs del proceso de vuelta a los 9 días del experimento en fases. La DQO de esta muestra era de 447 ppm.

ANEXO 11: FICHAS INFORMATIVAS DEL ACEITE DE CORTE

HOCUT SB-5880

Aceite de corte de elevada lubricación para mecanizado y rectificado

DESCRIPCION

HOCUT SB-5880 es un fluido, soluble en agua, compuesto de aceite mineral y emulgentes especiales con aditivos anticorrosivos, conservantes y lubricantes polares y de MEDIA PRESIÓN.

Está exento de: *Boro, Azufre Activo, Cloro, Fenoles, Metales Pesados y Nitratos.*

CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS

ENSAYO	VALOR TÍPICO	METODICA ENSAYO
PRODUCTO CONCENTRADO		
<i>Aspecto</i>	Líquido límpido	HI-101
<i>Color</i>	Ambar	HI-102
<i>Densidad 15,5°C</i>	0,975 g/cm ³	ASTM D-1298
<i>Factor Refractómetro</i>	1,2	HI-531
EMULSIÓN AL 5% CON H₂O DE 5 °HF		
<i>Aspecto</i>	Lechoso	HI-101
<i>Ph</i>	9,3	HI-501
<i>Corrosión papel IP-287</i>	Nula	HI-612

HI = Test desarrollado por Houghton Ibérica

APLICACIONES

HOCUT SB-5880 es ideal para mecanizado severo de acero y fundición.

Especialmente diseñado como refrigerante de alta presión.

En la utilización de las emulsiones de HOCUT SB-5880 destacamos, entre otras, las siguientes cualidades.

- Larga duración en servicio.
- Bajo nivel de espumabilidad.
- Buen poder anticorrosivo.
- Excelentes acabados superficiales y mayor duración de herramientas de corte.

MODO DE EMPLEO

Las emulsiones de HOCUT SB-5880 deben formarse siempre vertiendo el producto sobre el agua base de la emulsión, con fuerte agitación en el momento de realizar la mezcla siendo aconsejable el uso de dosificador volumétrico DOSATRON, o similar.

En la preparación de la emulsión recomendamos utilizar agua con las características siguientes:

Dureza:	15 - 40 ° HF
Cloruros:	< 50 ppm
Sulfatos:	< 50 ppm

CONCENTRACIONES

Las concentraciones de uso sugeridas son las siguientes:

Mecanizado general	4-6%
Mecanizado severo	7 - 10%
Rectificado	3 - 5%

SUMINISTRO

HOCUT SB-5880 se suministra habitualmente en envases de 200 y 1000 Kg.

Nº edición: 1
Fecha revisión: 07/05-M.D.

La información contenida en esta Noticia Técnica es, en lo que respecta a nuestros conocimientos, correcta. Dado que el uso final del producto está fuera de nuestra supervisión, no nos hacemos responsables de su empleo indebido. Los valores aquí presentes son datos promedios y cualquier diferencia es debida al margen de especificación propio del proceso de fabricación.

HOUGHTON IBERICA, S.A.
P.I. Can Salvatella - Avda. Arraona, 73-79
08210 Barberà del Vallès BARCELONA
Tel. +34 93 718 85 00
Fax +34 93 718 93 00
info@houghton-ib.com





**FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD
según la Directiva 2001 / 58 / CE**

Página 1
Emitido: 07-abr-08
Nº revisión: 03

HOCUT SB-5880

1. IDENTIFICACION DE LA SUSTANCIA / PREPARADO Y DE LA EMPRESA

Nombre del producto: HOCUT SB-5880

Aplicación: Aceite de corte soluble para mecanizado de acero.

Empresa: HOUGHTON IBERICA S.A. Pol. Ind. CAN SALVATELLA - TORRE MATEU

Avda. Arraona 73-79 08210 Barberá del Vallés (BARCELONA)

Tel (93) 718 85 00 Fax (93) 718 93 00 e-mail: info@houghton-ib.com

Teléfono de emergencia: HOUGHTON IBERICA: 93 718 85 00

2. COMPOSICION / INFORMACION DE LOS COMPONENTES

Composición química: Mezcla de aceite mineral, agua y aditivos.

Componentes peligrosos:

NOMBRE:	Nº CAS	Nº EINECS	SIMBOLO	%	FRASES R
3-yodo-2-propinil butilcarbamato	55406-53-6	259-627-5	Xn , N	<2,5	20/22, 41, 50
Poliiglicoleter de alcohol graso	68920-66-1		Xi	2,5-10	38
Biocida.	66204-44-2	266-235-8	C	2,5-10	22-37/38-41-52
Alquil benzotriazol	80584-88-9		Xn	<2,5	22, 41, 43, 52/53
isopropanolamina	78-96-6		C	<2,5	34

3. IDENTIFICACION DE PELIGROS

Designación de peligrosidad: Xi Irritante.

Otros peligros: Irrita los ojos y la piel.

4. PRIMEROS AUXILIOS

Indicaciones generales: No es necesaria ninguna medida especial.

Contacto con la piel: Lavar con agua y jabón neutro. Sacar la ropa contaminada y lavarla antes de reutilizar. Acudir al médico.

Contacto con los ojos: Lavar con agua abundante durante al menos 15 minutos. Acudir al médico.

Inhalación: Llevar al aire fresco. Acudir al médico en caso de paro respiratorio y aplicar masaje artificial.

Ingestión: No inducir al vómito. Buscar asistencia médica.

Emitido: 07-abr-08

FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD**HOCUT SB-5880**

Página 2

5. MEDIDAS DE LUCHA CONTRA INCENDIOS**Medios de extinción adecuados:** Polvo seco, CO₂, espuma.**Medios de extinción no adecuados:** Agua a presión.**Riesgos de exposición:** En la descomposición térmica y combustión pueden desprenderse óxidos de carbono.**Equipo de protección especial:** Vestir equipo completo para productos químicos y llevar aparato de respiración autónoma.**6. MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL****Protección individual:** Evitar contacto con la piel, ojos y vestidos.**Protección medioambiental:** Prevenir la contaminación de suelo, aguas y desagües.**Métodos de limpieza:** Uso de materiales absorbentes y depositar en un contenedor para residuos que se pueda cerrar.**7. MANIPULACION Y ALMACENAMIENTO****Manipulación:** No comer, beber ni fumar en el lugar de trabajo.**Almacenamiento:** Mantener alejado de fuentes de ignición. Almacenar en el recipiente original cerrado de forma segura y a temperatura ambiente.**Usos específicos:** No aplicable.**8. CONTROLES DE EXPOSICION Y PROTECCION PERSONAL****Control límite de exposición:** Aceite mineral: TWA 8 h: 5 mg/m³**Protección personal:****- Respiratoria:** No necesaria en condiciones normales.**- Manos:** Guantes adecuados.**- Ojos:** Gafas de seguridad adecuadas con protección lateral.**- Piel:** Ropa adecuada para el trabajo y zapatos cerrados.**Medidas generales de protección e higiene:** Las estipuladas en empresas con manipulación de productos químicos.

Emitido: 07-abr-08

FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD
HOCUT SB-5880

Página 3

9. PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS

Aspecto: Líquido.	Punto de fusión: N.D.	°C
Color: Ambar.	Punto de ebullición: >100	°C
Olor: Ligero.	Punto de inflamación: N.A.	°C
Densidad a 15 °C: N.D.	Autoinflamabilidad: N.D.	°C
gr/c.c.	Coefficiente de reparto: N.D.	
Viscosidad a 40 °C: N.D.	Peligro de explosión: N.A.	
cSt.	Contenido solventes: N.D.	
Solubilidad en agua: Emulsionable.	Velocidad de evaporación: N.D.	
Solubilidad en aceite: Insoluble.	Propiedades comburentes: N.A.	
pH Concentrado: N.D.		
pH al N.D. %: N.D.		
Presión de vapor: N.D.		

Otras: pH al 7% en agua 15° HF = 9,3-9,8

N.A. : No Aplicable N.D. : No determinado

10. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

- Condiciones a evitar:** Superficies calientes, fuentes de ignición.
- Materias a evitar:** Ácidos y agentes oxidantes fuertes.
- Productos de descomposición peligrosos:**
En la descomposición térmica y combustión pueden desprenderse óxidos de carbono.

11. INFORMACION TOXICOLOGICA

- Toxicidad oral:** Puede provocar náuseas, diarrea o malestar del aparato digestivo.
- Toxicidad por inhalación:** En cantidades apreciables por los conductos respiratorios, puede producir dolor de cabeza.
- Toxicidad dérmica:** El contacto prolongado produce irritación.
- Toxicidad ocular:** El contacto prolongado produce irritación.
- Sensibilización:** Se desconocen efectos de sensibilización.
- Información adicional:** No aplicable.

12. INFORMACION ECOLOGICA

- Movilidad:** Producto soluble en agua.
- Biacumulación:** No determinado.
- Biodegradabilidad:** Por su composición, este producto es de biodegradabilidad media.
- Ecotoxicidad:** No determinado.
- Otros efectos nocivos:** Prevenir la contaminación del suelo, aguas o desagües.

Emitido: 07-abr-08

FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD

HOCUT SB-5880

Página 4

13. CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA ELIMINACION

Producto: Incinerar o depositar de acuerdo con las reglamentaciones locales.

Envase/Embalaje: Los embalajes no contaminados se tratarán como los residuos domésticos o como material reciclable. Los contaminados se tratarán igual que el producto.

Legislación comunitaria: Ley 10/1998 de Residuos, Ley 11/1997 de Envases y Residuos de Envases y posteriores modificaciones.

14. INFORMACION RELATIVA AL TRANSPORTE

Transporte terrestre ADR/RID: No clasificado como ADR/RID

Transporte marítimo IMDG/OMI: No clasificado como IMDG/OMI

Transporte aéreo CAO/IATA: No clasificado como ICAO/IATA

Información adicional: No aplicable.

15. INFORMACION REGLAMENTARIA

Simbolo CEE: Xi Irritante.

FRASES R/S: Contiene alquilbenzotriazol: puede provocar reacción alérgica.

R 36/38 Irrita los ojos y la piel.

S 26: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.

S 28: En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con....(productos a especificar por el fabricante).

S 60: Elimínense el producto y su recipiente como residuos peligrosos.

La clasificación anterior es aplicable al producto en su forma de suministro, no en emulsión.

16. OTRA INFORMACION

R 20/22: Nocivo por inhalación y por ingestión.

R 34: Provoca quemaduras.

R 41: Riesgo de lesiones oculares graves.

R 43: Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel.

R 50: Muy tóxico para los organismos acuáticos.

R 37/38: Irrita las vías respiratorias y la piel.

Esta información se basa en el estado actual de nuestros conocimientos. Su objetivo es describir nuestros productos desde el punto de vista de la seguridad, por lo que no garantiza propiedades concretas de los productos.

ANEXO 12: PREPARACIONES UTILIZADAS EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

A12.1. Preparación de citrato de plomo (fijador)

Receta de Elena Fedorova (Modificado de Reynolds, 1963)

- a) Llevar a ebullición 100 mL de agua Mili-Q en un erlenmeyer de 250 mL.
- b) Pasarla inmediatamente a hielo para que se enfríe y pierda rápidamente la capacidad de disolver el vapor generado.
- c) En un Erlenmeyer pequeño preparar: 8 mL de NaOH 1N (Merck, Artº. 106498) (0,16gr NaOH + 4 mL de agua).
- d) Solución de nitrato de plomo: Preparar en un erlenmeyer de 50 mL: 0,66 g $Pb(NO_3)_2$ (Merck, Artº. 107398) + 7,5 mL de agua.
- e) Solución de citrato sódico: En otro erlenmeyer de 50 mL preparar: 0,88 g $Na(C_6H_5O_7) \cdot 2H_2O$ (Sigma, Artº. S-4641) + 7,5 mL de agua.
- f) Agitar a mano, 10-15 minutos, las soluciones de nitrato y citrato. Mezclarlas muy bien en uno de los dos Erlenmeyer hasta que parezca leche muy homogénea.
- g) Añadir 4 mL de NaOH 1 N a la mezcla anterior (se tornará transparente). Agitar un ratito.
- h) Añadir agua hasta alcanzar 25 mL (concretamente añadir 6 mL). Agitar otro poco.
- i) Ponerlos en un vaso de precipitados de 50 mL para poder cargar con facilidad 8 jeringuillas al máximo e ir tapándolas, a medida que se cargan, con una aguja de jeringuilla con su funda de plástico. Envolverlas en papel de aluminio (en dos grupos de 4 es más cómodo) y guardarlas a 4 °C.
- j) Dejar pasar 24 horas antes de utilizarlo por primera vez. Caduca a los tres meses desde la preparación.

A12.2. Preparación de tetróxido de osmio (ácido ósmico) 2%

Debe prepararse, como mínimo, 24 horas antes de su empleo.

El día anterior a su preparación (48 horas antes de su empleo) lavar en mezcla sulfocrómica: Una varilla de vidrio gruesa, una probeta de 25 cc y un frasco de vidrio ámbar, con boca ancha y tapón esmerilado.

Al día siguiente, para preparar la solución, raspar la etiqueta de la ampolla de ácido ósmico y hacer una raya con la lima. Ponerla en agua caliente (se funde el ácido ósmico, tarda muy poco, no meter a fondo) e inmediatamente pasarla a hielo para que cristalice el sobre las paredes de la ampolla.

Meter la ampolla dentro del frasco con mezcla sulfocrómica y dejarla algunos minutos. Después, aclarar el frasco, con la ampolla dentro, sucesivamente con agua caliente, destilada y bidestilada. Sujetar la ampolla con pipeta Pasteur.

Romper la ampolla dentro del frasco con la varilla lavada (no hace falta llevarla al rojo). Añadir 12,5 mL de agua Milli-Q si la ampolla es de 250 miligramos.

No utilizarlo hasta pasadas 24 horas, como mínimo, mantenido en nevera. En el momento de la fijación, diluir el ácido ósmico (2%) en el mismo tampón (0,05 M) empleado en la fijación primaria. Obtener una concentración de 1%.

A12.3. Preparación de tampón de cacodilato 0,05 M

Disolver 5,35 gr. De cacodilato sódico en 500 mL de agua Milli-Q estéril. Ajustar el pH a 7,4 con HCl concentrado y mantener a 4 °C.

A12.4. Preparación de cacosacarosa

Añadir 25 mg sacarosa por mL de cacodilato sódico.

A12.5. Preparación de Acetato de Uranilo en etanol

Preparar una solución de EtOH 70% puro en agua Milli-Q, poner 1 g de uranilo y agitar bastante tiempo. Después filtrar con papel de filtro.

A12.6. Tinción de rejillas con citrato de plomo para microscopio electrónico

a) Poner durante 1 a 2 minutos las rejillas invertidas sobre gotas de CtPb dispuestas sobre parafilm en ambiente reducido con perlas de NaOH.

b) Lavar durante 10 minutos en gotas de agua milli-Q dispuestas sobre parafilm. Se obtiene un mejor resultado con H₂O hervida y enfriada rápidamente.

ANEXO 13: PATENTE “PROCEDIMIENTO PARA LA REDUCCIÓN DE LA DQO DE EFLUENTES LÍQUIDOS ACEITOSOS MEDIANTE FITORREMEDIACIÓN CON MAÍZ-ESPARTO; SU APLICACIÓN AL TRATAMIENTO DE TALADRINAS AGOTADAS”



① Número de publicación: **2 350 433**

② Número de solicitud: 201000684

⑤ Int. Cl.:
C02F 3/32 (2006.01)
A01G 31/00 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **26.05.2010**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **24.01.2011**

Fecha de la concesión: **29.08.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **08.09.2011**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
08.09.2011

⑰ Titular/es: **Fundación Universitaria San Pablo Ceu
c/ Isaac Peral, 58
28040 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Lucas García, José Antonio;
Grijalbo Fernández, Lucía;
Ramos Solano, Beatriz y
Gutiérrez Mañero, Francisco Javier**

⑲ Agente: **Fuentes Palancar, José Julián**

⑳ Título: **Procedimiento para la reducción de la DQO de efluentes líquidos aceitosos mediante fitorremediación con maíz-esparto; su aplicación al tratamiento de taladrinas agotadas.**

㉑ Resumen:

Procedimiento para la reducción de la DQO de efluentes líquidos aceitosos mediante fitorremediación con maíz-esparto; su aplicación al tratamiento de taladrinas agotadas.

Nuevo procedimiento para reducir la DQO (Demanda Química de Oxígeno) de efluentes líquidos aceitosos de origen industrial, basado en un sistema de fitorremediación constituido por un cultivo hidropónico de plantas de maíz en crecimiento sobre soportes de fibras de esparto en el interior de contenedores estancos convenientemente aireados, el cual, cuando es aplicado al tratamiento de taladrinas agotadas provenientes de la industria del mecanizado metálico, en sólo cinco días permite reducir la DQO a valores muy por debajo del nivel autorizado. El procedimiento es ventajoso respecto a los métodos tradicionales porque siendo un proceso ecológico de fitorremediación, con un residuo final biodegradable y reutilizable como fertilizante orgánico, es también más económico, al evitar el alto consumo de agua que supone la práctica común de dilución de los efluentes, o el alto coste de los biorreactores diseñados para el mismo fin.

ES 2 350 433 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

ES 2 350 433 B1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la reducción de la DQO de efluentes líquidos aceitosos mediante fitorremediación con maíz-
esparto; su aplicación al tratamiento de taladrinas agotadas.

5 El objeto de la presente invención es un nuevo procedimiento para reducir la DQO (Demanda Química de Oxígeno) de efluentes líquidos aceitosos de origen industrial, como son en particular las taladrinas agotadas provenientes de la industria del mecanizado metálico, basado en un sistema de fitorremediación constituido por un cultivo hidropónico de plantas de maíz en crecimiento sobre soportes de fibras de esparto en el interior de contenedores estancos convenientemente aireados. Cuando el efluente líquido contaminado se mantiene durante un tiempo en estos contenedores
10 en contacto con el medio creado por el entramado de raíces de plantas de maíz enmarañadas en las fibras de esparto, se produce una importante disminución de su DQO, hasta valores que posibilitan su evacuación a los cauces fluviales o red de saneamiento sin infracción de las leyes medioambientales, siendo el residuo final del proceso, las raíces de maíz-esparto que quedan en los contenedores, totalmente biodegradable, pudiendo ser utilizado como fertilizante orgánico.

15 El procedimiento ha sido aplicado con éxito y demostrada su viabilidad técnica y económica en el caso particular de la descontaminación de taladrinas agotadas, que es un residuo líquido aceitoso generado principalmente por empresas de transformación mecánica del metal, que está considerado como residuo peligroso por la ley, y que en un porcentaje muy elevado es vertido directamente al medio diluido con agua, con el consiguiente perjuicio ambiental. Con el
20 presente procedimiento se consigue reducir en poco tiempo la DQO de este tipo de efluente líquido peligroso desde los valores medios medidos en los deshechos, muy por encima de lo permitido por la normativa, hasta valores muy por debajo del límite de infracción, y con todas las ventajas que el proceso conlleva.

25 El proceso es ventajoso respecto a los métodos que actualmente se están ya aplicando para resolver la problemática de la elevada DQO de las taladrinas agotadas y, en general, de los efluentes industriales aceitosos, porque siendo un proceso ecológico, al basarse en una técnica de fitorremediación, con un residuo final biodegradable y reutilizable, es también mucho más económico, al evitar el gasto en infraestructuras y alto consumo de agua que supone la práctica común de dilución de dichos efluentes antes de su vertido final, o el alto coste de los últimos biorreactores específicamente diseñados para el mismo fin.

30

Campo técnico

35 El campo técnico en que se encuadra la presente invención es el de las técnicas de tratamiento de los efluentes líquidos aceitosos procedentes de la industria, a fin de reducir hasta niveles permitidos su grado de contaminación orgánica, cuantificado por el parámetro DQO (Demanda Química de Oxígeno), y, en concreto, las técnicas basadas en métodos de fitorremediación, por las que se utilizan diversos tipos de plantas para la descontaminación de aguas y suelos contaminados.

40

Estado de la técnica

45 Sobre el referido campo técnico de la invención cabe decir que no se conoce de la existencia actual de técnicas de fitorremediación utilizando plantas o partes de plantas de maíz (tallos, raíces,...) para el tratamiento de efluentes líquidos aceitosos de uso industrial, como es el caso de las taladrinas agotadas, o al menos no se han encontrado patentes al respecto tras búsquedas en bases de datos de cobertura mundial.

50 Sólo se han visto dos patentes sobre procedimientos de fitorremediación de efluentes utilizando plantas de maíz, pero con el fin de eliminar residuos o contaminantes distintos a los oleosos. Una es la patente china con número de publicación CN101492206A (prioridad 09/03/2009), relativa a un método para la depuración *in situ* de aguas subterráneas contaminadas con nitrógeno mediante tallos de plantas de maíz, caracterizado porque esta paja de maíz, o un hidrolizado de la paja de maíz, sirve como fuente de carbono para la desnitrificación y como coadyuvante de la flora de bacterias desnitrificante. La otra patente es una solicitud internacional PCT con número de publicación
55 WO9636568, que ha dado lugar a una familia de patentes, relativa a un método para la eliminación de metales solubles de una fase acuosa, que comprende etapas en las cuales la solución con metales entra en contacto con la parte inferior de una planta terrestre, como puede ser en concreto maíz (reivindicación 16).

60 Aunque estos documentos presentan tecnologías de fitorremediación con plantas de maíz para el tratamiento biológico de aguas residuales, la finalidad perseguida y los sistemas utilizados son muy diferentes a los de la invención en cuestión, cuyo objetivo es conseguir que efluentes con alto contenido en aceites reduzcan su DQO por debajo de los valores permitidos, mediante un sistema no contemplado en ninguno de los casos anteriores, constituido por una serie de contenedores en los que se crea un entramado de raíces de plantas de maíz y fibras de esparto mediante un flujo adecuado de aire.

65 Uno de dichos efluentes más problemáticos son las taladrinas agotadas procedentes de la industria del mecanizado metálico, que por normativa deben de reducir su DQO por debajo de límites establecidos antes de poder ser evacuadas al medio ambiente, y ha sido este tipo de líquido aceitoso residual sobre el que se ha aplicado y desarrollado experimentalmente la tecnología objeto de la presente solicitud de patente.

ES 2 350 433 B1

Las taladrinas forman parte de un grupo de productos pertenecientes al grupo de los fluidos de corte y mecanizado utilizados principalmente por las empresas de transformación mecánica del metal y que las utilizan básicamente para refrigerar y lubricar las zonas de contacto entre la pieza que se está fabricando y la herramienta. Las taladrinas mejoran el acabado superficial de la pieza y alargan la vida de la herramienta.

5 Las taladrinas están constituidas principalmente por aceites minerales y se comercializan de forma concentrada. Posteriormente son diluidas con agua en la propia empresa que las utiliza. Normalmente se utilizan emulsiones de taladrinas del 5%. Al cabo de cierto tiempo de utilización la taladrina pierde sus propiedades teniendo que ser sustituidas por nuevas. Estas "taladrinas agotadas" tienen que ser gestionadas debidamente, ya que están consideradas como residuo peligroso. Debido a ello su manipulación esta regulada por la Ley 20/1986, de 14 de mayo, Básica de Residuos Tóxicos y Peligrosos y el Real Decreto 833/1988, de 20 de julio, por el que se aprueba, el Reglamento para la ejecución de la Ley 20/1986, Básica de Residuos Tóxicos y Peligrosos.

15 Algunas empresas han incorporado sistemas para separar el agua de los aceites, de forma que el aceite puede ser gestionado por empresas autorizadas. Muchas otras empresas se deshacen de las taladrinas agotadas vertiéndolas diluidas a los sistemas de saneamiento o a los cauces fluviales. Incluso en el primer caso, no es posible separar completamente el aceite y el agua, generando un residuo líquido mucho menos concentrado en aceite, pero que no cumple con las especificaciones que marca la ley 10/1993 de 26 de octubre sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento y con disposiciones locales mas exigentes, por lo que al final tienen que ser vertidos al sistema integral de saneamiento igualmente muy diluidos.

El problema que conlleva el diluir con agua las taladrinas agotadas, y en general los efluentes industriales líquidos aceitosos, a fin de bajar la DQO a valores permitidos, es que el gasto de agua es extremadamente elevado.

25 Por ello en los últimos años se están introduciendo procedimientos biológicos llevados a cabo en biorreactores que son capaces de remediar las taladrinas hasta cumplir con la normativa vigente y ser vertidos sin problemas aparentes, sin embargo son procesos muy costosos y con problemas técnicos aun sin resolver.

30 En dicho sentido cabe destacar la patente española con número de publicación ES2264883B1, de la Universidad de Cádiz (prioridad 15-04-2005), que propone un biorreactor para degradar residuos acuo-oleosos en reactores con biomasa inmovilizada. En ella se reconoce el coste elevado de desarrollo del proceso, debido a los materiales empleados y a las condiciones ambientales que es necesario crear para su correcto desarrollo, además, dado que las taladrinas también incorporan compuestos de naturaleza tóxica (trazas de metales, biocidas, inhibidores de la corrosión, etc.), que inhiben el proceso microbiológico en el que se basa este tipo de degradación, el rendimiento final se ve afectado.

35 Por todo lo arriba indicado queda claro el coste ambiental (vertido directo en sistemas de saneamiento o cauces), social (enorme gasto de agua utilizada para diluir el residuo) y económico (para empresas y administraciones publicas que tienen que gestionar los residuos) que genera este tipo de residuos procedentes de la industria de los transformados metálicos.

45 El procedimiento de invención que se expone viene a solucionar en gran parte los comentados problemas que conlleva la gestión de las taladrinas agotadas y, en general, de los efluentes industriales líquidos aceitosos. Como ya se introducido en la presente memoria descriptiva, dicho procedimiento consiste en utilizar plantas de maíz creciendo en contenedores en cultivo hidropónico utilizando fibra de esparto como soporte de crecimiento de las raíces de la planta, en unas condiciones de flujo continuo de aire para evitar situaciones de anoxia en las raíces.

50 Como se especificará posteriormente en el apartado de resultados experimentales, en el caso del tratamiento de taladrinas agotadas en muy poco tiempo se consigue reducir la DQO de estos residuos desde valores que imposibilitan su evacuación al medio, hasta valores muy por debajo de lo permitido por la normativa.

Compendio de la invención

55 Concretamente, el procedimiento reivindicado de invención es un proceso para la reducción de la DQO (Demanda Química de Oxígeno) de efluentes industriales líquidos aceitosos basado en una técnica de fitorremediación con maíz-esparto, más exactamente con un medio vegetal constituido por un entramado de raíces de plantas de maíz enmarañadas con fibras de esparto, con aireación continua de las raíces.

60 El proceso se lleva a cabo mediante la entrada de un caudal del efluente líquido aceitoso a descontaminar en contenedores estancos provistos de bombas de flujo de aire en los que crecen en un ambiente convenientemente aireado cultivos hidropónicos de plantas de maíz sobre soportes de fibras de esparto, de modo que cuando el líquido contaminado se mantiene en contacto directo con el entramado de raíces de plantas de maíz enmarañadas en fibras de esparto creado en cada contenedor, se produce la degradación de la materia orgánica por proceso de fitorremediación, con la consiguiente disminución de la DQO del efluente, que queda listo para su evacuación de los contenedores mediante caudal de salida. El proceso es completamente ecológico porque el residuo que queda en los contenedores, el entramado de raíces de plantas de maíz y esparto, es biodegradable, lo que posibilita su utilización tras un proceso de compostaje como fertilizante orgánico.

ES 2 350 433 B1

Cuando este proceso se aplica al tratamiento de taladrinas agotadas provenientes de la industria del mecanizado metálico, se ha comprobado experimentalmente, que al cabo de sólo cinco días de la puesta en contacto de estos efluente aceitoso con el cultivo hidropónico aireado de raíces de planta de maíz enmarañadas con fibras de esparto, se reduce su DQO desde valores de alrededor de 2000 ppm hasta aproximadamente valores alrededor de 500 ppm, muy por debajo de los 17 50 ppm marcados como límite en la ley 10/1993.

Por consiguiente, el nuevo procedimiento desarrollado en base a tecnología de fitorremediación para la reducción de la Demanda Química de Oxígeno de taladrinas agotas, aplicable igualmente a otros efluentes oleosos provenientes de la industria, es un procedimiento viable técnica y económicamente, que consigue solucionar muchos problemas producidos por dicho tipo de residuos, generando secundariamente algunos beneficios.

El procedimiento tiene un coste muy reducido y los residuos sólidos que generan (maíz y esparto) son fácilmente biodegradables, pudiendo ser utilizados como fertilizantes orgánicos. Por otra parte la utilización de las fibras de esparto puede revitalizar una industria que fue muy potente en nuestro país por su gran producción, pero que podría desaparecer en poco tiempo por el su escaso uso que se hace de las fibras de esparto en la actualidad.

Planos y dibujos

Para la mejor comprensión del sistema desarrollado, en la Figura 1 se muestra un esquema del procedimiento de cultivo: entramado de raíces de maíz-esparto (1) en contacto con el líquido contaminado (2), con aireación continua de las raíces mediante bomba de flujo de aire (3).

Puesta en práctica

Los experimentos que se describen a continuación para la reducción de la DQO de taladrinas agotadas se basan en un sistema de cultivo de plantas de maíz en condiciones hidropónicas en las cuales las raíces de la planta quedan entrelazadas con fibras de esparto, que hacen de soporte de crecimiento de dichas raíces. El sistema debe estar bajo un flujo continuo de aire para evitar situaciones de anoxia que comprometen la viabilidad de las plantas. Aunque el procedimiento que se detalla en los experimentos se ha realizado en condiciones de laboratorio en pequeños contenedores, el sistema puede ser escalado a nivel industrial manteniendo las condiciones básicas del cultivo, es decir, maíz creciendo sobre fibras de esparto como soporte y con aireación continua.

A continuación se exponen los experimentos llevados a cabo y los resultados obtenidos.

Primer experimento

Se utilizaron plántulas procedentes de semillas de maíz que habían sido germinadas previamente en placas de Agar Bacteriológico Europeo. Dichas plántulas se colocaron en contenedores de 1 litro de volumen, sobre rejillas metálicas y fibras de esparto a modo de soporte para las plántulas. Se hicieron dos tratamientos:

- Contenedor control, consistente en un contenedor del volumen descrito anteriormente con agua de taladrinas en su interior, sin plántulas de maíz ni fibras de esparto. Se pretendió así determinar si existía una degradación natural de dicha agua residual.
- 5 contenedores experimentales, en los cuales se habían colocado las plántulas de maíz con sus raíces enmarañadas con fibras de esparto.

Una vez pregerminadas las semillas, durante 2 días a 28°C, se pasaron a los contenedores experimentales, poniendo en cada una de las cinco réplicas 20 semillas. Estos contenedores control se rellenaron con agua corriente. Tras 15 días, cuando las plantas habían alcanzado una altura media de 25 cm., se les cambió el agua corriente por agua con taladrinas, con una DQO de 1823 ppm. El sistema se mantuvo en todo momento en aireación con una bomba de membrana M2K3 de Schego, con un caudal de aire de 350 l/h y a una temperatura de entre 27 y 30°C.

Después de 6 días de crecimiento de las plantas en el agua con taladrinas, se midió la DQO. Tras dicha medida, se cambió el agua con taladrinas por una nueva, con la misma DQO de partida (1811 ppm), tanto en el contenedor control como en los 5 experimentales. Transcurridos 5 días, se volvió a determinar la DQO. El procedimiento utilizado para cuantificar la DQO es análogo al de la EPA 410.4 US Standard Methods 5220D, y también al de la ISO 15705. En la Tabla I se muestran los valores de la DQO en ppm, indicando el error estándar (\pm), en el contenedor control, únicamente con agua de taladrinas, y en los contenedores experimentales que contienen el maíz con fibras de esparto y el agua de taladrinas a fitorremediar.

ES 2 350 433 B1

TABLA I

Contenedor	DQO partida	DQO tras 5 días	DQO agua taladrinas intercambiada	DQO 6 días después
Control	1811	1804 ± 25	1811	1830 ± 30
Maíz + Esparto + Agua de taladrinas	1811	724 ± 73	1811	695 ± 46

Como puede deducirse de los datos mostrados en la Tabla I, la DQO del control apenas varió durante el experimento, lo que indica que no existe ningún proceso interno de degradación de las taladrinas por sí solas. Este control no se volvió a realizar en los siguientes experimentos. En cambio, las plantas de maíz creciendo sobre fibras de esparto redujeron la DQO en un 60% en la primera medida y en un 61,1% en la segunda.

Segundo experimento

Se realizó bajo las mismas condiciones del primero en lo referente a temperaturas, caudal de aireación y condiciones de pregerminación de las plántulas. En este caso, después de transcurridos 5 días de crecimiento de las plantas sobre las fibras de esparto en contacto con el agua de taladrinas, se midió la DQO y se cambió el agua contaminada de los contenedores por otra nueva con la misma DQO que la obtenida en la medición. Pasados 2 días de este cambio, se volvió a medir la Demanda Química de Oxígeno.

La Tabla II muestra los valores de DQO en ppm, considerando el error estándar, en el tratamiento con maíz creciendo sobre fibra de esparto y el agua de taladrinas a fitorremediar.

TABLA II

Contenedor	DQO partida	DQO 5 días después	DQO agua taladrinas intercambiada	DQO 2 días después
Maíz+Esparto+Agua de taladrinas	1477	643 ± 56	643	451 ± 12

Con los datos de la tabla, puede observarse de nuevo que el sistema maíz + esparto redujo considerablemente la DQO del agua de taladrinas, en este caso un 69,4%.

Tercer experimento

En el tercer experimento y en los siguientes, las condiciones ambientales (temperatura, caudal de aire introducido) fueron las mismas que las descritas para el primer experimento. La principal diferencia respecto a éste estriba en que solo se hizo una medida de la DQO a los 5 días de añadir el agua de taladrinas al sistema, y además se inocularon los contenedores con una bacteria para intentar mejorar el proceso de biorremediación. Las bacterias empleadas fueron TP9 (*Bacillus licheniformis*), aisladas previamente de las propias taladrinas o del esparto empleado en los experimentos.

Previo al experimento, y como en los anteriores casos, se pregerminaron las semillas de maíz durante 2 días, a 28°C, se pusieron 20 semillas por contenedor y se rellenaron con agua del grifo.

ES 2 350 433 B1

Transcurridos 12 días, se realizó un primer inóculo con una solución bacteriana de 10^9 ufc/mL, de manera que, como el volumen de agua depositado en el contenedor es de 900 mL, la concentración final de bacterias en el depósito fue de 10^7 ufc/mL. El cambio de agua de taladrinas por agua del grifo tuvo lugar 15 días después de que se pusieran las semillas en los contenedores, es decir, 3 días después de inocular la solución bacteriana, cuando las plantas de maíz habían alcanzado una altura media de 32 cm. Una hora después de haber realizado el cambio de agua, se efectuó una nueva inoculación.

Como se ha indicado anteriormente, a los 5 días de introducir el agua de taladrinas en el sistema se realizó una medición de la DQO. Los resultados se muestran en la Tabla III.

TABLA III

Experimento	DQO inicial	DQO tras 5 días
Maíz+Esparto+Bacteria+Agua de taladrinas	1678	533 ± 29
Maíz+Esparto+Agua de taladrinas	1678	490 ± 25

Se observa de nuevo que el sistema constituido por el maíz creciendo con fibras de esparto es capaz de reducir significativamente la DQO de partida. En este caso, la adición del inóculo bacteriano consiguió reducir el parámetro DQO en un 68% respecto a la inicial, mientras que sin dicho inóculo la reducción fue del 70,8%.

Los siguientes experimentos son similares al tercero, variando únicamente el tipo de cepa bacteriana inoculado y la DQO de partida, que es ligeramente superior.

Cuarto experimento

Se utilizó un agua de taladrinas con una DQO de partida de 1800 ppm, inoculándose el sistema con la cepa Esp21, identificada como levadura por su aspecto al microscopio. Los resultados de la medición realizada a los 5 días de introducir el agua de taladrinas en el sistema preconizado se reflejan en la siguiente Tabla IV:

TABLA IV

Experimento	DQO Inicial	DQO tras 5 días
Maíz+Esparto+Inóculo+Agua de taladrinas	1800	921 ± 20
Maíz+Esparto+Agua de taladrinas	1800	784 ± 36

De nuevo el sistema formado por maíz creciendo en fibras de esparto consigue reducir significativamente la DQO inicial del agua de taladrinas, siendo en este caso la disminución de un 49% en el caso en que se inocula la bacteria Esp 21, y de un 50% si no se realiza esa inoculación.

Quinto experimento

La DQO del agua de taladrinas introducida 15 días después de la colocación de las semillas en los contenedores fue ligeramente inferior a la del cuarto experimento (1726 ppm). La cepa bacteriana inoculada es en este caso la conocida como Aur6 (*Pseudomonas fluorescens*).

ES 2 350 433 B1

La medición de los valores de la DQO realizada 5 días después de la introducción del agua de taladrinas en el sistema arrojó los resultados que se muestran en la Tabla V:

5

TABLA V

Experimento	DQO inicial	DQO tras 5 días
Maíz+Esparto+Inóculo+Agua de taladrinas	1726	819 ± 20
Maíz+Esparto+Agua de taladrinas	1726	784 ± 36

10

15

20 Se confirma otra vez que el sistema preconizado reduce significativamente la DQO de partida. En este caso dicha reducción representa un 52,5% respecto de la inicial en el caso en que se inocula la cepa bacteriana Aur6, y un 54,5% sin dicha inoculación.

25 Sexto experimento

La DQO de partida fue de 1779 ppm, y la disolución bacteriana añadida procedía de la cepa Esp1, identificada como del género Enterobacter por la secuenciación parcial del gen 16s.

30 Los valores de la medición realizada transcurridos 5 días desde la introducción en el sistema del agua de taladrinas se reflejan en la siguiente Tabla VI:

35

TABLA VI

Experimento	DQO inicial	DQO tras 5 días
Maíz+Esparto+Bacteria+Agua de taladrinas	1779	683 ± 28
Maíz+Esparto+Agua de taladrinas	1779	632 ± 23

40

45

50 Una vez más, otro experimento demuestra que el sistema constituido por maíz creciendo con fibra de esparto reduce en gran medida la DQO inicial del agua de taladrinas. En este caso, dicha reducción es de un 61,4% respecto del inicial en el caso en que se inocula la disolución bacteriana, y un 64,5% sin añadir la bacteria.

55

60

65

ES 2 350 433 B1

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la reducción de la DQO (Demanda Química de Oxígeno) de efluentes industriales líquidos aceitosos mediante fitorremediación con maíz-esparto, **caracterizado** por llevarse a cabo mediante la entrada de un caudal de efluente líquido aceitoso en contenedores estancos provistos de bombas de flujo de aire en los que crecen cultivos hidropónicos de plantas de maíz sobre soportes de fibras de esparto con aireación continua de las raíces, de modo que cuando el líquido contaminado se mantiene en contacto directo con el entramado de raíces de plantas de maíz enmarañadas en fibras de esparto creado en cada contenedor, se produce la degradación de la materia orgánica por proceso de fitorremediación, con la consiguiente disminución de la DQO del efluente a que se da salida, resultando en los contenedores un residuo de raíces de plantas de maíz y esparto que es biodegradable.

2. Procedimiento para la reducción de la DQO de efluentes industriales líquidos aceitosos mediante fitorremediación con maíz-esparto, según primera reivindicación, **caracterizado** porque cuando se aplica al tratamiento de taladrinas agotadas provenientes de la industria del mecanizado metálico, al cabo de cinco días de la puesta en contacto del efluente líquido aceitoso con el cultivo hidropónico aireado de raíces de planta de maíz enmarañadas con fibras de esparto, se reduce la DQO del líquido desde valores entorno a 2000 ppm hasta valores entorno a 500 ppm.

3. Procedimiento para la reducción de la DQO de efluentes líquidos aceitosos mediante fitorremediación con maíz-esparto, según reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el residuo resultante del proceso, el entramado de raíces de plantas de maíz y esparto, es utilizable tras un proceso de compostaje como fertilizante orgánico.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 350 433 B1

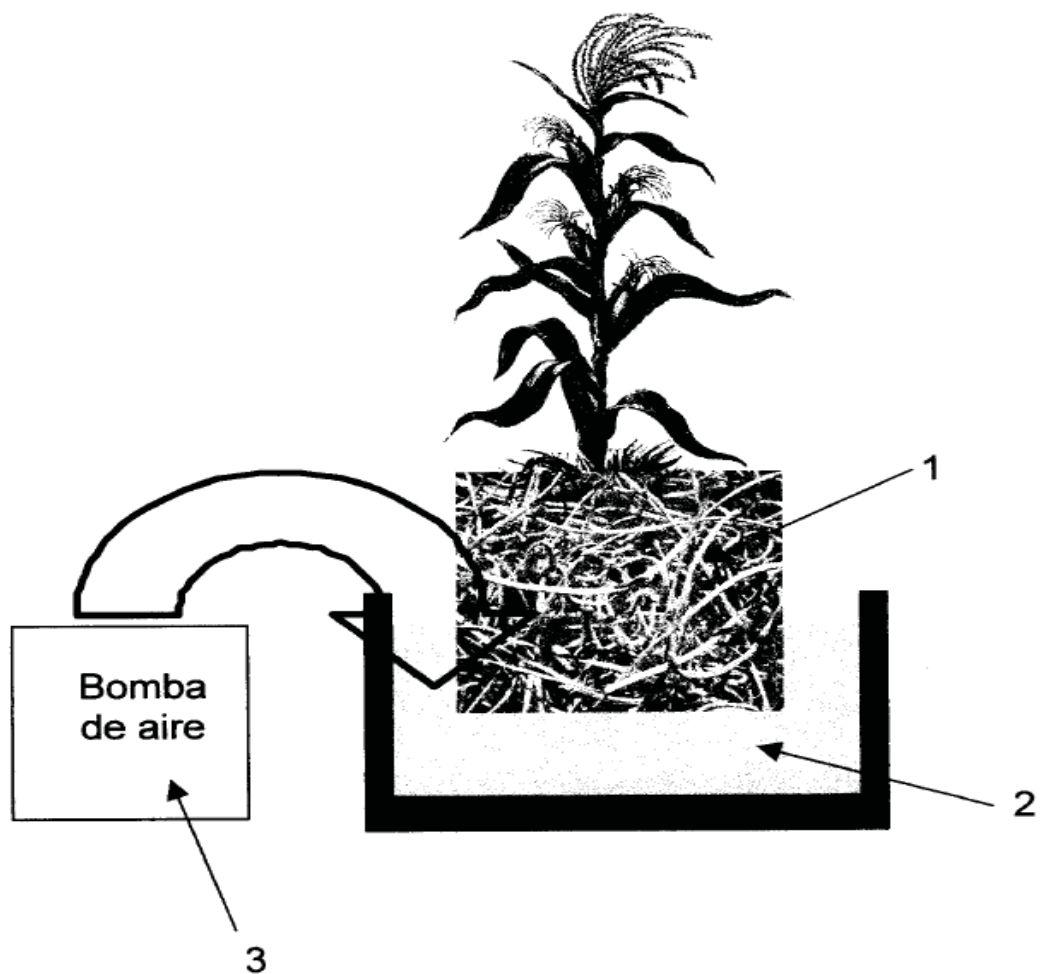


Fig. 1



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ① N.º solicitud: 201000684
- ② Fecha de presentación de la solicitud: 26.05.2010
- ③ Fecha de prioridad: 00-00-0000
00-00-0000
00-00-0000

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.:	C02F 3/32 (2006.01) A01G 31/00 (2006.01)
-------------	---

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DOMINGUEZ-ROSADO, E. AND PICHTEL, J. "Phytoremediation of Soil Contaminated with Used Motor Oil: II. Greenhouse Studies". Environmental Engineering Science. Volumen 21, Número 2, 2004. páginas 169-180.	1-3
A	CONLEY, L. et al. "An assessment of the root zone method of wastewater treatment". Research Journal WPCF. Volumen 63, Número 3, 1991. páginas 239-247.	1-3
A	WO 03042115 A1 (IASIS USA LC) 22.05.2003, página 4, líneas 1-17; página 8, línea 7 - página 10, línea 11; resumen.	1-3
A	CN 101492206 A (UNIV HEFEI TECHNOLOGY) 29.07.2009, resumen. [en línea] [recuperado el 04.10.2010]. Recuperado de: EPODOC Database.	1-3
<p>Categoría de los documentos citados</p> <p>X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica</p> <p>Q: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud</p>		
<p>El presente informe ha sido realizado</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> para todas las reivindicaciones <input type="checkbox"/> para las reivindicaciones nº:</p>		
<p>Fecha de realización del informe 15.10.2010</p>	<p>Examinador B. Aragón Urueña</p>	<p>Página 1/4</p>

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

Nº de solicitud: 201000684

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C02F, A01G

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP

OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 201000684

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.10.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-3	SÍ
	Reivindicaciones _____	
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-3	SÍ
	Reivindicaciones _____	

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 201000684

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Phytoremediation of Soil Contaminated with Used Motor Oil: II. Greenhouse Studies	2004
D02	An assessment of the root zone method of wastewater treatment	1991
D03	WO03042115	22.05.2003
D04	CN101492206	29.07.2009

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la presente invención es un procedimiento para la reducción de la DQO de efluentes líquidos aceitosos mediante fitorremediación con maíz-esparto.

El documento D01 divulga el tratamiento de recuperación que se realiza sobre un suelo contaminado por aceites de motores. Para ello se emplea la técnica de fitorremediación empleando, entre otras plantas, maíz.

El documento D02 realiza la valoración del tratamiento de aguas residuales mediante el empleo de plantas hidrofitas con una extensa red de raíces y rizomas, tipo juncos. En el estudio se valora los buenos resultados que se obtienen midiéndose en términos de DBO (demanda bioquímica de oxígeno).

El documento D03 divulga un procedimiento para el tratamiento de agua residual. Una de las etapas de tratamiento se basa en un reactor hidropónico. El propósito es la reducción de la DBO, eliminación de sólidos en suspensión y denitrificación.

El documento D04 divulga un método para realizar la denitrificación de aguas subterráneas mediante plantaciones de maíz.

Ninguno de los documentos citados, tomado solo o en combinación, revela ni contiene sugerencia alguna que dirija al experto en la materia hacia el procedimiento para la reducción de la DQO de efluentes líquidos aceitosos con plantas de maíz-esparto tal de manera que las raíces de las plantas se convierten en un residuo biodegradable tal y como se muestran en la invención. En consecuencia, las reivindicaciones 1-3 de la solicitud reúne los requisitos de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 Ley Patentes).

**ANEXO 14: COMPARACIÓN DEL
ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS
DE LAS MUESTRAS INICIALES Y
FITORREMEIADAS DURANTE UN
PERIODO DE 5 DÍAS**

Tabla A4. Análisis de hidrocarburos cualitativo de las muestras inicial y fitorremediadas durante un periodo de 5 días con las cepas Aur 6, Esp1, Esp14, TP9 y el consorcio. (+) indica la presencia del hidrocarburo en la muestra; (-) indica la ausencia del mismo.

	$C_{12}H_{19}NO$ (5.77 min)	C_6H_6O (6.80 min)	$C_{14}H_{30}O$ (7.30 min)	$C_6H_{16}OSi$ (7.32 min)	$C_9H_{18}O_2$ (8.54 min)	$C_8H_{18}O_3$ (9.17 min)	$C_8H_{10}O_2$ (9.55 min)	$C_{16}H_{24}N_2O$ (9.59 min)	$C_{16}H_{34}O_3S$ (11.19 min)	$C_{12}H_{23}N$ (11.49 min)	$C_{13}H_{25}N$ (12.25 min)	$C_{22}H_{23}NO_4$ (14.90 min)
Inicial	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Plantas no inoculadas	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
Plantas inoculadas con TP9		-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
Plantas inoculadas con Aur 6	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-
Plantas inoculadas con Esp1	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Plantas inoculadas con Esp14	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
Plantas inoculadas con el consorcio	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-

Tabla A5. Análisis de hidrocarburos cuantitativo de las muestras inicial y fitorremediadas durante un periodo de 5 días con las cepas Aur 6, Esp1, Esp14, TP9 y el consorcio. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,5$)

	Muestra inicial	Plantas no inoculadas	Plantas inoculadas con TP9	Plantas inoculadas con Aur 6	Plantas inoculadas con Esp1	Plantas inoculadas con Esp14	Plantas inoculadas con el consorcio
ppm	12.53±0.28 e	2.32±0.06 a	4.14±0.89 c	3.01±0.10 ab	3.18±0.01 b	8,27±0.39 d	2.40±0.00 ab

**ANEXO 15: CEPAS AISLADAS DEL
REACTOR BIOLÓGICO DE
MEMBRANA (R. B. M.)**

Tabla A6. Bacterias aisladas del reactor biológico de membrana (R. B. M.). RBM-A: cepas aisladas en el muestreo A; RBM-B: cepas aisladas en el muestreo B; RBM-C: cepas aisladas en el muestreo C; RBM-D: cepas aisladas en el muestreo D; RBM-E: Cepas aisladas en el muestreo E.

Nombre cepa	Aislamiento	T ^a Aislamiento y tiempo de crecimiento	Morfología mucílago	Morfología colonia	Gram	Afiliación taxonómica según Genbank y n° acceso
RBM-A1	Agar nutritivo	30 °C 48 horas	Blanquecino (fluorescente)	Bacilos	Negativo	<i>Pseudomonas migulae</i> JF937322
RBM-A3	Agar nutritivo	30 °C 48 horas	Blanquecino	Bacilos	Negativo	<i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i> JF937323
RBM-A4	Agar nutritivo	30 °C 48 horas	Blanquecino	Bacilos	Negativo	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> JF937324
RBM-A5	Agar nutritivo	30 °C 48 horas	Anaranjado	Cocos unidos	Negativo	<i>Shewanella sp.</i> JF937325
RBM-A8	Agar nutritivo	30 °C 48 horas	Blanco - amarillento	Cocos	Negativo	<i>Comamonas</i> <i>sp.</i> JF937326
RBM-A10	Agar nutritivo	30 °C 48 horas	Blanco- Amarillento	Bacilos	Negativo	<i>Bosea sp.</i> JF937326
RBM-A11	Agar con taladrina	30 °C 48 horas	Blanco - anaranjado	Bacilos	Negativo	<i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i> JF937328
RBM-A12	Agar con taladrina	30 °C 48 horas	Blanquecino	Diplococos	Negativo	<i>Acinetobacter johnsonii</i> JF937329
RBM-A13	Agar con taladrina	30 °C 48 horas	Blanco - amarillento	Bacilos	Negativo	<i>Pseudomonas stutzeri</i> JF937330
RBM-A15	Agar con taladrina	30 °C 48 horas	Blanquecino (fluorescente)	Bacilos	Negativo	<i>Pseudomonas migulae</i>
RBM-A16	Agar con taladrina	30 °C 48 horas	Blanco-rosada	Diplococos	Negativo	<i>Acinetobacter johnsonii</i> JF937331
RBM-A17	Agar nutritivo	25 °C 48 horas	Blanquecino	Bacilos	Negativo	<i>Pseudomonas migulae</i> JF937333
RBM-A19	Agar nutritivo	25 °C 48 horas	Blanquecino	Bacilos	Negativo	<i>Pseudomonas migulae</i> JF937334
RBM-A21	Agar nutritivo	25 °C 7 días	Blanquecino	Cocos	Negativo	<i>Afipia sp.</i> JF937335
RBM-A22	Agar nutritivo	25 °C 7 días	Blanquecino	Bacilos	Negativo	<i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i> JF937336

Tabla A6. Continuación.

Nombre cepa	Aislamiento	T ^a Aislamiento y tiempo de crecimiento	Morfología mucílago	Morfología colonia	Gram	Afiliación taxonómica según Genbank y n° acceso
RBM-A23	Agar con taladrina	25 °C 7 días	Amarillo	Bacilos	Negativo	<i>Sphingobium xenophagum</i> JF937337
RBM-A24	Agar con taladrina	25 °C 7 días	Blanquecino	Bacilos pequeños	Negativo	<i>Acidovorax temperans</i> JF937338
RBM-A25	Agar con taladrina	25 °C 7 días	Blanco - amarillento	Bacilos pequeños	Negativo	<i>Brevundimonas bullata</i> JF937339
RBM-A26	Agar con taladrina	25 °C 7 días	Rosado	Corineforme	Negativo	<i>Shewanella putrefaciens</i> JF937340
RBM-A27	Agar con taladrina	25 °C 7 días	Blanquecino	Bacilos pequeños	Negativo	<i>Acidovorax temperans</i> JF937341
RBM-B1	Agar cono taladrina	30 °C 48 horas	Blanco – amarillento	Bacilos	Negativo	<i>Pseudomonas</i> sp. JF937342
RBM-B2	Agar nutritivo	25 °C 48 horas	Blanco	Cocos	Negativo	<i>Citrobacter gillenii</i> JF937343
RBM-B3	Agar nutritivo	30 °C 48 horas	Blanco - Anaranjado	Cocos unidos	Negativo	<i>Shewanella</i> sp. JF937344
RBM-B4	Agar nutritivo	30 °C 48 horas	Blanco	Bacilos pequeños	Negativo	<i>Riemerella</i> sp. JF937345
RBM-B5	Agar nutritivo	30 °C 48 horas	Blanco	Bacilos	Negativo	<i>Bacterium</i> JF937346
RBM-B8	Agar nutritivo	25 °C 48 horas	Blanco – amarillento	Bacilos	Negativo	<i>Pseudomonas</i> sp. JF937347
RBM-B9	Agar con taladrina	25 °C 48 horas	Blanco – amarillento	Bacilos	Negativo	<i>Pseudomonas</i> sp. JF937348
RBM-B10	Agar con taladrina	25 °C 48 horas	Blanco - amarillento	Cocos unidos	Negativo	<i>Comamonas</i> sp. JF937349
RBM-B12	Agar nutritivo	30 °C 7 días	Blanco	Bacteria pequeña	Negativo	<i>Rhizobium borbori</i> JF937350
RBM-B13	Agar nutritivo	30 °C 7 días	Amarillento	Bacilos	Negativo	<i>Novosphingobium hassiacum</i> JF937351
RBM-B14	Agar nutritivo	30 °C 7 días	Blanco	Cocos	Negativo	<i>Ancylobacter</i> sp. JF937352

Tabla A6. Continuación.

Nombre cepa	Aislamiento	T ^a Aislamiento y tiempo de crecimiento	Morfología mucilago	Morfología colonia	Gram	Afiliación taxonómica según Genbank y n° acceso
RBM-B15	Agar nutritivo	30 °C 7 días	Blanco – amarillento	Bacilos	Negativo	<i>Pseudomonas</i> sp. JF937353
RBM-B17	Agar nutritivo	30 °C 7 días	Blanco	Bacilos	Negativo	<i>Morganella</i> <i>morganii</i> JF937354
RBM-B18	Agar nutritivo	30 °C 7 días	Blanco – amarillento	Bacilos	Negativo	<i>Pseudomonas</i> sp. JF937355
RBM-B20	Agar nutritivo	25 °C 48 horas	Blanco	Cocos	Negativo	<i>Citrobacter</i> <i>gillenii</i> JF937356
RBM-B21	Agar nutritivo	25 °C 48 horas	Blanco	Bacilos	Negativo	<i>Morganella</i> <i>morganii</i> JF937357
RBM-B22	Agar nutritivo	25 °C 48 horas	Anaranjado	Bacilos	Negativo	<i>Paracoccus</i> <i>yeei</i> JF937358
RBM-B23	Agar nutritivo	25 °C 48 horas	Blanco	Bacilos	Negativo	<i>Morganella</i> <i>morganii</i> JF937359
RBM-B24	Agar nutritivo	25 °C 48 horas	Blanco	Cocos	Negativo	<i>Citrobacter</i> <i>gillenii</i> JF937360
RBM-B25	Agar nutritivo	25 °C 48 horas	Blanco	Colineforme	Negativo	<i>Citrobacter</i> sp. JF937361
RBM-B26	Agar nutritivo	25 °C 48 horas	Blanco	Corineforme	Negativo	<i>Citrobacter</i> sp. JF937362
RBM-B27	Agar nutritivo	25 °C 48 horas	Blanco	Bacilos	Negativo	<i>Enterobacter</i> sp. JF937363
RBM-C1	Agar con taladrina	30 °C 48 horas	Blanco - amarillento	Corineforme	Negativo	<i>Bacterium</i> JF937364
RBM-C3	Agar nutritivo	30 °C 48 horas	Blanco	Cocos	Negativo	<i>Citrobacter</i> <i>gillenii</i> JF937365
RBM-C4	Agar nutritivo	30 °C 48 horas	Blanco	Corineforme	Negativo	<i>Caulobacter</i> sp. JF937366
RBM-C5	Agar nutritivo	30 °C 48 horas	Blanco	Corineforme	Negativo	<i>Caulobacter</i> sp. JF937367
RBM-C6	Agar nutritivo	30 °C 48 horas	Anaranjado	Cocos unidos	Negativo	<i>Shewanella</i> sp. JF937368

Tabla A6. Continuación.

Nombre cepa	Aislamiento	T ^a Aislamiento y tiempo de crecimiento	Morfología mucilago	Morfología colonia	Gram	Afiliación taxonómica según Genbank y n° acceso
RBM-C7	Agar nutritivo	30 °C 48 horas	Blanco	Bacilos pequeños	Negativo	<i>Riemerella</i> sp. JF937369
RBM-C10	Agar nutritivo	25 °C 48 horas	Blanco	Cocos	Negativo	<i>Novosphingobium resinovorum</i> JF937370
RBM-C11	Agar nutritivo	25 °C 48 horas	Blanco	Bacilos pequeños	Negativo	<i>Riemerella</i> sp. JF937371
RBM-C12	Agar con taladrina	25 °C 48 horas	Blanco	Bacilos	Negativo	<i>Pseudomonas</i> sp. JF937372
RBM-C13	Agar con taladrina	25 °C 7 días	Blanquecino	Diplococos	Negativo	<i>Acinetobacter johnsonii</i> JF937373
RBM-C15	Agar con taladrina	25 °C 7 días	Blanco	Bacilos	Negativo	<i>Pseudomonas</i> sp. JF937374
RBM-C16	Agar con taladrina	25 °C 7 días	Blanquecino -naranja	Corineforme	Negativo	<i>Acidovorax</i> sp. JF937375
RBM-C17	Agar con taladrina	25 °C 7 días	Blanco	Bacteria pequeña	Negativo	<i>Rhizobium borbori</i> JF937376
RBM-C18	Agar con taladrina	25 °C 7 días	Blanquecino -naranja	Bacilos	Negativo	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> JF937377
RBM-C21	Agar nutritivo	30 °C 48 horas	Blanquecino -naranja	Corineforme	Negativo	<i>Acidovorax</i> sp. JF937378
RBM-C25	Agar nutritivo	30 °C 48 horas	Blanquecino -naranja	Bacilos	Negativo	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> JF937379
RBM-C27	Agar nutritivo	30 °C 48 horas	Blanco	Cocos	Negativo	<i>Ancylobacter</i> sp. JF937380
RBM-C30	Agar nutritivo	30 °C 48 horas	Blanco	Cocos	Negativo	<i>Catellibacterium</i> sp. JF937381
RBM-D3	Agar nutritivo	30 °C 7 días	Blanco	Bacilos	Negativo	<i>Bosea thiooxidans</i> JF937382
RBM-D4	Agar nutritivo	30 °C 7 días	Blanco	Bacilos	Negativo	<i>Sphingomonas</i> sp. JF937383

Tabla A6. Continuación.

Nombre cepa	Aislamiento	T ^a Aislamiento y tiempo de crecimiento	Morfología mucílago	Morfología colonia	Gram	Afiliación taxonómica según Genbank y n° acceso
RBM-D5	Agar nutritivo	25 °C 7 días	Blanco	Cocos	Negativo	<i>Ancylobacter polymorphus</i> JF937384
RBM-D6	Agar nutritivo	25 °C 7 días	Blanco	Bacilos	Negativo	<i>Rhizobium sp.</i> JF937385
RBM-D8	Agar con taladrina	30 °C 7 días	Blanco	Bacilos	Negativo	<i>Bosea thiooxidans</i> JF937386
RBM-D9	Agar con taladrina	30 °C 7 días	Blanquecino -naranja	Corineforme	Negativo	<i>Acidovorax sp.</i> JF937387
RBM-D10	Agar con taladrina	25 °C 48 horas	Blanco	Bacteria pequeña	Negativo	<i>Diaphorobacter sp.</i> JF937388
RBM-D11	Agar con taladrina	25 °C 48 horas	Anaranjado	Cocos	Negativo	<i>Stenotrophomonas sp.</i> JF937389
RBM-D12	Agar con taladrina	25 °C 48 horas	Blanquecino -naranja	Corineforme	Negativo	<i>Acidovorax sp.</i> JF937390
RBM-D13	Agar nutritivo	25 °C 48 horas	Anaranjado	Cocos	Negativo	<i>Stenotrophomonas sp.</i> JF937391
RBM-D14	Agar nutritivo	25 °C 48 horas	Blanco	Bacilos	Negativo	<i>Bosea thiooxidans</i> JF937392
RBM-E1	Agar nutritivo	25 °C 48 horas	Blanco	Bacilos	Negativo	<i>Bosea thiooxidans</i> JF937393
RBM-E2	Agar con taladrina	25 °C 48 horas	Blanco	Cocos	Positivo	<i>Mycobacterium sp.</i> JF937394
RBM-E3	Agar con taladrina	25 °C 48 horas	Blanco	Cocos	Negativo	<i>Ancylobacter sp.</i> JF937395
RBM-E6	Agar con taladrina	25 °C 48 horas	Blanco	Cocos	Negativo	<i>Brevundimonas sp.</i> JF937396
RBM-E9	Agar con taladrina	30 °C 7 días	Blanco	Cocos	Negativo	<i>Brevundimonas sp.</i> JF937397
RBM-E10	Agar con taladrina	30 °C 7 días	Blanco-amarillento	Bacilos	Negativo	<i>Bosea sp.</i> JF937398
RBM-E13	Agar con taladrina	30 °C 7 días	Blanco	Cocos	Negativo	<i>Brevundimonas sp.</i> JF937399

Tabla A6. Continuación.

Nombre cepa	Aislamiento	T ^a Aislamiento y tiempo de crecimiento	Morfología mucilago	Morfología colonia	Gram	Afiliación taxonómica según Genbank y n ^o acceso
RBM-E14	Agar nutritivo	30 °C 7 días	Blanco	Cocos	Negativo	<i>Xanthobacter sp.</i> JF937400
RBM-E15	Agar nutritivo	30 °C 7 días	Blanco- amarillento	Bacilos	Negativo	<i>Bosea sp.</i> JF937401
RBM-E16	Agar nutritivo	25 °C 7 días	Blanquecino -naranja	Corineforme	Negativo	<i>Acidovorax sp.</i> JF937402
RBM-E17	Agar nutritivo	25 °C 7 días	Blanco	Cocos unidos	Negativo	<i>Novosphingobium sp.</i> JF937403
RBM-E18	Agar con taladrina	30 °C 7 días	Anaranjado	Cocos	Negativo	<i>Stenotrophomonas sp.</i> JF937404
RBM-E19	Agar con taladrina	30 °C 48 horas	Anaranjado	Bacilos	Negativo	<i>Paracoccus yeei</i> JF937405
RBM-E20	Agar con taladrina	25 °C 48 horas	Blanco	Bacilos	Negativo	<i>Pseudomonas sp.</i> JF937406
RBM-E21	Agar con taladrina	25 °C 48 horas	Blanco- amarillento	Bacilos	Negativo	<i>Bosea sp.</i> JF937407
RBM-E22	Agar nutritivo	30 °C 48 horas	Blanco	Cocos unidos	Negativo	<i>Novosphingobium sp.</i> JF937408
RBM-E23	Agar con taladrina	30 °C 48 horas	Blanco	Cocos	Negativo	<i>Xanthobacter sp.</i> JF937409
RBM-E24	Agar con taladrina	30 °C 48 horas	Amarillo	Bacilos	Negativo	<i>Pseudoxanthomonas sp.</i> JF937410
RBM-E25	Agar con taladrina	30 °C 48 horas	Blanco- amarillento	Diplococos	Negativo	<i>Acinetobacter sp.</i> JF937411
RBM-E26	Agar con taladrina	30 °C 7 días	Blanco- amarillento	Diplococos	Negativo	<i>Acinetobacter sp.</i> JF937412
RBM-E27	Agar con taladrina	25 °C 48 horas	Anaranjado	Cocos	Negativo	<i>Stenotrophomonas sp.</i> JF937413
RBM-E28	Agar con taladrina	25 °C 48 horas	Anaranjado	Bacilos	Negativo	<i>Paracoccus yeei</i> JF937414

Tabla A6. Continuación.

Nombre cepa	Aislamiento	T ^a Aislamiento y tiempo de crecimiento	Morfología mucílago	Morfología colonia	Gram	Afiliación taxonómica según Genbank y n° acceso
RBM-E29	Agar con taladrina	25 °C 48 horas	Blanco	Bacilos	Negativo	<i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i> JF937415
RBM-E30	Agar con taladrina	25 °C 48 horas	Blanco	Cocos	Negativo	<i>Achromobacter</i> <i>spanius</i> JF937416
RBM-E31	Agar con taladrina	25 °C 48 horas	Blanco	Cocos	Negativo	<i>Xanthobacter sp.</i> JF937417
RBM-E32	Agar con taladrina	25 °C 48 horas	Blanquecino -naranja	Corineforme	Negativo	<i>Acidovorax sp.</i> JF937418
RBM-E33	Agar con taladrina	25 °C 48 horas	Blanquecino -naranja	Corineforme	Negativo	<i>Acidovorax sp.</i> JF937419
RBM-E34	Agar con taladrina	25 °C 48 horas	Blanco	Cocos	Negativo	<i>Xanthobacter sp.</i> JF937420

ANEXO 16: MEDIDAS DE SEGUI- MIENTO DE UN REACTOR BIOLÓ- GICO DE MEMBRANA (R. B. M.)

Tabla A7. Medidas de seguimiento del Reactor Biológico de Membrana (RBM) en los distintos periodos: puesta en funcionamiento - aclimatación (26/04/2010 – 10/05/2010) y funcionamiento al 100% (14/05/2010 – 17/06/2010). DQOt: DQO total; DQOs: DQO soluble; SST: sólidos en suspensión; Rendimiento: $(DQOt\text{ efluente} - DQOt\text{ influente}) * 100 / DQOt\text{ influente}$.

		Influente			Efluente			RBM		
Fecha	pH	DQOt (ppm)	DQOs (ppm)	DQOs/DQOt	pH	DQOt (ppm)	Turbidez (NTU)	SST (ppm)	Rendimiento (%)	
Puesta en funcionamiento - aclimatación	26/04/2010	8,01	3763,07	2460,8	1,89	7,93	109,93	0,50	8,25	97,08
	28/04/2010	7,30	4618,2	3011,05	1,87	7,40	893,88	9,00	8,17	80,64
	30/04/2010	7,19	3011,31	1583,04	1,11	7,49	923,75	6,00	-	69,32
	03/05/2010	7,27	2386,61	1690,81	2,43	7,49	634,46	6,00	11,66	73,42
	05/05/2010	7,41	3846,43	2377,68	1,62	7,37	361,25	4,00	11,95	90,61
	07/05/2010	7,33	7864,29	3081	0,64	7,50	1963,00	3,30	16,54	75,04
	10/05/2010	7,06	7127,83	2317,96	0,48	7,44	1207,12	20,00	18,42	83,06
Funcionamiento al 100%	14/05/2010	8,12	5607,63	3970,17	2,5	7,55	1560,51	60,2	17,88	72,17
	17/05/2010	6,99	4633,05	2693,91	1,9	7,41	1418,98	15,7	20,22	69,37
	20/05/2010	6,99	6073,73	2302,94	0,61	7,32	964,75	3,5	16,23	84,12
	24/05/2010	7,46	4090,14	1407,31	0,3	7,51	1163,27	14	15,73	71,56
	26/05/2010	7,05	4902,21	2487,24	1,03	7,43	1086,73	6	15,26	77,83
	28/05/2010	7	4036,17	1576,37	2,0	7,29	804,82	11,3	17,48	80,06
	31/05/2010	7,63	4438,1	1640,68	0,4	7,4	1268,02	9	11,29	71,43

Tabla A7. Continuación.

Fecha	Influyente				Efluente			RBM	Rendimiento %
	pH	DQOt ppm	DQOs ppm	DQOs/DQOt	pH	DQOt ppm	Turbidez NTU	SST ppm	
02/06/2010	7,59	7476,96	5539,39	2,86	7,57	1033,92	7,1	9,95	86,17
04/06/2010	7,32	5611,74	1897,91	0,3	7,69	120,74	6,5	9,82	97,85
07/06/2010	7,16	5503,22	2878,62	0,5	7,47	1201,93	7	10,25	78,16
09/06/2010	7,39	8610,13	2211,47	0,35	7,56	1022,67	13	11,11	88,12
11/06/2010	7,86	6631,16	4778,17	2,58	7,67	321,83	118	8,8	95,15
14/06/2010	7,21	7423,42	1917,25	0,3	7,43	2098,24	258	-	71,73
17/06/2010	-	6419,89	1292,25	0,25	-	820,7	-	7,17	87,22

Funcionamiento al 100%

**ANEXO 17: CROMATOGRAMAS
CORRESPONDIENTES AL ANÁLISIS
DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS DE
LEMNA MINOR DE LOS TRATAMIENTOS
CONTROL, CONTROL CON INÓCULO,
5 DÍAS EN AGUA DE TALADRINA Y 5 DÍAS
EN AGUA DE TALADRINA CON
INÓCULO**

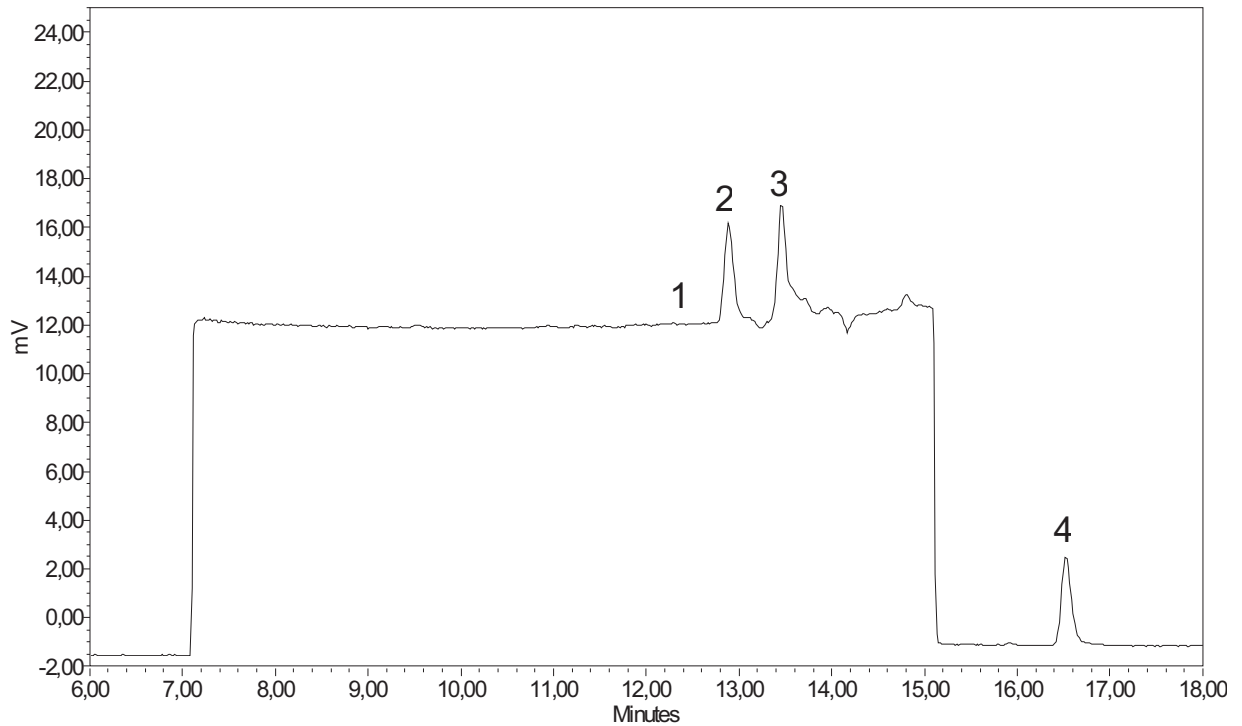


Figura A54. Cromatograma de fluorescencia correspondiente a los Antioxidantes lipofílicos de un extracto de *Lemna minor* del tratamiento control. (1) δ -Tocoferol, (2) β + γ -Tocoferol, (3) α -Tocoferol, (4) Feofitina. Unidades eje Y: mV (milivoltios); unidades eje X: minutos.

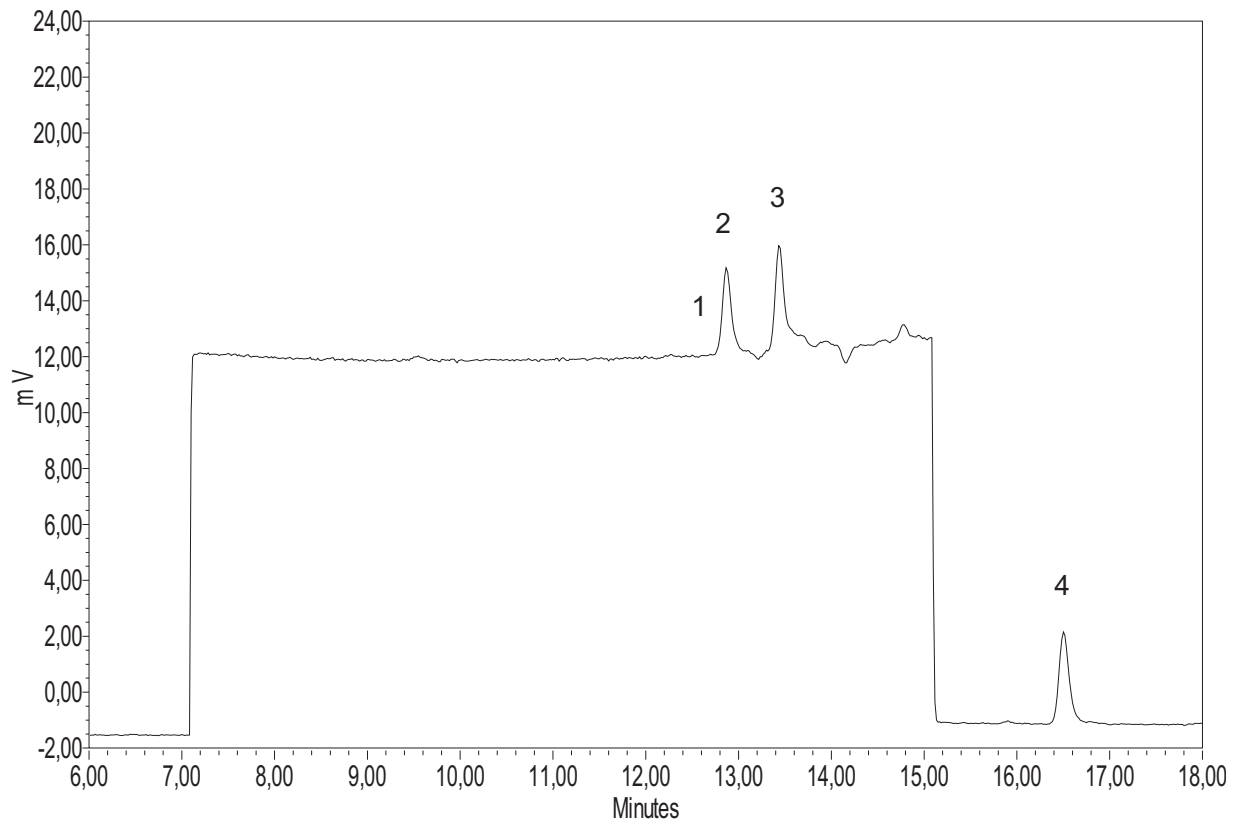


Figura A55. Cromatograma de fluorescencia correspondiente a los Antioxidantes lipofílicos de un extracto de *Lemna minor* del tratamiento control con inóculo. (1) δ -Tocoferol, (2) β + γ -Tocoferol, (3) α -Tocoferol, (4) Feofitina. Unidades eje Y: mV (milivoltios); unidades eje X: minutos.

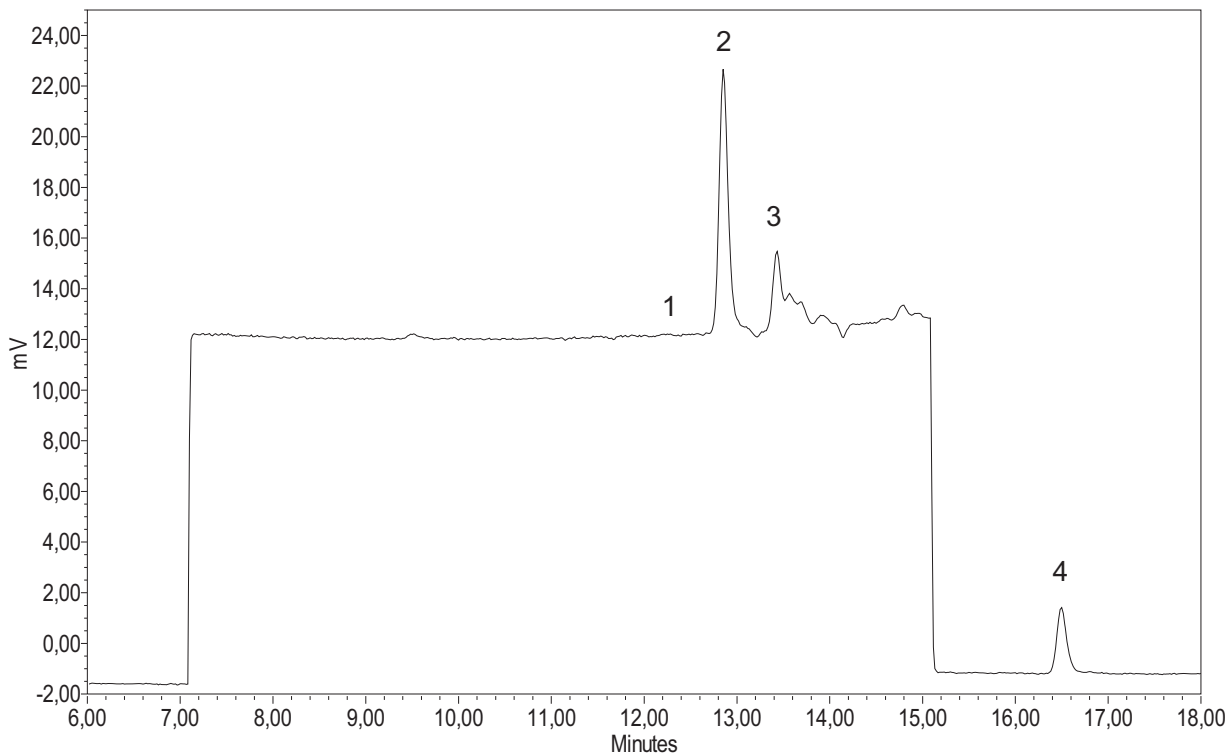


Figura A56. Cromatograma de fluorescencia correspondiente a los Antioxidantes lipofílicos de un extracto de *Lemna minor* del tratamiento 5 días en agua de taladrina. (1) δ -Tocoferol, (2) β + γ -Tocoferol, (3) α -Tocoferol, (4) Feofitina. Unidades eje Y: mV (milivoltios); unidades eje X: minutos

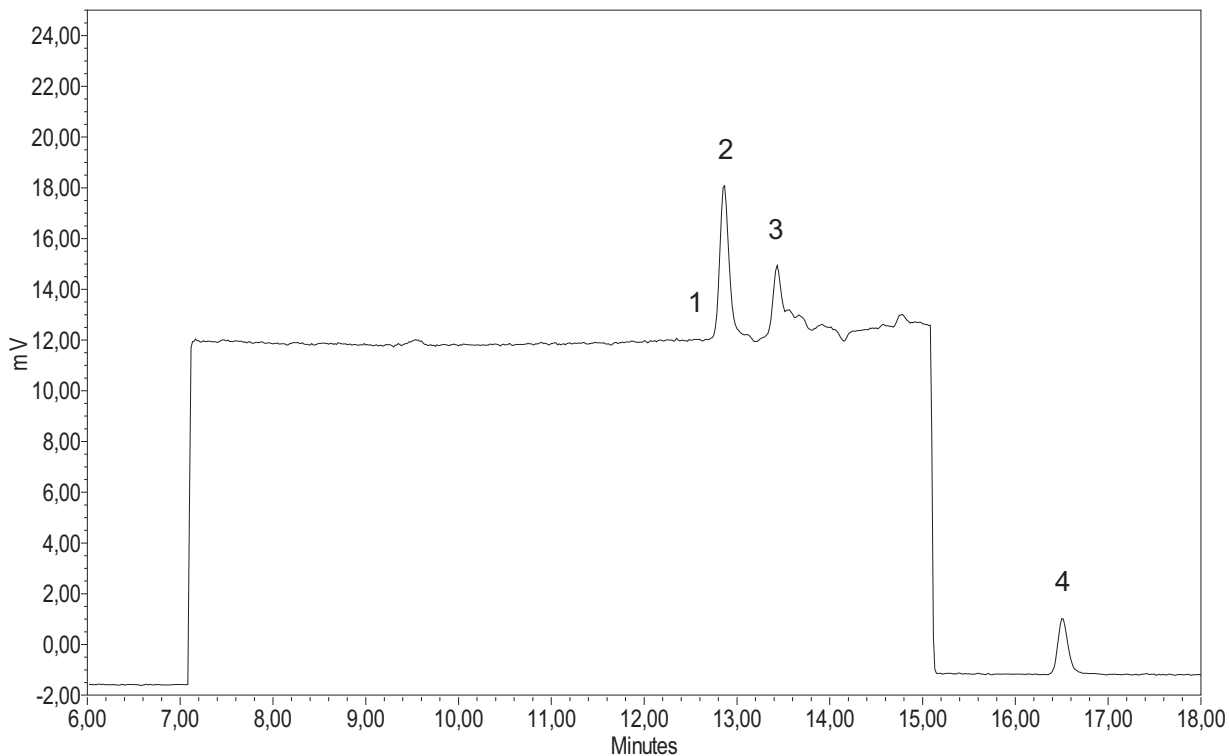


Figura A57. Cromatograma de fluorescencia correspondiente a los Antioxidantes lipofílicos de un extracto de *Lemna minor* del tratamiento 5 días en agua de taladrina con inóculo. (1) δ -Tocoferol, (2) β + γ -Tocoferol, (3) α -Tocoferol, (4) Feofitina. Unidades eje Y: mV (milivoltios); unidades eje X: minutos.

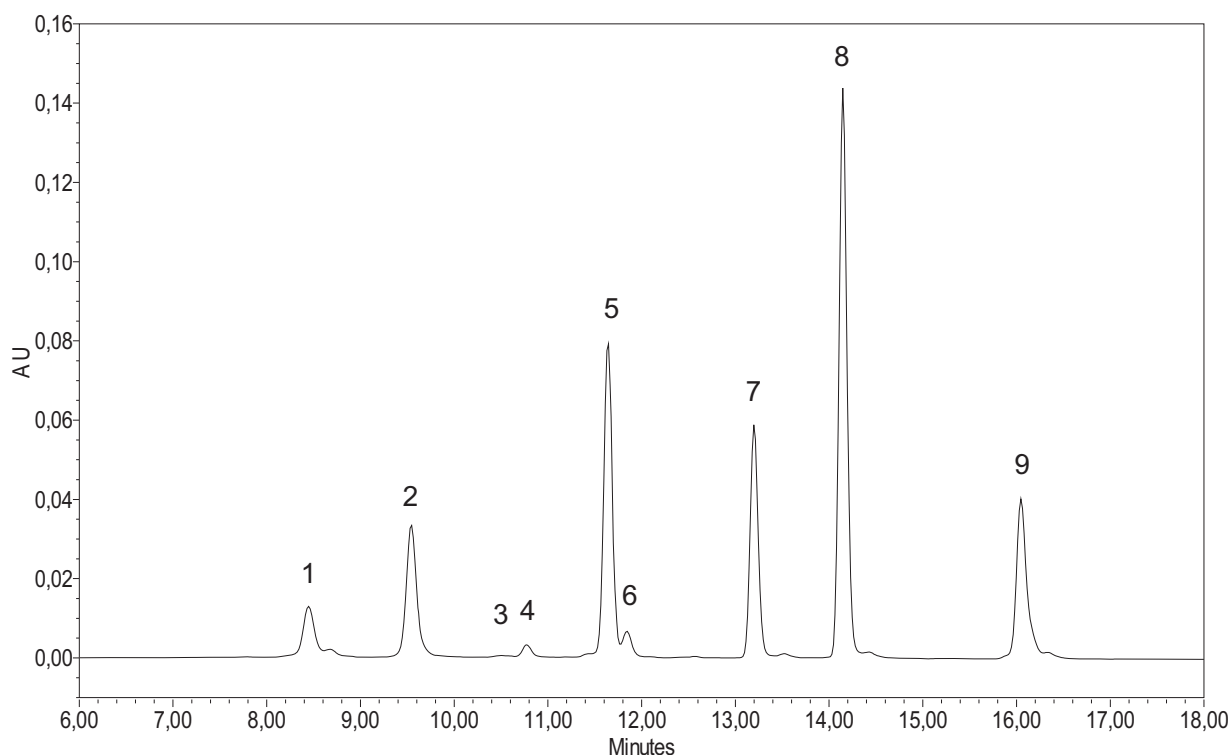


Figura A58. Cromatograma a 445 nm correspondiente a los pigmentos fotosintéticos de un extracto de *Lemna minor* del tratamiento control. (1) Neoxantina, (2) Violaxantina, (3) Luteína epóxido, (4) Anteraxantina, (5) Luteína, (6) Zeaxantina, (7) Clorofila *b*, (8) Clorofila *a*, (9) β -Caroteno. Unidades eje Y: AU (Absorbance Units); unidades eje X: minutos.

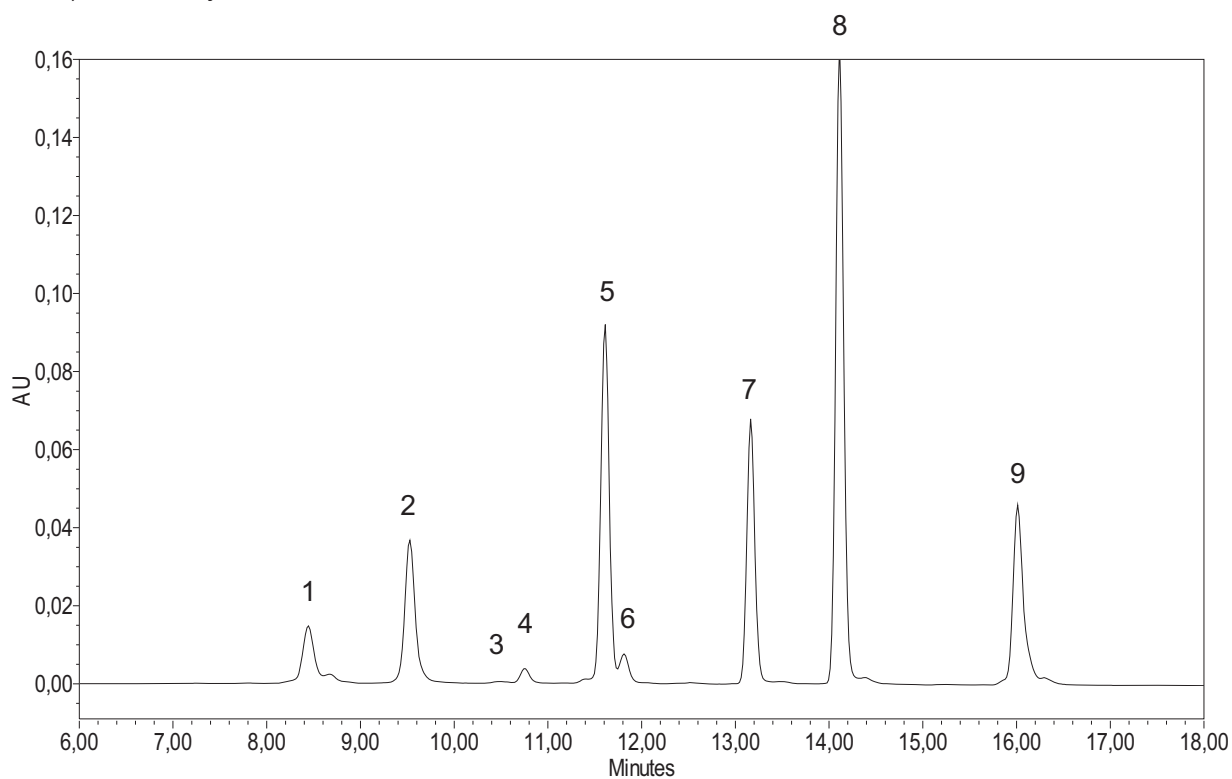


Figura A59. Cromatograma a 445 nm correspondiente a los pigmentos fotosintéticos de un extracto de *Lemna minor* del tratamiento control con inóculo. (1) Neoxantina, (2) Violaxantina, (3) Luteína epóxido, (4) Anteraxantina, (5) Luteína, (6) Zeaxantina, (7) Clorofila *b*, (8) Clorofila *a*, (9) β -Caroteno. Unidades eje Y: AU (Absorbance Units); unidades eje X: minutos.

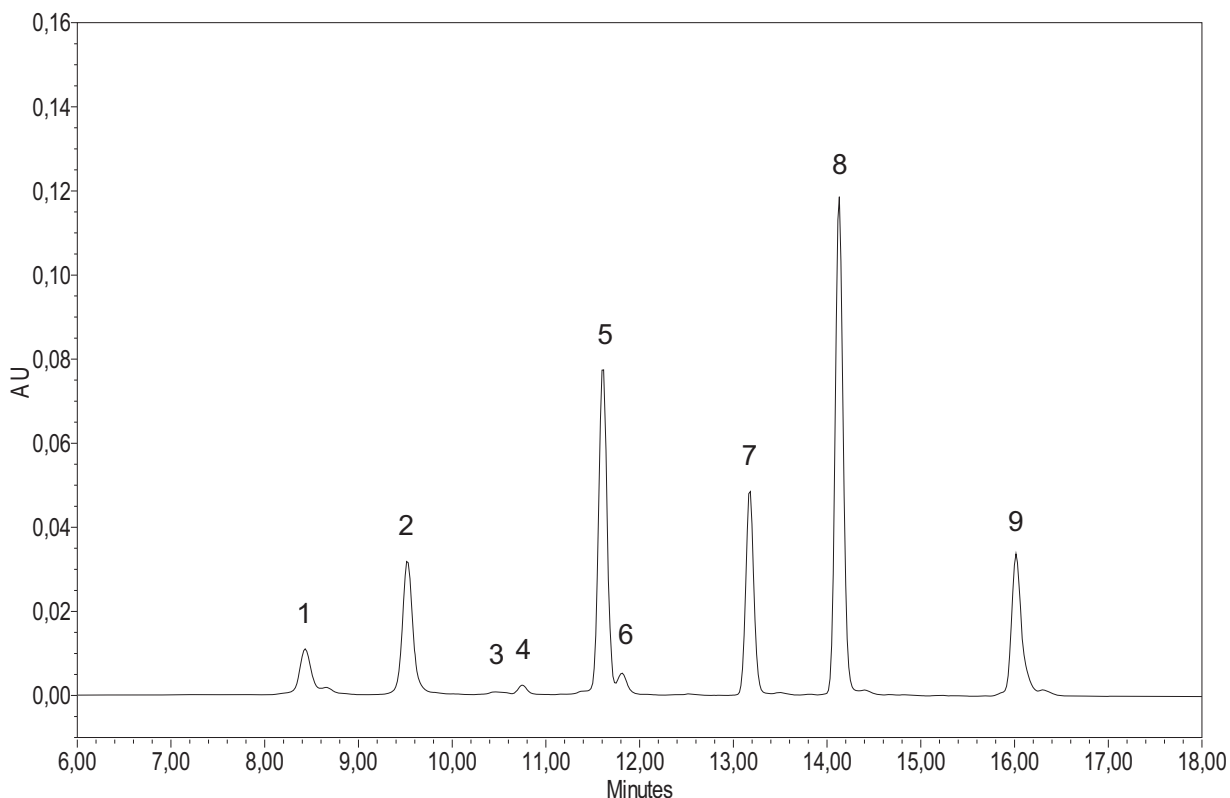


Figura A60. Cromatograma a 445 nm correspondiente a los pigmentos fotosintéticos de un extracto de *Lemna minor* del tratamiento 5 días en agua de taladrina. (1) Neoxantina, (2) Violaxantina, (3) Luteína epóxido, (4) Anteraxantina, (5) Luteína, (6) Zeaxantina, (7) Clorofila *b*, (8) Clorofila *a*, (9) β -Caroteno. Unidades eje Y: AU (Absorbance Units); unidades eje X: minutos.

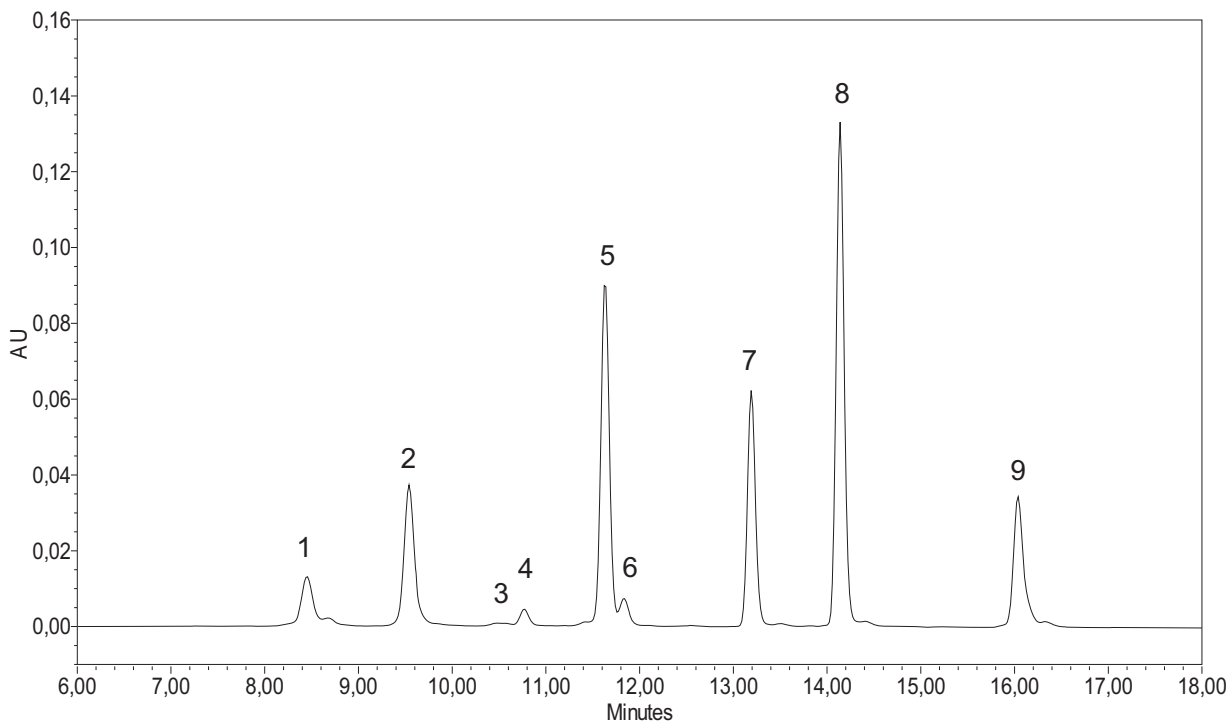


Figura A61. Cromatograma a 445 nm correspondiente a los pigmentos fotosintéticos de un extracto de *Lemna minor* del tratamiento 5 días en agua de taladrina con inóculo. (1) Neoxantina, (2) Violaxantina, (3) Luteína epóxido, (4) Anteraxantina, (5) Luteína, (6) Zeaxantina, (7) Clorofila *b*, (8) Clorofila *a*, (9) β -Caroteno. Unidades eje Y: AU (Absorbance Units); unidades eje X: minutos.

**ANEXO 18: CROMATOGRAMAS
CORRESPONDIENTES AL ANÁLISIS
DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS
DE ZEA MAYS DE LOS TRATAMIENTOS
CONTROL, CONTROL CON INÓCULO,
5 DÍAS EN AGUA DE TALADRINA Y
5 DÍAS EN AGUA DE TALADRINA
CON INÓCULO**

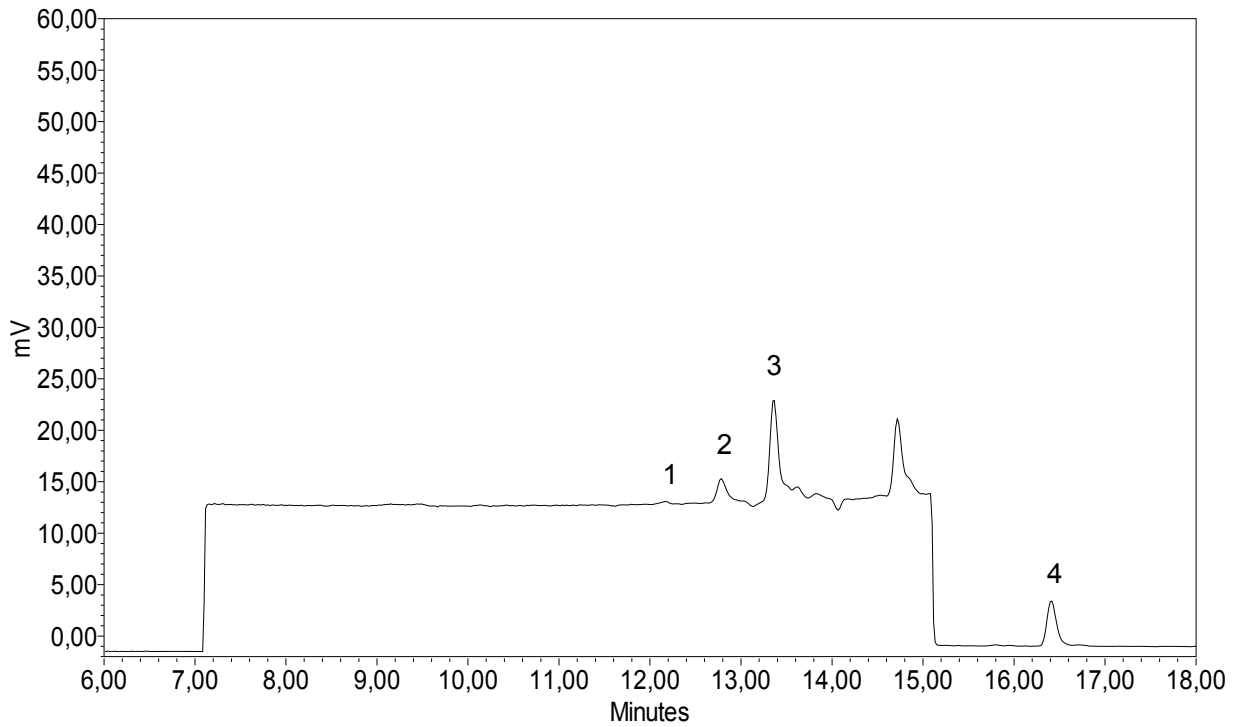


Figura A62. Cromatograma de fluorescencia correspondiente a los Antioxidantes lipofílicos de un extracto de una hoja de *Zea mays* del tratamiento control. (1) δ -Tocoferol, (2) β + γ -Tocoferol, (3) α -Tocoferol, (4) Feofitina. Unidades eje Y: mV (milivoltios); unidades eje X: minutos.

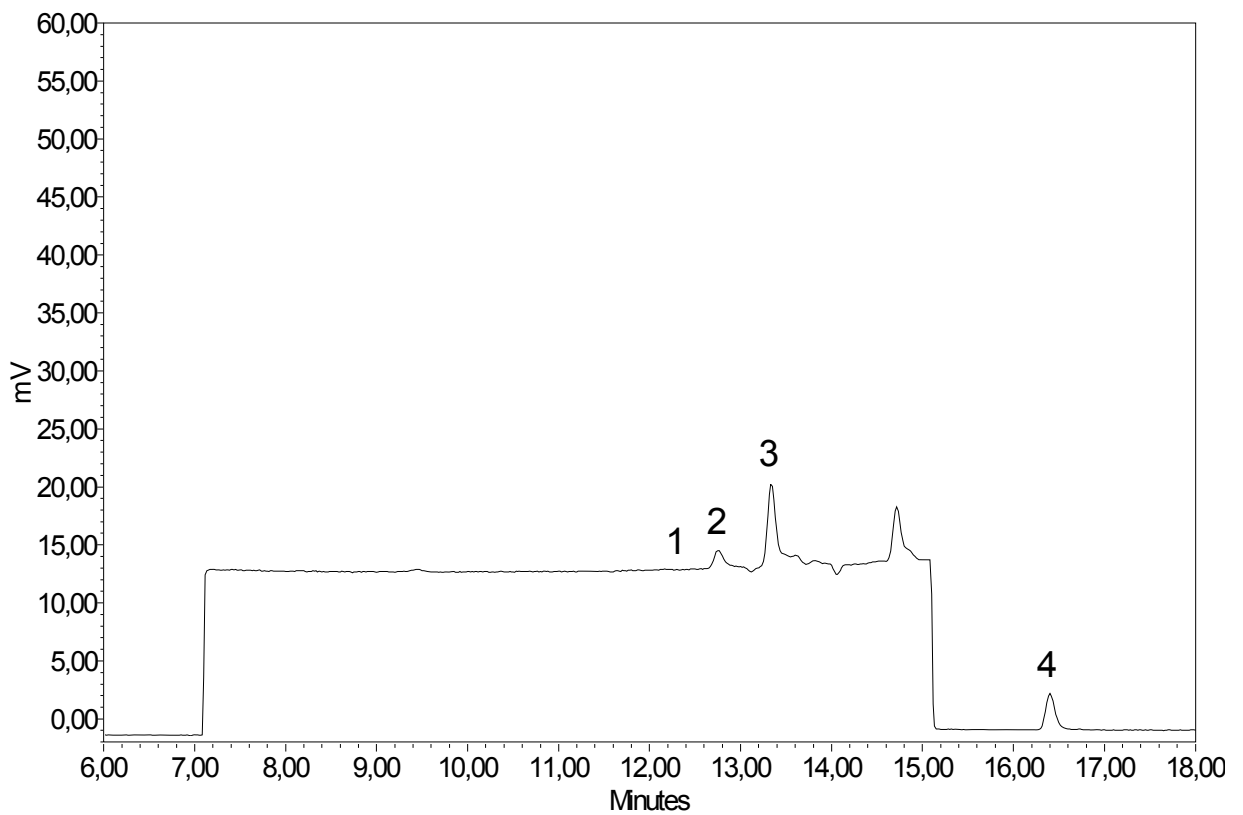


Figura A63. Cromatograma de fluorescencia correspondiente a los Antioxidantes lipofílicos de un extracto de una hoja de *Zea mays* del tratamiento control con inóculo. (1) δ -Tocoferol, (2) β + γ -Tocoferol, (3) α -Tocoferol, (4) Feofitina. Unidades eje Y: mV (milivoltios); unidades eje X: minutos.

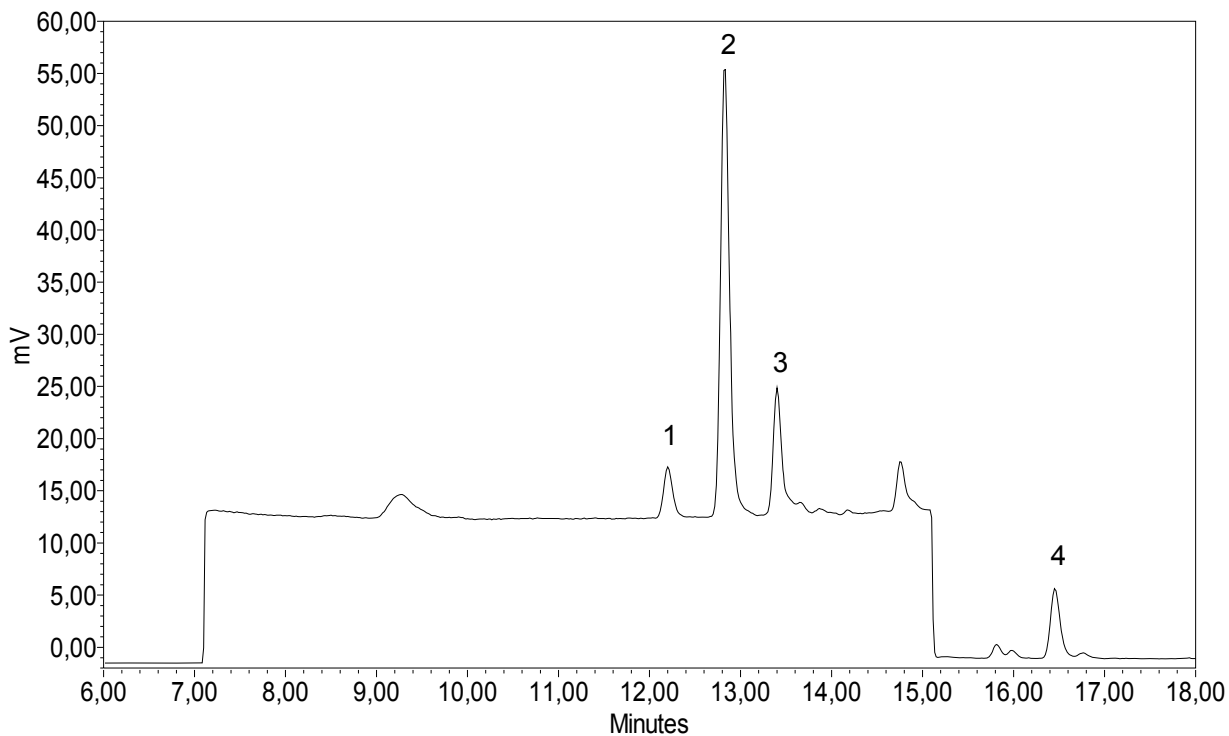


Figura A64. Cromatograma de fluorescencia correspondiente a los Antioxidantes lipofílicos de un extracto de una hoja de *Zea mays* del tratamiento 5 días en agua de taladrina. (1) δ -Tocoferol, (2) β + γ -Tocoferol, (3) α -Tocoferol, (4) Feofitina. Unidades eje Y: mV (milivoltios); unidades eje X: minutos.

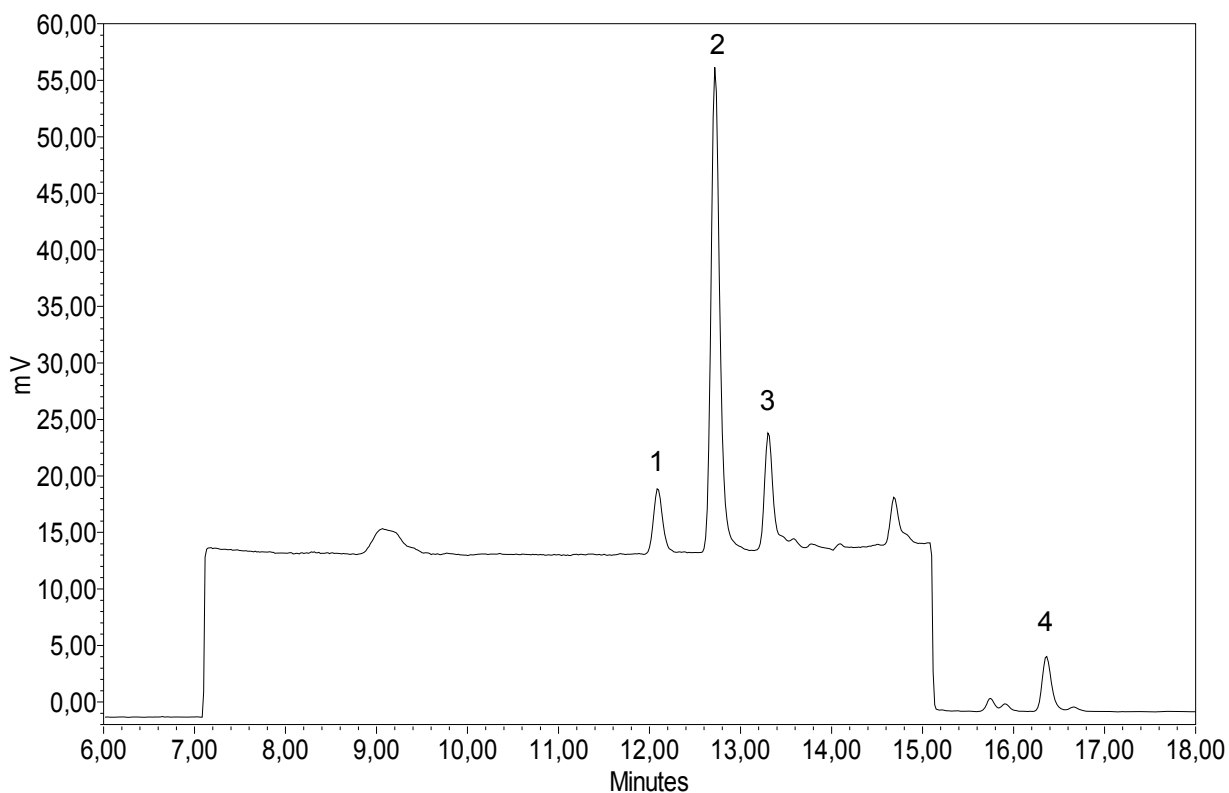


Figura A65. Cromatograma de fluorescencia correspondiente a los Antioxidantes lipofílicos de un extracto de una hoja de *Zea mays* del tratamiento 5 días en agua de taladrina con inóculo. (1) δ -Tocoferol, (2) β + γ -Tocoferol, (3) α -Tocoferol, (4) Feofitina. Unidades eje Y: mV (milivoltios); unidades eje X: minutos.

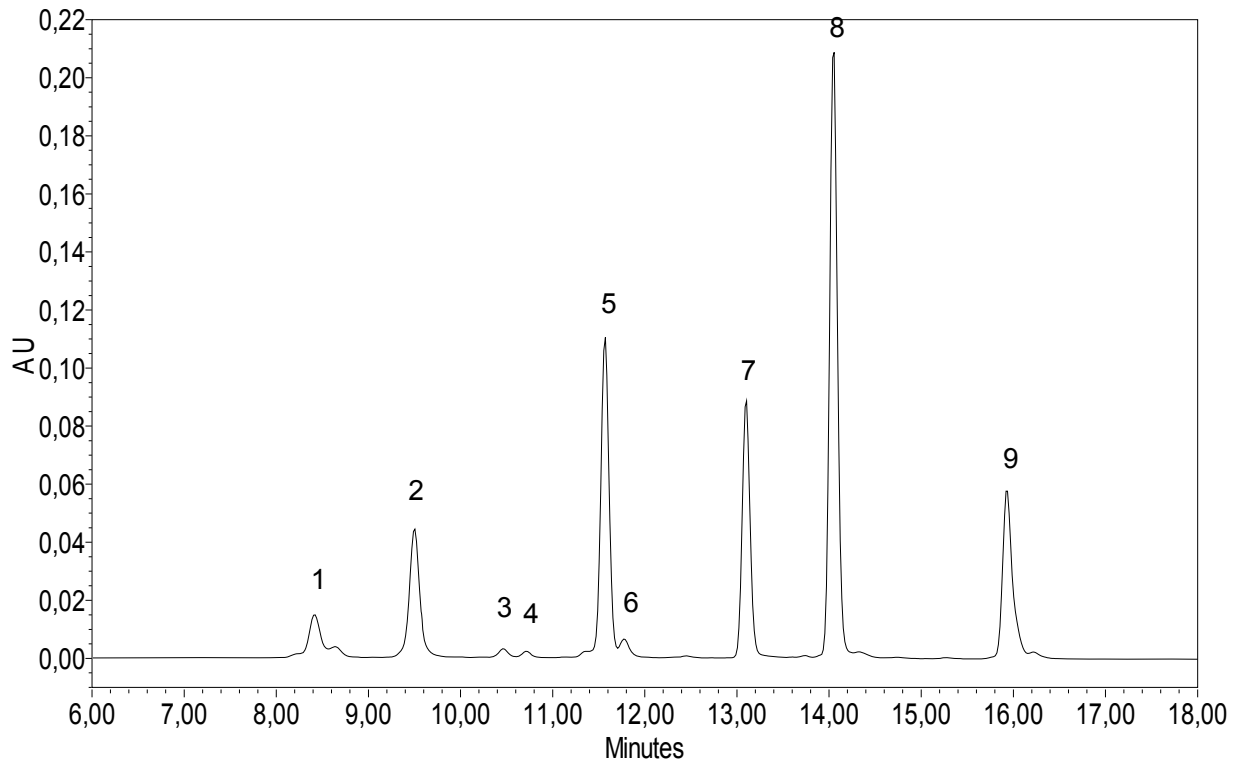


Figura A66. Cromatograma a 445 nm correspondiente a los pigmentos fotosintéticos de un extracto de una hoja de *Zea mays* del tratamiento control. (1) Neoxantina, (2) Violaxantina, (3) Luteína epóxido, (4) Anteraxantina, (5) Luteína, (6) Zeaxantina, (7) Clorofila *b*, (8) Clorofila *a*, (9) β -Caroteno. Unidades eje Y: AU (Absorbance Units); unidades eje X: minutos.

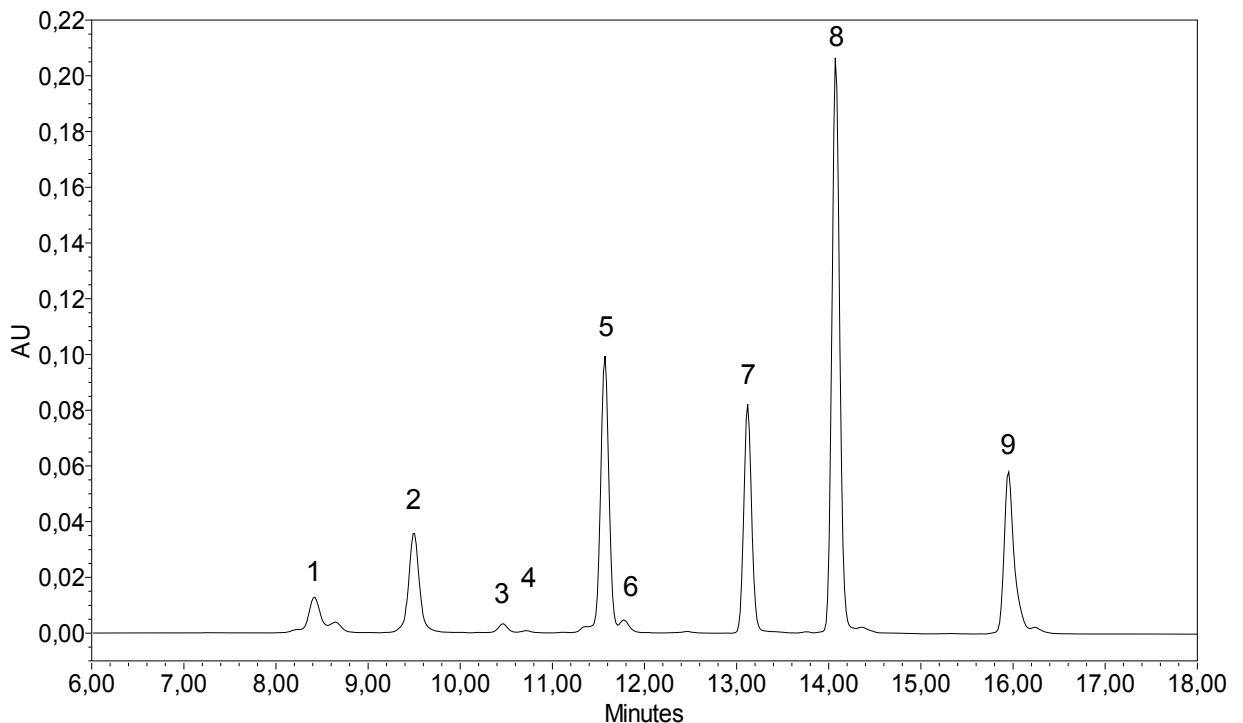


Figura A67. Cromatograma a 445 nm correspondiente a los pigmentos fotosintéticos de un extracto de una hoja de *Zea mays* del tratamiento control con inóculo. (1) Neoxantina, (2) Violaxantina, (3) Luteína epóxido, (4) Anteraxantina, (5) Luteína, (6) Zeaxantina, (7) Clorofila *b*, (8) Clorofila *a*, (9) β -Caroteno. Unidades eje Y: AU (Absorbance Units); unidades eje X: minutos.

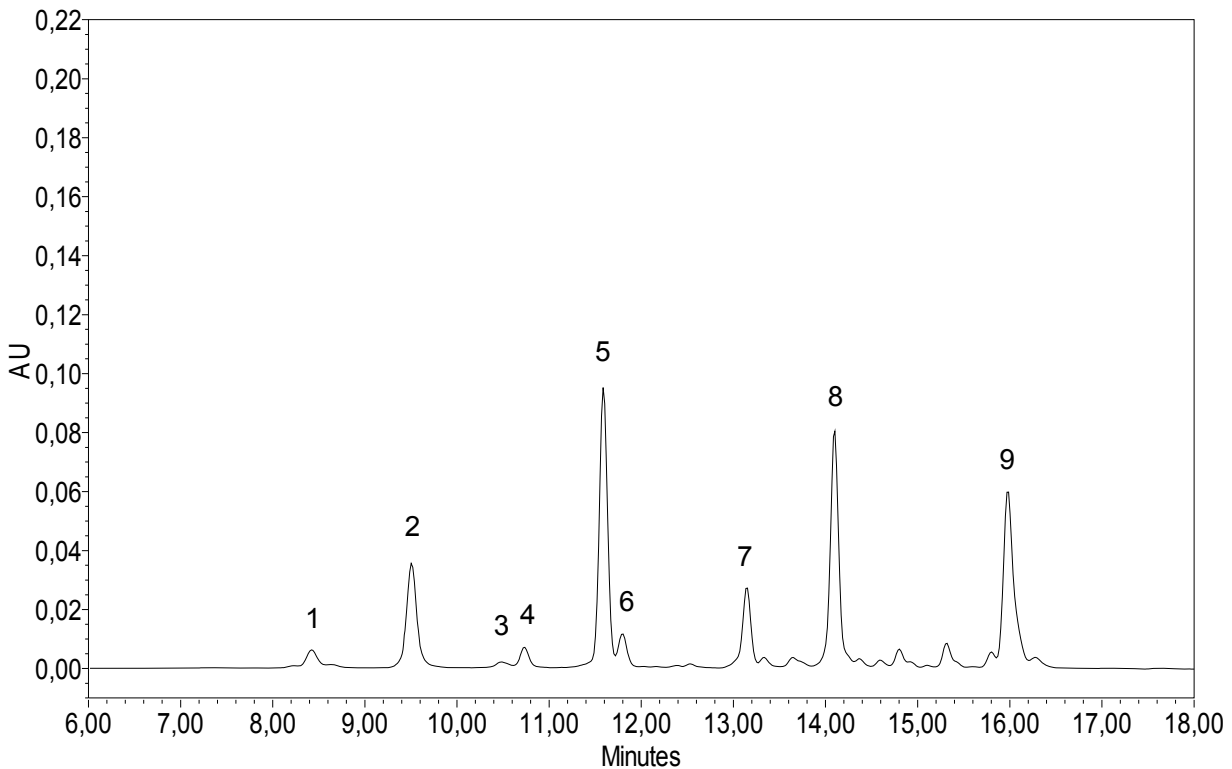


Figura A68. Cromatograma a 445 nm correspondiente a los pigmentos fotosintéticos de un extracto de una hoja de *Zea mays* del tratamiento 5 días en agua de taladrina. (1) Neoxantina, (2) Violaxantina, (3) Luteína epóxido, (4) Anteraxantina, (5) Luteína, (6) Zeaxantina, (7) Clorofila *b*, (8) Clorofila *a*, (9) β -Caroteno. Unidades eje Y: AU (Absorbance Units); unidades eje X: minutos.

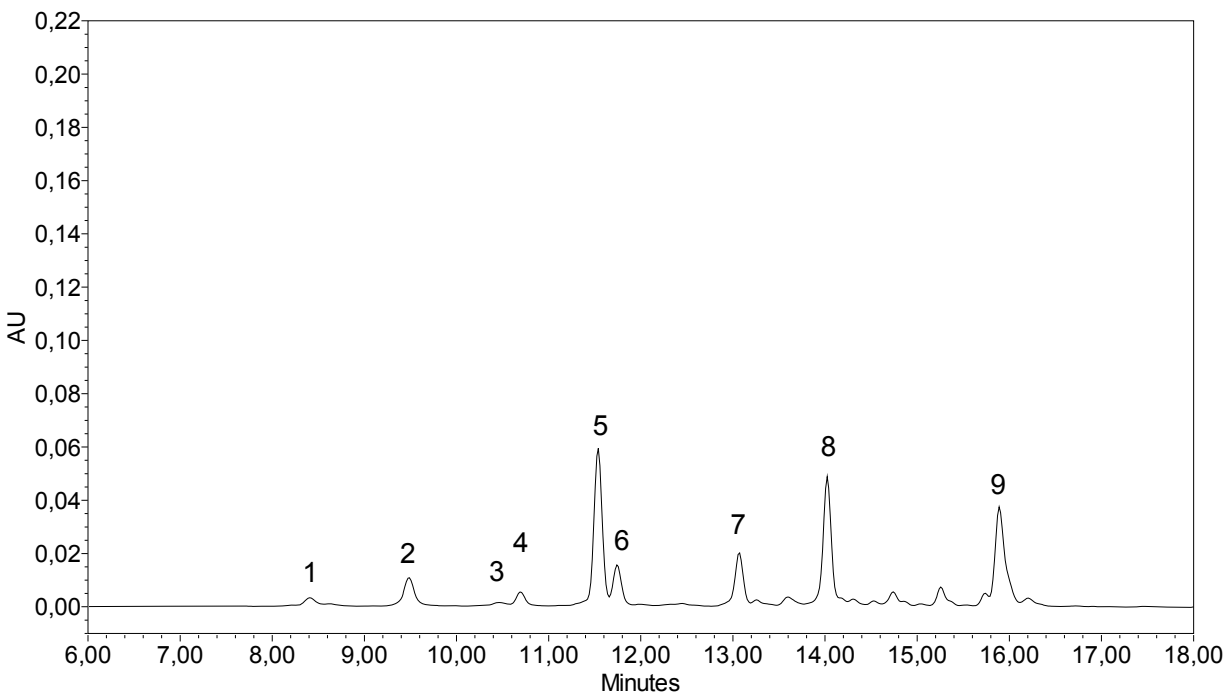


Figura A69. Cromatograma a 445 nm correspondiente a los pigmentos fotosintéticos de un extracto de una hoja de *Zea mays* del tratamiento 5 días en agua de taladrina con inóculo. (1) Neoxantina, (2) Violaxantina, (3) Luteína epóxido, (4) Anteraxantina, (5) Luteína, (6) Zeaxantina, (7) Clorofila *b*, (8) Clorofila *a*, (9) β -Caroteno. Unidades eje Y: AU (Absorbance Units); unidades eje X: minutos.

ANEXO 19: APORTACIONES A CONGRESOS

XIII National Meeting of the Spanish Society of Nitrogen Fixation II Portuguese-Spanish Congress on Nitrogen Fixation. Zaragoza. 15-18 Junio 2010.

Abstract y póster: Phytoremediation of aqueous solutions of lubricants from industrial activities using maize plants grown in hydroponic conditions inoculated with different bacterial strains.

Lucas García JA., Bonilla A., Gutiérrez Mañero FJ., Grijalbo Fernández, L.

Departamento de Biología. Universidad San Pablo – CEU, 28668 Boadilla del Monte, Madrid, España.

Summary: Many companies produce industrial waste rich in oils with DQO values above those permitted by law. In most cases this value is reduced by diluting with water. In this study we have developed a bioremediation system using maize plants growing in hydroponic culture, which have been inoculated with different bacterial strains. In all experiments the system was able to reduce the DQO below the values allowed by law in a very short period of time. In all cases bacterial inoculation reduced the value of DQO less than in the non-inoculated treatments, although differences were not significant. The study was complemented by measuring the pH after the remediation as well as biometric measurements of plants.

Introducción: La biorremediación se define como la acción de los microorganismos u otros sistemas biológicos para degradar contaminantes ambientales (Caplan, 1993; Watanabe, 2001; Dua *et al.*, 2002). Es una técnica muy utilizada para limpiar lugares contaminados tanto con metales pesados como con distintos tipos de hidrocarburos. Existen distintas estrategias de biorremediación (atenuación natural, bioaumento, fitorremediación, etc). En nuestros experimentos se ha utilizado la fitorremediación (un tipo de fitorremediación) que consiste en utilizar las raíces de las plantas para extraer los contaminantes (Marín *et al.*, 2005), y la rizorremediación que es la contribución de poblaciones bacterianas de la rizosfera al proceso de biorremediación (Schwab y Banks, 1994; Anderson *et al.*, 2003).

Materiales y Métodos: Se colocaron 20 semillas pregerminadas de *Zea mays* en un sistema hidropónico con un material inerte que permitía el enraizamiento de las plantas, éstas se regaron con una solución nutritiva formada por agua, Hoagland (1 g/l) y caldo nutritivo (8 g/l). A los 12 días se realizó un primer inóculo (10^9 ufc/ml) y tres días después, cuando las plantas tenían un tamaño de unos 28 cm, se cambió el agua por agua de taladrina (DQO entre 1500 y 1800 ppm) con Hoagland (1 g/l) y caldo nutritivo (8 g/l) y se realizó un nuevo inóculo (10^9 ufc/ml). Cinco días después de añadir agua de taladrina se realizaron las medidas de: altura, nº hojas, DQO y pH. En el primer experimento se utilizó el maíz con material inerte como soporte y también el maíz sin material inerte pero no se inoculó, mientras que en el resto se inoculó con: una levadura (Esp14), una cepa bacteriana del género *Enterobacter* (Esp1), una cepa de *Pseudomonas fluorescens* (Aur 6) y una cepa *Bacillus licheniformis* (TP9) aislada de las propias taladrinas.

La taladrina es una emulsión de agua y aceite (2%) que se utiliza para refrigerar la zona de contacto entre las herramientas de corte y los materiales a mecanizar. Una vez que ha perdido sus propiedades se somete a un proceso físico que consta de varias etapas en las que se separa parcialmente el aceite del agua y que tiene como resultado el agua de taladrina utilizada en este trabajo.

Resultados y Discusión: El primer objetivo de este trabajo fue determinar si la reducción de la DQO del agua de taladrina (A.T.) era mejor con el material inerte o sin dicho soporte. Se obtuvo que la combinación material inerte y planta era la que garantizaba una mayor reducción de la DQO, de donde se dedujo la posible presencia de cepas con capacidad biorremediadora en el material inerte.

En segundo lugar, se quiso determinar si la inoculación de la cepa elegida mejoraba el proceso de biorremediación (Tabla 1). En todos los casos se observó que la reducción era mayor cuando no se inoculaba la cepa, aunque no presentaban diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con y sin inóculo. Sin embargo, sí existían diferencias significativas entre la DQO inicial y la DQO obtenida después del tratamiento de biorremediación (49 y 50% de reducción con y sin inóculo). Las plantas podrían disminuir la DQO absorbiendo algunos compuestos acumulándolos en el interior de las células de la raíz, hecho ya demostrado por otros autores (Gao y Zhu, 2004). Además, los exudados radicales son fuente de nutrientes para los microorganismos que viven cerca de sus raíces, acelerando los procesos degradativos bacterianos hasta 100 veces con respecto a bacterias no asociadas a raíces (Parrish *et al.*, 2005).

También se observó una reducción del pH (Tabla 1) en un punto en los tratamientos con inóculo frente a los que no lo llevan, siendo la reducción significativa cuando se añadía la levadura.

En tercer lugar se quiso conocer el efecto del A.T. en las plantas. Para ello se estudió la altura y el número de hojas. En la altura se encontró una disminución significativa en los tratamientos con A.T. frente a los controles. En cuanto al nº de hojas, se encontró que este parámetro disminuía en los tratamientos con A.T. frente a los controles, aunque esta disminución no es significativa cuando se inoculó con la levadura. La reducción en estos parámetros puede deberse a que la habilidad de las plantas para extraer PAHs (como el fluoreno y el pireno presentes en el A.T.), translocarlos, transformarlos y acumularlos es un factor limitante por la fitotoxicidad de estos compuestos y puede afectar cuantitativa y cualitativamente a varios procesos bioquímicos y fisiológicos que conllevan a la producción de biomasa (Kummerová *et al.*, 2006).

Tabla 1. Reducción de la DQO y pH en los experimentos con maíz y cepa inoculada.

Cepa	DQO inicial	pH inicial	DQO final sin bacteria	DQO final con bacteria	pH final sin bacteria	pH final con bacteria
TP9	1678 ppm	-	490,96 ppm	533,3 ppm	-	-
Aur 6	1726 ppm	9,41	784 ppm	819 ppm	8,66	8,52
Esp14	1800 ppm	9,43	902 ppm	921,7 ppm	8,62	8,54
Esp1	1779 ppm	9,71	632,9 ppm	683, 8 ppm	8,65	8,56

Agradecimientos: Queremos agradecer a la empresa John Deere Ibérica, S.A. su interés en la creación de un convenio de colaboración Universidad – Empresa y por el suministro del agua de taladrina con la que se han realizado los experimentos. También al programa FPU del Ministerio de Educación y Ciencia.

Referencias

Anderson, T.A, Guthrie, E.A. and Walton, B.T. (1993). Bioremediation in the rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.* 27: 2630-2636

Caplan. J. A. (1993). The worldwide bioremediation industry: prospects for profit. *Tibtech* 11:320–323.

Dua, M., Sethurnathan, N., and Johri, A. K. (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:143–152.

Gao, Y. Z. and Zhu, L. Z. (2004). Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere* 55:1169-1178.

Kummerová, M., Krulová, J., Zezulka, S., Tríska, J. (2006). Evaluation of fluoranthene phytotoxicity in pea plants by Hill reaction and chlorophyll fluorescence. *Chemosphere* 65: 489–496

Marin, I., De la Fuente, V., Rufo, L., Sanz, J.L., Amils, R. (2005). Biotecnología y medioambiente. Edit. Ephemera. Capítulo 9. Pp. 156.

Parrish, Z.D., Banks, M.K., Schwab, A.P. (2005) Effect of root death and decay on dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of yellow sweet clover and tall fescue. *J Environ Qual.* 34(1):207-216.

Schwab, A.P., and Banks, M.K. (1994). Biologically mediated dissipation of polyaromatic hydrocarbons in the root zone. Pages 132-141. *In: Bioremediation Through Rhizosphere Technology.* Anderson, T.A., and Coats, J.R. eds. American Chemicals Society. Washington. DC.

Watanabe, K. (2001) Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 12:237–241.

Phytoremediation of aqueous solutions of lubricants from industrial activities using maize plants grown in hydroponic conditions inoculated with different bacterial strains



Lucas García JA., Bonilla A., Gutiérrez Mañero F.J., Grijalbo Fernández L.

Dpto. Biología, Fac. Farmacia, Universidad San Pablo CEU, 28668-Boadilla del Monte, Madrid, Spain

Introducción

La biorremediación se define como la acción de los microorganismos u otros sistemas biológicos para degradar contaminantes ambientales (Caplan, 1993; Watanabe, 2001; Dua et al. 2002). Esta tecnología está aprobada y recomendada por varias agencias reguladoras en todo el mundo como por ejemplo la EPA (United States Environmental Protection Agency). Es una técnica muy utilizada para limpiar lugares contaminados tanto con metales pesados como con distintos tipos de hidrocarburos.

Existen distintas estrategias de biorremediación (atenuación natural, bioaumentación, fitorremediación y rizorremediación).

Las estrategias utilizadas en este trabajo son:

- La fitorremediación, que supone el uso de plantas para estabilizar (transformar compuestos tóxicos en otros menos tóxicos), extraer contaminantes y acumularlos en los tejidos aéreos, degradar o volatilizar los contaminantes (Kuiper et al., 2004). Los tipos de fitorremediación son fitoextracción, fitodegradación, fitovolatilización, fitoestabilización y rizofiltración, nosotros hemos utilizado este último, que se basa en el crecimiento de raíces (rizofiltración) o plántulas (blastofiltración) en agua contaminada con un suministro continuo de aire (Marín, I. et al., 2005). Las plantas se cultivan en invernaderos por procesos hidropónicos y los tóxicos son fijados o absorbidos por las raíces.
- La rizorremediación, que es la contribución de poblaciones bacterianas de la rizosfera al proceso de biorremediación (Schwab y Banks, 1994; Anderson et al., 2003).

Resultados y Discusión

El primer objetivo de este trabajo fue determinar si la reducción de la DQO del agua de taladrina (A.T.) era mejor con el material inerte o sin dicho soporte. Se obtuvo que la combinación material inerte - planta era la que garantizaba una mayor reducción de la DQO (figura 1), de donde se dedujo la posible presencia de cepas con capacidad biorremediadora en el material inerte. Existen en la bibliografía ejemplos de remediación con materiales inertes como zeolita, titanosilicatos o fibras naturales como lino para adsorber metales pesados (Marshall et al., 2007; Ferrerira et al., 2009; Panuccio et al., 2009), pero no se han encontrado referencias de materiales que adsorban hidrocarburos.

El efecto remediador del material inerte utilizado podría deberse a un fenómeno de adsorción de hidrocarburos. Además, el material inerte actúa como soporte apropiado donde se enraizan las plantas, creando un sistema radical denso, que como estableció Adam et al. (2002) garantiza ideales condiciones para la fitorremediación. Las plantas, por su parte, pueden estar disminuyendo la DQO mediante la absorción de algunos compuestos, acumulándolos en el interior de las células de la raíz, hecho ya demostrado por Gao y Zhu (2004). Además, se sabe que los exudados radicales son fuente de nutrientes para los microorganismos que viven cerca de sus raíces, dichos exudados mejoran los procesos degradativos llevados a cabo por las bacterias, acelerando el proceso hasta 100 veces con respecto a bacterias no asociadas a raíces (Parrish et al., 2005).

En segundo lugar, se quiso determinar si la inoculación de la cepa elegida mejoraba el proceso de biorremediación (Tabla 1). En todos los casos se observó que la reducción era mayor cuando no se inoculaba la cepa, aunque no presentaban diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con y sin inóculo. Sin embargo, sí existían diferencias significativas entre la DQO inicial y la DQO obtenida después del tratamiento de biorremediación (49 y 50% de reducción con y sin inóculo). Las plantas podrían disminuir la DQO absorbiendo algunos compuestos acumulándolos en el interior de las células de la raíz, hecho ya demostrado por otros autores (Gao y Zhu, 2004). Además, los exudados radicales son fuente de nutrientes para los microorganismos que viven cerca de sus raíces, acelerando los procesos degradativos bacterianos hasta 100 veces con respecto a bacterias no asociadas a raíces (Parrish et al., 2005).

También se observó una reducción del pH (Tabla 1) en un punto en los tratamientos con inóculo frente a los que no lo llevan, siendo la reducción significativa cuando se añadía la levadura.

En tercer lugar se quiso conocer el efecto del A.T. en las plantas (figura 2). Para ello se estudió la altura y el número de hojas. En la altura se encontró una disminución significativa en los tratamientos con A.T. frente a los controles. En cuanto al nº de hojas, se encontró que este parámetro disminuía en los tratamientos con A.T. frente a los controles, aunque esta disminución no es significativa cuando se inoculó con la levadura. La reducción en estos parámetros puede deberse a que la habilidad de las plantas para extraer PAHs (como el fluoreno y el pireno presentes en el A.T.), translocarlos, transformarlos y acumularlos es un factor limitante por la fitotoxicidad de estos compuestos y puede afectar cuantitativa y cualitativamente a varios procesos bioquímicos y fisiológicos que conllevan a la producción de biomasa (Kummerová et al. 2006)

Materiales y Métodos

Se colocaron 20 semillas pregerminadas de *Zea mays* en un sistema hidropónico con un material inerte que permitía el enraizamiento de las plantas, éstas se regaron con una solución nutritiva formada por agua, Hoagland (1 g/l) y caldo nutritivo (8 g/l). A los 12 días se realizó un primer inóculo (10^9 ufc/ml) y tres días después, cuando las plantas tenían un tamaño de unos 28 cm, se cambió el agua por agua de taladrina (DQO entre 1500 y 1800 ppm) con Hoagland (1 g/l) y caldo nutritivo (8 g/l) y se realizó un nuevo inóculo (10^9 ufc/ml). Cinco días después de añadir agua de taladrina se realizaron las medidas de: altura, nº hojas, DQO y pH. En el primer experimento se utilizó el maíz con material inerte como soporte y también el maíz sin material inerte pero no se inoculó, mientras que en el resto se inoculó con: una levadura (Esp21), una cepa bacteriana del género *Enterobacter* (Esp1), una cepa de *Pseudomonas fluorescens* (Aur 6) y una cepa *Bacillus licheniformis* (TP9) aislada de las propias taladrinas.

La taladrina es una emulsión de agua y aceite (2%) que se utiliza para refrigerar la zona de contacto entre las herramientas de corte y los materiales a mecanizar. Una vez que ha perdido sus propiedades se somete a un proceso físico que consta de varias etapas en las que se separa parcialmente el aceite del agua y que tiene como resultado el agua de taladrina utilizada en este trabajo.

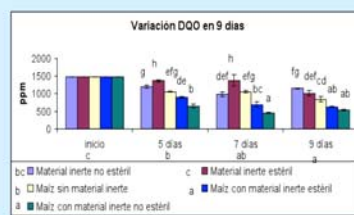


Figura 1. Variación de la DQO en función de la presencia o ausencia del material inerte (estéril y no estéril)

Tabla 1: Reducción de la DQO y pH en los experimentos con maíz y cepa inoculada

Cepa	DQO inicial	pH inicial	DQO final sin bacteria	DQO final con bacteria	pH final sin bacteria	pH final con bacteria
TP9	1678 ppm	-	490,96 ppm	533,3 ppm	-	-
Aur 6	1726 ppm	9,41	784 ppm	819 ppm	8,66	8,52
Levadura	1800 ppm	9,43	902 ppm	921,7 ppm	8,62	8,54
Esp1	1779 ppm	9,71	632,9 ppm	683, 8 ppm	8,65	8,56

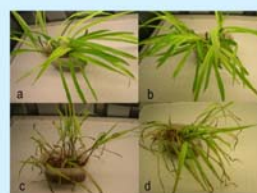


Figura 2. Plantas de maíz después de 5 días en contacto con agua de taladrina. (a) Control sin bacteria. (b) Control con bacteria. (c) Taladrina sin bacteria. (d) Taladrina con bacteria.

Agradecimientos

Queremos agradecer a John Deere Ibérica, S.A. su interés en la creación de un convenio de colaboración Universidad - Empresa y por el suministro del agua de taladrina con la que se han realizado los experimentos. También al Ministerio de Educación por su programa FPU.

Referencias

Adem, O., Gamon, K., Morris, D. G. and Duncan, H. 2002. Effect of alcohol on the movement of petroleum hydrocarbon fuels in soil. *J. Sci. Total Environ* 288(1-3): 15-25.

Anderson, T.A., Guhrh, E.A. and Wilson, B.T. 1983. Bioremediation in the microsphere. *Environ. Sci. Technol* 17: 2630-2638.

Caplan, J. A. 1993. The worldwide bioremediation industry: prospects for profit. *Taltech* 11:320-323.

Dua, M., Sethuraman, N. and Jothi, A. K. (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58:143-152.

Ferreira, T.R., Lopes, C.B., Liu, P.F., Orens, M., Liu, Z., Rocha, J., Pereira, E., Silva, C.M. and Duarte, A. 2009. Cadmium removal from aqueous solution using microcapsule ETS-4. *Chemical Engineering Journal* 147:175-179.

Gao, Y. Z. and Zhu, L. Z. (2004). Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere* 55:1169-1178.

Kuiper, I., Legendre, E., Bloembergen, G. and Lugtenberg, B. (2004). Rhizoremediation: A beneficial Plant - Microbe interaction (Review). *The American Phytopathological Society* 175:15.

Kummerová, M., Kholová, J., Zicháková, S., Trnka, J. (2006). Evaluation of fluoranthene phytotoxicity in pea plants by HPL reaction and chlorophyll fluorescence. *Chemosphere* 65: 489-496.

Marín, I., De la Fuente, V., Ruiz, L., Sanz, J.L., Amik, R. (2005). *Biotecnología y medioambiente*. Edt: Ephemera. Capítulo 9. Pp. 156.

Marshall, W.E., Warkelle, L.H. and Akin, D.E. 2009. Flax straw as a source of activated carbon for metals remediation. *Bioresources* 2(1):82-90.

Panuccio, M.R., Soragna, A., Rizzo, M. and Cacco, G. 2009. Cadmium adsorption on vermiculite, zeolite and pumice: Batch experimental studies. *Journal of Environmental Management* 90:304-314.

Parrish, Z.D., Banks, M.K., Schwab, A.P. (2005) Effect of root death and decay on dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of yellow sweet clover and tall fescue. *J Environ Qual* 34(1):207-216.

Schwab, A.P., and Banks, M.K. (1994). Biologically mediated dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the root zone. Pages 132-141. In: *Bioremediation Through Rhizosphere Technology*. Anderson, T.A., and Gupta, J.R. eds. American Chemical Society, Washington, DC.

Watanabe, K. (2001) Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 12:237-241.

XIX Reunión de la sociedad española de Fisiología Vegetal. Castellón de la plana. Junio 2011.

Abstract y póster: Efectos fisiológicos en plantas de maíz utilizadas en ensayos de fito-rizoremediación de aguas de taladrinas.

Grijalbo Fernández, L., Gutiérrez Mañero, F.J., Lucas García, J.A

Universidad San Pablo CEU, Fac. Farmacia, Dpto. Biología

El agua de taladrinas (A.T.) es una solución acuosa rica en aceites utilizada por muchas empresas en sus procesos industriales y que por su elevado valor de DQO no puede ser vertido al sistema integral de saneamiento. En la mayoría de las ocasiones el A.T. es vertido previa dilución con grandes cantidades de agua para disminuir la DQO. El uso de plantas y bacterias inoculadas en el sistema radical (fito-rizoremediación) podría convertirse en una alternativa mucho más sostenible.

En el presente trabajo se han utilizado plantas de maíz creciendo en contenedores de plástico en cultivo hidropónico sobre A.T. (nº patente: 2 350 433) inoculados con dos cepas bacterianas: Esp 1 y Esp 14. Al cabo de 5 días se midió la disminución de la DQO en el A.T. y el estado fisiológico de las plantas mediante la detección de la fluorescencia emitida por el fotosistema II en hojas adaptadas a oscuridad, utilizando el equipo Hansatech FMS2. Además se determinó la velocidad del flujo de electrones a través de los fotosistemas mediante la determinación de la velocidad de la reacción de Hill.

Se observó que la reducción de la DQO era mayor en plantas sin inocular, aunque no encontramos diferencias significativas entre los tratamientos. Mediante la detección de fluorescencia del fotosistema II se determinaron los siguientes parámetros: F_o , F_v/F_m , Φ_{PSII} , ETR y qP . Salvo para F_o , la disminución en los valores del resto de parámetros indican una pérdida de eficiencia fotosintética (Rohacek, 2002). El efecto tóxico de las taladrinas se muestra en la disminución de todos los parámetros en relación al control. El caso de F_o es diferente, ya que aumentos en este parámetro se relaciona con un daño en el aparato fotosintético (Baker, 2008). En ambos experimentos el A.T. reduce este parámetro significativamente lo que puede deberse a una reducción en el número de cloroplastos como se ha comprobado en otros experimentos mediante técnicas microscópicas. Parece que Esp 1 tiene un pequeño efecto protector.

La velocidad de la reacción de Hill disminuyó significativamente en las plantas que crecieron sobre A.T., constatando de nuevo su efecto tóxico.

Rohacek, K. (2002). *Photosynthetica* 40 (1): 13-29.

Baker, N.R. (2008). *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 89-113.

Este trabajo ha sido financiado por: Comunidad de Madrid CAM S-0505/AMB/000321; S2009/AMB-1511, John Deere S.A. y Fundación Universitaria San Pablo CEU.



EFFECTOS FISIOLÓGICOS EN PLANTAS DE MAÍZ UTILIZADAS EN ENSAYOS DE FITO-RIZORREMEDIAÇÃO DE AGUAS DE TALADRINAS



Grijalbo Fernández, L., Gutiérrez Mañero, F.J., Lucas García, J.A.

Dpto. Biología, Fac. Farmacia, Universidad San Pablo CEU, 28668-Boadilla del Monte, Madrid, Spain

Introducción

La biorremediación se define como la acción de los microorganismos u otros sistemas biológicos para degradar contaminantes ambientales (Caplan, 1993; Watanabe, 2001; Dua et al. 2002). Esta tecnología está aprobada y recomendada por varias agencias reguladoras en todo el mundo como por ejemplo la EPA (United Status Environmental Protection Agency). Es una técnica muy utilizada para limpiar lugares contaminados tanto con metales pesados como con distintos tipos de hidrocarburos.

El agua de taladrinas (A.T.) es una solución acuosa rica en aceites utilizada por muchas empresas en sus procesos industriales y que por su elevado valor de DQO (demanda química de oxígeno) no puede ser vertido al sistema integral de saneamiento. En la mayoría de las ocasiones el A.T. es vertido previa dilución con grandes cantidades de agua para disminuir la DQO. El uso de plantas y bacterias inoculadas en el sistema radical (fito-rizorremediación) podría convertirse en una alternativa mucho más sostenible.

Existen distintas estrategias de biorremediación (atenuación natural, bioaumentación, fitorremediación y rizorremediación). Las estrategias utilizadas en este trabajo son:

- La fitorremediación, es el uso de plantas para estabilizar (transformar compuestos tóxicos en otros menos tóxicos), extraer contaminantes y acumularlos en los tejidos aéreos, degradar o volatilizar los contaminantes (Kuiper et al., 2004). Los tipos de fitorremediación son fitoextracción, fitodegradación, fitovolatilización, fitoestabilización y rizofiltración. Nosotros hemos utilizado este último, que se basa en el crecimiento de raíces (rizofiltración) o plántulas (blastofiltración) en agua contaminada con un suministro continuo de aire (Marín, I. et al., 2005). Las plantas se cultivan en invernaderos por procesos hidropónicos y los tóxicos son fijados o absorbidos por las raíces.

- La rizorremediación, es la contribución de poblaciones bacterianas de la rizosfera al proceso de biorremediación (Schwab y Banks, 1994; Anderson et al, 2003).

Resultados y Discusión

En primer lugar, se quiso determinar si la inoculación de la cepa elegida mejoraba el proceso de biorremediación (Tabla 1). En ambos casos se observó que la reducción era mayor cuando no se inoculaba, aunque no presentaban diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con y sin inóculo. Sin embargo, si existían diferencias significativas entre la DQO inicial y la DQO obtenida después del tratamiento de biorremediación (49 y 50% de reducción con y sin inóculo). Las plantas podrían disminuir la DQO absorbiendo algunos compuestos acumulándolos en el interior de las células de la raíz, hecho ya demostrado por otros autores (Gao y Zhu, 2004). Además, los exudados radicales son fuente de nutrientes para los microorganismos que viven cerca de sus raíces, acelerando los procesos de degradación bacterianos hasta 100 veces con respecto a bacterias no asociadas a raíces (Parrish et al., 2005).

También se observó una reducción del pH (Tabla 1) en un punto en los tratamientos con inóculo frente a los que no lo llevan, siendo la reducción significativa cuando se añadía la levadura.

Además se quiso conocer el efecto del A.T. en las plantas (figura 1). Para ello, mediante la detección de fluorescencia del fotosistema II, se determinaron los parámetros fotosintéticos: Fo, Fv/Fm, ΦPSII, ETR y qP (tabla 2). Salvo para Fo, la disminución en los valores del resto de parámetros indican una pérdida de eficiencia fotosintética (Rohacek, 2002). El efecto tóxico de las taladrinas se muestra en la disminución de todos los parámetros en relación al control. En el caso del parámetro ΦPSII, la disminución puede atribuirse a los compuestos orgánicos que inhiben el proceso fotoquímico de la fotosíntesis relacionado con la cadena de transporte electrónico en la membrana de los tilacoides (Kummerová, 2008).

El caso de Fo es diferente, ya que aumentos en este parámetro se relaciona con un daño en el aparato fotosintético (Baker, 2008). En ambos experimentos el A.T. reduce este parámetro significativamente lo que puede deberse a una reducción en el número de cloroplastos como se ha comprobado en otros experimentos mediante técnicas microscópicas. Parece que Esp 1 tiene un pequeño efecto protector.

La velocidad de la reacción de Hill (tabla 2) disminuyó significativamente en las plantas creciendo sobre A.T. constatando de nuevo su efecto tóxico. Esta disminución puede deberse a que en el PSII, el daño está primero localizado en la proteína D1 donde ocurre la transferencia de electrones entre el primer donador, Tyr Z, y la segunda plastoquinona aceptora, Qb (Barber and Anderson, 1992).

Materiales y Métodos

Se colocaron 20 semillas pregerminadas de *Zea mays* en un sistema hidropónico con un material inerte que permitía el enraizamiento de las plantas (nº patente: 2 350 433), éstas se regaron con una solución nutritiva formada por agua y Hoagland (1 g/l). A los 12 días se realizó un primer inóculo (10⁹ ufc/ml) y tres días después, cuando las plantas tenían un tamaño de unos 28 cm, se cambió el agua por agua de taladrina (DQO aproximada de 1800 ppm, pH de aproximadamente 9.5) con Hoagland (1 g/l) y caldo nutritivo (8 g/l) y se realizó un nuevo inóculo (10⁹ ufc/ml).

Cinco días después de añadir agua de taladrina se midió la disminución de la DQO y el pH en la misma y el estado fisiológico de las plantas mediante la detección de la fluorescencia emitida por el fotosistema II en hojas adaptadas a oscuridad, utilizando el equipo Hansatech FMS2. Además se determinó la velocidad del flujo de electrones a través de los fotosistemas mediante la determinación de la velocidad de la reacción de Hill.

En ambos experimentos se utilizó el material inerte sin esterilizar y se inoculó con: la levadura *Rhodotorula dairenensis* AF44501 (Esp14) y la cepa bacteriana del género *Enterobacter* sp. GU831891 (Esp1).

Tabla 1: Reducción de la DQO y pH en los experimentos con maíz y cepa inoculada. Letras diferentes (en cada bacteria) indican diferencias significativas (p < 0.05).

Cepa	DQO inicial	DQO final sin bacteria	DQO final con bacteria	pH inicial	pH final sin bacteria	pH final con bacteria
Esp1	1779 ppm b	632.9 ± 22.81 ppm a	663, 8 ± 26,16 ppm a	9,71 x	8,65 ± 0,007 y	8,56 ± 0,06 y
Esp14	1800 ppm b	902 ± 40 ppm a	921,7 ± 15,97 ppm a	9,43 x	8,62 ± 0,008 y	8,54 ± 0,01 z

Tabla 2: Efecto del agua de taladrina sobre los parámetros fotosintéticos y la reacción de Hill. Letras diferentes (en cada bacteria) indican diferencias significativas (p < 0,05).

Tratamiento	Fo	Fv/Fm	ΦPSII	NPQ	qP	ETR	Hill Reaction (µg DCP/PP reduced min ⁻¹ Chl µg ⁻¹)
Sin taladrina sin Esp1	162.76±6.82 a	0.766±0.004 b	0.330±0.01 c	0.062±0.007 ns	0.439±0.015 bc	8.615±0.281 b	53.594±2.156 a
Sin taladrina con Esp1	180.27±6.86 c	0.755±0.006 ab	0.327±0.001 bc	0.07±0.007 ns	0.454±0.015 c	8.393±0.266 ab	81.697±1.849 b
Con taladrina sin Esp1	144.56±5.14 b	0.758±0.008 b	0.289±0.012 a	0.066±0.005 ns	0.386±0.015 a	7.681±0.285 a	28.697±1.349 c
Con taladrina con Esp1	154.63±3.19 ab	0.735±0.009 a	0.294±0.014 ab	0.066±0.007 ns	0.393±0.021 ab	7.822±0.331 a	18.822±1.536 d
Sin taladrina sin Esp14	179.67±5.43 c	0.752±0.007 ns	0.492±0.016 c	0.057±0.007 a	0.623±0.025 b	12.820±0.441 c	17.291±0.358 b
Sin taladrina con Esp14	182.27±4.78 c	0.769±0.006 ns	0.430±0.015 b	0.051±0.005 a	0.582±0.022 b	11.205±0.395 b	36.466±2.533 c
Con taladrina sin Esp14	120.73±6.41 a	0.758±0.010 ns	0.300±0.016 a	0.069±0.009 b	0.420±0.017 a	7.8260.441 a	18.700±1.183 b
Con taladrina con Esp14	158.99±6.33 b	0.737±0.018 ns	0.325±0.021 a	0.068±0.006 a	0.407±0.021 a	8.465±0.562 a	13.065±0.581 a

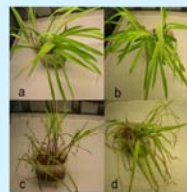


Figura 1. Plantas de maíz después de 5 días en contacto con agua de taladrina. (a) Control sin bacteria. (b) Control con bacteria. (c) Taladrina sin bacteria. (d) Taladrina con bacteria.

Agradecimientos

Queremos agradecer a John Deere Ibérica, S.A. su interés en la creación de un convenio de colaboración Universidad – Empresa y por el suministro del agua de taladrina con la que se han realizado los experimentos. También al Ministerio de Educación por su programa FPU, Comunidad de Madrid CAM S-0505/AMB/000321, S2009/AMB-1511 y Fundación Universitaria San Pablo CEU.

Referencias

Anderson, T.A., Guthrie, E.A. and Walton, B.T. (1993). Bioremediation in the rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.* 27: 2630-2636.
 Baker, N.R. (2008). *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 89-113.
 Barber, J., Andersson, B., 1992. Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 17: 61-66.
 Caplan, J. A. (1993). The worldwide bioremediation industry: prospects for profit. *Tibtech* 11:320-323.
 Dua, M., Sethurathnan, N., and Johri, A. K. (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:143-152.
 Gao, Y. Z. and Zhu, L. Z. (2004). Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere* 55:1169-1178.
 Kuiper, I., Legendijk, E., Bloemberg, G. and Lugtenberg, B. (2004) Rhizoremediation: A beneficial Plant – Microbe interaction (Review). *The American Phytopathological Society*, 17:6-15
 Kummerová, M., Vá n'ová, L., Krulová, J. and Zezulka, S. The use of physiological characteristics for comparison of organic compounds phytotoxicity. *Chemosphere* 71 (2008) 2050-2059
 Marín, I., De la Fuente, V., Rufo, L., Sanz, J.L., Amils, R. (2005). *Biotechnology y medioambiente*. Edit. Ephemera. Capítulo 9. Pp. 156.
 Parrish, Z.D., Banks, M.K., Schwab, A.P. (2005) Effect of root death and decay on dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of yellow sweet clover and tall fescue. *J Environ Qual.* 34(1):207-216.
 Rohacek, K. (2002). *Photosynthetica* 40 (1): 13-29.
 Schwab, A.P., and Banks, M.K. (1994). Biologically mediated dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the root zone. Pages 132-141. In: *Bioremediation Through Rhizosphere Technology*. Anderson, T.A., and Coats, J.R. eds. American Chemical Society, Washington, DC.
 Watanabe, K. (2001) Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 12:237-241.

IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. BioMicroWorld2011. Torremolinos. 14-16 September 2011.

Abstract y poster: Structural diversity of microbial communities in a bioreactor fed with bio-remediated metal-working fluid.

Grijalbo Fernández, L.¹; Lucas García, J. A.¹; Gutiérrez-Mañero, F. J.¹; Garbisu, C.²; Etxebarria, J.³

¹ Plant Biology, Faculty of Pharmacy, San Pablo – CEU University (Madrid-Spain).

² NEIKER, Basque Institute of Agricultural Research and Development, C/Berreaga, 1, 48160 (Derio-Spain).

³ GAIKER. Technological Centre, building 202, 48100 (Zamudio-Spain).

The membrane bioreactor (MBR) is an innovative technology which combines biodegradation together with membrane separation in a single process, thereby separating microorganisms and suspended solids from the treated water by membrane filtration. (Chang *et al.*, 2010).

In the process of manufacturing metal pieces, water-oil emulsions are used to lubricate and to cool the contact surface between the cutting tool and the manufactured piece. Water-based cutting fluids and coolants used in machining operations typically contain ethanolamines, polyglycols, chlorinated or sulfonated paraffins, mineral oil and similar molecules (Backer *et al.*, 2010). When physicochemical properties are lost, the emulsion is pretreated by a physical process and this is a waste solution that cannot be released in this form and needs further processing. This metal-working fluid is the target material to be biorremediated in this work.

The aim of this study is to determine MBR's structural diversity of spontaneous microbial communities. To achieve this purpose, culturable microorganisms were isolated and cloned in a library. 16S rRNA gene was amplified and the cloned plasmids were isolated using the Speedtools Plasmid DNA purification Kit (Biotools). Ninety nine culturable and 303 non-culturable clones were sequenced at MacroGen Europe Service. Sequence alignment was done on Mega 5.0. to generate a phylogenetic tree using the neighbor-joining method.

Isolates identified as *Pseudomonas sp.* appeared to dominate the bioreactor culturable population. This domination may be due to its extreme nutritional versatility (Stanier *et al.*, 1966). Also, this genus has been found in cutting fluids by other investigators (Bennet, 1974; Pivnick, 1954) and in other MBR feeded with metal-working fluids (Backer *et al.*, 1983). The *Caulobacteriaceae* order also appeared in the reactor, and has been reported before in other studies (Backer *et al.*, 2010), but this is the first time in metal-working fluids.

In the MBR's structural diversity (culturable and non-culturable organisms) the most abundant orders were α -proteobacteria, β -proteobacteria and γ -proteobacteria. According to others MBR studies (Wan *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010) one of the most common OTUs in this systems belonged to the *Proteobacteria*.

None of the predominant bacteria from the reactor belonged to a strictly pathogenic group. Strikingly, genera with representatives of opportunistic pathogens like *Acinetobacter* and *Pseudomonas* were found

Acknowledgments: John Deere Ibérica S.A. (Getafe-Spain) for the metal-working fluids supplied, Gaiker Foundation (Vizcaya – España) for use of the MBR, FPU Programme from the Science and Innovation Ministry (Spain).

References

Backer, C. A.; Claus, G. W. and Taylor, P. A. 1983. Predominant Bacteria in an Activated Sludge Reactor for the Degradation of Cutting Fluids. *App. and Env. Microbiology*. 46:1214-1223.

Bennet, E. O., 1974. The deterioration of metal cutting fluids. *Prog. Ind. Microbiol.* 13:123-149.

Chang, C-H.; Tanong, K.; Xu, J. and Shon, H. 2010. Microbial community análisis o fan aerobic nitrifying-denitrifying MBR treating ABS resin wastewater. *Bios. Technology*. 102:5337-5344.

Pivnick, H. And Fabian, F. W. 1954. Coliform bacteria in soluble oil emulsions. *Appl. Microbiol.* 2:107-110.

Stainer, R. Y.; Palleroni, N. J. and Doudoroff. 1966. The aerobic *Pseudomonas*: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43:159-271.

Wan, C-Y.; de Wever, H.; Diels, L.; Thoeye, C.; Liang, J-B.; Huang, L.N. 2010. Biodiversity and population dynamics of mycroorganisms in a full-scale membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. *Water research* 45:1129-1138.

Wang, X.; Wen, X.; Yan, H.; Ding, K.; Zhao, F.; Hu, M. 2010. Bacterial community dynamics in a functionally stable pilot-scale wastewater treatment plant. 102:2352-2357.

Keywords: R.B.M, biorremediation, Metal-working fluid



Structural diversity of microbial communities in a bioreactor fed with metal-working fluid



Grijalbo Fernández, L.¹; Lucas García, J. A.¹; Gutiérrez-Mañero, F. J.¹; Garbisu, C.²; Etxebarria, J.³

¹ Plant Biology, Faculty of Pharmacy, San Pablo – CEU University (Madrid-Spain).

² NEIKER, Basque Institute of Agricultural Research and Development, C/Berreaga, 1, 48160 (Derio-Spain).

³ GAIKER. Technological Centre, building 202, 48100 (Zamudio-Spain).

Introduction

In the process of manufacturing metal pieces, water-oil emulsions are used to lubricate and to cool the contact surface between the cutting tool and the manufactured piece. Water-based cutting fluids and coolants used in machining operations typically contain ethanalamines, polyglycols, chlorinated or sulfonated paraffins, mineral oil and similar molecules (Backer *et al.*, 2010). When physicochemical properties are lost, the emulsion is pretreated by a physical process and this is a waste solution that cannot be released in this form and needs further processing. This metal-working fluid is the target material to be bioremediated in this work.

The membrane bioreactor (MBR) is an innovative technology which combines biodegradation together with membrane separation in a single process, thereby separating microorganisms and suspended solids from the treated water by membrane filtration. (Chang *et al.*, 2010). The microorganisms came from an activated sludge from the Larrabetzu's wastewater treatment plant.

The aim of this study is to determine the MBR's structural diversity of spontaneous microbial communities during the assay time (2 months), with a double approach: on the one hand, isolating culturable microorganisms and characterizing them by PCR technique; on the other hand, making a metagenomic library with the 16S rRNA obtained by the amplification of the total community DNA.

Materials and Methods

The metal working fluids used in this work were supplied by the John Deere Iberica S.A. company. This material were used to refrigerate the contact between machines and pieces, in this process the coolant lose its properties so it is necessary to delete them.

A membrane bioreactor was used in order to obtain a microbial community that was able to degrade the metal working fluids' pollutants. This reactor (figure 1) can treat 36 L/h. The feeding effluent (pretreated metal working fluids) has a Chemical Oxygen Demand (COD) of 6000 ppm while the permeate effluent has a COD of 1000 ppm.

The sludge community was progressively acclimated to the metal working fluids. When it was acclimated to a feeding of 6000 ppm, it was made 5 samplings (along a month and a half) in order to obtain culturable microorganisms and to isolate the total community DNA, using the UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MOBIO). The DNA was cloned in a library using the With obtained the TOPO TA CLONING SEQUENCE (invitrogen)

The bacterial 16S rRNA gene was amplified by the PCR process and the cloned plasmids were isolated using the Speedtools Plasmid DNA purification Kit (Biotools).

The sequence edition was made with the program Clone Manager Professional Suite versión 6.00. The chimeras checking were made with the online Bellerophon Server (Huber, T. *et al.*, 2004). The sequence was made with the program MAFFT version 6 (Katoh, *et al.*, 2009). The sequence phylogenetic classification was made by two strategies:

a) Using the blastn with each of the sequences: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TY PE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on

b) By the introduce of the sequences in RDP Release 10 (Wang, Q. *et al.*, 2007).

The phylogenetic trees inference was made with the program PHYLIP version 3.68 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>).



Figure 1: Membrane bioreactor

Results

Ninety nine culturable and 303 clones were sequenced.

The different samples shown (figure 2) that the predominant classes in the reactor community were *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria*. The *Betaproteobacteria* was the most abundant class except in the fifth sample where the most abundant was the *Gammaproteobacteria* one. An interesting point is the presence of *Sphingobacteria* and *Proteobacterias* unclassified organisms in the two last samples. In these ones, the bioreactors works without the membrane.

The diversity index related to non culturable microorganisms, like the Shannon one (figure 3), has shown that the higher diversity exists in sample A, while the sample B and the sample E has the less diversity. However, the diversity index studies related to culturable microorganisms (figure 4) has shown that the first sample (A) had the lowest structural diversity.

Discussion / conclusions

The results of this study shown a low biodiversity, probably due to the great selection made by the substratum. The community organization change during the experiment time, only a small bacterial group was dominant in the water treatment (*Proteobacteria*). None of the predominant bacteria from the reactor belonged to a strictly pathogenic group. Strikingly, genera with representatives of opportunistic pathogens like *Acinetobacter* and *Pseudomonas* were found.

The most relevant result is the abundance of the *Proteobacteria* OTUs. According to others MBR studies (Wan *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010) one of the most common OTUs in this systems belonged to the *Proteobacteria*. This OTU has already been described in other MBR studies (Wagner and Loy, 2002; Wang *et al.*, 2010) and in other studies that indicate the predominance of this order in sludge and in water treatment of industrial effluents (Juretschko, S. *et al.* 2002; Kraigher, B. *et al.*, 2008). In the MBR's structural diversity (culturable and non-culturable organisms) the most abundant orders were α -proteobacteria, β -proteobacteria and γ -proteobacteria. The β -*Proteobacteria* has been identified as the principal subpopulation of the bioreactor residual water (Snaird, J. *et al.*, 1997).

Isolates identified as *Pseudomonas* sp. appeared to dominate the bioreactor culturable population. This domination may be due to its extreme nutritional versatility (Stanier *et al.*, 1966). Also, this genus has been found in cutting fluids by other investigators (Bennet, E.O., 1974; Pivnick, H., 1954) and in other MBR feeded with metal-working fluids (Backer *et al.*, 1983). The *Caulobacteriaceae* order also appeared in the reactor and has been reported before in other studies (Backer *et al.*, 2010), but this is the first time in metal-working fluids.

The genus *Thiobacillus*, from the order *Hydrogenophilliales* (sample C) have been obtained. This genus can oxidize organic and inorganic sulfur compounds and has commonly been discovered in residual waters from the refineries treatment (Cho, K. H. *et al.*, 1991; Sipma, J. *et al.*, 2004).

The non-culturable diversity study has shown a significant reduction between the first sample and the others (figure 3). It could be due to an increase in chemical oxygen demand (COD) in the influent wastewater. Temporal fluctuations in influent wastewater characteristics are generally thought to affect microbial community structure in WWTPs (Wan *et al.*, 2010). Another point is that molecular characterizations from water treatment ecosystems has revealed that unknown organisms, like the non culturable bacteria, are responsible for the conventional activated sludge and biological reactors process (Wagner and Loy, 2002).

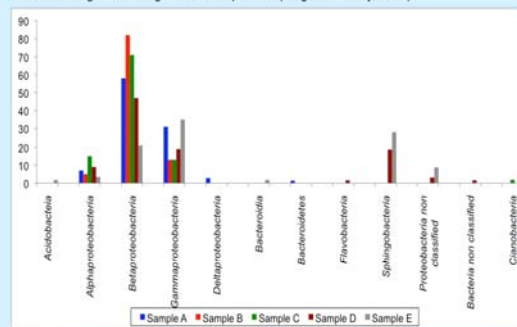


Figure 2: Distribution of the different classes in each sample. Blue (sample A), red (sample B), green (sample C), brown (sample D), grey (sample E)

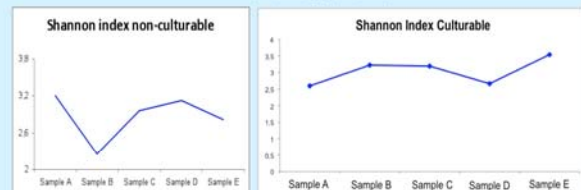


Figure 3: Diversity estimation in each sample by the Shannon Index for non culturable microorganisms. OTUs distance was 0.02 (2%)

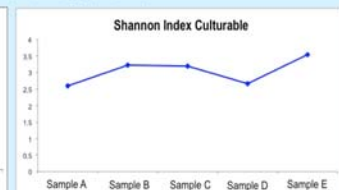


Figure 4: Diversity estimation in each sample by the Shannon Index for culturable microorganisms

Acknowledgments

John Deere Iberica S.A. (Getafe-Spain) for the metal-working fluids supplied, Gaiker Foundation (Vizcaya – España) for use of the MBR, FPU Programme from the Science and Innovation Ministry (Spain).

References

- Backer, C. A. *et al.* 1983. *App. and Env. Microbiology*. 46:1214-1223.
 Bennet, E. O., 1974. *Prog. Ind. Microbiol.* 13:123-149.
 Chang, C-H. *et al.* 2010. *Bios. Technology*. 102:5337-5344.
 Cho, K. S. *et al.* 1991. *J. Ferment. Bioeng.* 71:384-389.
 Huber, T. *et al.* 2004. *Bioinformatics* 20:2317-2319.
 Juretschko, S. *et al.* 2002. *System. Appl. Microbiol.* 25:84-99.
 Katoh, R. *et al.* 2009. *Methods in Molecular Biology* 537:39-64.
 Kraigher, B. *et al.* 2008. *Water Res.* 42:4578-4588.
 Pivnick, H. and Fabian, F. W. 1954. *Appl. Microbiol.* 2:107-110.
 Sipma, J. *et al.* 2004. *Water Res.* 38:4331-4340.
 Snaird, J. *et al.* 1997. 63:2884-2896.
 Stanier, R. Y. *et al.* 1966. *J. Gen. Microbiol.* 43:159-271.
 Wagner, M. and Loy, A. 2002. *Current Opinion in Biotechnology* 13:218-227.
 Wan, C. Y. *et al.* 2010. *Water research* 45:1129-1138.
 Wang, Q. G. M. *et al.* 2007. *Appl Environ Microbiol.* 73(16): 5261-7.
 Wang, X. *et al.* 2010. *Bioresour. Technology*. 102:2352-2357.

IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. BioMicroWorld2011. Torremolinos. 14-16 September 2011.

Abstract y poster: Functional diversity of microbial communities in a bioreactor fed with bio-remediated metal-working fluid.

Grijalbo Fernández, L.¹; Lucas García, J. A.¹; Gutiérrez-Mañero, F. J.¹; Garbisu, C.²; Etxebarria, J.³

¹ Plant Biology, Faculty of Pharmacy, San Pablo – CEU University (Madrid-Spain).

² NEIKER, Basque Institute of Agricultural Research and Development, C/Berreaga, 1, 48160 (Derio-Spain).

³ GAIKER FOUNDATION. Technological Centre, building 202, 48100 (Zamudio-Spain).

The membrane biorreactor (MBR) is an innovative technology which combines biodegradation together with membrane separation in a single process, thereby separating microorganisms and suspended solids from the treated water by membrane filtration. (Chang *et al.*, 2010). In the process of manufacturing metal pieces, water-oil emulsions are used to lubricate and to cool the contact surface between the cutting tool and the manufactured piece. Water-based cutting fluids and coolants used in machining operations typically contain ethanolamines, polyglycols, chlorinated or sulfonated paraffins, mineral oil and similar molecules (Backer *et al.*, 2010). When physicochemical properties are lost, the emulsion is pretreated by a physical process and this is a waste solution that cannot be released in this form and needs further processing. This metal-working fluid is the target material to be biorremediated in this work. The aim of this study is to know the MBR functional diversity. To this aim, 5 samples of the MBR microbial community (culturable and non-culturable) were taken. Biodiversity (CHAO and SHANNON) and metabolic diversity by Biolog® (Gram -, Gram + and anaerobia) plates were studied.

The biodiversity study has shown a significant reduction between the first sample and the others. It could be due to an increase in chemical oxygen demand (COD) in the influent wastewater. Temporal fluctuations in influent wastewater characteristics are generally thought to affect microbial community structure in WWTPs (Wan *et al.*, 2010). However, the Biolog® study showed that the first sample had the lowest metabolic diversity. This could indicate that the COD increase did not increase the toxic effect in the environment, but stimulated the microbial community production. Other studies have demonstrated that the addition of contaminants (like retardants or fertilisers) cause an increase of the microbial activity (García-Villaraco Velasco *et al.*, 2009; Basanta *et al.*, 2002; Adams and Attiwil, 1991; Dunn *et al.*, 1985). The Biolog® study also revealed that the aromatic compounds and the polymers are the preferred carbon sources consumed by anaerobic organisms. However, the Biolog® Gram + and Gram - have shown that these compounds are the less consumed by non-anaerobic organisms.

Acknowledgments: John Deere Ibérica S.A. (Getafe-Spain) for the metal-working fluids supplied, Gaiker Foundation (Vizcaya – España) for use of MBR, FPU Programme from the Science and Innovation Ministry (Spain).

References

Adams, M. A. and Attiwill, P. M. 1991 Nutrient balance in forests of Northern Tasmania 2. Alteration of nutrient availability and soil-water chemistry as a result of logging, slash-burning and fertilizar application. *Forest. Ecol. Management.* 44:115-132.

Backer, C. A.; Claus, G. W. and Taylor, P. A. 1983. Predominant Bacteria in an Activated Sludge Reactor for the Degradation of Cutting Fluids. *App. and Env. Microbiology.* 46:1214-1223.

Basanta, M. R.; Díaz-Ravina, M.; González-Prieto, S. J.; Carballas, T. 2002 Biochemical properties of forest soils as affected by a fire retardant. *Biol. Fert. Soils* 36(5):377-383.

Chang, C-H.; Tanong, K.; Xu, J. and Shon, H. 2010. Microbial community análisis o fan aerobic nitrifying-denitrifying MBR treating ABS resin wastewater. *Bios. Technology.* 102:5337-5344.

Dunn, P. H.; Barro, S. C.; Poth, M. 1985. Soil-moisture affects survival of microorganisms in heated chaparral soil. *Soil Biol. Biochem.* 17(2):143-148.

García-Villaraco Velasco, A.; Probanza, A.; Gutiérrez Mañero, F. J.; Cruz Treviño, A.; Moreno, J. M.; Lucas García, J. A. 2009. Effect of fire and retardant on soil microbiological activity and functional diversity in a Mediterranean pasture. *Geoderma* 153:186-193.

Wan, C-Y.; de Wever, H.; Diels, L.; Thoeye, C.; Liang, J-B.; Huang, L.N. 2010. Biodiversity and population dynamics of mycroorganisms in a full-scale membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. *Water research* 45:1129-1138.

Keywords: R.B.M, metal-working fluid, biorremediación, Biolog®.



Functional diversity of microbial communities in a bioreactor fed with metal-working fluid



Grijalbo Fernández, L.¹; Lucas García, J. A.¹; Gutiérrez-Mañero, F. J.¹; Garbisu, C.²; Etxebarria, J.³

¹ Plant Biology, Faculty of Pharmacy, San Pablo – CEU University (Madrid-Spain).

² NEIKER, Basque Institute of Agricultural Research and Development, C/Berreaga, 1, 48160 (Derio-Spain).

³ GAIKER. Technological Centre, building 202, 48100 (Zamudio-Spain).

Introduction

In the process of manufacturing metal pieces, water-oil emulsions are used to lubricate and to cool the contact surface between the cutting tool and the manufactured piece. Water-based cutting fluids and coolants used in machining operations typically contain ethanalamines, polyglycols, chlorinated or sulfonated paraffins, mineral oil and similar molecules (Backer et al., 2010). When physicochemical properties are lost, the emulsion is pretreated by a physical process and this is a waste solution that cannot be released in this form and needs further processing. This metal-working fluid is the target material to be bioremediated in this work.

The membrane bioreactor (MBR) is an innovative technology which combines biodegradation together with membrane separation in a single process, thereby separating microorganisms and suspended solids from the treated water by membrane filtration. (Chang et al., 2010). The microorganisms came from an activated sludge from the Larrabetzu's wastewater treatment plant.

The aim of this study is to know the functional diversity and the capacity of the microbial communities developed in the MBR during the assay time (2 months), to consume different nutrient devices.

Materials and Methods

The metal working fluids used in this work were supplied by the John Deere Iberica S.A. company. This material were used to refrigerate the contact between machines and pieces, in this process the coolant loose its properties so is necessary to delete them.

A membrane bioreactor was used in order to obtain a microbial community that degrade the metal working fluids' pollutants. This reactor (figure 1) can treat 36 lh. The feeding effluent (pretreated metal working fluids) has a Chemical Oxygen Demand (COD) of 6000 ppm while the permeate effluent has a COD of 1000 ppm.

The sludge community was progressively acclimated to the metal working fluids. When the MBR was acclimated to a feeding of 6000 ppm COD, it was made 5 samplings (along a month and a half) in order to know the metabolic capacities from the microbial community, the Biolog® analysis was made.

The Biolog studies shown the metabolic diversity and the compounds more likely to be consumed by the microbial community.

In each sample, the activated sludge was used to obtain a bacterial suspension. So this sludge was shaking 125 rpm, 1 hour and then centrifuge 10 minutes 1000 rpm. The supernatant was diluted with phosphate buffer in order to obtain dilutions of an absorbance between 0.05 to 0.15 at 420 nm.

This solution was inoculated (150 µL) in each wells of three kinds of plates: Gram -, Gram + and Anaerobic. The absorbance was measured at 0 hours and each 24 hours at a λ = 595 nm, except for anaerobic plates, where measure was made at 96 hours. The last measure was made at 262 hours.

A correspondance analysis was made with the CANOCO program.



Figure 1: Membrane bioreactor

Results

The Correspondance Analysis (CA) has shown that the sample 1 has a different metabolic capacity related to the other samples. This analysis shown similar results for each plate (Gram +, Gram - and anaerobic), only the Gram - correspondance analysis is shown (figure 2)

The Biolog® study related to culturable microorganisms has shown that the first sample (A) had the lowest metabolic diversity.

The Biolog® study also revealed that the aromatic compounds and the polymers are the preferred carbon sources consumed by anaerobic organisms (figure 3). However, the Biolog® Gram + (figure 4) and Gram - (figure 5) have shown that these compounds are the less consumed by non-anaerobic organisms.

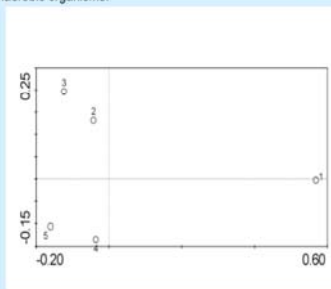


Figure 2: Correspondance Analysis (CA) with the correct absorbance data for each kind of plate (Gram -).

Discussion / conclusions

It is known that changes in the metabolic diversity, observed with the Biolog® system, are related to changes in the community composition (Schutter and Dick, 2001; Crecchio et al. 2004).

The Biolog® study showed that the first sample had the lowest metabolic diversity (data not shown). This could indicate that the COD increase that has happened between sample A and the other samples did not increase the toxic effect in the environment, but stimulated the microbial community production. Other studies have demonstrated that the addition of contaminants (like retardants or fertilisers) cause an increase of the microbial activity (García-Villaraco Velasco et al., 2009; Basanta et al. 2002; Adams and Attwil, 1991; Dunn et al., 1985).

To sum up, it seems that the diversity variation observed in this study could be related to changes in the Chemical Oxygen Demand (for example, in sample B and C this parameter were higher than in the others) and also to the absence of the membrane could affect the diversity (in sample D and E the reactor operates without it).

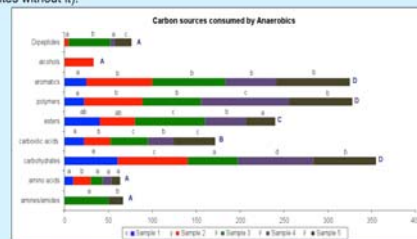


Figure 3. Carbon sources consumed by Biolog Anaerobics (dipeptides, alcohols, aromatics, polymers, esters, carboxylic acids, carbohydrates, aminoacids, amines / amides). Blue (sample 1, 262 hours), red (sample 2, 262 hours), green (sample 3, 262 hours), purple (sample 4, 94 hours), brown (sample 5, 262 hours). ANOVA unidirectional for each carbon source by sample (single letters, p<0.05). ANOVA factorial to know the differences between sources in each sample (capital letters, p<0.05) and between samples (x, y, z p<0.05)

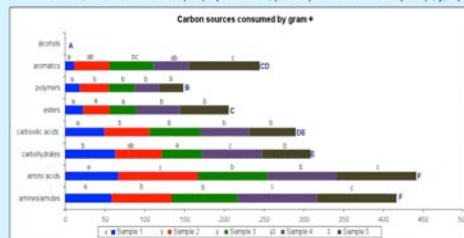


Figure 4. Carbon sources consumed by Biolog Gram + (alcohols, aromatics, polymers, esters, carboxylic acids, carbohydrates, aminoacids, amines / amides). Blue (sample 1, 262 hours), red (sample 2, 166 hours), green (sample 3, 166 hours), purple (sample 4, 94 hours), brown (sample 5, 166 hours). ANOVA unidirectional for each carbon source by sample (single letters, p<0.05). ANOVA factorial to know the differences between sources in each sample (capital letters, p<0.05) and between samples (x, y, z p<0.05)

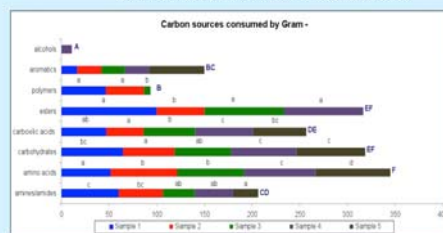


Figure 5. Carbon sources consumed by Biolog Gram - (alcohols, aromatics, polymers, esters, carboxylic acids, carbohydrates, aminoacids, amines / amides). Blue (sample 1, 262 hours), red (sample 2, 94 hours), green (sample 3, 94 hours), purple (sample 4, 94 hours), brown (sample 5, 94 hours). ANOVA unidirectional for each carbon source by sample (single letters, p<0.05). ANOVA factorial to know the differences between sources in each sample (capital letters, p<0.05).

Acknowledgments

John Deere Iberica S.A. (Getafe-Spain) for the metal-working fluids supplied, Gaiker Foundation (Vizcaya – España) for use of the MBR, FPU Programme from the Science and Innovation Ministry (Spain).

References

Adams et al. 1991. Forest. Ecol. Management. 44:115-132.
 Backer, C. A. et al. 1983. App. and Env. Microbiology. 46:1214-1223.
 Basanta, M. R. et al. 2002. Biol. Fert. Soils 36(5):377-383.
 Chang, C. H. et al. 2010. Bios. Technology. 102:5337-5344.
 Crecchio, C. et al. 2004. Soil Biol. Biochem., 36:1873-1883.
 Dunn, P. H. et al. 1985. Soil Biol. Biochem. 17(2):143-148.
 García-Villaraco Velasco, A. et al. 2009. Geoderma 153:186-193.
 Magurán, A. E. 2004. Measuring Biological Diversity. Blackwell Publishing, Oxford.
 Schutter, M. and Dick, R. 2001. Soil Biol. Biochem. 33:1481-1491.
 Silva, C. et al. 2010. J. Microbiol. Biotechnol. 20(3):447-459.
 Wagner, M. and Loy, A., 2002. Current Opinion in Biotechnology 13:218-227.
 Wan, C. Y. et al. 2010. Water research 45:1129-1138.