

*UNIVERSIDAD DE OVIEDO*

MASTER OFICIAL EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**“CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y  
MICROBIOLÓGICA DE UN PROCESO DE  
TRATAMIENTO DE  
LIXIVIADOS DE VERTEDERO”**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**POR**

**MELANIA SANCHA ANTUÑA**

**JULIO, 2013**





### **PROFESORES TUTORES:**

Dr. Baltasar Mayo

Dra. Amanda Laca

### **CERTIFICAN:**

Que **Melania Sancha Antuña** ha realizado bajo nuestra dirección el Proyecto de Investigación al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, promoción 2012-2013.

Oviedo, 12 de Julio de 2013

Baltasar Mayo

Amanda Laca

VºBº

Mario Díaz Fernández

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis tutores, Amanda Laca, por sus consejos, su paciencia, dedicación y apoyo incondicional y Baltasar Mayo, por sus consejos y enseñanzas.

A COGERSA, por haberme proporcionado las muestras para la realización de este trabajo.

A Susana Díaz y Ana Belén Flórez, integrantes del IPLA, por sus consejos y enseñanzas, que fueron muy útiles en el transcurrir de este trabajo.

A José Luis Martínez y Daniel Serna, integrantes de la Unidad de Secuenciación de los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Oviedo, por sus consejos y enseñanzas que fueron muy útiles en el transcurrir de este trabajo.

A Paula Oulego, Rosana González y Saúl Alonso, integrantes del grupo TBR del Departamento de Ingeniería Química, que con su ayuda hicieron más fácil mi desenvolvimiento en el laboratorio.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>V</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Tratamiento de lixiviados.....</b>	<b>5</b>
2.1.1 Composición de los lixiviados .....	5
2.1.2 Tratamiento de lixiviados en Cogersa.....	7
2.1.2.1 Tratamiento físico-químico .....	11
2.1.2.2 Depuración biológica.....	11
2.1.2.3 Descripción del proceso.....	11
2.1.3 Principales organismos que intervienen en los Sistemas de Tratamiento Biológico .....	13
<b>2.2 Parámetros físicos- químicos y microbiológicos caracterización de         aguas residuales .....</b>	<b>17</b>
2.2.1 pH.....	17
2.2.2 Sólidos en sus diferentes formas .....	17
2.2.3 Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) .....	19
2.2.3.1 Métodos de dilución .....	19
2.2.3.2 Métodos respirométricos .....	21
2.2.4 Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	22
2.2.5 Análisis de aniones y cationes mediante Cromatografía Iónica.....	22
2.2.6 Carbono Orgánico Total (TOC).....	24
<b>2.3 Parámetros microbiológicos de caracterización de aguas residuales .....</b>	<b>25</b>
2.3.1 Importancia de las técnicas moleculares para la caracterización de aguas .....	26
2.3.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	27
2.3.1.2 Electroforesis en gel de agarosa .....	29
2.3.1.3 Electroforesis en gel desnaturalizante (DGGE).....	30
2.3.1.4 El gen 16S ARNr bacteriano .....	31
2.3.2 Secuenciación.....	31
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Recogida de Muestras.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2 Análisis Físico- Químico .....</b>	<b>36</b>
3.2.1 pH.....	36
3.2.2 Sólidos en suspensión .....	36

3.2.3 DBO5 .....	36
3.2.4 DQO .....	38
3.2.5 Cromatografía de Intercambio Iónico .....	39
3.2.5.1 Cationes .....	40
3.2.5.2 Aniones .....	40
3.2.6 TOC.....	40
<b>3.3 Análisis Microbiológico .....</b>	<b>41</b>
3.3.1 Aerobios mesófilos .....	41
3.3.2 Clostridios sulfito reductores .....	41
3.3.3 <i>Thiobacillus</i> sp .....	42
3.3.4 Coliformes totales .....	42
3.3.5 <i>Streptococcus</i> fecales .....	42
3.3.6 Caracterización morfológica de los microorganismos.....	42
<b>3.4 Técnicas Moleculares.....</b>	<b>44</b>
3.4.1 Extracción del ADN genómico .....	44
3.4.2 Amplificación por PCR.....	45
3.4.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	46
3.4.4 DGGE.....	47
3.4.4.1 Montaje del Equipo.....	47
3.4.4.2 Preparación del gel .....	48
3.4.4.3 Carga del gel para electroforesis.....	49
3.4.4.4 Carga de muestras.....	50
3.4.4.5 Inicio de la electroforesis.....	50
3.4.4.6 Revelación del gel.....	50
<b>3.5 Secuenciación .....</b>	<b>51</b>
3.5.1 Amplificación del ADN .....	51
3.5.2 Electroforesis en gel de agarosa, purificación y cuantificación del ADN.....	52
3.5.3 Secuenciación.....	53
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>56</b>
<b>4.1 Análisis físico-químico del proceso de nitrificación-desnitrificación.....</b>	<b>57</b>
<b>4.2 Caracterización microbiológica.....</b>	<b>63</b>
4.2.1 Recuento en placa .....	63
4.2.2. Morfología .....	69
<b>4.3 Técnicas moleculares .....</b>	<b>75</b>
4.3.1 Amplificación del gen 16S ARNr (PCR).....	75
4.3.2 DGGE.....	78
4.3.3 Secuenciación.....	80
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>83</b>
<b>6. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....</b>	<b>85</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>89</b>

## RESUMEN

Como consecuencia inevitable de la existencia de vertederos tiene lugar la generación de lixiviados, que son una fuente importante de contaminación para suelos y aguas. Los lixiviados aunque presentan una gran heterogeneidad, se caracterizan por contener concentraciones elevadas de contaminantes orgánicos e inorgánicos, incluyendo ácidos húmicos, nitrógeno amoniacal y metales pesados, además de sales inorgánicas.

El objetivo de este trabajo fue analizar el proceso de tratamiento de lixiviados de vertedero, para ello se tomaron diferentes muestras procedentes de la planta depuradora instalada en COGERSA. Se realizaron análisis de diversos parámetros físico-químicos habitualmente empleados en la caracterización de aguas residuales (TOC, DBO, DQO, pH, SS e iones). Asimismo, y dado que el sistema de depuración se basa fundamentalmente en un tratamiento biológico mediante un proceso de nitrificación-desnitrificación, también se realizó una caracterización desde un punto de vista microbiológico empleando, además de cultivos clásicos (Clostridios sulfito-reductores, aerobios mesófilos, Coliformes, Estreptococos fecales y *Thiobacillus* sp.), técnicas moleculares (PCR, DGGE y secuenciación) que fue necesario poner a punto.

Los análisis físico-químicos demostraron que el tratamiento de los lixiviados resulta eficaz, reduciendo su carga orgánica así como su contenido en nitrógeno amoniacal por debajo de los límites legales establecidos para aguas residuales urbanas.

Por otro lado, los cultivos clásicos mostraron una diferente composición de la comunidad microbiana de las muestras analizadas, lo que fue corroborado por la DGGE que mostró un diferente patrón de bandas en cada una de las muestras analizadas lo que indica la presencia de distintos grupos de bacterias. Sin embargo, al realizar la secuenciación no fue posible identificar a qué especie o familia corresponden dichas bandas. Una posible mejora de los resultados podría lograrse modificando las etapas de purificación del ADN de las bandas obtenidas en la DGGE, otra alternativa sería recurrir al empleo de técnicas de clonación o de secuenciación masiva que permitirían un análisis en profundidad de las complejas comunidades bacterianas presentes en estas muestras.

## ABSTRACT

As inevitable consequence of the existence of landfills, leachates are generated, being an important source of soil and water contamination. Although leachates are very heterogeneous, they typically contain high concentrations of organic and inorganic contaminants, including humic acids, ammoniacal nitrogen, heavy metals and inorganic salts.

The aim of this work was to study the landfill leachate treatment process, with this purpose samples were taken at different points of the treatment plant installed in COGERSA. Several physico-chemical analyses commonly employed in wastewater characterization were developed (TOC, BOD, COD, pH, SS and ions). Since the treatment is fundamentally based on a nitrification-denitrification process, a microbiological characterization of samples was also carried out. Not only classical culture of microorganisms (sulfite-reducing clostridia, aerobic mesophilic bacteria, coliforms, fecal streptococci and *Thiobacillus* sp.) were used, but it was also necessary to set up and optimize different molecular techniques (PCR, DGGE and DNA sequencing).

According to physico-chemical tests, leachate treatment is effective, achieving organic matter and ammoniacal nitrogen concentration values below the legal limits established for urban wastewater.

On the other hand, classical cultures showed a different microbial community composition of studied samples. This was also verified by DGGE results, showing a different band pattern for each sample, which reveals the presence of different bacteria groups. However, sequencing techniques were not able to identify which family or specie corresponded with each band. It may be possible improved these results modifying the purification steps of DNA bands obtained from DGGE. Alternatively, employing massive sequencing or cloning techniques could allow achieving an exhaustive characterization of bacterial communities present in these samples.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama del proceso de tratamiento de lixiviados. (Fuente: Cogersa).....	8
Figura 2. Balsas para el almacenamiento de lixiviados. A) Balsa para lixiviados de residuos no peligrosos; B) Balsa para lixiviados de residuos peligrosos e inertes. (Fuente: Cogersa) .....	9
Figura 3. Vista general de la planta de tratamiento biológico. (Fuente: Cogersa) .....	10
Figura 4. Reactores; A) Reactor del proceso de tratamiento biológico; B) Reactores del tratamiento terciario con carbono activo. (Fuente: Cogersa).....	10
Figura 5. Instalación dónde se realiza el tratamiento físico-químico. (Fuente: Cogersa).....	11
Figura 6. Proceso de Desnitrificación- Nitrificación.....	12
Figura 7. Sistema de ultrafiltración de fangos. (Fuente: Cogersa) .....	13
Figura 8. Árbol filogenético del gen 16S ARNr basado en los linajes principales de bacterias amonio oxidantes conocidas (Daim <i>et al.</i> 2009).....	15
Figura 9. Árbol filogenético del gen 16S ARNr basado en los linajes principales de bacterias nitrito-oxidantes conocidas (Daims <i>et al.</i> 2009).....	16
Figura 10. Esquema de la clasificación de los sólidos presentes en agua .....	19
Figura 11. Medida de la DBO por el método de dilución. A) Sin siembra; B) Con siembra.....	21
Figura 12. Equipo de electrodo sensible al oxígeno.....	21
Figura 13. Respirómetro de Warburg .....	21

Figura 14. Diagrama de los componentes del analizador de carbono orgánico total (TOC) .....	26
Figura 15. Esquema de las etapas de PCR: A) Desnaturalización, B) Hibridación, C) Extensión.....	29
Figura 16. Gradiente de desnaturalización DGGE .....	31
Figura 17. Esquema de la secuenciación por el método enzimático de terminación de cadena o método de Sanger .....	34
Figura 18. Esquema de la secuenciación por el método automático de electroforesis capilar.....	35
Figura 19. a) Equipo de medición de la DBO5; b) Ejemplo de funcionamiento de un frasco de medición de DBO con muestra de agua residual .....	40
Figura 20. Gráfica de la recta de calibrado de DQO .....	41
Figura 21. Panel frontal del ICS-1000, con el puerto de inyección por dónde se inyecta las muestras.....	42
Figura 22. Microscopio automático Olympus BX61 .....	46
Figura 23. Programa para la amplificación del ADN.....	48
Figura 24. Tamaño de fragmento (bp) del marcador.....	49
Figura 25. Equipo para la realización de la DGGE .....	53
Figura 26. Equipo de análisis genético utilizado en secuenciación.....	55
Figura 27. Ejemplo de diagramas obtenidos del análisis del TOC. A) diagrama de TC; B) diagrama de IC .....	59
Figura 28. Ejemplo de cromatograma obtenido. a) Detalle ampliado (DN) .....	61
Figura 29. Placas Petri mostrando el crecimiento de Aerobios mesófilos en Agar Nutritivo; a) Entrada (dilución $10^{-1}$ ); b) DN (dilución $10^{-1}$ ); c) NO (dilución $10^{-1}$ ); d) N1 (dilución $10^{-5}$ ); e) N2 (dilución $10^{-3}$ ); f) Salida (dilución $10^{-1}$ ).....	64
Figura 30. Tubos mostrando la presencia/ausencia de Clostridios sulfito reductores en las distintas muestras en Agar SPS, a) Entrada (izda.) y Salida (dcha.) con ausencia de colonias negras; b) DN con presencia	

de colonias negras; c) NO con presencia de colonia negras; d) N1 con presencia de colonias negras; e) N2 con presencia de colonias negras y formación de gas .....	65
Figura 31. Placas de Petri mostrando crecimiento de <i>Thiobacillus</i> sp.; a) Colonias de <i>Thiobacillus</i> obtenidas en este trabajo (dilución 10 <sup>-1</sup> ) (Salida); b) <i>Thiobacillus</i> BCG (Starosvetsky <i>et al.</i> 2012); c) Colonias de <i>Thiobacillus</i> obtenidas en medio específico (dilución 10 <sup>-1</sup> ) (Salida); d) <i>Thiobacillus</i> en el medio modificado (+BCG) (dilución 10 <sup>-6</sup> ) después de 8 días de incubación (Starosvetsky <i>et al.</i> 2012).....	67
Figura 32. Colonias seleccionadas para la tinción de Gram y posterior observación mediante microscopía .....	69
Figura 33. Tinción de Gram (100X) (Colonias 1 y 2).....	70
Figura 34. Tinción de Gram (100X) (Colonias 3 y 4).....	71
Figura 35. Tinción de Gram (100X) (Colonias 5 y 6).....	72
Figura 36. Tinción de Gram (100X) (Colonias 7 y 8).....	73
Figura 37. Tinción de Gram (100X) (Colonias 9 y 10).....	73
Figura 38. Amplificación de los fragmentos del gen 16S ARNr visualizados en un gel de agarosa al 1%. De derecha a izquierda: 1-Marcador Low ADN Mass Ladder; 2- Entrada; 3- DN; 4-NO; 5-N1; 6-N2; 7- Salida.....	75
Figura 39. Amplificación de los fragmentos del gen 16S ARNr visualizado en un gel de agarosa al 1%. De izquierda a derecha: 1-Marcador Low ADN Mass Ladder; 2- DN; 3-NO; 4-N1; 5-N2 .....	76
Figura 40. Amplificación de los fragmentos del gen 16S ARNr visualizados en un gel de agarosa al 1%. De izquierda a derecha: 1-Marcador Low ADN Mass Ladder; 2- Entrada; 3-DN; 4- NO; 5- N1; 6-N2.....	77
Figura 41. Amplificación de los fragmentos del gen 16S ARNr visualizados en un gel de agarosa al 1%. 1-1-Marcador Low ADN Mass Ladder; 2- Entrada; 3- Salida .....	78

Figura 42. Producto de amplificación del gen 16S ARNr en DGGE con un porcentaje de desnaturalización de 40 – 60 %. 1- Marcador con mezcla de DNA molde de cepas aisladas e identificadas previamente. A) <i>Lactococcus garvieae</i> ; B) <i>Lactobacillus plantarum</i> ; C) <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ; D) <i>Staphylococcus parauberis</i> . 2- Entrada; 3- DN; 4- NO; 5- N1; 6- N2; 7- Salida; 8- Marcador con mezcla de ADN molde de cepas aisladas e identificadas previamente. E) <i>Enterococcus faecium</i> ; F) <i>Enterococcus faecalis</i> ; G) <i>Lactococcus lactis</i> ; H) <i>Echerichia coli</i> ; i) <i>Lactobacillus paracasei</i> .....	79
Figura 43. Bandas seleccionadas de los productos de amplificación en DGGE .....	80
Figura 44. Amplificación de los fragmentos del gen 16S ARNr visualizados en un gel de agarosa al 1%Gel de agarosa 1%. 1- Marcador Low ADN Mass Ladder. ADN amplificado y purificado de las bandas seleccionadas en la DGGE; 2-Banda nº 1; 3- Banda nº 2; 4- Banda nº 3; 5- Banda nº 4; 6-Banda nº 5; 7-Banda nº 6; 8-Banda nº7 .....	81
Figura 45. Ejemplo de electroferograma obtenido en la secuenciación por electroforesis capilar (banda 3) .....	82

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de lixiviados (Renou <i>et al.</i> 2008).....	7
Tabla 2. Criterios para la selección de primers.....	28
Tabla 3. Resumen de los análisis realizados de los lixiviados de vertedero.....	37
Tabla 4. Intervalo de medida DBO según los mg/L .....	39
Tabla 5. Intervalo de medida DBO mg/L con su correspondiente volumen y dosificación de ATH .....	39
Tabla 6. Resumen de la DQO .....	40
Tabla 7. Tinción de Gram en los grupos de bacterias Gram + y Gram - .....	45
Tabla.8. Relación entre tamaño de fragmento (bp) y concentración de ADN, para un volumen de 2 $\mu$ L del marcador.....	49
Tabla 9. Mezclas para los diferentes gradientes .....	51
Tabla 10. Resultados de diversos parámetros físico- químicos de las muestras de lixiviados (valores medios $\pm$ SD) .....	57
Tabla 11. Contenido en carbono de las muestras (valores medios $\pm$ SD).....	60
Tabla 12. Contenido en aniones y cationes de las muestras (valores medios SD) .....	61
Tabla 13. Recuento de aerobios (valores medios) .....	63

# **1. Introducción.**

Según la Ley 22/2011 de Residuos y Suelos contaminados, se entiende por residuo “*cualquier sustancia u objeto que su poseedor deseche o tenga la intención o la obligación de desechar*”. Enterrar los residuos sólidos en vertederos es una de las prácticas más utilizadas, formándose inevitablemente durante su proceso de descomposición, un efluente líquido originado por la percolación del agua de lluvia a través del lecho de dichos residuos. De esta manera, se genera un residuo acuoso denominado lixiviado contaminado con una elevada carga de materia orgánica, metales pesados, nitrógeno amoniacal y/o sales inorgánicas, con un intenso color negro/marrón y un desagradable olor.

La Directiva europea 1999/31/CE define lixiviado como “*cualquier líquido que percole a través de los residuos y que sea emitido o esté contenido en un vertedero*”. Esta Directiva establece los requisitos que se deben cumplir en materia de diseño y operación de vertederos, así como la recogida de los lixiviados generados y su apropiado tratamiento antes de ser vertidos al medio ambiente. Por tanto, los lixiviados de vertedero deben ser gestionados y tratados de forma adecuada para evitar la contaminación de las aguas superficiales y/o subterráneas receptoras de este efluente, lo cual provocaría serios problemas en el medio ambiente y en la salud pública. Además, se debe tener en cuenta que un vertedero puede continuar produciendo lixiviados hasta 50 años después de su clausura y cese de las actividades (Kurniawan *et al.* 2005).

Las características físico-químicas de un lixiviado, dependen fundamentalmente de una serie de factores tales como la naturaleza y la cantidad de los residuos almacenados, la antigüedad y forma de explotación del vertedero, la climatología del lugar o la época del año (El-Fadel *et al.* 2002). Su composición es bastante compleja y variable, pudiendo clasificar sus componentes en cuatro grandes categorías: materia orgánica disuelta, expresada en forma de parámetros generales como DBO, DQO o TOC, componentes inorgánicos ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ...), metales (Fe, Cd, Cr, Cu, Pb, Ni, Zn...) y compuestos xenobióticos (PAHs, AOX, fenoles...) (Christensen *et al.* 2001; Kjeldsen *et al.* 2002). Por ello, la caracterización de los parámetros físico-químicos resulta de gran interés desde un punto de vista ambiental.

Debido a su fiabilidad, simplicidad y buena relación coste-eficacia, los procesos biológicos son los comúnmente usados para el tratamiento de lixiviados. Las comunidades bacterianas implicadas en estos procesos son diversas, complejas y dinámicas e influyen en el funcionamiento y el rendimiento de los mismos (Wells *et al.* 2009). Por tanto, debido a su gran importancia, hoy en día se están utilizando técnicas moleculares (DGGE, secuenciación, FISH, clonación, etc.) para identificar los microorganismos que forman parte de la comunidad bacteriana presente en los lixiviados, así como en las diferentes etapas del tratamiento biológico.

Sin embargo, cuando se trabaja con lixiviados estabilizados (poco biodegradables), los procesos biológicos pueden no resultar un tratamiento adecuado debido al carácter recalcitrante de los compuestos presentes en este tipo de efluentes. Además, la actividad biológica también puede ser inhibida por algunos compuestos de carácter tóxico. En

este aspecto, los tratamientos físico-químicos han demostrado su eficacia no solo para la eliminación de las sustancias refractarias del lixiviado maduro, sino también como etapa final de afino tras un proceso biológico. Antes de su descarga, el efluente es sometido a un proceso físico-químico adicional como: precipitación, coagulación–floculación, adsorción con carbón activo, intercambio iónico o filtración con membranas. Los mayores inconvenientes de estas tecnologías son el encarecimiento de costes por el consumo de reactivos y los requerimientos energéticos (Kurniawan *et al.* 2005; Wiszniowski *et al.* 2006; Renou *et al.* 2006).

La búsqueda de nuevas tecnologías eficaces para el tratamiento de lixiviados de vertedero se ha intensificado en los últimos años, no solo para solventar las limitaciones de los tratamientos convencionales si no a fin de cumplir la legislación cada vez más estricta en cuanto a tratamiento de residuos. Estas tecnologías emergentes combinan procesos biológicos con tecnologías de filtración avanzada, ósmosis inversa o nanofiltración (Bódalo *et al.* 2007)

## **2. Fundamentos teóricos.**

## 2.1 Tratamiento de lixiviados.

Uno de los grandes problemas que generan los vertederos son los lixiviados, debido a que son una fuente importante de contaminación del suelo y del agua. Se puede definir al lixiviado, según la Directiva Europea 1999/31/EC como “*cualquier líquido que percole a través de los residuos y que sea emitido o esté contenido en un vertedero*”.

Los lixiviados se caracterizan por arrastrar gran cantidad de moléculas orgánicas e inorgánicas, siendo en algunos casos tóxicos por la presencia de metales pesados, hidrocarburos aromáticos, pesticidas; además presentan un elevado contenido en nitrógeno amoniacal y una alta conductividad. Los daños que pueden ocasionar en el suelo pueden ser importantes, debido a la sustitución de iones de los complejos arcillo-húmicos, la alteración de sus características, y los daños directos que producen a los microorganismos, invertebrados y plantas que forman parte del suelo.

Los animales también pueden verse afectados al beber el agua de manantiales contaminados, debido a que los lixiviados se pueden filtrar a través de las capas freáticas a los ríos, aguas subterráneas, etc. En el caso del hombre, los daños pueden ser especialmente importantes en aquellas poblaciones que se abastecen de captaciones profundas de agua o en las zonas agrícolas que utilizan para riego aguas de pozo.

### 2.1.1 Composición de los lixiviados.

Más de 200 compuestos orgánicos han sido identificados en los lixiviados, estos compuestos se pueden clasificar en hidrocarburos cíclicos, hidrocarburos aromáticos, bencenos, alcoholes, éteres cíclicos, ácidos y ésteres, fenoles, lantanos y furanos, compuestos que contienen nitrógeno, fósforo, sulfuro y sílice, y trazas inidentificables. Entre los compuestos mencionados están sustancias reconocidas por su capacidad contaminante, entre las que se encuentran el tolueno, etilbenceno, xilano, estireno, naftaleno, pireno, entre otras (Bauer *et al.* 1998; Paxéus, 2000).

Muchos factores influyen en la producción y composición del lixiviado en un vertedero, entre estos factores se encuentra la edad del vertedero; además la composición varía significativamente con los procesos anaeróbicos que se producen en los residuos depositados (Harrington *et al.* 1986; Bretschneider *et al.* 1993; Edeline, 1987).

Un vertedero antiguo tendrá una relación DBO5/DQO entre 0.05 y 0.2, debido a la abundancia de ácidos húmicos y fúlvicos, difícilmente biodegradables, mientras que los lixiviados de vertederos jóvenes generalmente son más fáciles de tratar que los de vertederos más antiguos, así un lixiviado con una DBO5/DQO baja tiene como característica un contenido en materia orgánica altamente persistente difícil de tratar (Deng, 2007; Primo *et al.* 2008).

En un vertedero de 3-5 años de edad, hay muchos compuestos orgánicos, esto es resultado de la fase metanogénica de la descomposición anaerobia del residuo. En este caso la DQO y la DBO5 alcanza valores muy altos y el pH es bajo por la gran cantidad

de ácidos grasos volátiles producidos en esta fase. Por lo tanto la relación de DBO5/DQO alcanza valores más altos que 0.7, debido a la alta biodegradabilidad de los compuestos orgánicos presentes en el lixiviado. A medida que el vertedero se va haciendo más viejo, la concentración de los componentes fácilmente biodegradables y la relación DBO5/DQO va bajando. Cuando los residuos se han estabilizado completamente la relación DBO5/DQO alcanza el valor de 0.1.

Una relación DBO/DQO entre 0.22-0.26 indica una baja fracción biodegradable en el lixiviado, esto significa un incremento de la actividad microbiana que se traduce en una reducción de la fracción biodegradable (Karthikeyan *et al.* 2006). Esto ocurre debido al descenso de la cantidad de productos biodegradables en el residuo estabilizado, y el aumento de la cantidad de productos resistentes a la descomposición biológica en el residuo estabilizado.

Todas las sustancias orgánicas detectadas en el lixiviado pueden ser ordenadas por su biodegradabilidad, desde los más fácilmente biodegradables como los ácidos grasos volátiles, aldehídos de bajo peso molecular, aminoácidos y carbohidratos; a los menos biodegradables como los aminoácidos hidrolizados y los ácidos húmico y fúlvico (Szpadt, 1998).

El aumento de los ácidos húmico y fúlvico en un lixiviado es el causante de una muy baja relación de DBO5/DQO, porque sus estructuras sufren cambios con la edad del vertedero y llegan a dificultar el metabolismo de las bacterias. En un lixiviado de un vertedero joven los anillos aromáticos de las moléculas de ácidos húmico están menos condensados, y las moléculas tienen un tamaño más pequeño. Para el caso de lixiviado de un vertedero viejo los anillos aromáticos están más condensados y las moléculas de ácidos húmico tienen un tamaño más grande. Esto significa que el grado de humificación de un lixiviado se incrementa con la edad del residuo depositado.

La presencia de ácidos húmico y fúlvico en el lixiviado es muy importante no sólo por su resistencia a la biodegradabilidad, sino también por su afinidad por los contaminantes. Son los responsables del transporte y del comportamiento de los contaminantes en el medio ambiente como metales pesados y contaminantes hidrofóbicos (Kang *et al.* 2002)

Por otro lado, durante la fase ácida de la descomposición de la materia orgánica, el pH será bajo y las concentraciones de DBO5, DQO, TOC, nutrientes y metales pesados serán altos. Sin embargo, durante la fase de fermentación del metano el pH estará entre 6.5-7.5, y los valores de DBO5, DQO, TOC, nutrientes y metales pesados serán significativamente más bajos. La mayoría de los metales son menos solubles para valores de pH neutros. Por otro lado, el pH será más bajo cuanto mayor sea la presencia de ácidos y cuanto mayor sea la presión parcial del CO<sub>2</sub> (Tchobanoglous *et al.* 1994).

**Tabla 1. Clasificación de lixiviados (Renou *et al.* 2008).**

	Jóvenes	Intermedios	Viejos
Edad (años)	< 1	1-5	> 5
pH	< 6.5	6.5-7.5	> 7.5
DQO (g / L)	> 15	3-15	< 3
DBO/DQO	0.5-1	0.1-0.5	< 0.1
TOC/DQO	< 0.3	0.3-0.5	> 0.5
NH <sub>3</sub> - N (mg/L)	< 400	400	> 400
Metales pesados (mg/L)	> 2	< 2	< 2
Compuestos orgánicos	80% AGV	5-30% AGV+AH+AF	AH+AF
Tipo	S/D	P	E

VFA= Ácidos Grasos Volátiles; AH= Ácidos Húmicos; AF= Ácidos Fúlvicos; SD= sin degradar; P= parcialmente degradados o estabilizados; E= Estabilizados.

En la Tabla 1 se resumen las características que presentan los lixiviados según la edad del vertedero. En cuanto a los metales que se pueden encontrar en los lixiviados, éstos pueden estar como iones libres, o formando uniones con compuestos orgánicos e inorgánicos, variando sus características físico-químicas e influyendo significativamente en su movilidad, disponibilidad y toxicidad (Janos *et al.* 2004; Pesavento *et al.* 2009; Weng *et al.* 2002). Los procesos del tratamiento afectan a la distribución de los metales, siendo crucial especificar las fracciones metálicas cuando se evalúa la movilidad y la ecotoxicidad de los metales, por lo que se puede decir que hay una clara y directa relación entre el comportamiento de los metales presentes en el lixiviado y el pH (Yanyu Wu *et al.* 2011).

### **2.1.2 Tratamiento de Lixiviados en Cogersa.**

Los lixiviados producidos en los vertederos de COGERSA se recogen y almacenan en balsas hasta su tratamiento final, en el caso de residuos no peligrosos se almacenan en una balsa de homogenización, mientras que los residuos peligrosos se recogen en balsas impermeabilizadas con polietileno de alta densidad. Además para minimizar la producción de lixiviados, está instalado un sistema de cunetas perimetrales que evita la entrada de las aguas de escorrentía en el vertedero y conducen estas aguas pluviales hacia los arroyos sin que entren en contacto con los residuos. El vertedero de COGERSA cuenta con una planta depuradora de lixiviados basada en el proceso BIOMENBRAT; en esta planta se tratan habitualmente los lixiviados procedentes tanto del vertedero de residuos no peligrosos como los que proceden de residuos peligrosos, efluentes de la planta Físico-Química y otras aguas residuales susceptibles de depuración biológica. Este sistema de depuración se basa fundamentalmente en una depuración biológica mediante bacterias nitrificantes y desnitrificantes (proceso de nitrificación-desnitrificación) en reactores a presión, con una fase posterior de ultrafiltración para separar el efluente de los fangos biológicos. El proceso completo se esquematiza en la Figura 1.

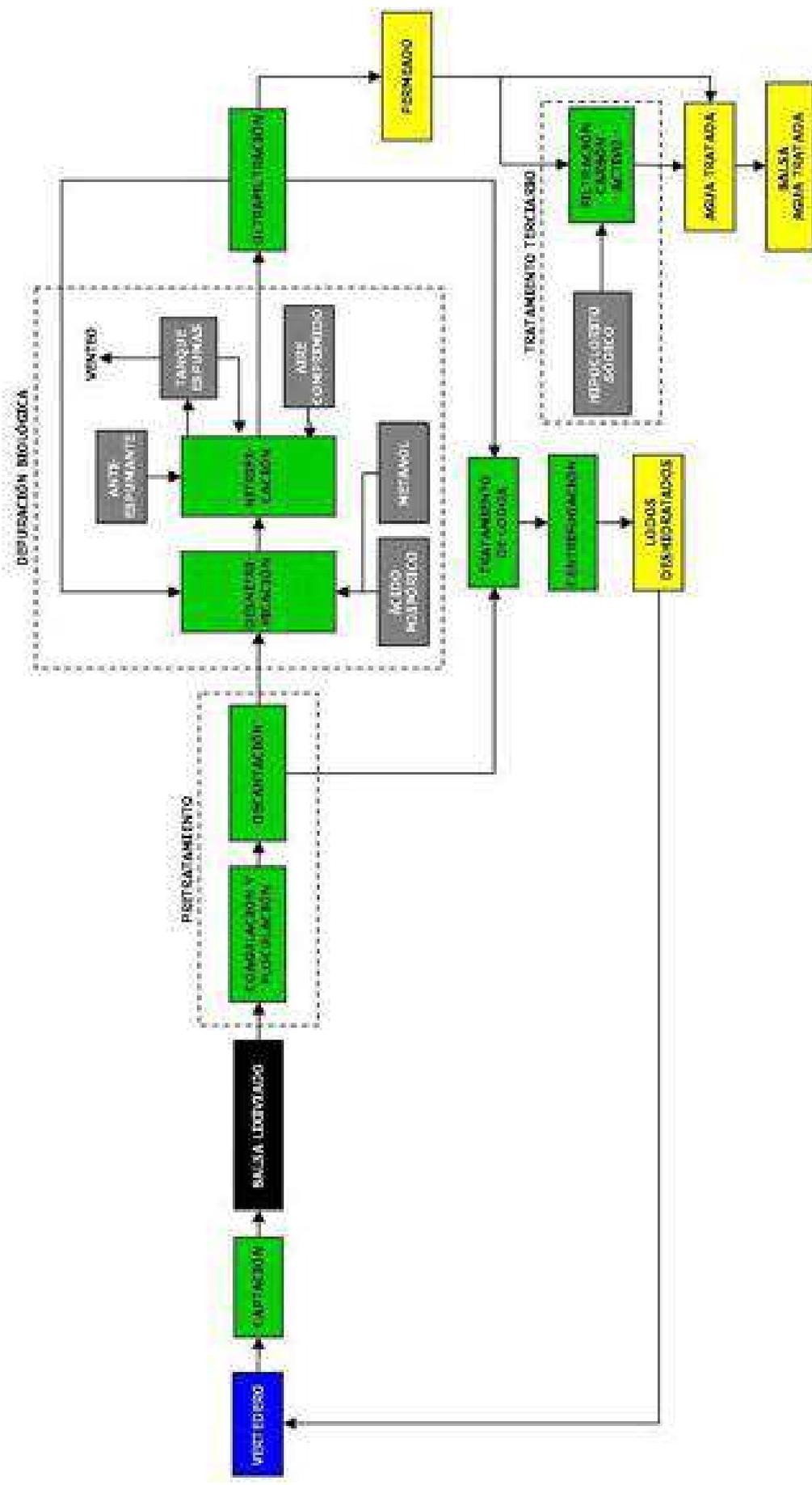


Figura 1. Diagrama del proceso de tratamiento de lixiviados (Fuente: Cogersa).

Este sistema de tratamiento de lixiviados presenta varias ventajas: alta eficacia de aireación de los fangos biológicos, capacidad de soportar elevadas concentraciones de fangos, menos superficie para la instalación y elevada automatización.

La depuradora de tratamiento biológico está constituido por 2 balsas para el almacenamiento de lixiviados, una para el almacenamiento de los lixiviados de residuos no peligrosos y otra balsa para los lixiviados de los residuos peligrosos e inertes (Figura 2), por un sistema de tratamiento físico-químico de lixiviados (eliminación de sólidos en suspensión) (ver apartado 2.1.2.1), por 3 reactores con una presión a 2,5 bar y una capacidad de (175 m<sup>3</sup>) donde se lleva a cabo el tratamiento biológico de **nitrificación-desnitrificación** (Figura 4); un sistema de ultrafiltración para la retención de lodos biológicos y sólidos; compresores para el aporte de oxígeno; intercambiadores de calor para disipar la energía de las reacciones exotérmicas del proceso de depuración; sistemas de dosificación de aditivos (metanol, antiespumante, ácido fosfórico); un panel de control de la planta; analizadores de diferentes parámetros físico-químicos (amonio, pH, conductividad, oxígeno).

A continuación se encuentra una instalación para la deshidratación de los lodos mediante la adición de coagulante, espesado y posterior centrifugación de los lodos biológicos; estos lodos una vez deshidratados se recirculan al vertedero de residuos no peligrosos. Además la depuradora consta de un tratamiento terciario con carbón activo para eliminar aquella materia orgánica disuelta que no se ha degradado durante el proceso biológico, esta materia orgánica se elimina en 6 reactores (Figura 4), donde quedan retenidos los compuestos orgánicos. De esta manera este sistema permite garantizar la calidad del efluente.

Y por último está constituida por una balsa de almacenamiento para el agua tratada.



**Figura 2. Balsas para el almacenamiento de lixiviados. A) Balsa para lixiviados de residuos no peligrosos; B) Balsa para lixiviados de residuos peligrosos e inertes. (Fuente: Cogersa).**



**Figura 3. Vista general de la planta de tratamiento biológico. (Fuente: Cogersa).**



**Figura 4. Reactores; A) Reactor del proceso de tratamiento biológico; B) Reactores del tratamiento terciario con carbono activo. (Fuente: Cogersa).**

### 2.1.2.1 Tratamiento físico-químico.

Los lixiviados pueden contener niveles elevados de sólidos en suspensión, normalmente asociado a episodios de tormentas en los que las aguas de escorrentía del vertedero arrastran sólidos que acaban en la balsa de lixiviados. Estos niveles de sólidos se concentran en los reactores como consecuencia del proceso de ultrafiltración posterior. Para ello se tienen que realizar purgas habituales y un tratamiento físico-químico para coagular, precipitar y centrifugar esos sólidos, asegurando la calidad del lixiviado a tratar y por lo tanto la capacidad de la instalación.



**Figura 5. Instalación dónde se realiza el tratamiento físico-químico. (Fuente: Cogersa)**

### 2.1.2.2 Depuración biológica.

Los tratamientos biológicos tienen como objetivo la eliminación de materia orgánica de las aguas residuales, así como la oxidación del nitrógeno amoniacal (nitrificación), la eliminación del nitrógeno a través de la conversión de las formas oxidadas a nitrógeno gaseoso (desnitrificación) y/o la eliminación de fósforo (Ferrer, 2007).

Los procesos biológicos emplean microorganismos, que actúan sobre la materia orgánica e inorgánica, suspendida, disuelta y coloidal existente en el agua residual, transformándola en gases y materia celular flotante, que puede separarse fácilmente mediante sedimentación.

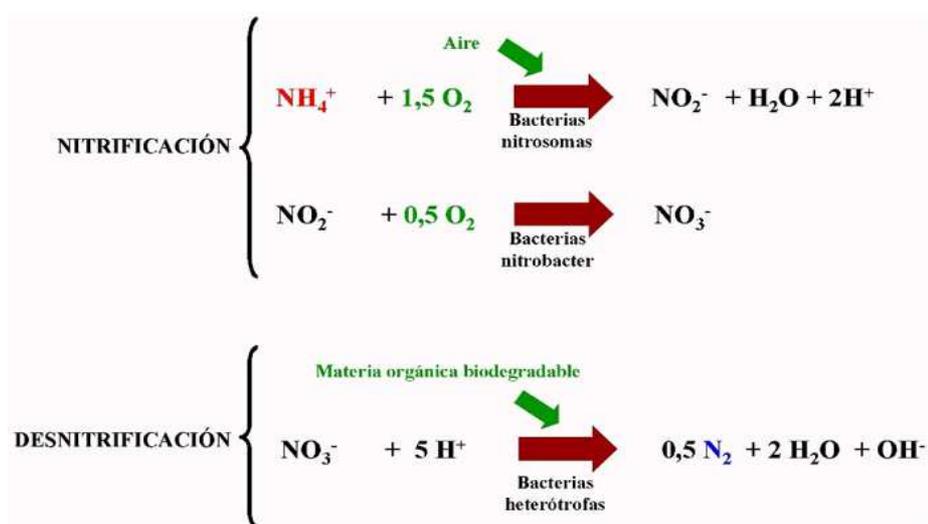
### 2.1.2.3 Descripción del proceso.

Los lixiviados del vertedero de residuos no peligrosos presentan una carga orgánica reducida y resistente a la degradación biológica. Sin embargo, presentan una carga de nitrógeno amoniacal importante. Para la adecuada depuración este tipo de lixiviado se recomienda un tratamiento biológico de **nitrificación-desnitrificación**, el cual se lleva a cabo en reactores con una presión de 2,5 bar. La acción combinada de las bacterias

nitrificantes y desnitrificantes permite convertir el amonio presente en los lixiviados en nitrógeno, a la vez que se reduce el contenido de materia orgánica biodegradable.

La depuradora consta de 3 reactores: 1 de nitrificación, 1 de desnitrificación y 1 mixto de nitrificación-desnitrificación.

El proceso de nitrificación tiene lugar en presencia de oxígeno disuelto, este oxígeno se aporta mediante compresores de aire a través de unos eyectores de fondo por los que unas bombas de inyección hacen circular la mezcla aire-lodo, favoreciendo la disolución del oxígeno y la homogenización de los lodos en el interior de los reactores. La desnitrificación heterótrofa se lleva a cabo en ausencia de oxígeno. En la Figura 6 puede observarse ambos procesos.



**Figura 6. Proceso de nitrificación- Desnitrificación.**

Las bacterias requieren una proporción adecuada de (C/N/P) a 100/10/1 aproximadamente. Como consecuencia de la edad y características del vertedero de COGERSA, el lixiviado obtenido posee una relación C/N/P inadecuada para depuración completa del amonio. La elevada concentración de amonio (unos 2 g/L) frente a la escasa concentración de materia orgánica (menos de 500 mg/L de DBO5) hace necesario el aporte de una fuente de carbono (metanol) fácilmente asimilable por las bacterias en el proceso de desnitrificación. Este aditivo se almacena en 2 tanques enterrados que poseen sendos sistemas de dosificación. En el caso de detectar bajos niveles de fósforo en el lixiviado también es posible aportar ácido fosfórico para mantener la relación C/N/P adecuada.

Como consecuencia de la aireación, las características de los fangos biológicos y la circulación de los mismos en los reactores se pueden producir espumas que se controlan mediante la adición de antiespumante en los reactores aireados.

El proceso biológico debe transcurrir en un rango mesófilo, en concreto entre los 37°C y 40°C. Teniendo en cuenta que el balance energético del proceso de tratamiento es exotérmico, la depuradora cuenta con 3 torres de refrigeración para evitar que la temperatura de los reactores sea superior a 40°C.

Finalizada la depuración biológica se pasa a la fase de ultrafiltración en la que se separa la biomasa del agua tratada (permeado). Además, la ultrafiltración evita la salida de los microorganismos y sólidos por lo que los fangos en el interior de los reactores tienden a incrementar su concentración. El sistema cuenta, como se puede observar en la Figura 7, con 5 calles de ultrafiltración, cuatro calles con 10 módulos tubulares conectados en serie y cada módulo constituido por 37 membranas en su interior con un tamaño de poro de 0.02  $\mu\text{m}$ . Una quinta calle con 6 módulos y 100 membranas por módulo. Para el adecuado funcionamiento del proceso de ultrafiltración es necesario realizar una limpieza periódica de las membranas, en este caso se realiza mediante un sistema automático de lavado con hipoclorito.



**Figura 7. Sistema de ultrafiltración de fangos. (Fuente: Cogersa).**

### **2.1.3 Principales organismos que intervienen en los Sistemas de Tratamiento biológico.**

Los microorganismos mayoritarios en los fangos activos son las bacterias, mientras que los hongos, protozoos y metazoos tienen un papel secundario (Wesley *et al.* 1992). En el flóculo de fangos activos las bacterias que se han encontrado *Zoogloea ramigera* (bacilo Gram negativo); *Pseudomonas*; *Comamonas*; bacterias filamentosas sin septos como *Cytophaga-Flavobacterium*; o proteobacterias oxidantes del hidrógeno como *Alcaligenes* (con capacidad desnitrificante). Entre las bacterias Gram positivas se pueden encontrar; *Arthrobacter* y *Bacillus*. También se pueden encontrar además de las

bacterias nitrificantes descritas a continuación; bacterias rojas no del azufre pertenecientes al género *Rhodospirillum* o *Rhodobacter*.

Las bacterias nitrificantes son Gram negativas, viven en una gran variedad de hábitats, incluyendo todo tipos de aguas (dulce, potable, residuales) y en el suelo. Los principales géneros de bacterias nitrificantes en los fangos activos usan dióxido de carbono o carbono inorgánico para la síntesis de material celular. Las bacterias nitrificantes tienen una muy baja velocidad de crecimiento en comparación a la de las bacterias desnitrificantes, siendo especialmente problemática la etapa de nitrificación en el proceso global de desnitrificación-nitrificación, debido a que ambas compiten por espacio y la concentración de oxígeno disuelto (Bernet *et al.* 2001). Además tienen una elevada sensibilidad a la variación de la concentración de sustratos (amonio, nitrito), y a cambios producidos en el sistema (temperatura, pH, alcalinidad, etc).

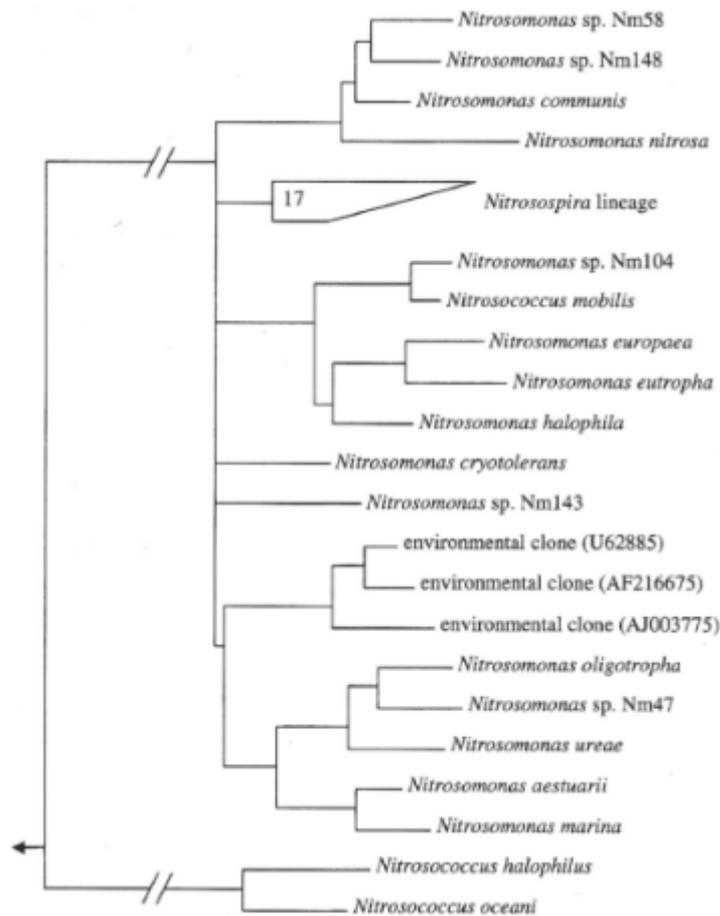
El término nitrificación se refiere a la oxidación secuencial aeróbica del amonio a nitrito y luego a nitrato. Estos dos pasos son catalizados por organismos procariotas quimilitótrofos denominados: bacterias amonio oxidantes (AOB), *Archaea* amonio oxidantes (AOA) y bacterias nitrito oxidantes (NOB). Hasta el momento no se han identificado organismos capaces de realizar ambos pasos de nitrificación-desnitrificación (Daims *et al.* 2009).

Filogenéticamente las AOB se limitan a dos clases diferentes dentro del phylum Proteobacteria: *Gammaproteobacterias* y *Betaproteobacterias*. La mayoría son *Betaproteobacterias*, incluyendo *Nitrosomonas* y *Nitrosospira*. Todos los miembros del género *Nitrosospira* están muy relacionados, en cambio en el grupo de las *Nitrosomonas*, hay seis líneas distintas de descendencia (Purkhold *et al.* 2003; Mota *et al.* 2005). Comúnmente las AOB están relacionadas con *N. europaea*, *N. eutropha*, *N. mobilis* y *N. oligotropha*.

En la mayoría de las plantas de tratamiento biológico, el amonio es oxidado por las AOB del género *Nitrosomonas*, que son responsables de la conversión del amonio a nitrito, primer paso de la reacción de nitrificación. El proceso de oxidación del amonio a nitrito se compone de dos reacciones catalizadas por dos enzimas diferentes. La enzima amonio monooxigenasa (AMO), ubicada en la membrana bacteriana, que cataliza la transformación del amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) a hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ), mientras que la enzima hidroxilamina oxidoreductasa (HAO), ubicada en el periplasma celular, cataliza la conversión de la hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ).

Diferencias locales en las concentraciones de sustrato dentro del flóculo o de la biocapa pueden afectar a la distribución y la actividad de las AOB en las plantas de tratamiento biológico (Daims *et al.* 2009). En los fangos activos, en los flóculos y en la biocapa, las AOB referidas a las *Nitrosomonas* generalmente forman agregados celulares esféricos y compactos. Las células individuales de AOB son rara vez encontradas en fangos activos por microscopia, así que suelen ser pasadas por alto cuando se observan flóculos densos a través del microscopio (Daims *et al.* 2009).

Las AOB del género *Nitrospira* se han detectado ocasionalmente en plantas de tratamiento biológico, pero éstas se encuentran comúnmente en hábitats terrestres y juegan un papel de menor importancia en el tratamiento de aguas residuales (Daims *et al.* 2009).



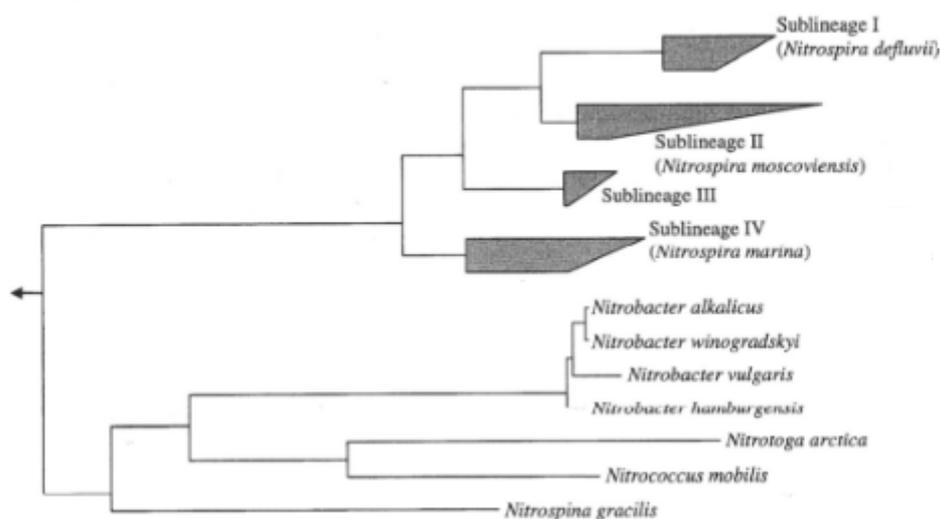
**Figura 8. Árbol filogenético del gen 16S ARNr basado en los linajes principales de bacterias amonio oxidantes conocidas (Daims *et al.* 2009).**

En la Figura 8 se representa el árbol filogenético de los principales linajes de las bacterias amonio oxidantes identificadas hasta el momento basándose en el gen 16 ARNr.

Las NOB son las responsables de la conversión del nitrito a nitrato, segundo paso de la reacción de nitrificación. Esta reacción es catalizada por la enzima nitrito oxidoreductasa (Nxr). Desde el punto de vista filogenético los organismos NOB son un grupo más heterogéneo que las bacterias AOB, son organismos quimioautótrofos y se dividen en cuatro géneros: *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* y *Nitrospira* (Mota *et al.* 2005). En la mayoría de las plantas de tratamiento biológico las bacterias nitrito oxidantes dominantes pertenecen al género *Nitrospira* o *Nitrobacter* (Wagner *et al.* 1996; Mota *et al.* 2005).

El género *Nitrospira* son de crecimiento lento, muy difíciles de cultivar en el laboratorio; es un género diverso que se compone de varios sublinajes filogenéticos (Daims *et al.* 2009). Sin embargo, la aplicación de técnicas más específicas para la detección microbiológica, como es el caso de la técnica de hibridación in situ FISH, permitió identificar a las bacterias del genero *Nitrospira* como los organismos NOB dominantes en las plantas de tratamiento de agua residual (Daims *et al.* 2001).

En las aguas residuales las bacterias *Nitrospira* forman agregados esféricos o irregulares, que contienen cientos o miles de células. El género *Nitrobacter* parece desempeñar un papel menor en plantas de tratamiento biológico con concentraciones de nitrito medias. Sin embargo, se ha detectado presencia de *Nitrobacter* en reactores que contienen elevadas concentraciones de nitritos, como por ejemplo reactores de tipo Batch tratando altas concentraciones de fangos (Daims *et al.* 2001). Esto puede deberse a que las *Nitrobacter* prosperan en aguas con altas concentraciones de oxígeno y de nitritos, al contrario de las *Nitrospira* que se adaptan mejor a bajas concentraciones de nitrito y de oxígeno disuelto (Schramm *et al.* 1998). Por otro lado los miembros de los géneros *Nitrococcus* y *Nitrospina* son halófilos y por lo tanto no se espera una presencia significativa en las plantas de tratamiento biológico (Koops *et al.* 2001).



**Figura 9. Árbol filogenético del gen 16S ARNr basado en los linajes principales de bacterias nitrito-oxidantes conocidas (Daims *et al.* 2009).**

En la Figura 9 se representa el árbol filogenético basado en los principales linajes de las bacterias nitrito-oxidantes identificadas hasta el momento basándose en el gen 16S ARNr.

Los microorganismos desnitrificantes pueden utilizar compuestos nitrogenados como el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y gases como el óxido nítrico (NO) y el óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) como aceptores de electrones en su metabolismo respiratorio.

El proceso de desnitrificación es generalmente considerado como un proceso anóxico, aunque hay indicios de que éste puede ocurrir en condiciones aerobias (Robertson y Kuenen, 1984).

La desnitrificación a partir de nitrato integra una reacción bioquímica de reducción de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) catalizada generalmente por la enzima nitrato reductasa (Nar) localizada en la membrana celular. Sin embargo, existe otra clase de enzima periplasmática denominada nitrato reductasa (Nap) de diferente estructura y localización cuya actividad no es suprimida por el oxígeno (Philippot, 2002), por lo que se sugiere que está involucrada en el proceso de desnitrificación en condiciones aerobias.

La reducción del nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) a óxido nítrico (NO) se encuentra catalizada por dos enzimas nitrito reductasas denominadas NirS y NirK, presentes en organismos desnitrificantes. Por otro lado, la reacción de reducción del óxido nítrico (NO) a óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) se encuentra catalizada por la enzima óxido nítrico reductasa (Nor), localizada en la membrana celular, esta enzima juega un papel muy importante en la prevención de la acumulación de NO, debido a que es una sustancia tóxica para las bacterias. Finalmente, la reacción de reducción de óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) a nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) es catalizada por la enzima periplasmática óxido nitroso reductasa (Nos). Este paso constituye un proceso respiratorio independiente que puede darse también en algunas bacterias que no son desnitrificantes. El proceso de desnitrificación no siempre lleva a una completa reducción hasta nitrógeno ( $\text{N}_2$ ).

Existen microorganismos involucrados en todas las reacciones del proceso de desnitrificación, así como microorganismos implicados en una o varias reacciones (Kampschreur, 2010). A escala global, los microorganismos desnitrificantes no sólo juegan un papel crucial en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno y la química de la atmósfera, éstos también se encuentran implicados en la problemática del calentamiento global debido a las emisiones de intermediarios gaseosos como el óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), el cual tiene un impacto en el calentamiento global 300 veces mayor que el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) (Kampschreur, 2010).

Los grupos de bacterias involucradas en el proceso de desnitrificación se componen principalmente de los géneros: *Achoromobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* y *Spirillum* (Metcalf y Eddy, 1995). En algunos organismos del dominio *Arquea* y ciertos hongos también se ha identificado capacidad de desnitrificación (Thorndycroft *et al.* 2007).

## **2.2 Parámetros físicos- químicos y microbiológicos de caracterización de aguas residuales.**

Al hablar de calidad de aguas ya se sean para tratamientos de depuración, potabilización, vertido o cualquier otro uso, es imprescindible determinar una serie de parámetros físico-químicos y microbiológicos mediante métodos normalizados, con objeto de conocer si el valor de estos parámetros se encuentra dentro del intervalo que marca la legislación vigente. Entre los parámetros físicos se puede destacar los sólidos en suspensión, color, olor, turbidez, etc. En cuanto a los parámetros químicos se puede destacar, el pH, materia orgánica, TOC, DQO, DBO, aniones y cationes ( $\text{SO}_4^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , etc....).

### **2.2.1 pH.**

La determinación del pH en el agua es una medida de su acidez o de su alcalinidad. Se basa en la capacidad de respuesta del electrodo de vidrio ante soluciones de diferente actividad de iones  $\text{H}^+$ . La fuerza electromotriz producida en el electrodo de vidrio varía linealmente con el pH del medio. Se debe tener en cuenta la temperatura de la muestra ya que esta puede afectar al valor del pH. Un pH menor de 7.0 indica una tendencia hacia la acidez, mientras que un valor mayor de 7.0 muestra una tendencia hacia lo alcalino. En el caso de aguas superficiales presentan un valor de pH en un intervalo de 6-8.5, las aguas subterráneas presentan menores valores de pH que las superficiales. En los lagos y embalses, el pH experimenta una evolución espacial y temporal ligada a la dinámica térmica del lago, de forma que disminuye con la profundidad del agua. Para aguas residuales el valor de pH es menor que el valor del agua potable; los vertidos industriales tienen efecto en el pH del agua, produciendo una subida o una bajada del pH dependiendo del tipo de vertido.

### **2.2.2 Sólidos en sus diferentes formas.**

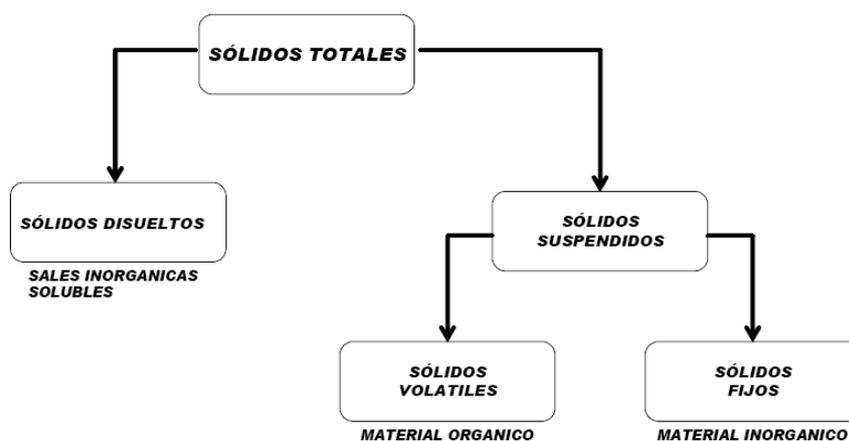
Los sólidos en las aguas tienen gran importancia. En el caso de las aguas potables indican la calidad de la misma, para el caso de las aguas de proceso es conveniente conocer la cantidad de sólidos que contienen. Los sólidos pueden encontrarse en diferentes formas como sólidos totales, sólidos disueltos y sólidos en suspensión como se indica a continuación.

**Sólidos totales**, los sólidos totales es la suma de los sólidos disueltos y en suspensión que la muestra de agua pueda contener. Las aguas naturales contienen una mezcla de sólidos disueltos y suspendidos.

**Sólidos disueltos**, los sólidos disueltos lo constituyen sales que se encuentran presentes en el agua y que no pueden ser separadas del líquido por algún medio físico, tal como la sedimentación, la filtración, etc. La presencia de estos sólidos no es detectable a simple vista, por lo que se puede tener un agua completamente cristalina con un alto contenido de sólidos disueltos. La presencia de estos sólidos solo se detecta cuando el agua se evapora y quedan las sales residuales en el medio que originalmente contiene el líquido. Analíticamente se miden por diferencia de peso entre las sales residuales obtenidas tras la evaporación de la muestra de agua y su peso neto inicial. También es posible cuantificar los sólidos disueltos midiendo la conductividad del agua, éstos se encuentran en forma de cationes y aniones, por lo que al ser partículas con carga pueden conducir la corriente eléctrica, y así pueden ser cuantificados indirectamente, con cierta precisión, midiendo la conductividad de la muestra.

**Sólidos en suspensión**; los sólidos en suspensión son partículas que permanecen en suspensión en el agua debido al movimiento del líquido o debido a que la densidad de la partícula es menor o igual que la del agua. La concentración de sólidos en suspensión es un valor utilizado como uno de los indicadores de la calidad del agua. Todos los sólidos en suspensión se pueden eliminar del agua mediante filtrado; sin embargo, si los sólidos en suspensión tienen una densidad mayor que el agua, estas partículas se pueden eliminar también por sedimentación, si la turbulencia del agua es mínima.

Los sólidos en suspensión pueden ser de origen orgánico o inorgánico y pueden desempeñar un papel importante como contaminantes, tanto debido a la materia que los forma, como por los agentes patógenos que son transportados en la superficie de dichas partículas. Por ello, cuanto menor sea el tamaño de la partícula, mayor será el área superficial por unidad de masa de la partícula, y por lo tanto, mayor será la carga patógena que puede ser transportada. Dentro de los sólidos suspendidos podemos distinguir sólidos volátiles y no volátiles o fijos. (Figura 10)



**Figura 10.** Esquema de la clasificación de los sólidos presentes en agua.

### 2.2.3 DBO.

La demanda bioquímica de oxígeno (DBO) se define como la cantidad de oxígeno que se consume en mg O<sub>2</sub>/L por procesos bioquímicos durante la degradación de ingredientes orgánicos, por tanto mediante el análisis de DBO se determinan los compuestos orgánicos degradables.

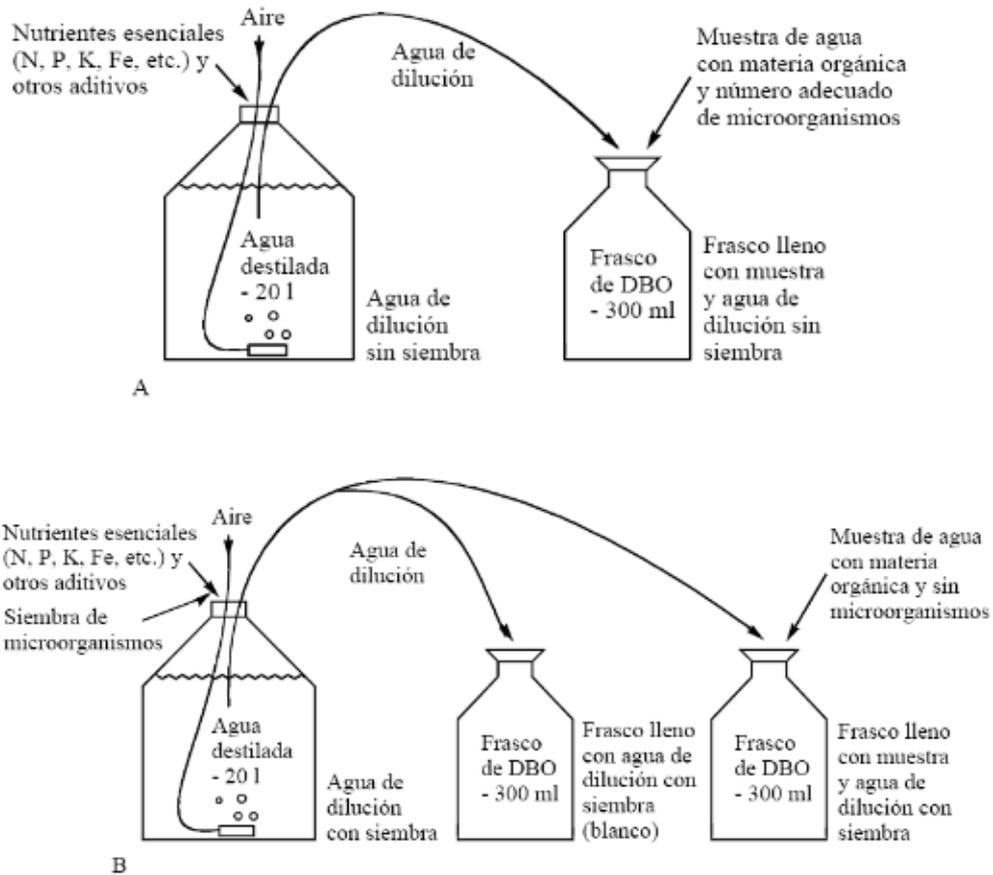
La determinación de la DBO constituye un importante instrumento en la determinación de la influencia de aguas residuales domésticas y aguas residuales industriales sobre depuradoras y cauces de evacuación. Existen diversos métodos para la determinación de la DBO, los cuales se pueden clasificar en métodos de dilución y métodos respirométricos.

#### 2.2.3.1 Métodos de dilución.

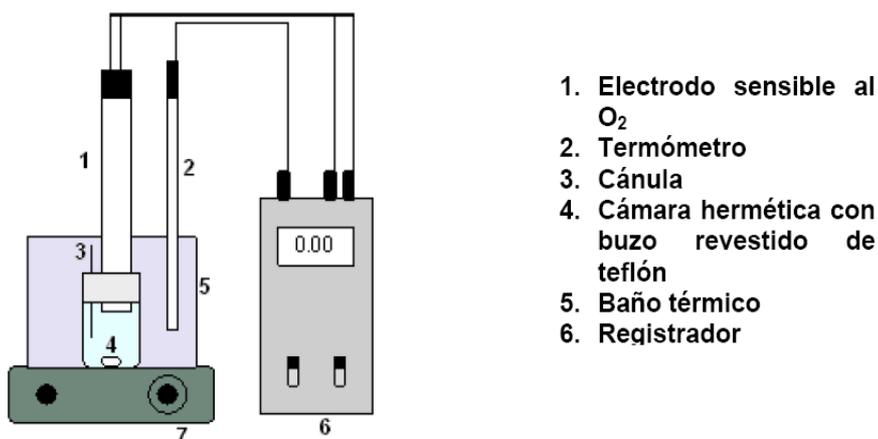
Estos métodos consisten en diluir el agua residual con agua saturada de oxígeno disuelto (OD), a la que se le han añadido sales y nutrientes, (Figura 11) y determinar la cantidad de oxígeno que resta al final del ensayo, ya sea por vía instrumental, electrodo selectivo de oxígeno (figura 12); o por vía química, método de Winkler. En estos métodos presenta importancia el grado de dilución, que tiene que ser de acorde con la materia orgánica presente en la muestra, así como la realización de la siembra, para aguas con nula o poca cantidad de microorganismos.

**Método Winkler;** las mediciones de oxígeno por este método implican la toma de muestras en una botella Winkler, la cual es simplemente un recipiente de vidrio con tapa hermética, que está diseñado de tal forma que posibilita la forma de muestras sin dejar atrapadas burbujas en el interior de la botella. El oxígeno disuelto (OD) en el agua oxida una cantidad equivalente del precipitado de hidróxido manganoso. En medio ácido, y en presencia de iones yoduro, el manganoso (Mn) oxidado revierte a reducido, con una liberación de yodo equivalente al contenido original de OD. Posteriormente se valora el yodo con una solución patrón de tiosulfato.

**Método electrodo selectivo de oxígeno;** son muy utilizados actualmente, estos respirómetros a volumen constante incluyen electrodos sensibles al oxígeno, los cuales registran el descenso de la concentración de O<sub>2</sub> disuelto en una solución acuosa (inicialmente saturada de O<sub>2</sub>) contenida en una cámara hermética (Figura 12). A fin de controlar la temperatura, las cámaras de medición se sumergen en un baño termostatzado con agitación continua. La toma de datos de los respirómetros se efectúa por lectura del monitor del medidor.



**Figura 11. Medida de la DBO por el método de dilución. A) Sin siembra; B) Con siembra.**



**Figura 12. Equipo de electrodo sensible al oxígeno.**

### 2.2.3.2 Métodos respirométricos.

Un respirómetro es un instrumento que consiste en un pequeño reactor biológico que sirve para medir velocidades de respiración aerobia de una población microbiana en determinadas condiciones. El respirómetro determina la cantidad de oxígeno consumida por unidad de tiempo y de volumen. Algunos autores consideran al respirómetro como un sensor, ya que consiste en una unidad física con una entrada de muestra externa y una salida de resultados obtenida después de un procedimiento interno.

Por otra parte, y debido a su condición de reactor biológico, los resultados son extremadamente dependientes de las condiciones de trabajo y, por tanto, puede existir una variabilidad en la salida. Esta variabilidad cuestiona el hecho de que se considere sensor al respirómetro y obliga a que los resultados de las respirometrías se acompañen de las condiciones de operación: estado de la biomasa (concentración, pH, temperatura, DQO, edad, etc); tipo de sustrato utilizado; temporalidad de la medida de oxígeno (puntual, continua)

Estos métodos siguen el consumo de oxígeno por medida de la presión del aire que está en contacto con la muestra. Como en la reacción se libera CO<sub>2</sub>, se dispone en todos ellos un sistema de absorción del CO<sub>2</sub> desprendido mediante disoluciones de KOH. Entre ellos están el Respirómetro Warburg (Figura 13) y el Respirómetro Sierp.

**Respirómetro Warburg**, es un sistema totalmente cerrado donde se introduce la muestra biológica y en donde a medida que se consume el oxígeno se va produciendo una depresión que se mide por un manómetro (por la diferencia en la altura del líquido manométrico en ambas ramas del manómetro).

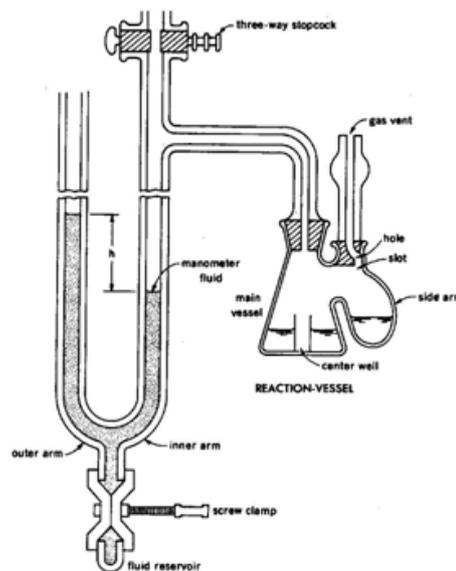


FIG. F-1 Warburg constant-volume respirometer. (From drawing by K. V. Tackett)

Figura 13. Respirómetro de Warburg.

#### **2.2.4 DQO.**

Desde el punto de vista ambiental, la demanda química de oxígeno (DQO) es una medida aproximada del contenido total de materia orgánica presente en una muestra de agua. Esta materia orgánica en condiciones naturales puede ser biodegradada lentamente y es oxidada a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O mediante un proceso lento que puede tardar, desde unos pocos días hasta unos varios millones de años, dependiendo del tipo de materia orgánica presente y de las condiciones de biodegradación. La DQO a diferencia de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) determina adicionalmente sustancias orgánicas no degradables. En las pruebas de DQO se acelera el proceso de biodegradación que realizan los microorganismos, mediante un proceso de oxidación forzada, utilizando oxidantes químicos y métodos debidamente estandarizados.

En el método de dicromato potásico, la determinación se efectúa por retroceso, valorando el exceso de dicromato potásico aportado con sulfato ferroso amónico.

Este método presenta algunos inconvenientes, en las condiciones del ensayo, se oxida el 95% del valor teórico de los compuestos orgánicos; no oxida a algunos compuestos aromáticos (como benceno, piridina, tolueno); puede oxidar a ciertos compuestos inorgánicos (nitritos, cloruros y sulfuros, estos últimos se enmascaran por formación de un complejo con sulfato mercúrico) y el amoníaco sólo es oxidado en presencia de concentración significativa de iones cloruro libres.

La DQO de un agua residual es superior a la DBO, puesto que es mayor el número de compuestos que pueden oxidarse por vía química, que por vía biológica.

#### **2.2.5 Análisis de aniones y cationes mediante Cromatografía Iónica.**

La cromatografía iónica (CI) permite separar de modo eficiente cationes y aniones orgánicos de bajo peso molecular e inorgánicos. Con ella, es posible la determinación en paralelo de los iones en una amplia gama de concentraciones. En las últimas décadas, la cromatografía iónica se ha convertido en uno de los métodos más importantes para el análisis de trazas de aniones y cationes, siendo una técnica imprescindible en el análisis de aguas y medio ambiente.

La cromatografía iónica permite la separación de los analitos, basándose en las propiedades de carga de las moléculas.

La fase estacionaria consta de una matriz (insoluble) con grupos funcionales cargados y contraiones de carga opuesta, susceptibles de intercambiarse con especies de la misma carga contenidas en la fase móvil. Las moléculas cargadas se adhieren a los intercambiadores de forma reversible de modo que dichas moléculas pueden ser unidas o no cambiando el ambiente iónico.

La separación mediante intercambiadores iónicos se realiza por lo general, en dos fases: en la primera fase, las sustancias a separar se unen al intercambiador dando lugar a una unión fuerte y estable; en la segunda fase, se produce la competencia de los componentes del tampón con el material, por los sitios de unión.

Entre los compuestos que se pueden analizar están los nitratos, fosfatos, nitritos, cloruros, amonio, sulfatos, etc.

**Nitratos**, los nitratos constituyen la especie nitrogenada más abundante y de mayor interés en todo tipo de aguas naturales, la presencia de  $\text{NO}_3^-$  en aguas proceden de la disolución de rocas y minerales, de la descomposición de materias vegetales y animales, de efluentes industriales y de lixiviados. En general, las aguas naturales de superficie no suelen contener más de unos 10 mg/L e incluso con frecuencia no pasan de 1 mg/L. Sin embargo, desde hace unos años se ha comprobado un gran incremento del contenido de  $\text{NO}_3^-$  en muchas aguas, sobre todo subterráneas, está relacionado con el uso de fertilizantes nitrogenados. En aguas residuales la presencia de  $\text{NO}_3^-$  es mínima, si puede ser elevada en las aguas ya tratadas procedentes de estaciones depuradoras, ya que el compuesto se convierte en factor limitante del crecimiento en sistemas hídricos si existe abundancia de fósforo, produciéndose fenómenos de eutrofización. La determinación de los nitratos es importante, sobre todo para aguas de consumo humano.

**Nitritos**, especie poco estable químicamente, su presencia en un agua suele indicar una contaminación de carácter fecal reciente. Así pues, en aguas superficiales bien oxigenadas, la concentración de  $\text{NO}_2^-$  no suele superar 0.1 mg/L. Sin embargo, en ríos con contaminaciones de aguas residuales urbanas e industriales apreciables pueden medirse niveles más altos que en las aguas superficiales oxigenadas. Lógicamente, las aguas subterráneas sometidas a un ambiente reductor y/o pobre en oxígeno, pueden contener también  $\text{NO}_2^-$ . Las aguas profundas y desoxigenadas de lagos y embalses estratificados presentan concentraciones de  $\text{NO}_2^-$  más altas que las detectadas en aguas superficiales. Los nitritos al igual que los nitratos pueden ser tóxicos debido a su poder de transformar la hemoglobina de la sangre en metahemoglobina incapaz de fijar el oxígeno y realizar correctamente la respiración celular.

**Sulfatos**, el sulfato ( $\text{SO}_4^-$ ) se distribuye ampliamente en la naturaleza y se halla en todo tipos de aguas, pueden proceder de la oxidación bacteriana de sulfuros, de procesos industriales como la disolución de yesos, etc. La concentración de sulfatos en el agua es variable, oscilando entre 20-50 mg/L en aguas del Norte de Europa y encontrándose concentraciones mayores (>400 mg/L) en zonas mediterráneas. Hay que destacar que aguas con elevado contenido en sulfatos, insolubilizan los metales pesados presentes en ellas, minimizando su toxicidad.

**Amonio**, el agua de lluvia suele presentar trazas de amonio, mientras que las aguas superficiales bien aireadas, generalmente suelen contener poco  $\text{NH}_3$  no más de 0.1 mg/L. Sin embargo, las aguas contaminadas por vertidos residuales domésticos exhiben concentraciones mucho más elevadas hasta 50 mg/L. En los lagos y embalses,

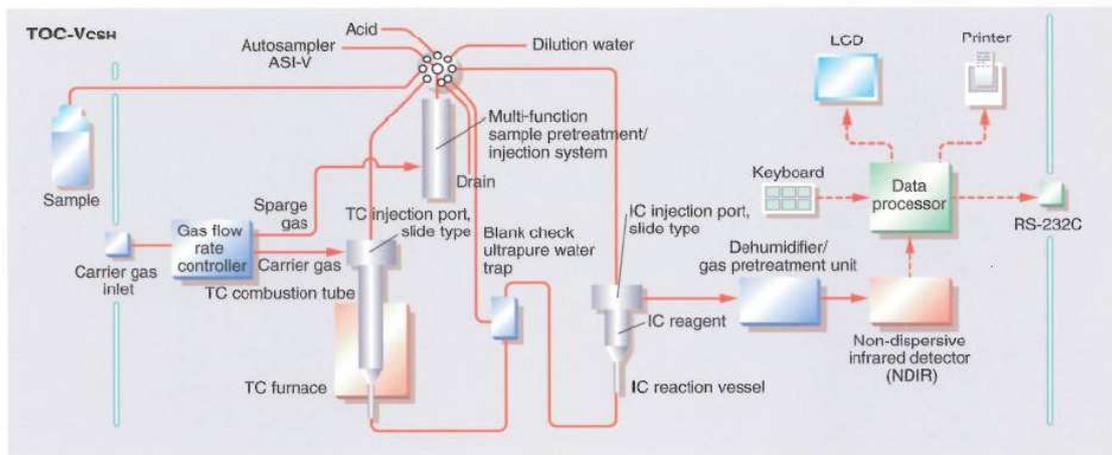
las concentraciones de amonio están regidas por la estratificación y la mezcla vertical y horizontal de la masa de agua, los niveles de amonio apenas varían en la columna de agua manteniéndose bajos  $< 0.2$  mg/L; sin embargo, las aguas de los fondos que se encuentran poco oxigenadas presentan unas concentraciones de amonio superiores (1 mg/L) a las de las aguas de la superficie. Las aguas subterráneas siempre suelen contener concentraciones altas de amonio. El amonio no es especialmente tóxico para los organismos superiores pero si lo puede ser para los peces cuando se encuentra en forma de  $\text{NH}_3$  iónico.

### **2.2.6 TOC.**

El carbono orgánico total (TOC) es la cantidad de carbono que contienen los compuestos orgánicos. Suele utilizarse como indicador no específico de la calidad del agua. La medida de la cantidad de materia orgánica se puede establecer directamente a través del Carbono Orgánico Total (TOC), o bien indirectamente a partir de la capacidad reductora del carbón existente en la muestra mediante la determinación de la DQO y la DBO ya descritos (2.2.3 y 2.2.4.). No obstante, el TOC es una medida rápida, fiable y directa del contenido orgánico ya que no depende del estado de la oxidación inicial de la materia, ni mide otros enlaces orgánicos como nitrógeno e hidrógeno, o inorgánicos que pueden contribuir en la demanda de oxígeno medida. Al valor del TOC contribuyen distintas sustancias desde compuestos de origen natural, procedentes de la actividad de animales y vegetales (ácidos húmicos, urea, aminas, etc) hasta compuestos sintéticos presentes como resultado de la actividad humana (detergentes, fertilizantes, pesticidas, etc).

El método para la determinación del TOC se basa en la oxidación catalítica a  $680^\circ\text{C}$ , como producto de la combustión se genera agua el carbono (orgánico e inorgánico) que se oxida a  $\text{CO}_2$ . Este dióxido de carbono generado se mide mediante un detector de infrarrojos no dispersos (NDIR), obteniéndose así el carbono total (TC).

El carbono inorgánico (IC), que contempla básicamente dióxido de carbono disuelto, carbonatos y bicarbonatos, y se calcula mediante la acidificación de la muestra con ácido fosfórico, proceso en el que se forma  $\text{CO}_2$ , y que es analizado por el NDIR. El TOC se obtiene por diferencia de los anteriores (TC-IC). En la Figura 14 se esquematizan los componentes del analizador de carbono orgánico total.



**Figura 14. Diagrama de los componentes del analizador de carbono orgánico total (TOC).**

### 2.3 Parámetros microbiológicos de caracterización de aguas residuales.

El agua es un recurso natural necesario para el desarrollo de la actividad humana. De su calidad depende su empleo en un gran número de usos, es por ello, que se hace necesario la realización de estudios que permitan determinar la calidad de dicha agua. Entre estos estudios se encuentran los análisis microbiológicos, los microorganismos que puede haber en el agua son virus, bacterias, hongos, algas y protozoos. Todos los organismos que se encuentran en el agua son importantes en el momento de establecer el control de la calidad de la misma independientemente de si tienen su medio natural de vida en el agua o pertenecen a poblaciones transitorias introducidas por el ser humano y si tienen capacidad para intoxicar a las personas y/o a los animales superiores. En concreto, los parámetros biológicos en las aguas potables son de mucho interés, siendo de gran importancia las especies patógenas para el hombre. Dado que buscar todo tipo de microorganismos patógenos, por su diversidad, es costoso y complicado y como la relación patógenos/no patógenos es muy pequeña, se realiza un control del agua a través de indicadores microbiológicos de contaminación. La normativa recoge una serie de análisis microbiológicos según se efectúe sobre el agua un análisis mínimo: Coliformes Totales y Fecales; uno estándar: los anteriores más, bacterias aerobias a 37°C, *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens*; o completo: los anteriores más aerobias a 22°C.

### **2.3.1 Importancia de las técnicas moleculares para la caracterización de aguas.**

Inicialmente, la investigación sobre la composición de las comunidades de bacterias presentes en el agua residual se realizó mediante el empleo de técnicas tradicionales basadas en cultivos de bacterias, pruebas bioquímicas y observación al microscopio (Ueda y Earle, 1972; Eikelboom, 1975; Curds, 1975). Sin embargo, estos métodos tradicionales presentan algunos inconvenientes que impiden una correcta caracterización de la composición y diversidad de bacterias de una comunidad. Así, resulta imposible obtener cultivos puros de la mayoría de los organismos presentes en un medio natural (Amann *et al.* 1995; Hugenholtz *et al.* 1998; Gilbride *et al.* 2006) debido al incompleto conocimiento de sus requerimientos fisiológicos así como de las complejas relaciones de simbiosis y sintrofia entre organismos muy frecuentes en la naturaleza (Sanz y Köchling, 2007). Además, la mayor parte de los medios de cultivo empleados tienden a favorecer el crecimiento de ciertos grupos de organismos, generalmente organismos heterótrofos de crecimiento rápido.

No obstante, algunos trabajos recientes han demostrado que con nuevas técnicas todavía es posible aislar nuevas especies en cultivos puros, lo que puede indicar que aún quedan muchas especies cultivables por descubrir (Suzuki *et al.* 1997; Pinhassi *et al.* 1997).

Los primeros estudios realizados con técnicas moleculares en procariontes mostraron un gran número de especies nuevas desconocidas hasta el momento (Giovannoni *et al.* 1990; DeLong, 1992). Investigaciones posteriores en diferentes hábitats han ido incrementado el número de nuevas especies. Algunas de ellas forman parte de linajes con organismos disponibles en cultivos puros, pero también se han encontrado otras especies pertenecientes a linajes de los que no se disponen aún de ningún representante cultivado. Estimaciones ecológicas y moleculares apoyan la idea de que el número de especies procariontes conocidas en la actualidad constituye sólo una pequeña parte de la diversidad real presente en la naturaleza (Amann *et al.* 1995). El desarrollo de nuevas técnicas moleculares permite en la actualidad el estudio de la biodiversidad, estructura y función de las comunidades de bacterias en un hábitat de manera completa. Estas técnicas pueden clasificarse en función de distintos criterios; así, es posible agrupar aquellos métodos que operan directamente sobre las bacterias, y aquellos otros en los que se estudia el ADN. La necesidad de amplificación del ADN es otro criterio que permite diferenciar entre aquellas técnicas que no requieren amplificación y se basan en el empleo de sondas, y las técnicas que si requieren amplificación y se basan por lo tanto en la PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction).

### 2.3.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), descrita en 1986 por Mullis (Bartlett y Stirling, 2003), tiene como objetivo obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original. Actualmente se utiliza esta técnica molecular como herramienta para la amplificación de genes o fragmentos de genes para la identificación de microorganismos del suelo (Bruce *et al.* 1992).

La PCR es una técnica de amplificación exponencial de ADN o ARN, dónde se utiliza una enzima, la Taq-polimerasa que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus*; en un principio la primera enzima polimerasa que fue utilizada para la PCR, provenía de la bacteria *Escherichia coli*. El ADN debe de estar sometido a temperaturas de 95°C para la desnaturalización de la molécula y permitir unir los cebadores, que le dan el inicio y fin de la copia del ADN a la enzima polimerasa y esta polimerasa que provenía de *E. coli* no soportaba las altas temperaturas, por lo que debía ser renovada en cada ciclo del proceso de amplificación. Por lo tanto, se comenzó a utilizar la enzima Taq polimerasa, que sí que es capaz de soportar las altas temperaturas que son necesarias para separar las cadenas de ADN.

También se utilizan unos cebadores o primers que son secuencias cortas de ADN (18-25 bases) que se unen específicamente a la región de material genético que se desea amplificar.

Tal y como se explica en la Tabla 2, existen una serie de criterios a la hora de seleccionar los primers. Además son necesarios nucleótidos (dNTP's) que la enzima Taq-polimerasa va uniendo; catión divalente (MgCl<sub>2</sub>), ya que los iones de magnesio estimulan el funcionamiento de la enzima Taq polimerasa para que incorpore y por último tampón salino que mantiene el pH óptimo para que la enzima actúe; proporcionándole la fuerza iónica adecuada para su máxima actividad.

**Tabla 2. Criterios para la selección de primers.**

<b>Tamaño</b>	Tamaño ideal: 20-25 nucleótidos de longitud generalmente: 18-30 nucleótidos de longitud
<b>Base en el extremo 3'</b>	Debe ser una G o una C
<b>Temperaturas de fusión (T<sub>m</sub>)</b>	50-65 °C
<b>contenido GC</b>	40-60%
<b>auto-complementariedad</b>	Debe ser evitada Para minimizar la formación de estructuras secundarias y los dímeros de primer
<b>Similaridad</b>	Debe tener un 100% de apareamiento con el molde

La reacción de la PCR es un proceso que consta de 3 etapas: desnaturalización, hibridación y extensión (Figura 15).

Para que pueda iniciarse la reacción es preciso que las moléculas de ADN molde se encuentren en forma de cadena simple. Esto se consigue en la etapa de **desnaturalización** con una temperatura de 90 a 95°C necesaria para que se produzca la rotura de los enlaces de puente de hidrógeno intercatenarios y la separación de ambas cadenas, de esta manera se asegura la completa separación de la doble cadena del ADN, esta temperatura debe mantenerse durante unos minutos. Si el ADN solo se desnaturaliza parcialmente éste tenderá a renaturalizarse muy rápidamente dificultando con esto el proceso de hibridación.

La siguiente etapa es la de **hibridación**, una vez que el ADN está desnaturalizado, se disminuye la temperatura de la reacción hasta un rango comprendido entre los 40 y los 60°C para que se pueda producir la hibridación específica de los cebadores a las secuencias flanqueantes del fragmento que se desea amplificar. La temperatura a la que se realiza esta etapa debe establecerse para cada reacción en función de la longitud de los cebadores y su secuencia (temperaturas inferiores a la óptima producirán hibridaciones no específicas de los cebadores y temperaturas superiores dificultarán la eficiencia de la misma).

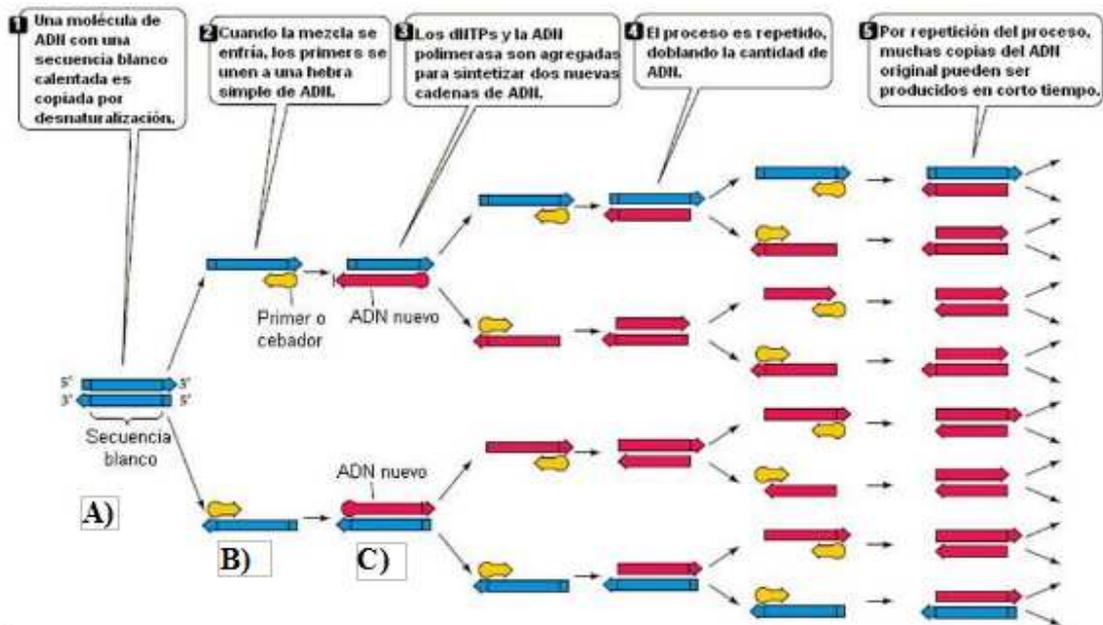


Figura 15. Esquema de las etapas de PCR: A) Desnaturalización, B) Hibridación, C) Extensión.

Y por último la etapa de **extensión**, durante esta etapa la DNA polimerasa termorresistente incorpora nucleótidos en el extremo 3' del cebador utilizado como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se realiza esta etapa de la reacción suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la "*Taq polimerasa*" alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pares de bases, y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2 Kb. Al finalizar cada uno de los ciclos el número de copias obtenidas se duplica de modo que después de 20 ciclos hay aproximadamente 1 millón de copias de cada una de las moléculas molde iniciales ADN.

Algunos estudios señalan que la adición de seroalbúmina bovina en la reacción de PCR para muestras de ADN de suelo, favorece las condiciones de amplificación disminuyendo el efecto de inhibidores presentes en el suelo, como los ácidos húmicos, haciendo más eficiente la reacción. Estos ácidos al estar presentes en la muestra dificultan la reacción en cadena de la polimerasa y por lo tanto no se produce amplificación del ADN (Romanowski, 1993).

### **2.3.1.2 Electroforesis en gel de agarosa.**

La concentración e integridad del ADN extraído, así como la de los productos de PCR pueden ser verificadas mediante electroforesis en geles de agarosa. La electroforesis consiste en la separación de ácidos nucleicos a través de una matriz tamponada (agarosa). La matriz funciona como un filtro, separando las moléculas en un campo eléctrico, de acuerdo al tamaño y la carga neta que poseen. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato es el responsable por la fuerte carga negativa en condiciones de pH neutro, haciendo que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo) durante la electroforesis (Posso y Ghneim, 2008). La resolución y velocidad de separación de fragmentos de ADN por electroforesis son reguladas a través de la concentración de agarosa en el gel y el voltaje aplicado durante la electroforesis, de modo que los fragmentos de menor tamaño migran más rápidamente hacia el ánodo que aquellos de mayor tamaño. Al aumentar la concentración de agarosa se dificulta el movimiento de los fragmentos a lo largo del gel, permitiendo obtener una mayor resolución en los fragmentos de menor longitud. El incremento del voltaje aumenta proporcionalmente la velocidad de migración de los fragmentos en el gel (Posso y Ghneim, 2008). La técnica para la cuantificación de ADN consiste simplemente en la utilización de una secuencia de concentraciones de solución patrón de ADN con la que se comparan muestras de ADN de concentración desconocida. El ADN se tiñe con bromuro de etidio y el cálculo de las concentraciones se hace bajo la luz ultravioleta según la fluorescencia.

### 2.3.1.3 Electroforesis en gel desnaturalizante (DGGE).

La electroforesis en gel desnaturalizante permite el estudio de la composición de bacterias en un medio basándose en la diferente movilidad en geles de poliacrilamida de fragmentos de ADN de tamaño semejante pero distinta secuencia de nucleótidos (incluso de un sólo nucleótido). Dichos fragmentos deben de haber sido previamente amplificados por PCR. La técnica se basa en la migración diferencial de las moléculas de ADN a través de un gel de poliacrilamida que contiene concentraciones crecientes de agentes desnaturalizantes como formamida o urea (Kazuya *et al.* 2000) (Figura 16).

La desnaturalización total del ADN se evita uniendo al ADN una “pinza” o *clamp* de guanina y citosina (G-C) que impide la desnaturalización total. Se obtiene así un patrón de bandas en diferentes posiciones que caracterizan cada secuencia. Con frecuencia se recurre a la secuenciación de las bandas y a su análisis filogenético. La limitación más importante de esta técnica, en cuanto a la realización de una adecuada caracterización de la comunidad bacteriana, viene dada por la corta longitud de los fragmentos amplificados (aproximadamente 500 bp de las secuencias ribosomales 16S) lo que dificulta los análisis filogenéticos y por tanto, la correcta caracterización de la comunidad. La co-migración de fragmentos de distintas secuencias, la aparición de bandas dobles por la degeneración de los primers, y la formación de moléculas heterodúplex constituyen otras de las principales desventajas (Zhang *et al.* 2005).

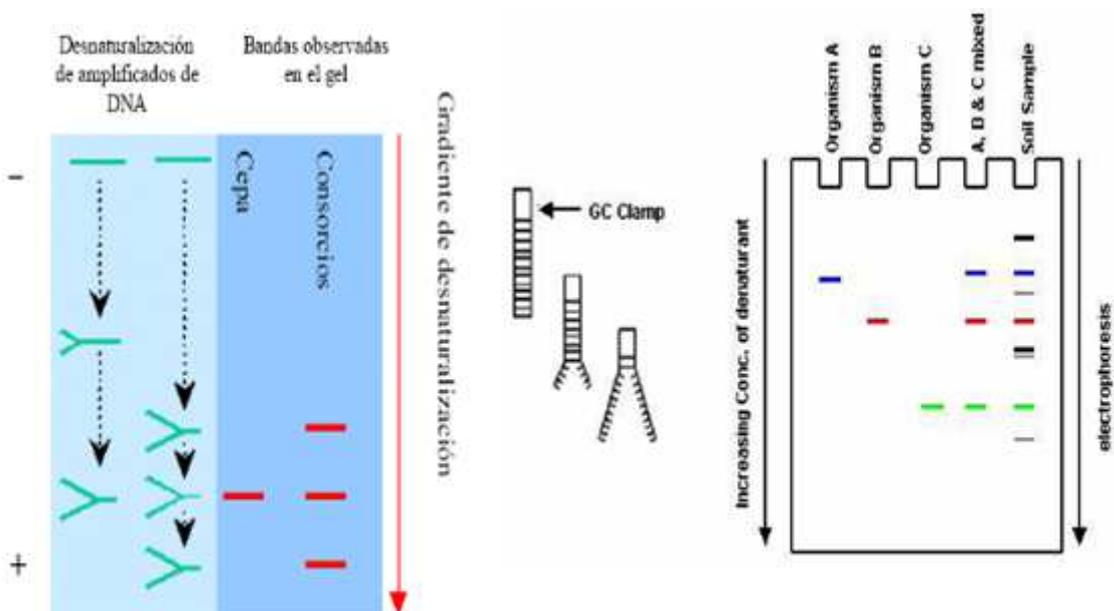


Figura 16. Gradiente de desnaturalización DGGE.

### **Aplicaciones de la DGGE en medio ambiente.**

La mayoría de las especies bacterianas que viven en el ambiente no son cultivables en los medios empleados habitualmente, por ello, la DGGE (del inglés denaturing gradient gel electrophoresis) es una técnica con gran potencial en la caracterización de comunidades microbianas en muestras ambientales. Entre los ejemplos de aplicación de esta técnica se pueden citar: Conocer la estructura, distribución y diversidad de microorganismos presentes en la biorremediación de fenol en una planta industrial (Andrew *et al.* 2000). Caracterización de microorganismos presentes en pastizales ingleses (Robert *et al.* 2000; Allison *et al.* 2001). Estudios realizados en la universidad de Nueva Delhi en la India, muestran los efectos de adición de microorganismos para estimular la biorremediación in-situ de un suelo contaminado con hidrocarburos y el seguimiento de este sistema utilizando técnicas de biología molecular (Mishra *et al.* 2001). En suelos contaminados con hidrocarburos que además contienen altas concentraciones de azufre, se han identificado los microorganismos implicados en la degradación de compuestos azufrados, en especial cuando la mayor parte de ellos no son cultivables por técnicas convencionales (Frois *et al.* 2001). Algunos estudios en los que se emplea este método en humedales artificiales son los realizados por (Tietz *et al.* 2007) para identificación de bacterias oxidantes del amonio.

#### **2.3.1.4 El gen 16S ARNr bacteriano.**

Los tres genes ribosomales en bacterias, codifican para tres moléculas de ARN (16S, 23S y 5S) y constituyen parte de la estructura del ribosoma. Algunos estudios han mostrado que dentro del genoma de todos los procariotas se encuentra el gen 16S, con regiones conservadas y regiones variables (Kazuya *et al.* 1998; Andrew *et al.* 2000; Robert *et al.* 2000; Allison *et al.* 2001). Esta característica le transfiere una importante utilidad, como biomarcador, ya que se encuentra presente en todos los organismos. Algunas regiones de este gen poseen una alta conservación estructural y funcional, resultando útiles en la diferenciación de organismos lejanos filogenéticamente mientras que las regiones variables se emplean en la detección de organismos filogenéticamente cercanos. Por estas características, la secuencia de estas biomoléculas se pueden utilizar para la construcción de árboles filogenéticos. En las bacterias, este gen posee alrededor de 1.5 kp.

#### **2.3.2 Secuenciación.**

La secuenciación permite determinar el orden de los nucleótidos de un fragmento de ADN. Los grandes avances de las técnicas de secuenciación del ADN permiten hoy en día leer el ADN a gran velocidad lo que ha llevado a abordar proyectos a gran escala como el Proyecto Genoma Humano. Pero además se dispone ya de la secuencia completa de ADN de muchos genomas de animales, plantas y microorganismos.

A finales de los años 70 comenzaron a desarrollarse los métodos para la secuenciación de fragmentos de ADN. Tanto el método químico desarrollado por Gilbert y Maxam, como el método enzimático desarrollado por Sanger, quien logró la secuencia completa de la molécula de insulina, compartían un principio común: la generación de cadenas sencillas de ADN, marcadas radiactivamente, cuyo tamaño se diferenciaba del de la siguiente cadena en una única base y que podían separarse por su diferente movilidad electroforética. Todavía hoy en día el Método Sanger es el más usado en los laboratorios, aunque en los últimos años está adquiriendo gran relevancia las técnicas de secuenciación masiva.

Para determinar la secuencia de una determinada molécula de ADN, es necesario multiplicar el número de copias de dicha molécula mediante una PCR o usando un vector de clonación.

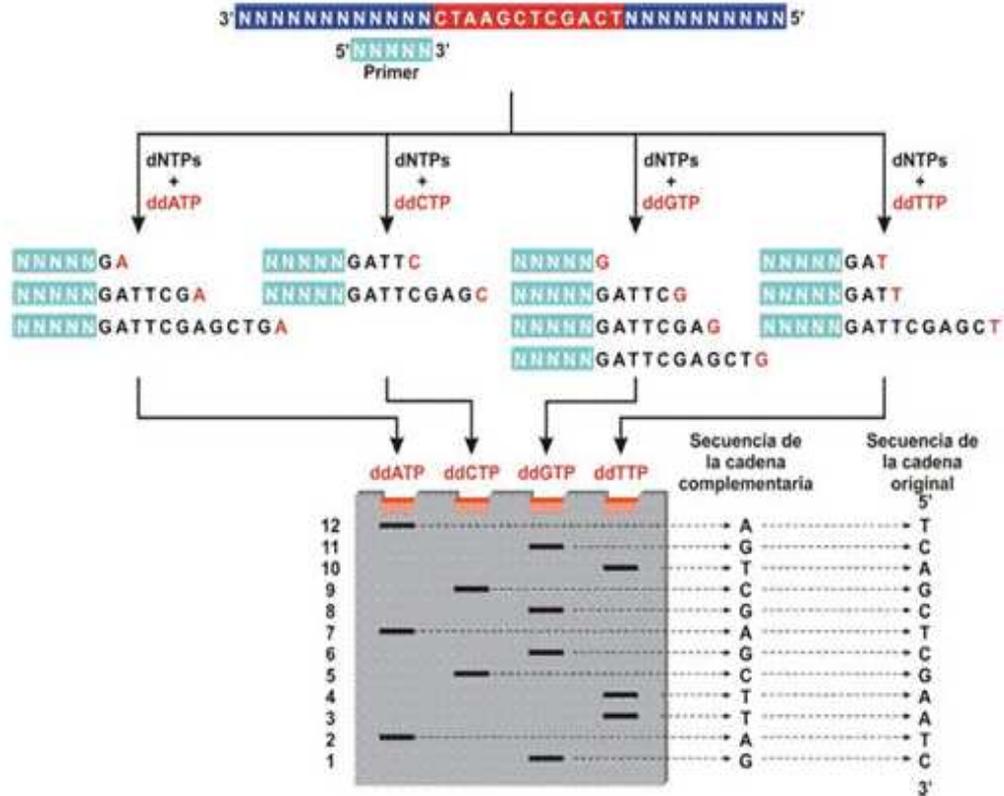
Las reacciones para secuenciar el ADN son similares a cualquier reacción PCR. La mezcla incluye una muestra de ADN, nucleótidos libres, una enzima (generalmente una variante de la Taq polimerasa) y un "primer" que pueda ser capaz de hibridar con una de las hebras de la muestra de ADN. Se calienta la mezcla para separar las dos hebras de ADN, lo que permite que el "primer" se ligue a la zona deseada y la ADN-polimerasa inicie la elongación del primer. Se producen varios ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación del fragmento de ADN.

La secuenciación de ADN utilizando el "método dideoxi" de Sanger (ó "método enzimático de terminación de cadena") (Figura 17) emplea nucleótidos modificados (dideoxinucleótidos), que no poseen el grupo hidroxilo (-OH) en el extremo 3'. El ADN se sintetiza *in vitro* utilizando un molde de la cadena que se desee secuenciar, un exceso de nucleótidos deoxi (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), una pequeña cantidad de dideoxi específicos (ddATP, ddTTP, ddCTP o ddGTP), un cebador y la polimerasa.

El resultado de la reacción de síntesis son cadenas de distinta longitud. La incorporación de un nucleótido dideoxi hará que termine el proceso de síntesis. Esto se debe a que la polimerasa necesita un grupo hidroxilo en la posición 3' para poder agregar el siguiente nucleótido (si este grupo no está presente, la polimerasa no puede continuar con la síntesis). Una vez sintetizado el ADN, se realiza una electroforesis en geles de agarosa, de esta manera, se pueden ver distintas bandas correspondientes a los diferentes tamaños de los fragmentos de amplificación. Si se leen las calles de abajo arriba (es decir, de menor a mayor tamaño), tendremos la secuencia del ADN elegido (en orientación 5' → 3').

Posteriormente, este mismo método se modificó para adaptarlo a los equipos de electroforesis capilar con detectores de fluorescencia que además permiten la automatización. La principal diferencia entre el método enzimático de terminación de cadena y el método automático de secuenciación radica, en primer lugar en el tipo de marcaje. En el método automático en vez de radioactividad se utiliza fluorescencia y lo habitual es realizar cuatro mezclas de reacción, cada una con un nucleótido trifosfato

(dTTP) marcado con un fluorocromo distinto. Este sistema permite automatizar el proceso de manera que es posible leer al mismo tiempo los ADNs de nueva síntesis producto de las cuatro mezclas de reacción.

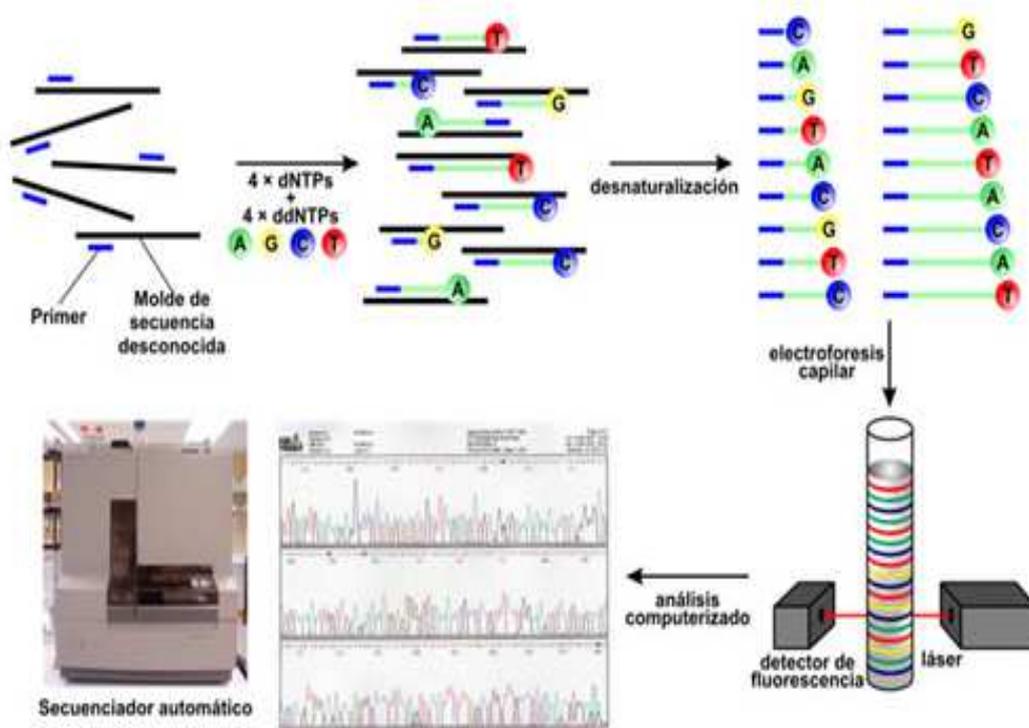


**Figura 17. Esquema de la secuenciación por el método enzimático de terminación de cadena o método de Sanger.**

La segunda diferencia radica en el sistema de detección de los fragmentos de ADN. La detección del tipo de fluorescencia correspondiente a cada reacción se lleva a cabo al mismo tiempo que la electroforesis, de manera que los fragmentos de ADN de menor tamaño que ya han sido detectados se dejan escapar del gel, permitiendo este sistema aumentar el número de nucleótidos que se pueden determinar en cada electroforesis y, por consiguiente, en cada secuenciación.

Como resultado de la secuenciación cíclica se obtienen múltiples copias de cada posible fragmento terminando con un didesoxinucleótido marcado. El producto de la secuenciación cíclica es introducido en un equipo de electroforesis capilar (Figura 18).

La muestra al ser sometida a un campo eléctrico se desplaza por los capilares, este desplazamiento es proporcional al tamaño. Al final del circuito los fragmentos fluorescentes son detectados por el equipo.



**Figura 18. Esquema de la secuenciación por el método automático de electroforesis capilar.**

Cada tipo de didesoxinucleótido emite una fluorescencia de una longitud de onda distinta que es captada por el sistema, que mediante un programa de ordenador interpreta los resultados del equipo y genera un electroferograma con picos de colores ordenados según su tamaño. Como cada nucleótido emite fluorescencia de un tipo determinado, el equipo asigna a cada pico de color el nucleótido correspondiente. Una vez obtenida la secuencia de nucleótidos se pasa a una base de datos, la más utilizada es el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) donde se introducirá la secuencia para la identificación del microorganismo correspondiente. El BLAST es un programa que es capaz de comparar una secuencia problema contra una gran cantidad de secuencias que se encuentran en la base de datos, con la ayuda de un algoritmo (bomba de barrido) para el caso de las secuencias de nucleótidos, este encuentra la secuencia de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia problema que se quiere identificar.

### **3. Materiales y métodos.**

### 3.1 Recogida de Muestras

La toma de muestras de lixiviados fue realizada el 14 de Marzo de 2013 en las instalaciones de COGERSA (Asturias). Las muestras corresponden a diferentes puntos de las etapas que forman parte del tratamiento biológico de la depuradora instalada en COGERSA basada en el proceso BIOMEMBRANT, descrito en el apartado de consideraciones teóricas. Se recogieron 6 muestras (Entrada, tanque DN, tanque NO, tanque N1, tanque N2 y Salida), en botellas de 0.5 L estériles, correspondientes a 6 puntos diferentes del tratamiento biológico de la depuradora de lixiviados de vertedero. Posteriormente fueron almacenadas a 4°C como máximo durante 24 horas hasta su análisis físico-químico y microbiológico. Para las técnicas moleculares se centrifugaron y se congelaron a -20°C.

En la Tabla 3 se resume las técnicas moleculares y los análisis físico-químicos, microbiológicos realizados en este trabajo.

**Tabla 3. Resumen de los análisis realizados de los lixiviados de vertedero.**

<b>Tipo de Muestra</b>	<b>Lixiviados de vertedero</b>
<b>Fecha recogida de muestras</b>	14/ 3/ 2013
<b>Nº de puntos de muestreo</b>	6
<b>Descripción puntos de muestreo</b>	Entrada, DN, NO, N1, N2, Salida.
<b>Parámetros analizados en laboratorio</b>	<b>Físico- Químicos:</b> DBO5, DQO, NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , SS, pH, TOC.
	<b>Microbiológico:</b> Aerobios mesófilos, Clostridios sulfito reductores, Coliformes totales, Estreptococos fecales, <i>Thiobacillus</i> sp.
	<b>Técnicas Moleculares:</b> Extracción de DNA, PCR, geles de agarosa, DGGE, secuenciación.

### **3.2 Análisis Físico- Químico.**

Los parámetros físico-químicos se han determinado siguiendo los procedimientos normalizados (APHA, 2005).

#### **3.2.1 pH.**

Para la determinación del pH se utilizó un pH-metro (CRISON). Antes de la realización de la medida, el aparato se calibró utilizando las disoluciones tampón de pH 7.00, 4.01 y 9.01 (CRISON) a temperatura ambiente (20°C).

#### **3.2.2 Sólidos en suspensión.**

Para calcular los sólidos en suspensión se tomaron 25 mL de muestra de lixiviado y se transfirió al equipo de filtración en el cual se colocó un filtro de 0.45 µm de tamaño de poro (Sigma Aldrich). Tras la filtración, el filtro se dejó durante 1 hora en la estufa a 100°C. Trascorrido el tiempo se cogen los filtros y se ponen en un desecador para que se enfríen evitando que cojan humedad. Por último, se pesaron los filtros, previamente habiendo tarado la báscula con un filtro nuevo sobre una tartaleta de aluminio, anotando el resultado obtenido.

#### **3.2.3 DBO5.**

A fin de eliminar los SS se centrifugaron 300 mL de la muestra de lixiviado en botellas de 0.5 L a 10000 xg durante 20 minutos a 4°C (Kubota, 6500). Parte del sobrenadante obtenido se recogió para la DBO5.

El método utilizado es por medición de la diferencia de presión en el sistema cerrado, mediante determinación respirométrica. Durante la determinación DBO las bacterias consumen el oxígeno disuelto en la prueba de agua residual. Este oxígeno consumido, es reemplazado por el oxígeno, que se encuentra en la cámara de aire de la botella de prueba. El dióxido de carbono producido queda combinado químicamente por una solución de hidróxido de potasio, que se encuentra dentro de un pequeño depósito en el interior de la botella. De esta manera se crea una disminución de la presión que es medida por el sensor para la DBO y que se indica en la pantalla frontal inferior directamente como valor de la DBO en mg/L de O<sub>2</sub>.

Se estimó el intervalo de medida de la muestra a analizar y el volumen de la muestra según la Tabla 4. El intervalo de medida debería elegirse de tal forma que los resultados, se encuentren en la mitad superior del intervalo de medida. Si el valor de la DBO es desconocido, se puede seguir la relación de que el valor DBO5 corresponde aproximadamente al 80% del valor DQO. Una vez escogido el intervalo, si fuera necesario se debe tratar previamente la muestra, para ello se debe comprobar el pH de la

muestra de agua. El valor óptimo se encuentra entre 6.5 y 7.5. En las muestras en la que pH sea superior a este intervalo se puede neutralizar con ácido sulfúrico diluido o ácido clorhídrico diluido (1 molar) y si el pH está por debajo del intervalo se puede neutralizar con una solución de hidróxido sódico (1 molar). En este caso se tuvieron que tratar las muestras de Entrada y del tanque DN con ácido clorhídrico diluido 1 molar (Panreac).

**Tabla 4. Intervalo de medida DBO según los mg/L.**

Intervalo de medida DBO en mg/l	Volumen de la muestra en ml	Dosificación ATH
0 – 40	428	10 gotas
0 – 80	360	10 gotas
0 – 200	244	5 gotas
0 – 400	157	5 gotas
0 – 800	94	3 gotas
0 – 2000	56	3 gotas
0 – 4000	21,7	1 gota

Se añadió la cantidad de muestra de correspondiente según el intervalo escogido tal como indica la Tabla 5, en el frasco para DBO (sistema DBO OxiDirect, Aqualytic).

**Tabla 5. Intervalo de medida DBO mg/L con su correspondiente volumen y dosificación de ATH.**

Muestra	Intervalo de medida DBO mg/L	Volumen de muestra ml	Dosificación ATH
<b>Entrada</b>	0-2000	56	3 gotas
<b>DN</b>	0-400	157	5 gotas
<b>NO</b>	0-400	157	5 gotas
<b>N1</b>	0-400	157	5 gotas
<b>N2</b>	0-400	157	5 gotas
<b>Salida</b>	0-200	244	5 gotas

Los volúmenes de las muestra fijados deben ser introducidos exactamente para evitar errores en la medición. Posteriormente se añadió un inhibidor de la nitrificación, el inhibidor utilizado es el inhibidor de nitrificación B (aliltiourea/ATH) y la cantidad va a depender del intervalo de medida que aparece en la Tabla 5. Por último, se introdujo un imán en cada uno de los frascos donde se va a realizar la prueba y se añadieron 3-4 gotas de solución de KOH al 45% en el carcaj.

Previamente antes de iniciarse la prueba se preparó la nevera unos 40 minutos antes para regular la temperatura a 20°C, temperatura a la cual se debe realizar la medición de la DBO. Finalmente se atornillan los sensores para DBO en los frascos para muestras, se colocan las muestras en el soporte para los frascos y se enciende el equipo (Figura 19).



Figura 19. a) Equipo de medición de la DBO5; b) Ejemplo de funcionamiento de un frasco de medición de DBO con muestra de agua residual.

### 3.2.4 DQO.

El método utilizado para llevar a cabo la medida de la DQO está tomado del manual de referencia “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” (APHA-AWWA-WEF, 2005). Para poder realizar el análisis de la DQO se necesita preparar las disoluciones A, B y C. Para la preparación de la disolución A se pesan 6.6 g de  $Ag_2SO_4$  (Sigma Aldrich) y se disolvieron en un litro de  $H_2SO_4$  (Sigma Aldrich). En el caso de la disolución B se pesan 120 g de  $HgSO_4$  (Sigma Aldrich) y se mezclaron con 35 mL de la disolución A y 100 mL de  $K_2Cr_2O_7$  (0.25 N) (Sigma Aldrich).

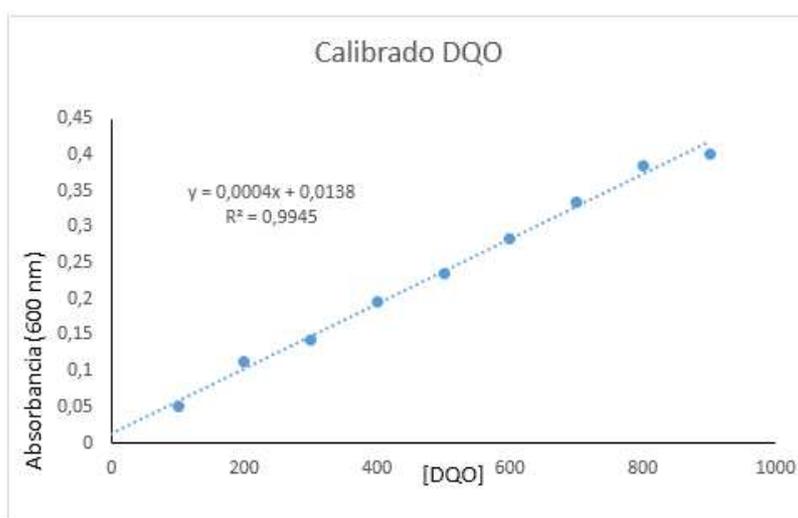
Tabla 6. Resumen del método de DQO.

[DQO] ppm/mg/l	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900
C (ml)	0	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5	1.8	2.1	2.4	2.7
Agua (ml)	3	2.7	2.4	2.1	1.8	1.5	1.2	0.9	0.6	0.3
B (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
A (ml)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		Digerir	2h	en	estufa	a	150°C			

Y para la disolución C se pesó 1 g de ftalato (Sigma Aldrich) y se diluyó en 1 L de agua destilada mezclándolo bien con agitación. Tras la preparación de las disoluciones se pasó a realizar los patrones de calibrado siguiendo la Tabla 6.

Una vez obtenido los patrones de calibrado se preparan las muestras de lixiviados. Previamente se realizó una dilución 1:10, del sobrenadante obtenido de las 6 muestras de lixiviados a través de la centrifugación de 300 mL de cada una de las muestras de lixiviados en botellas de 0.5 L a 10000 xg durante 20 minutos a 4°C (Kubota, 6500) y se filtró con la ayuda de una jeringuilla y un filtro de 0.45 µm (Axiva). Luego se pipeteó 3 mL de la muestra, posteriormente se añadió 2 mL de la disolución B, se agitó y se añadió 4 mL de la disolución A para luego colocar los tubos al digestor donde permanecieron 120 minutos a 150°C. Transcurrido el tiempo en el digestor (Cod Reactor, Hach), se pasó a realizar la medida de la absorbancia a 600 nm en el espectofotómetro (Hach).

En la Figura 20 se representa gráficamente la recta de calibrado de la DQO obtenida con una pendiente de 0.9945, a partir de los patrones de calibrado.



**Figura 20. Gráfica de la recta de calibrado obtenida.**

### 3.2.5 Cromatografía de Intercambio Iónico.

Se realizaron diluciones 1:50 del sobrenadante obtenido tras la centrifugación de 300 mL de las muestras de lixiviados de Entrada, DN, NO, N1, N2, en botellas de 0.5 L a 10000 xg durante 20 minutos a 4°C (Kubota, 6500) y una dilución de 1:20 del sobrenadante obtenido tras la centrifugación como se explica en este apartado, para la muestra de lixiviados de Salida. Cuando se tienen las diluciones hechas, estas se filtran por un filtro de 0.45 micras (Axiva) antes de ser inyectadas en el cromatógrafo. Los análisis fueron realizados por duplicado.

### 3.2.5.1 Cationes.

Para el análisis de  $\text{NH}_4^+$  presente en las muestras se utilizó el cromatógrafo de intercambio iónico ICS-1000 DIONEX (figura 21) equipado con una precolumna Ion Pac CG16 (5X50 mm), una columna Ion Pac CS16 (5x 250 mm) y una columna supresora CRS 300 (4 mm). La temperatura del horno fue de  $40^\circ\text{C}$ , la de la célula de detección de  $35^\circ\text{C}$  y la fase móvil empleada fue ácido metasulfónico 30 mM. El volumen de inyección fue de  $25\ \mu\text{L}$ .



**Figura 21.** Panel frontal del ICS-1000, con el puerto de inyección por dónde se inyecta las muestras.

### 3.2.5.2 Aniones.

Para el análisis de aniones presentes en las muestras de aguas de lixiviados se utilizó el cromatógrafo de intercambio iónico DIONEX DX-120 equipado con una precolumna Ion Pac AG23 (4X50 mm), una columna Ion Pac AS23(4x 250 mm) y una columna supresora ASRS ULTRA II (4 mm). La fase móvil empleada fue bicarbonato  $\text{HCO}_3^-$  0.8 mM y carbonato  $\text{CO}_3^{2-}$  4.5 mM. El volumen de inyección fue de  $25\ \mu\text{L}$ .

### 3.2.6 TOC.

El equipo utilizado para realizar el análisis de carbón orgánico total (TOC), carbono total (TC) y carbono inorgánico (IC) es el modelo TOC-V CSH (Shimadzu) Compuesto por un supresor, un infrarrojo no dispersivo con lámina de oro, un reactor que se encuentra a una temperatura de  $680^\circ\text{C}$ . El equipo mide en un intervalo de 0-125 ppm.

Se realizó una dilución de 1:50 para las muestras de lixiviados de Entrada, DN, N0, N1, N2 y una dilución de 1:20 para la muestra de Salida se filtró con una jeringuilla y un filtro de  $0.45\ \mu\text{m}$  (Axiva). Luego se cogió 3 mL de cada una de las muestras de lixiviados diluidas y se depositó en tubos de 10 mL donde se les puso parafilm en la

parte superior del tubo, esto se realizó para evitar que el capilar de la inyección no sobresalga y la muestra sea inyectadas de manera correcta. El volumen de inyección es de 50  $\mu$ L y los análisis fueron realizados por triplicado.

### **3.3 Análisis Microbiológico.**

A cada muestra de lixiviados, se le realizaron las siguientes determinaciones:

- Aerobios mesófilos (UFC/mL);
- Clostridios sulfito reductores (Presencia /Ausencia);
- Coliformes totales (Presencia/Ausencia);
- Estreptococos fecales (Presencia/ Ausencia);
- *Thiobacillus* sp. (Presencia/ Ausencia);

Cada una de las muestras fue procesada, del siguiente modo, se preparó una solución madre tomando 10 mL de muestra y se resuspendió en 90 mL de agua destilada estéril, agitando vigorosamente para lograr la homogenización completa. Posteriormente se realizaron diluciones en base 10, para esto se emplearon tubos cada uno con 9 mL de agua destilada estéril, al primer tubo se le añadió 1 mL de la solución madre, quedando de esta manera preparada la dilución de  $10^{-2}$  luego, se transfirió del primer tubo al siguiente 1 mL y así sucesivamente hasta alcanzar la dilución de  $10^{-6}$ .

#### **3.3.1 Aerobios mesófilos.**

De cada una de las diluciones se sembró 1 mL en superficie en (PCA) Plate Count Agar (Panreac) y en Agar Nutritivo (Laboratorios Microkit), se incubó a 30°C durante 72 horas y se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC/mL), en las placas que mostraban entre 20 y 200 colonias.

#### **3.3.2 Clostridios sulfito reductores.**

Se cogieron 5 ml de la dilución  $10^{-1}$  de cada muestra y se calentaron a 80°C durante 5 minutos. Se sembró en profundidad 1 mL de cada muestra en tubos con medio Agar SPS (Panreac). Una vez sembradas las muestras, se añadió parafina (Panreac) en los tubos para crear anaerobiosis. Se incubó a 37°C durante 48 horas y se observó la presencia o ausencia de colonias negras y formadoras de gas.

### **3.3.3 *Thiobacillus* sp.**

Para la determinación de la presencia de colonias de *Thiobacillus* sp. se preparó un medio específico para el crecimiento de estas bacterias, constituido por 5 g/L de peptona (Panreac); 5 g/L de extracto de carne (Panreac); 5 g/L de extracto de levadura (Biokar/Merck); 2,5 g/L de NaCl (Panreac); 0,1 g/l de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Panreac); 0.05 g/L de Mg SO<sub>4</sub> : 7H<sub>2</sub>O (Panreac) y 20 g/L de Agar (Panreac) (Katayama Fujimura, 1980). Una vez preparado el medio se sembró 1 mL de la dilución 10<sup>-1</sup> de cada muestra (todo por duplicado) por el método de extensión con ayuda de un asa de Digralsky, posteriormente se incubó a 30°C durante 5 días.

### **3.3.4 Coliformes totales.**

Para la determinación de Coliformes totales se sembró 1 mL de la dilución 10<sup>-1</sup> de cada muestra en Agar Endo (Panreac), incluido en las recomendaciones de la APHA (2004), por el método de extensión con ayuda de un asa de Digralsky, se incubó durante 24 horas a 37°C y se observó la presencia o ausencia de colonias rojas rosas y rojas para el caso de bacterias fermentadoras de lactosa y colonias incoloras o rosa pálido para las no fermentadoras de lactosa.

### **3.3.5 *Streptococos* fecales.**

Para la determinación de *Streptococos* fecales se sembró 1 mL de la dilución 10<sup>-1</sup> de cada muestra en Agar KF (Panreac) por el método de extensión con ayuda de un asa de Digralsky, se incubó a 37°C durante 48 horas y se observó la presencia o ausencia de colonias de color rojo y marrón.

### **3.3.6 Caracterización morfológica de los microorganismos.**

Las bacterias crecen en forma individual, pares, grupos de cuatro (tétradas), grupos irregulares o cadenas. Las células bacterianas individuales pueden ser esféricas (cocos), helicoidales (espirilos) o en forma de bastón (bacilos). La técnica de tinción de Gram, se utiliza para diferenciar las bacterias Gram positivas de las bacterias Gram negativas, y es una de las técnicas convencionales que sirven para diferenciar diferentes morfotipos de bacterias.

A fin de observar la morfología de los microorganismos aislados en los diferentes medios de cultivo empleados, fueron seleccionadas colonias con diferentes características y teñidas mediante una tinción de Gram (Tabla 7). Para ello es necesario fijar la colonia mediante calor en un portaobjetos; teniendo cuidado de no quemarla.

Tras la fijación con calor se añade Cristal de Violeta (Sigma Aldrich) y se deja actuar 1 minuto. Transcurrido el minuto se lava con agua destilada para eliminar los restos del Cristal de Violeta. El siguiente paso es añadir Lugol (Panreac) y dejar actuar durante 1 minuto. Luego se decolora con etanol, dejándolo actuar durante 30 segundos. Transcurridos los 30 segundos se lava con agua destilada y se añade Safranina (Panreac) que es el colorante de contraste, este se deja actuar durante 45 segundos. Por último se lava otra vez con agua destilada para eliminar el exceso del colorante y se deja secar el portaobjetos, una vez secado se coloca un cubreobjetos y ya estará listo para la observación en el microscopio óptico.

**Tabla 7. Tinción de Gram en los grupos de bacterias Gram + y Gram -.**

Productos que se utilizan	Reacción y coloración de las bacterias	
	Gram +	Gram -
<b>Cristal de violeta</b>	Células color violeta	Células color violeta
<b>Lugol</b>	Se forma el complejo CV-I. Las células continúan teñidas de color violeta	Se forma el complejo CV-I. Las células continúan teñidas de color violeta
<b>Etanol</b>	Se deshidratan las paredes celulares. Se contraen los poros. Disminuye la permeabilidad. El complejo CV-I no sale de las células que continúan teñidas de color violeta.	Eliminación por extracción de grasas de las paredes celulares. Aumenta la porosidad. El complejo CV-I se separa de la célula.
<b>Safranina</b>	Células no decoloradas; quedan teñidas de color violeta.	Células decoloradas; se tiñen de color rosado.

El microscopio empleado fue el microscopio automático Olympus BX61 (Figura 22), es un microscopio óptico automatizado para estudios de transmisión y fluorescencia, con platina motorizada Prior y una óptica de: 4x, 10x, 20x, 40x y 100x.



**Figura 22. Microscopio automático Olympus BX61.**

### **3.4 Técnicas Moleculares.**

#### **3.4.1 Extracción del ADN genómico.**

Para la extracción de ADN se emplearon diversos kits comerciales: kit E.Z.NA Tissue DNA Spin (Omega), empleado para tejidos; kit de extracción de ADN, empleado para heces ( Qiagen); y un Kit comercial específico para extracción de ADN de suelo (Gene Matrix Soil DNA purification Kit).

Se cogieron unos 300 mL de las muestras de lixiviados procedentes del sistema tratamiento biológico, que fueron depositados en botellas estériles de 0.5 L y sometidos a una centrifugación a 10000 xg durante 20 minutos a una temperatura de 4°C (Kubota 6500). Una vez finalizada la centrifugación y obtenido la separación del pellet y el sobrenadante, se retira el sobrenadante metiéndolo en tubos estériles para ser utilizado en los análisis físico-químicos y el pellet obtenido se resuspende con agua estéril para luego pasarlo a tubos eppendorf para realizar otra centrifugación, durante 5 minutos y a 12000 rpm (Eppendorf, 5415 D). El pellet obtenido, se empleará en la extracción de ADN siguiendo los protocolos específicos para cada uno de los kits empleados.

### 3.4.2 Amplificación por PCR.

Mediante esta técnica, los fragmentos de ADN codificante para el ARNr 16S de la región conservada, han sido amplificados utilizando los cebadores F357GC (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CCC TAC GGG AGG CAG CAG- 3') y el RS18 (5'- ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (Muyzer *et al.* 1993) del gen ribosomal 16S.

Los cebadores o primers (Invitrogen) se suministran liofilizados y deben resuspenderse previamente a la PCR, para ello se resuspenden en un 1 mL de agua bidestilada para pasarlo luego a alícuotas para no contaminar los cebadores. El primer F357GC (B10, Invitrogen) se encuentra a una concentración de 80.6 nM y el otro primer el RS18 (C11, Invitrogen) se encuentra a una concentración de 23.9 nM y se tienen que dejar a 10  $\mu$ M. Para ello calculamos:  $[ ] V = [ ]' V'$

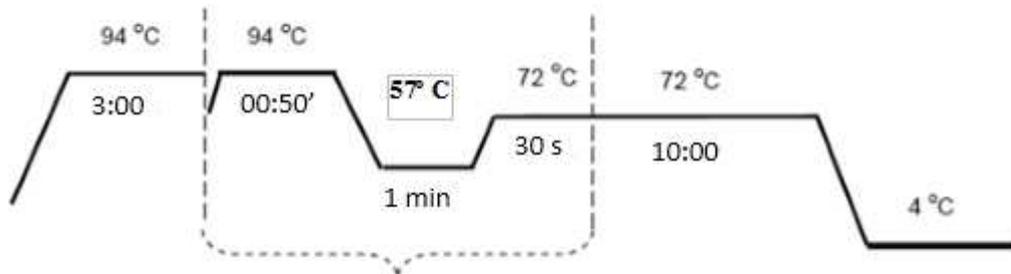
**Primer C11:** 23.9 nM X = 10  $\mu$ M 50  $\mu$ L..... X= 20.9

**Primer B10:** 80.6 nM X= 10  $\mu$ M 50  $\mu$ L.....X= 6.20

Para hacer las alícuotas de 50  $\mu$ L tendremos que añadir 20.9  $\mu$ L de stock resuspendido del primer **C11** + 29.1  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O bidestilada y para la alícuota del primer **B10** se tiene que añadir 6.2  $\mu$ L de stock resuspendido + 43.80  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O bidestilada.

Se han realizado reacciones de polimerización de 40 $\mu$ L, para ello se realiza una mezcla que contiene 23.4  $\mu$ L agua bidestilada ; 4  $\mu$ L de Buffer10x (Biotools); 4  $\mu$ L dNTP, mezcla de nucleótidos, con una concentración de 50 mM (Biotools); 2  $\mu$ L de primer rRNA 16S , F357GC en concentración 80.6 nM (Invitrogen); 2 $\mu$ L de primer rRNA 16S RS18 en concentración 23.9 nM (Invitrogen); 2  $\mu$ L de Cloruro de magnesio 50 mM (Biotools) y 0.6  $\mu$ L de Taq DNA polimerasa (Biotools). A esta mezcla se adicionan 2  $\mu$ L de DNA extraído de la muestra.

Se probaron diferentes programas de amplificación de ADN y diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub> para conseguir una banda de ADN lo más limpia posible. El programa que se utilizó para las amplificaciones en el termo-ciclador (Veriti, Applied-Biosystems) (Figura 23) consta de, un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos y a partir de aquí 34 ciclos de amplificación con las siguientes fases; una fase de desnaturalización del ADN a 94°C durante 50 segundos; una de hibridación de las cadenas de ADN donde se probó con diferentes temperaturas resultando óptima una temperatura de 57°C durante 60 segundos y una última fase de extensión durante 30 segundos a 72°C. Tras los 34 ciclos de amplificación se ha mantenido la muestra a 72°C durante 10 minutos para finalizar la extensión de las cadenas incompletas.



**Figura 23. Programa optimizado para la amplificación del DNA.**

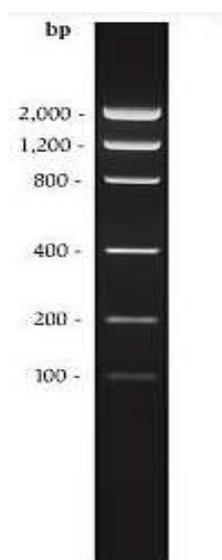
### 3.4.3 Electroforesis en Gel de Agarosa.

El éxito de la PCR se comprueba mediante electroforesis en geles de agarosa. El ADN total aislado y amplificado debe ser caracterizado electroforéticamente para evaluar su integridad, degradación y concentración. Para la preparación del gel de agarosa (1%) se añadieron 0.5 g de agarosa en 50 mL de TBE X1(Bio-Rad), posteriormente se añadieron 2 gotas de bromuro de etidio (10 mg/mL) (Bio-Rad). En cuanto a la preparación de la muestra, se pasaron 10  $\mu$ L de la muestra de (PCR) a un nuevo tubo estéril donde se añadieron también 10  $\mu$ L de agua bidestilada, para luego añadir 2  $\mu$ L del tampón de carga, en este caso el tampón de carga utilizado es el ADN Gel Loading Buffer 6X (Novagen). Esto se repitió hasta completar el número total de muestras. También se cargó como control un marcador sintético el Low ADN Mass Ladder (Invitrogen), la cantidad utilizada es de 2  $\mu$ L para seguir la relación de tamaño del fragmento (Figura 24) y cantidad de ADN, como aparece en la Tabla 8. Para cargar las muestras, se tomaron 15  $\mu$ L de la solución de ADN y al añadir el tampón de carga se homogeniza con la propia pipeta y se deposita cuidadosamente en el pocillo.

La electroforesis se realizó a 90V durante 60 minutos empleando una cubeta Mini-Subcel GT (Bio-Rad) que se conectó a una fuente de alimentación (POWER PAC 300, Bio-Rad). Finalmente tras la electroforesis el gel se visualizó en un transluminador de UV (Vilber Loumart).

**Tabla 8. Relación entre tamaño de fragmento (bp) y concentración de ADN, para un volumen de 2  $\mu$ L del marcador.**

Volumen 2 $\mu$ L	Fragment size
100 ng	2000 bp
60 ng	1200 bp
40 ng	800 bp
20 ng	400 bp
10 ng	200 bp
5 ng	100 bp



**Figura 24. Tamaños de fragmento (bp) del marcador.**

### 3.4.4 DGGE.

#### 3.4.4.1 Montaje del Equipo.

Se colocó un cristal (16.5x17.5 cm) encima de otro (20.5x20x0.4 cm) con los separadores entre ambos dejando un espacio para gel. Se pinzó el sándwich de cristales y separadores con las abrazaderas. Después se colocó el sándwich completo en el soporte para alineación. Para saber si se colocó bien se tomó una cartulina de alineación y se introdujo en el espacio para el futuro gel. Luego se colocó el sándwich sobre una esponja. La superficie del sándwich en la que está el cristal pequeño debe mirar hacia el lado contrario al de la superficie de montaje. Se apretaron los tornillos laterales hasta que el sándwich hizo presión con la almohadilla. Aunque se haga un solo gel, ambos sándwich deben ser montados para equilibrar el esqueleto dentro del tanque.

#### 3.4.4.2 Preparación del gel.

Se preparó Acrilamida 37,5:1 al 40%, para ello se pesaron 194.8 g de Acrilamida (Sigma Aldrich), 5.2 g de BIS Acrilamida (Sigma Aldrich) en 500 mL de agua destilada, se agitó y se filtró mediante un equipo de filtración y con un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  (Sigma Aldrich).

Con esta solución se preparan las soluciones 0% y 100%; para la solución 0% se añadió a un matraz 100 mL de Acrilamida 37,5:1 al 40%, 15 mL de TAE 5X (Bio-Rad) y se lleva a volumen de 500 mL con H<sub>2</sub>O destilada; para la solución 100% se añadió a un matraz 100 mL de Acrilamida 37,5:1, 5 mL de TAE 5X (Bio-Rad), 200 mL de Formamida (Ambresco), 210 g de Urea (Bio-Rad) y se añadió agua destilada hasta enrasar el matraz de 500 mL. Luego se pasó a preparar el plug (gel de sellado) constituido por 1.5 mL de solución 0% + 9  $\mu\text{l}$  TEMED (Bio-Rad) + 30  $\mu\text{l}$  APS al 10% p/v (Bio-Rad), el TEMED se debe poner justo en el momento de cargar el plug porque si no polimeriza; se agitó en el vortex y se pipetearon 750  $\mu\text{L}$  en cada esquina del sándwich. Una vez preparado el plug (gel de sellado) se pasó a preparar los gradientes, mayor y menor y el gel de empaquetamiento en tubos falcon siguiendo la Tabla 9, todo esto se realizó en hielo.

Luego se colocó la aguja del tubo de salida del gradientador centrada entre ambos cristales del sándwich, que se encuentra colocado en el soporte para la polimerización. Se llenó el reservorio del gradientador rotulado como H con la solución altamente desnaturizante, en este caso para la de 60% y se hizo lo mismo para el reservorio L donde se llenó con la solución de 40%. Una vez colocado se fue girando lentamente la rosca del gradientador para ir dosificando las soluciones y crear así el gradiente y comenzar a realizar el gel. También se verificó el sellado del sándwich asegurándose de que no existan fugas de solución desnaturizante por la parte inferior. Cuando el espacio para el gel estuvo a punto de llenarse se retiró la aguja dejando unos 2 cm para el gel de empaquetamiento.

Para preparar el gel de empaquetamiento se añadió a un tubo falcon 9 mL de la solución 0%, 50  $\mu\text{L}$  APS al 10% p/v (Bio-Rad) y 13  $\mu\text{L}$  de TEMED (Bio-Rad) Posteriormente se dejó polimerizar el gel durante 2 horas y se coloca el peine. Mientras el gel polimerizaba se preparó el tampón de electroforesis, para ello se llenó el tanque con 8 litros de tampón TAE 1X (previamente preparado a partir de 160 mL de Tampón TAE 5X (Bio-Rad) y enrasar hasta 8 L con agua destilada) hasta la indicación FILL. Se colocó el “casco” donde se controla la temperatura y se encendió el controlador de temperatura a 65°C para precalentar el tampón, unos 90 minutos antes de la electroforesis.

**Tabla 9. Mezclas para los diferentes gradientes.**

<b>Gradient Comp. (%)</b>	<b>0% (ml)</b>	<b>100% (ml)</b>	<b>Volumen Final (mL)</b>	<b>TEMED (µL)</b>	<b>10% APS (µL)</b>
<b>0</b>	<b>9</b>	<b>-</b>	<b>9</b>	<b>13</b>	<b>50</b>
<b>30</b>	9.1	3.9	13	13	50
<b>31</b>	8.97	4.03	13	13	50
<b>32</b>	8.84	4.16	13	13	50
<b>33</b>	8.71	4.29	13	13	50
<b>34</b>	8.58	4.42	13	13	50
<b>35</b>	8.45	4.55	13	13	50
<b>36</b>	8.32	4.68	13	13	50
<b>37</b>	8.19	4.81	13	13	50
<b>38</b>	8.06	4.94	13	13	50
<b>39</b>	7.93	5.07	13	13	50
<b>40</b>	<b>7.8</b>	<b>5.2</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>50</b>
<b>41</b>	7.67	5.33	13	13	50
<b>42</b>	7.54	5.46	13	13	50
<b>43</b>	7.41	5.59	13	13	50
<b>44</b>	7.28	5.72	13	13	50
<b>45</b>	7.15	5.85	13	13	50
<b>46</b>	7.02	5.98	13	13	50
<b>47</b>	6.89	6.11	13	13	50
<b>48</b>	6.76	6.24	13	13	50
<b>49</b>	6.63	6.37	13	13	50
<b>50</b>	6.5	6.5	13	13	50
<b>51</b>	6.37	6.63	13	13	50
<b>52</b>	6.24	6.76	13	13	50
<b>53</b>	6.11	6.89	13	13	50
<b>54</b>	5.98	7.02	13	13	50
<b>55</b>	5.85	7.15	13	13	50
<b>56</b>	5.72	7.28	13	13	50
<b>57</b>	5.59	7.41	13	13	50
<b>58</b>	5.46	7.54	13	13	50
<b>59</b>	5.33	7.67	13	13	50
<b>60</b>	<b>5.2</b>	<b>7.8</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>50</b>

#### **3.4.4.3 Carga del gel para electroforesis.**

Una vez polimerizado el gel, se quitaron los sándwiches del soporte, se retiró el peine y se encajó los sándwich en el esqueleto del tanque. Para el montaje del esqueleto, se colocó el esqueleto en posición horizontal dentro de la cubeta una vez retirado el casco; el botón rojo del esqueleto debe ir colocado hacia dentro. Por último se llenó con más tampón TAE 1X hasta la indicación RUN.

#### **3.4.4.4 Carga de muestras.**

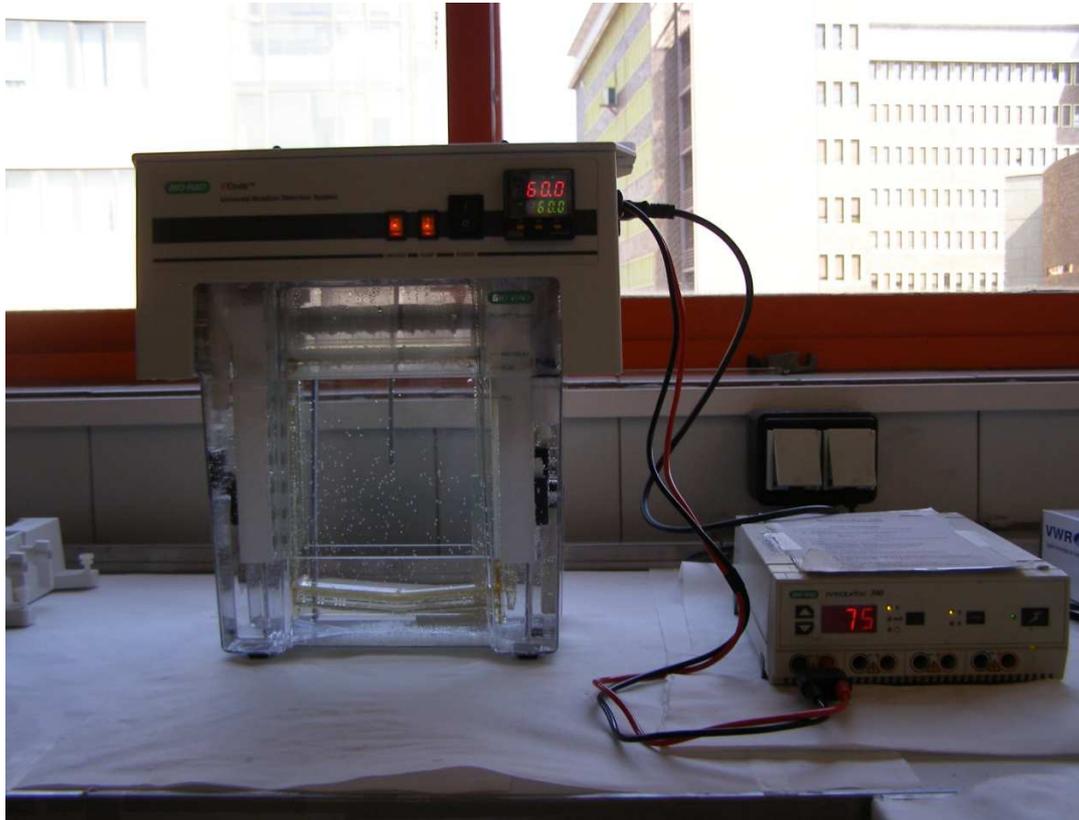
Se limpió con una jeringuilla con buffer caliente del Dcode los restos de gel no polimerizado. Se cargaron 7  $\mu$ L del producto de la PCR + 3  $\mu$ L de tampón de carga 6x cuya composición es 0.25% (w/v) de azul de bromofenol y 40% (w/v) de sacarosa en H<sub>2</sub>O. Además se utilizaron dos marcadores preparados en el IPLA utilizando como molde ADN de cepas aisladas e identificadas de (*Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Staphylococcus parauberis*), la cantidad que se utilizó fue 7  $\mu$ L de cada marcador + 3  $\mu$ L de tampón de carga.

#### **3.4.4.5 Inicio de la electroforesis.**

Se colocó el casco y se ajustó la temperatura a 60°C. Luego se conectó el tanque a una fuente de alimentación Power PAC 300 (Bio-Rad) manteniendo el voltaje a 200V durante aproximadamente 10 minutos (hasta que el frente de electroforesis alcance el comienzo del gel de acrilamida) y en ese momento se cambió el voltaje a 75V y se dejó correr el gel durante 16 h.

#### **3.4.4.6 Revelación del gel.**

Transcurridas las 16 h se desconectó el tanque de la fuente de alimentación y se sacó el sándwich del esqueleto del tanque. Posteriormente se procedió a despegar los cristales donde se encuentra el gel polimerizado, una vez despegados los cristales y dejando el gel en uno de ellos se pasó a realizar la tinción para la revelación del gel. Para ello se introdujo el gel en una cubeta a la cual se añadió una solución con bromuro de etidio, la cual se preparó con 500 mL de agua destilada y 5 gotas de bromuro de etidio (5 mg/mL) (Bio-Rad), se dejó tiñendo el gel durante 15 minutos. Trascurridos los 15 minutos se retiró la solución de tinción y se añadió a la cubeta 500 mL de agua destilada para la eliminación de exceso de bromuro de etidio que pueda afectar a la observación del gel en el transluminador, se dejó otros 15 minutos. Pasado el tiempo se retiró el agua de la cubeta teniendo cuidado de no romper el gel se procedió a transferirlo al transluminador (Vilber Loumart) para la observación del mismo. Posteriormente se procedió al corte de las bandas más significativas obtenidas tras la realización de la DGGE, con ayuda de una cuchilla estéril. Cada una de las bandas recortadas se introdujeron en tubos eppendorf a los que se añadieron 25  $\mu$ L de agua bidestilada. Se mantuvieron a 4°C hasta su secuenciación. Por último se limpiaron los cristales y los separadores con etanol y se dejó secar antes de comenzar con el montaje. También se limpiaron los peines, abrazaderas, almohadillas, el gradientador con agua y jabón al finalizar la electroforesis para eliminar los restos de acrilamida.



**Figura 25. Equipo para la realización de la DGGE.**

En la Figura 25 se muestra el equipo empleado para la DGGE, a la izquierda se observa el tanque donde se encuentra el sándwich con el gel polimerizado y a la derecha se observa la fuente de alimentación que se encuentra conectada al tanque.

### **3.5 Secuenciación.**

Las bandas cortadas se transfirieron a tubos eppendorf y se les añadió 25  $\mu$ L de agua bidestilada. Se mantuvieron a 4°C hasta la reamplificación previa a su secuenciación.

#### **3.5.1 Amplificación del ADN.**

Para la amplificación del ADN contenido en las bandas del gel de acrilamida, se realizaron reacciones de amplificación de 40  $\mu$ L, para ello se realizó una mezcla que contiene 20.4  $\mu$ L agua bidestilada ; 4  $\mu$ L de Buffer10x (Biotools); 4  $\mu$ L dNTP, mezcla de nucleótidos, con una concentración de 50 mM (Biotools); 2  $\mu$ L de primer ARNr 16S , F357 (5'-TAC GGG AGG CAG CAG- 3') en concentración 10  $\mu$ M (Invitrogen); 2  $\mu$ L de primer ARNr 16S; RS18 en concentración 10  $\mu$ M (Invitrogen); 2  $\mu$ L de Cloruro de magnesio 50 mM (Biotools) y 0.6  $\mu$ L de Taq ADN polimerasa (Biotools). A esta mezcla se adicionan 5  $\mu$ L de ADN de la banda.

El programa que se utilizó para las amplificaciones en el termo-ciclador (Figura 23) consta de, un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos y a partir de aquí 34 ciclos de amplificación con las siguientes fases; una fase de desnaturalización del ADN a 94°C durante 50 segundos; una de hibridación de las cadenas de ADN donde se probó con diferentes temperaturas quedando finalmente con una temperatura de 57°C durante 60 segundos y una última fase de extensión durante 30 segundos a 72°C. Tras los 34 ciclos de amplificación se ha mantenido la muestra a 72°C durante 10 minutos para finalizar la extensión de las cadenas.

### **3.5.2 Electroforesis en gel de agarosa, purificación y cuantificación del ADN.**

Para la preparación del gel de agarosa (1%) se añadió 0.5 g de agarosa en 50 mL de TBE X1 (Bio-Rad), posteriormente se añadió 2 gotas de bromuro de etidio (10 mg/mL) (Bio-Rad). En cuanto a la preparación de la muestra, se pasó 20 µL de la muestra de (PCR) a un nuevo tubo estéril donde se añadió 2 µL del tampón de carga, en este caso el tampón de carga utilizado es el ADN Gel Loading Buffer 6X (Novagen). Esto se repitió hasta completar el número total de muestras. También se cargó como control un marcador sintético, el Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), la cantidad utilizada es de 2 µL para seguir la relación de tamaño del fragmento (Figura 24) y cantidad de ADN, como aparece en la Tabla 8. Para cargar las muestras, se tomó 20 µL de la solución de ADN y al añadir el tampón de carga se homogeniza con la propia pipeta y se deposita cuidadosamente en el pocillo.

La electroforesis se realizó a 90V durante 60 minutos empleando una cubeta que se conectó a una fuente de alimentación. Finalmente tras la electroforesis el gel se visualizó en un transluminador de UV (Vilber Loumart). Una vez que se comprobó que aparecían bandas de ADN, se pasó a recortar las bandas del gel de agarosa con ayuda de cuchilla y se introdujeron en tubos eppendorf individualmente, para su posterior purificación.

Una vez recortadas las bandas de ADN se purificaron con el kit de purificación Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Para la cuantificación del ADN de las muestras se preparó un gel de agarosa como se explica en el apartado (3.5.2) pero en este caso se prepararon las muestras con 8 µL de DNA + 12 µL de agua bidestilada y 2 µL de tampón de carga. También se cargó el marcador citado en el apartado (3.5.2), la cantidad utilizada fue de 2 µL para seguir la relación de tamaño del fragmento y cantidad de DNA, como aparece en la Tabla 8.

La electroforesis se realizó a 90V durante 60 minutos empleando una cubeta que se conectó a una fuente de alimentación. Finalmente tras la electroforesis el gel se visualizó en un transluminador de UV (Vilber Loubarmt), donde se realizó la cuantificación del ADN.

### 3.5.3 Secuenciación.

Se cuantificó el ADN de cada una de las muestras se calculó la cantidad de ADN, para saber si llegaba a los 50 ng en 9  $\mu\text{L}$  + 1.5  $\mu\text{L}$  del oligonucleótido F357 a 5 $\mu\text{M}$  de ADN (valor mínimo para poder realizar la secuenciación). En este caso fue necesario concentrar el ADN porque la cantidad de ADN de las muestras estaba entre 1.25-2.5 ng/ $\mu\text{L}$ . Se concentró centrifugando con un vacío las muestras a una temperatura de 60°C en un speedback (Eppendorf). Una vez concentrado se pasó a realizar la secuenciación por electroforesis capilar en el equipo de análisis genético (ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer) (Figura 26).



**Figura 26. Equipo de análisis genético utilizado en secuenciación.**

## **4. Resultados y discusión.**

#### 4.1 Análisis físico-químico del proceso de nitrificación-desnitrificación.

Tal y como se observa en la Tabla 10, las muestras de lixiviados procedentes de los tanques DN, NO, N1 y N2 presentan el mayor contenido en sólidos en suspensión. Asimismo, el menor contenido en sólidos lo presenta la muestra de Salida, esto se debe a que en la fase de ultrafiltración se separa la biomasa del agua tratada evitando la salida de los microorganismos y sólidos a través del sistema de membranas de 0.02  $\mu\text{m}$ . Los datos obtenidos se correlacionan con el proceso de tratamiento biológico, siendo las muestras pertenecientes a los tanques en los que se realiza los procesos de nitrificación-desnitrificación y, por lo tanto, dónde hay un mayor contenido de bacterias los que presentan los mayores valores de sólidos en suspensión. Por otra parte, en la muestra de Entrada se registra un contenido de Sólidos en suspensión bajo debido al tratamiento primario (físico-químico) mediante coagulación, precipitación y centrifugación al que se le somete a los lixiviados previamente al tratamiento biológico.

**Tabla 10. Resultados de diversos parámetros físico-químicos de las muestras de lixiviados (Valores medios  $\pm$  SD).**

Muestra	SS (mg/L)	DBO (mg/L)	DQO (mg/L)	pH
Entrada	15.7 $\pm$ 0.7	640	2451.8 $\pm$ 1.5	7.47 $\pm$ 0.01
DN	230.9 $\pm$ 0.6	117	5364.0 $\pm$ 7.6	7.42 $\pm$ 0.01
NO	186.0 $\pm$ 16.1	107	6659.5 $\pm$ 12.1	7.38 $\pm$ 0.01
N1	166.8 $\pm$ 4.4	OFL* ( $>$ 400)	4197.0 $\pm$ 4.6	7.13 $\pm$ 0.01
N2	138.5 $\pm$ 10.8	86	3843.7 $\pm$ 4.5	6.98 $\pm$ 0.00
Salida	6.2 $\pm$ 0.2	UFL** ( $<$ 200)	1638.1 $\pm$ 4.5	6.89 $\pm$ 0.01

\*Superior al intervalo de medida

\*\*Inferior al intervalo de medida

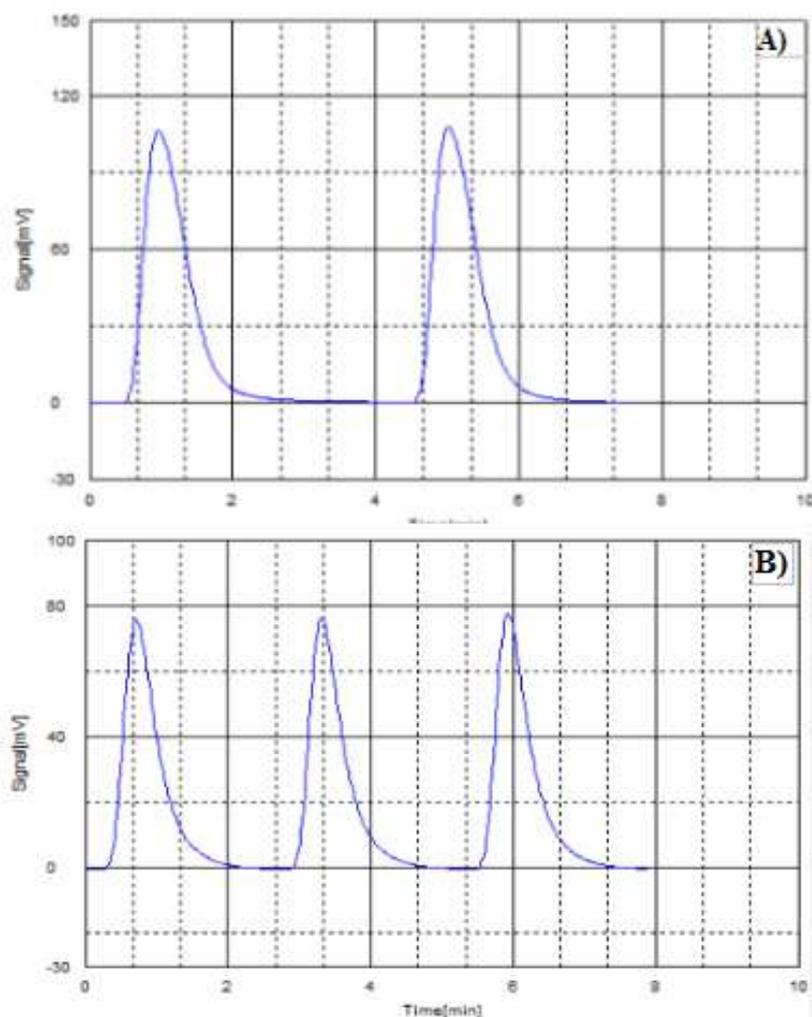
En cuanto al pH, a medida que va avanzando el tratamiento biológico de nitrificación-desnitrificación el pH va disminuyendo. Como se puede observar, la muestra del tanque de desnitrificación (DN) tiene un pH superior a las muestras de los tanques de nitrificación. La desnitrificación se caracteriza por producirse en condiciones anóxicas y en presencia de materia orgánica biodegradable, generando iones  $\text{OH}^-$ , lo que hace que el pH en este punto sea superior al de la etapa de nitrificación. En el caso de las muestras de la etapa de nitrificación NO, N1 y N2 el pH va disminuyendo a medida que avanzando el tratamiento, esto es debido a que se reduce el nivel de  $\text{HCO}_3^-$  y aumenta el de  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , lo que conlleva una disminución del pH hasta alcanzar un valor

mínimo que corresponde con el final de la nitrificación, manteniéndose constante como en la Salida.

Con respecto a la DBO en el caso de la Salida transcurridos los 5 días el valor de medición fue inferior al intervalo de medida ( $< 200$  mg/L). En el caso de la muestra N1 el valor de medición superó el nivel de medida ( $> 400$  mg/L). La tasa a la que se consume el oxígeno es directamente proporcional a la concentración de materia orgánica degradable. Durante los primeros días la tasa de disminución de oxígeno es rápida debido a la elevada concentración de materia orgánica presente; al disminuir ésta, también disminuye la tasa de consumo de oxígeno. Durante la última parte de la DBO, el consumo de oxígeno se asocia con la disminución de las bacterias que crecieron durante la parte inicial de la prueba. Se observa que la muestra de Entrada es la que tiene el valor más alto de DBO y a medida que va avanzando el proceso la DBO va disminuyendo, por lo que los resultados obtenidos cumplen lo esperado del tratamiento biológico.

Los valores de DQO más altos se observan en las muestras de DN y NO. Lógicamente, los valores de DQO obtenidos son mayores que la DBO, las razones son que muchos compuestos orgánicos oxidados por el dicromato no son oxidables bioquímicamente y que ciertos iones inorgánicos tales como sulfuros, tiosulfatos, sulfitos, nitritos e ion ferroso son oxidados por el dicromato potásico, lo cual significa que son tenidos en cuenta en la DQO y sin embargo no son cuantificados en el ensayo de DBO. El que los valores de DN y NO para la DQO sean mayores es debido a que en la etapa de desnitrificación las bacterias presentes son bacterias heterótrofas que utilizan como fuente de carbono compuestos orgánicos, por lo que hay un mayor contenido de compuestos inorgánicos como el  $\text{CO}_2$  y bicarbonatos que hacen que la de DQO tenga valores mayores. Sin embargo, en la nitrificación correspondiente a las muestras N1 y N2 tienen valores menores de DQO porque aquí las bacterias que realizan la nitrificación son bacterias autótrofas que utilizan una fuente inorgánica como  $\text{CO}_2$  y bicarbonato.

Una aproximación cuantitativa de la biodegradabilidad de un efluente está dada por la relación DBO/DQO (Hernández, 1992). En el caso de la muestra de Entrada el coeficiente de DBO/DQO es  $> 0.2$  (obteniéndose un valor de 0.26) lo que significa que es un vertido de naturaleza biodegradable, esto es debido a que los compuestos orgánicos presentes en el lixiviado tiene una alta biodegradabilidad, siendo fácilmente eliminados de forma biológica. A medida que va avanzado el proceso se produce una disminución del coeficiente de DBO/DQO, lo que resulta lógico ya que la materia orgánica se va degradando. Por lo contrario una relación DBO/DQO  $< 0.2$  indica una baja fracción biodegradable en el lixiviado, como el obtenido en las muestras de DN, NO y N2 (con un valor de 0.02), coincide con las etapas del proceso en donde existe una mayor actividad microbiana, lo que se traduce en una reducción de la fracción biodegradable (Karthikeyan *et al.* 2006).



**Figura 27. Ejemplo de diagramas obtenidos del análisis del TOC. A) diagrama de TC; B) diagrama de IC.**

En la Figura 27 se representa el resultado del carbono total y del carbono inorgánico para la muestra de Entrada.

Los valores obtenidos del carbono orgánico total (TOC), carbono total (CT) y carbono inorgánico (IC) para las diferentes muestras se muestran en la Tabla 11.

La concentración de carbono orgánico total es una medida del grado de contaminación de las aguas y estos valores se pueden correlacionar con la DQO y con la DBO. Los valores obtenidos de TOC para las muestras estudiadas son superiores a las obtenidas en la DBO e inferiores a las obtenidas en la DQO, esto es debido a de que el TOC es un ensayo que incluye la demanda de oxígeno ejercida por algunos compuestos orgánicos que son resistentes y que no se pueden medir con la DBO y no incluye la demanda de oxígeno ejercida por compuestos susceptibles a la oxidación por dicromato como el ion ferroso, sulfitos, sulfuros y compuestos nitrogenados.

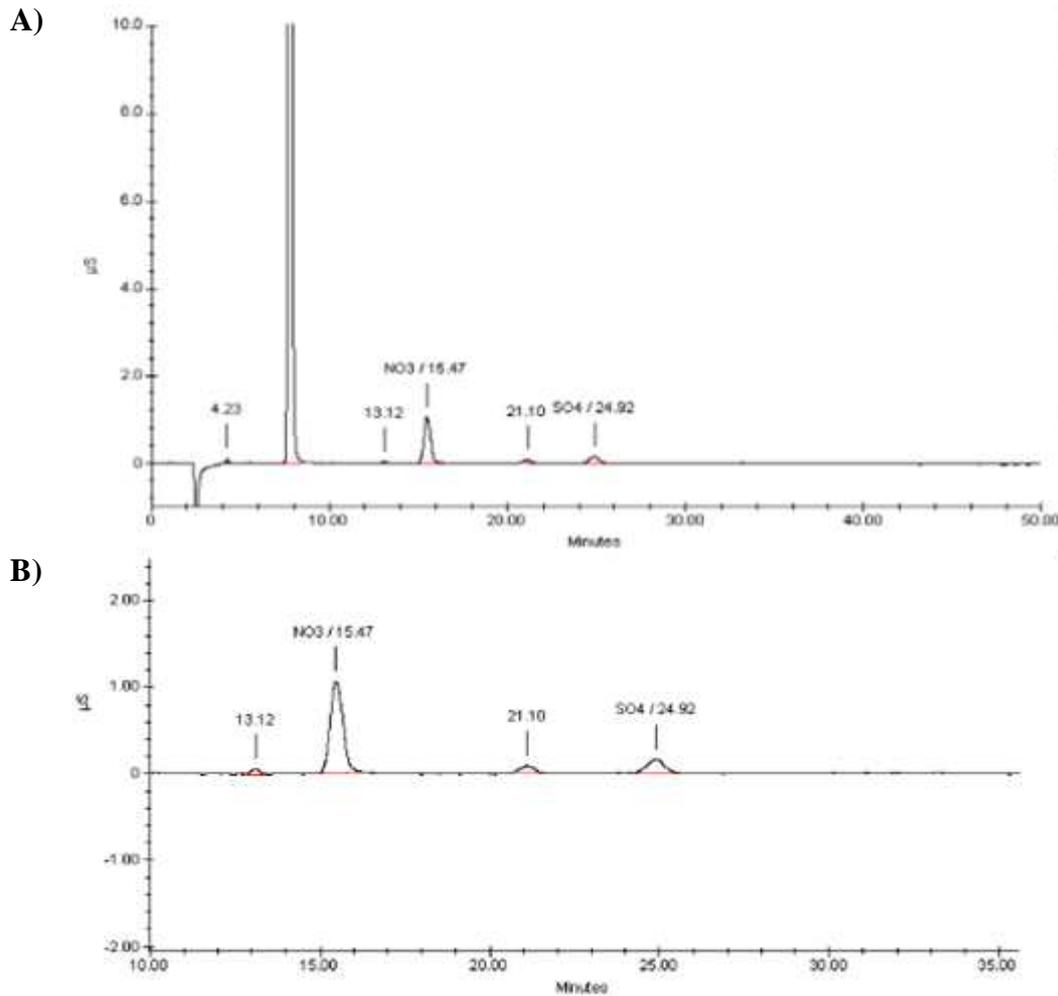
**Tabla 11. Contenido en carbono de las muestras (valores medios  $\pm$  SD).**

<b>Muestra</b>	<b>TC (mg/L)</b>	<b>IC (mg/L)</b>	<b>TOC (mg/L)</b>
<b>Entrada</b>	4490.5 $\pm$ 46.0	2571.0 $\pm$ 42.5	1919.0 $\pm$ 49.5
<b>DN</b>	2212.0 $\pm$ 65.1	447.8 $\pm$ 4.4	1764.2 $\pm$ 60.7
<b>NO</b>	2930.0 $\pm$ 22.6	295.1 $\pm$ 4.6	2635.0 $\pm$ 18.0
<b>N1</b>	2780.5 $\pm$ 51.6	189.5 $\pm$ 0.4	2591.1 $\pm$ 52.0
<b>N2</b>	2705.5 $\pm$ 13.4	258.5 $\pm$ 3.2	2449.1 $\pm$ 10.3
<b>Salida</b>	626.6 $\pm$ 1.2	141.8 $\pm$ 2.2	484.7 $\pm$ 1.1

El carbono inorgánico (IC) es un parámetro útil para la caracterización de una muestra de agua y refleja la concentración total de CO<sub>2</sub> disuelto, carbonatos y bicarbonatos. En cuanto a los valores obtenidos para el IC se observa que la muestra de Entrada es la que tiene la mayor concentración mientras que el resto de las muestras tiene una concentración inferior a 500 mg/L, se puede decir que la muestra de Entrada tiene un mayor contenido de carbonatos, bicarbonatos y CO<sub>2</sub> disuelto que el resto de las muestras analizadas, esto se correlaciona con los valores pH obtenido (Tabla 10), siendo la muestra de Entrada la que presentaba un valor de pH más alto.

Existe una relación entre la DQO y el TOC en la cual se debería esperar que la relación estequiométrica entre la DQO/TOC se aproximara a la relación molecular entre el oxígeno y el carbono (32/12= 2.66) (Rodríguez, 2003). Sin embargo, en la práctica dicha relación varía entre 0 y 5.33 debido a la gran resistencia de la oxidación por dicromato que presentan algunos compuestos orgánicos, en ocasiones la relación puede ser aún mayor de 5.33 cuando en la muestra de aguas residuales hay agentes reductores inorgánicos. De modo que cuanto mayor sea la variedad de compuestos mayor será la relación DQO/TOC.

En este caso se puede decir que las muestras de DN y de Salida son las que tienen una mayor relación de DQO/TOC > 3 con un valor de 3.1 y 3.4 respectivamente, estas muestras tendrían una mayor variedad de componentes. Mientras que en el caso de las muestras de Entrada, NO, N1 y N2 la relación de DQO/TOC es < 3 (1.5, 2.5, 1.6 y 1.6 respectivamente) por lo que tendrían una menor variedad de compuestos.



**Figura 28. A) Ejemplo de cromatograma obtenido. B) Detalle ampliado (DN).**

En la Figura 28 se representa uno de los cromatogramas obtenidos (muestra DN), en la que se puede observar los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) con un tiempo de detección de 15.47 minutos y los sulfatos ( $\text{SO}_4^-$ ) con un tiempo de detección de 24.92 minutos.

**Tabla 12. Contenido en aniones y cationes de las muestras (valores medios  $\pm$  SD).**

Muestra	$\text{NO}_2^-$ (ppm)	$\text{NO}_3^-$ (ppm)	$\text{SO}_4^-$ (ppm)	$\text{NH}_4^+$ (ppm)
Entrada	n.d	$19.5 \pm 0.7$	$7.5 \pm 1.4$	$1548.8 \pm 8.1$
DN	n.d	$78.3 \pm 1.1$	$11.8 \pm 0.4$	$355.8 \pm 6.7$
NO	n.d	$1071.0 \pm 15.6$	$20.0 \pm 0.7$	$140.0 \pm 0.7$
N1	n.d	$1417.5 \pm 10.6$	$14.3 \pm 0.4$	$47.3 \pm 2.4$
N2	n.d	$896.5 \pm 8.5$	$14.0 \pm 1.4$	$73.0 \pm 2.1$
Salida	$1.6 \pm 0$	$400.9 \pm 15.2$	$8.3 \pm 0.1$	$27.2 \pm 1.7$

n.d: no detectado

Tal como se observa en la Tabla 12, en el caso de los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) se observa un aumento inicial de la concentración y una posterior disminución de la misma. Esto se relaciona con el tratamiento biológico porque la etapa de nitrificación es en la que hay un mayor contenido de nitratos, (NO, N1 y N2).

En cuanto a los nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) sólo se han detectado valores en la muestra de Salida. Estos suelen estar en niveles muy bajos, en aguas residuales también hay que destacar aunque el nitrito se halla en un estado de oxidación intermedio entre el amoníaco y el nitrato, siendo más difícil de detectar. El haber obtenido presencia de nitritos en la Salida y no ser detectado en el resto de muestras analizadas, puede ser debido a que como la muestra de Salida esta diluida 1:20 y el resto de muestras al estar diluidas 1:50 solo sean detectados los nitritos en la de menor dilución al estar en una concentración muy baja.

Para el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) se observa un descenso de la concentración desde la muestra de Entrada hasta la Salida, correlacionándose con el tratamiento biológico, porque la acción combinada de las bacterias desnitrificantes y nitrificantes convierte el amonio, primero en  $\text{NO}_3^-$  en la nitrificación y luego en  $\text{N}_2$  en la desnitrificación.

En cuanto a los sulfatos, se produce un aumento de la concentración a partir de la muestra de Entrada hasta la muestra a NO. A partir de la muestra N1 se observa un descenso de la concentración hasta la muestra de Salida del tratamiento biológico. En el caso de las muestras NO, N1 y N2 en las cuales se ha detectado el mayor contenido de sulfato esto es debido a que en los tanques de nitrificación N1 y N2 como se encuentra en aerobiosis se produce la oxidación del  $\text{SH}_2$  a otros compuestos inorgánicos de azufre reducido generando directamente  $\text{SO}_4^-$ , donde estarían implicadas bacterias quimiolitótrofos como *Thiobacillus.sp.* En el caso de DN donde se ha detectado un menor contenido de sulfato puede ser debido a la presencia de bacterias sulfato reductoras que se encargan de la reducción del sulfato, durante la degradación anaerobia de la materia orgánica, utilizando el sulfato como aceptor de electrones, ya que en ausencia de oxígeno y nitratos los sulfatos sirven como aceptores finales de electrones para la oxidación bioquímica producida por bacterias anaerobias.

## 4.2 Caracterización microbiológica.

### 4.2.1 Recuento en placa.

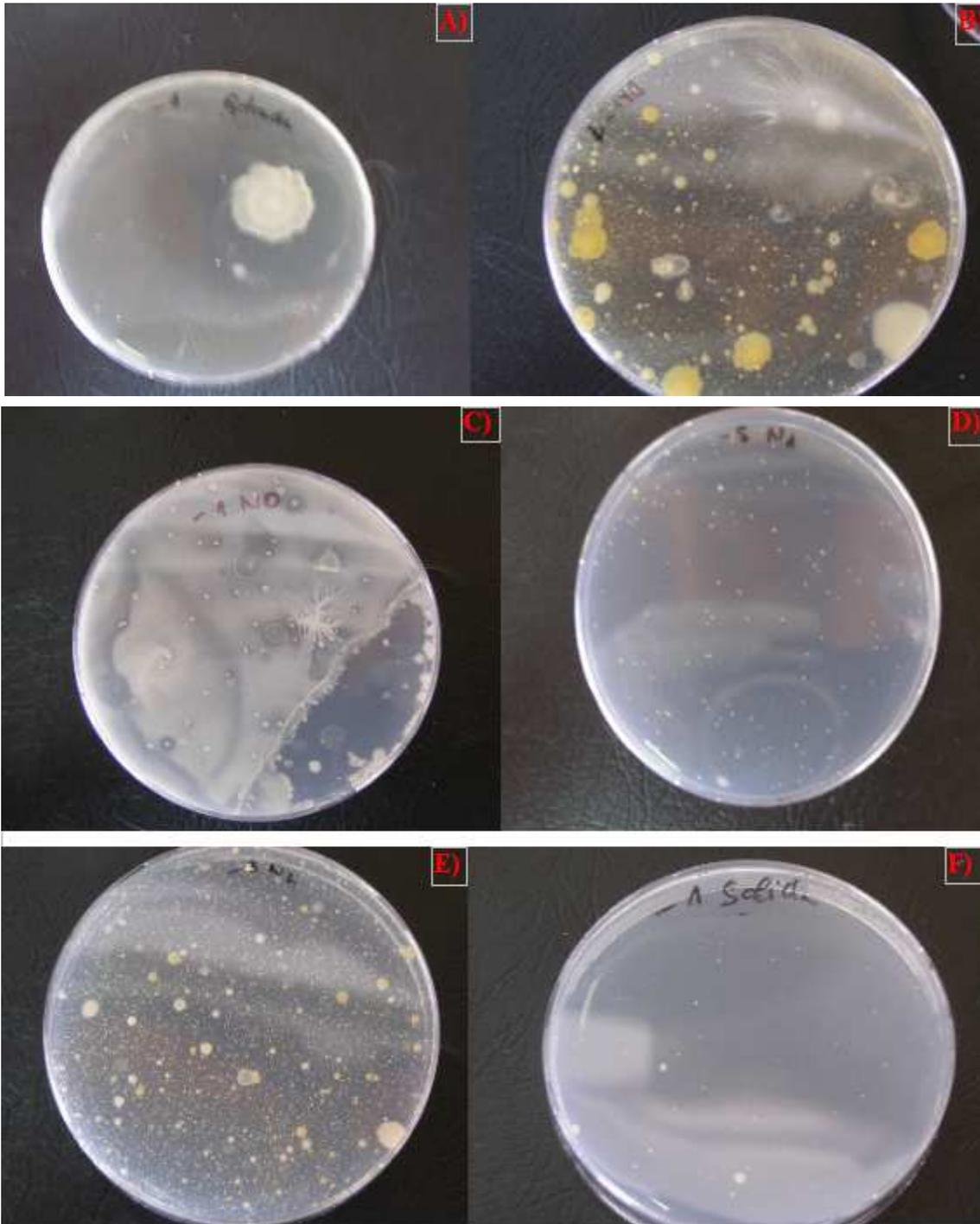
El recuento de UFC/mL de aerobios mesófilos presentes en las muestras analizadas de aguas de lixiviados se muestra en la Tabla 13.

**Tabla 13. Recuento de aerobios mesófilos (valores medios).**

<b>Muestra</b>	<b>UFC/mL</b>
<b>Entrada</b>	$5.3 \times 10^6$
<b>DN</b>	$2.6 \times 10^7$
<b>N0</b>	$6.0 \times 10^6$
<b>N1</b>	$2.0 \times 10^7$
<b>N2</b>	$2.5 \times 10^7$
<b>Salida</b>	<10

Los aerobios mesófilos incluyen bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse a 30°C, reflejan la exposición de la muestra a la contaminación en general, la existencia de condiciones favorables para la multiplicación de los mismos y la presencia de materia orgánica. Como puede observarse excepto la Salida, todas las muestras se encuentran en el rango  $10^6$ -  $10^7$ . Se obtuvo un mayor número de UFC/mL en las muestras de DN y en N2. La muestra de Salida es la que tiene el menor número de UFC/mL, esto es lógico ya que tras el tratamiento biológico hay un proceso de ultrafiltración que evita la salida de los microorganismos quedando retenidos en las membranas de 0.02  $\mu\text{m}$  Hay que tener en cuenta que un recuento bajo de aerobios mesófilos no asegura la ausencia de patógenos, de la misma manera que un recuento elevado no significa presencia de flora patógena.

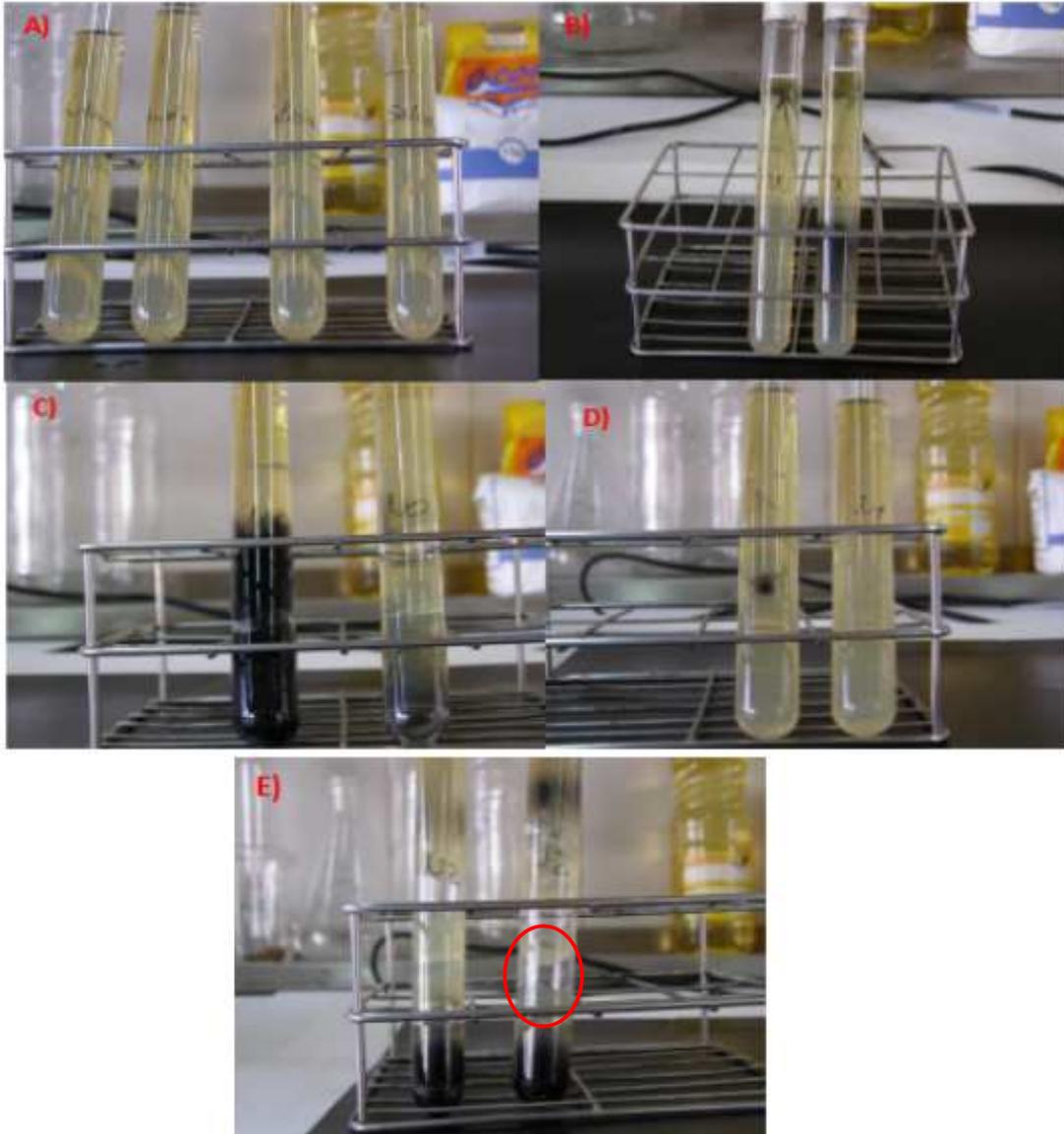
A continuación, en la Figura 29 se muestran los resultados más representativos del crecimiento de aerobios mesófilos en placas de Agar Nutritivo de las muestras analizadas.



**Figura 29.** Placas Petri mostrando el crecimiento de aerobios mesófilos en Agar Nutritivo: a) Entrada (dilución  $10^{-1}$ ); b) DN (dilución  $10^{-1}$ ); c) NO (dilución  $10^{-1}$ ); d) N1 (dilución  $10^{-5}$ ); e) N2 (dilución  $10^{-3}$ ); f) Salida (dilución  $10^{-1}$ ).

– **Clostridios sulfito reductores**

En cuanto a los Clostridios sulfito reductores tras la incubación se observó la presencia de colonias negras y productoras de gas en las muestras correspondientes a DN, N0, N1 y N2 y ausencia en las muestras correspondientes a la Entrada y la Salida (Figura 30).



**Figura 30. Tubos mostrando la presencia/ ausencia de Clostridios sulfito reductores en las distintas muestras en Agar SPS: a) Entrada (izda.) y Salida (dcha.) con ausencia de colonias negras; b) DN con presencia de colonias negras; c) NO con presencia de colonia negras; d) N<sub>1</sub> con presencia de colonias negras; e) N<sub>2</sub> con presencia de colonias negras y formación de gas.**

Los Clostridios sulfito- reductores junto con los coliformes totales y fecales, *E. coli* y estreptococos fecales son uno de los indicadores de contaminación de aguas más usados (Payment y Franco, 1993; OMS, 1995). Los anaerobios sulfito-reductores son Gram positivos, formadores de esporas, que están presentes en diversos ambientes (OMS, 1995) como suelos, sedimentos marinos, vegetación en descomposición, aguas superficiales, etc, (Sneath *et al.* 1986). Estas bacterias producen malos olores y, con mucha frecuencia, ennegrecimiento del medio cuando éste tiene hierro, formando un precipitado oscuro de sulfuro de hierro (Merck, 2000), además tienen la capacidad de reducir los sulfitos a sulfuros. Son indicadores de contaminación de alto riesgo del agua, porque tienen la facultad de que sus esporas son más resistentes que otras bacterias a diferentes condiciones físico-químicas. De este modo, pueden ser útiles como indicadores de estrés en diversos ecosistemas (Grabińska-Łoniewska *et al.* 2007).

En el caso de la muestra de Salida se observó ausencia de sulfito-reductores, esto es debido a que, como ya se comentó, en la fase de ultrafiltración que se produce después del tratamiento biológico, los microorganismos quedan retenidos por un sistema de membranas de 0.02  $\mu\text{m}$  (los clostridios suelen tener un tamaño de 0.6  $\mu\text{m}$ ). En el caso de la DN se puede explicar la presencia de los clostridios sulfito reductores porque al ser microorganismos anaerobios proliferarían en el tanque de desnitrificación al estar en condiciones de anaerobiosis. Para el resto de muestras (NO, N1 y N2) se puede explicar la presencia de clostridios porque son arrastrados donde desnitrificación por el sistema de recirculación que existe entre los tanques de nitrificación- desnitrificación. Además es importante tener en cuenta que los clostridios tienen la capacidad de formar esporas, pudiendo soportar condiciones de aerobiosis como ocurre en los tanques de nitrificación. Por último, en el caso de la Entrada en el que se observó ausencia puede ser debido a que como la muestra se tomó después de un tratamiento físico-químico de floculación- coagulación estos hayan sido parcial o totalmente eliminados.

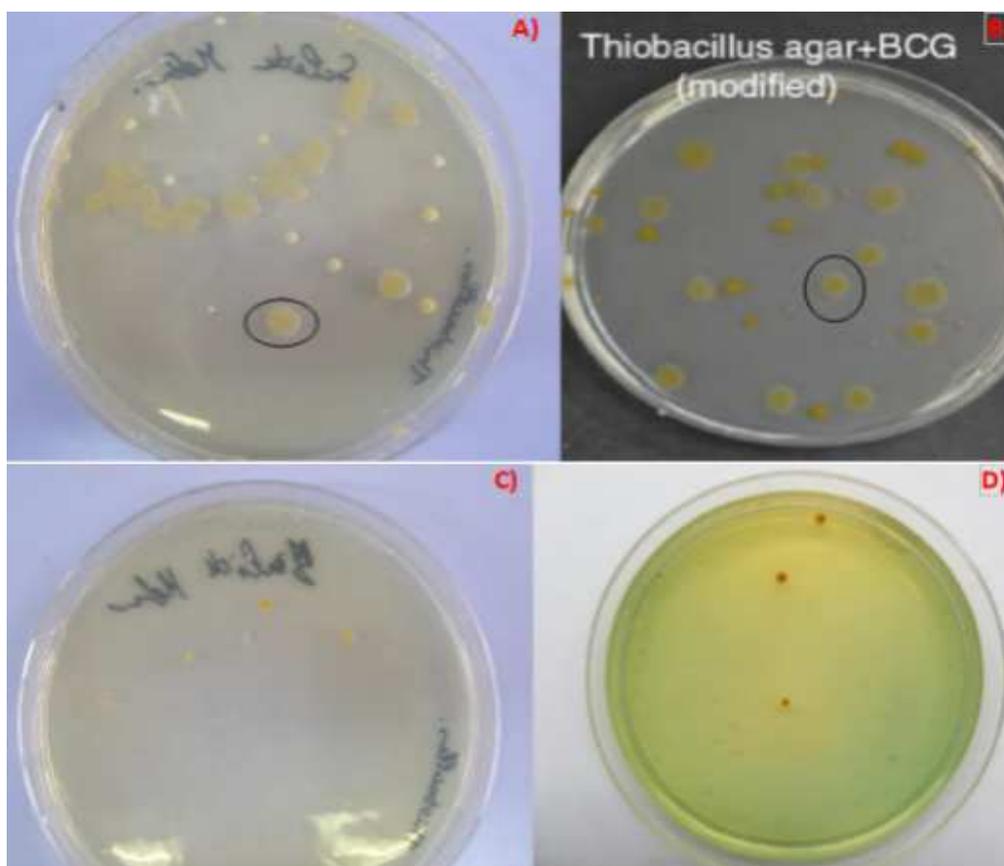
#### – ***Thiobacillus sp.***

Respecto a *Thiobacillus sp.*, aunque se necesitaría la realización de pruebas bioquímicas para la confirmación y por tanto, la correcta identificación de las colonias obtenidas, estas presentaban una morfología similar a los descritos por Starosvetsky *et al.* (2012) (Figura 31).

El género *Thiobacillus* comprende bacilos Gram negativos pequeños (1.0-4.0  $\mu\text{m}$ ) con flagelación polar son aerobios y autótrofos pudiendo obtener energía de la oxidación de azufre elemental, sulfuros, tiosulfato. Se multiplican en ambientes donde hay condiciones apropiadas para que se produzca  $\text{H}_2\text{S}$ . El género *Thiobacillus* en placa aparece formando colonias pequeñas impregnadas de azufre con zonas claras, esto indica la formación de ácido a partir de la oxidación de tiosulfato. Durante la fase de crecimiento la bacteria forma minúsculas colonias difícilmente detectables, especialmente en la fase de crecimiento temprano (en los 2 primeros días). Como se

puede observar en el medio de Agar BCG (Starosvetsky *et al.* 2012) (Figura 31b) las colonias son de color amarillo verdoso similares a las muestras obtenidas en el laboratorio correspondientes a la Salida (Figura 31a), siendo esta la muestra donde se obtuvo una mejor apreciación de las colonias. Aunque también se obtuvo crecimiento de posibles colonias de *Thiobacillus* en el resto de muestras, debido a la mayor carga microbiana resultó más difícil su comparación con las obtenidas por Starosvetsky *et al.* (2012).

También se muestra el resultado observado por Starosvetsky *et al.* (2012) en el medio de Agar BCG cuando se aumentaba el periodo de incubación (6-8 días) produciéndose un cambio de azul a amarillo, cuando al menos  $7 \pm 2$  colonias por placa estuvieron presentes, (incluso cuando sólo 2-3 colonias hayan crecido en la placa de Agar como es el caso de la Figura 31 d), además en este caso las colonias tienen un tamaño más pequeño siendo similares a las mostradas en la Figura 31c para la Salida.



**Figura 31. Placas de Petri mostrando crecimiento de *Thiobacillus* sp; a) Colonias de *Thiobacillus* obtenidas en este trabajo (dilución  $10^{-1}$ ) (Salida); b) *Thiobacillus* BCG (Starosvetsky *et al.* 2012); c) Colonias de *Thiobacillus* obtenidas en medio específico (dilución  $10^{-1}$ ) (Salida); d) *Thiobacillus* en el medio modificado (+BCG); dilución  $10^{-6}$  después de 8 días de incubación (Starosvetsky *et al.* 2012).**

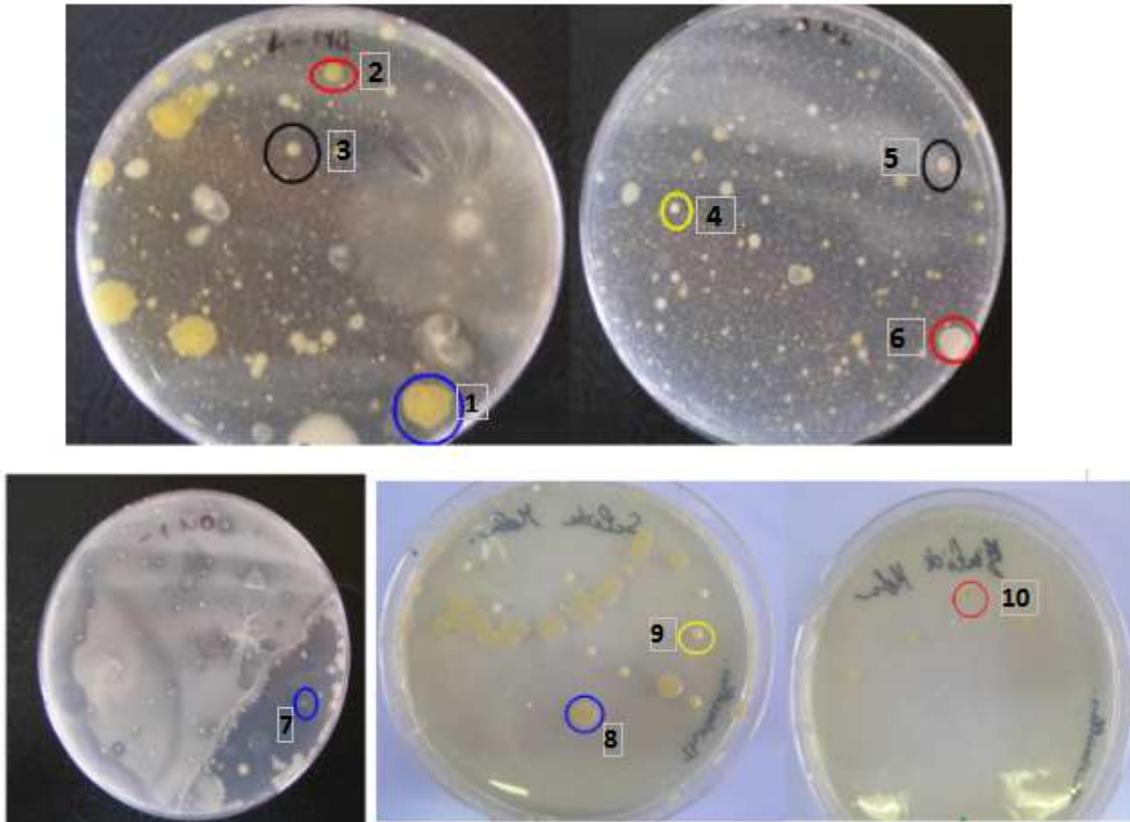
– **Coliformes totales.**

Tras la incubación, el resultado fue la ausencia de Coliformes en todas las muestras analizadas. Las aguas residuales suelen presentar un alta carga al inicio del tratamiento biológico de coliformes totales, ya que suelen ser abundantes en el ambiente aunque no están asociados necesariamente con la contaminación fecal (Allen, 1996). En este sentido, la determinación de coliformes se usa como indicador de la eficacia del tratamiento (OMS, 1995; Easton, 1998). El que no hubiera presencia en la muestra de Entrada puede ser debido a que la carga microbiana fuera muy baja. Si se hubiese detectado presencia de coliformes estos habrían aparecido como colonias lactosa positivo de color rojo y rojo metálico para colonias de *E. coli*. Por otra parte, lo más probable es que en las muestras de lixiviados haya presencia de *Pseudomonas* sp., que tal y como han descrito diversos autores (Roberts, *et al.* 1982; Soares, 1996; Ontiveros, 1983) tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de los Coliformes.

– **Streptococos fecales.**

Tras la incubación de las placas en medio KF el resultado fue la ausencia de Streptococos fecales, estas bacterias en el medio KF aparecen como colonias de color rojo debido a que los Streptococos reducen el TTC (cloruro de tetrazolio) presente en el medio. En este caso el resultado fue la presencia de colonias de color distinto al rojo. Los Enterococos son bacterias integrantes de la flora normal de los animales homeotérmicos junto con los coliformes fecales se utilizan para diferenciar la contaminación fecal del hombre de otros animales de sangre caliente (APHA, 1995). Los Streptococos fecales suelen tener cierta dificultad para multiplicarse en agua contaminada de tipo industrial, al no detectar presencia de estas bacterias en las diferentes muestras de las etapas de tratamiento biológico de los lixiviados lo más probable es que no se encuentren presentes debido al ambiente poco favorables para su multiplicación, debido a una baja temperatura o por la ausencia de azúcares fermentables. Aunque existe una relación entre coliformes fecales y estreptococos fecales que provee una información acerca de la fuente de contaminación de los mismos, siendo considerado un rango mayor de 4 indicativo de contaminación fecal humana, mientras que un rango menor a 0.7 sugiere contaminación por una fuente no humana (APHA, 1995), de acuerdo a los resultados obtenidos en el caso de las muestras de lixiviados no existiría contaminación por ninguna de dichas fuentes.

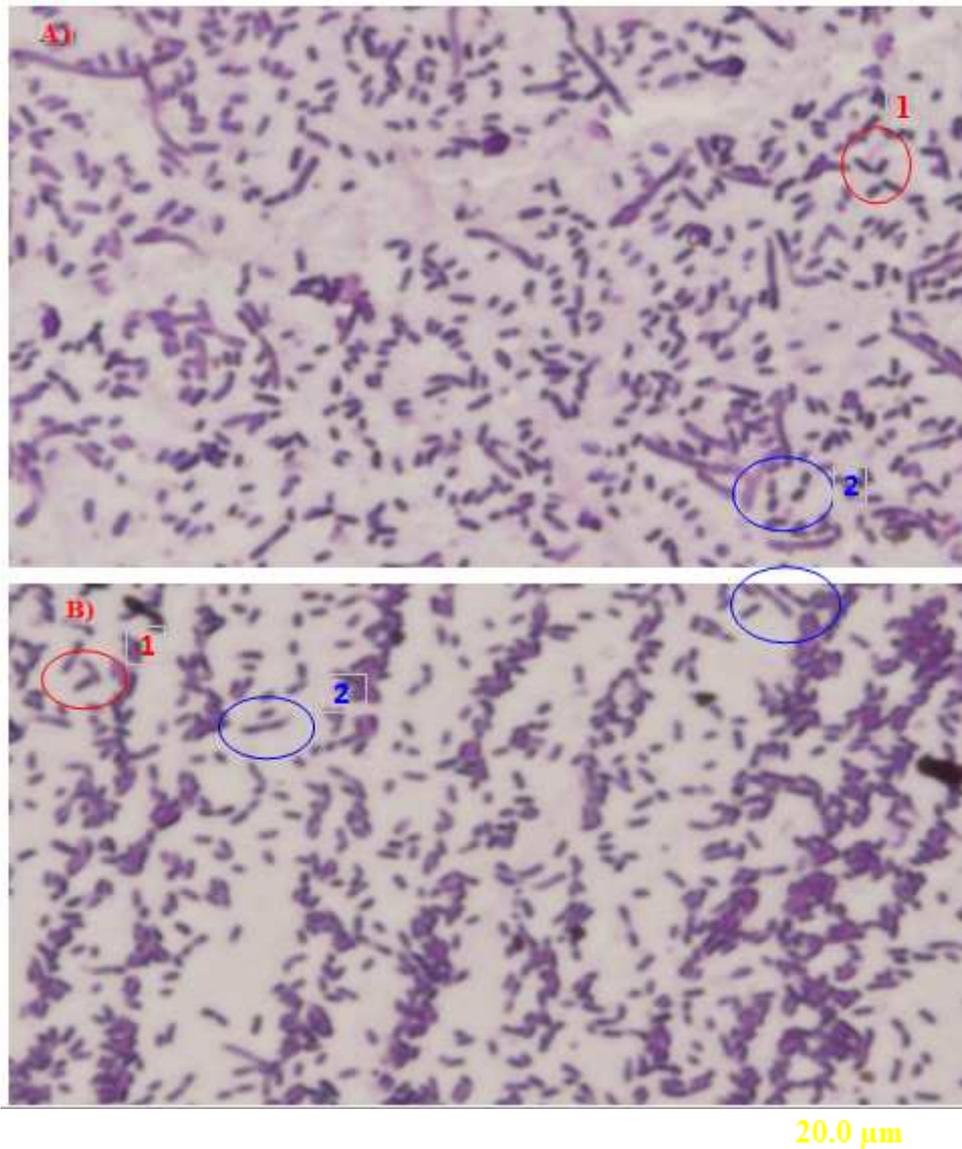
#### 4.2.2 Morfología.



**Figura 32. Colonias seleccionadas para la tinción Gram y posterior observación mediante microscopía.**

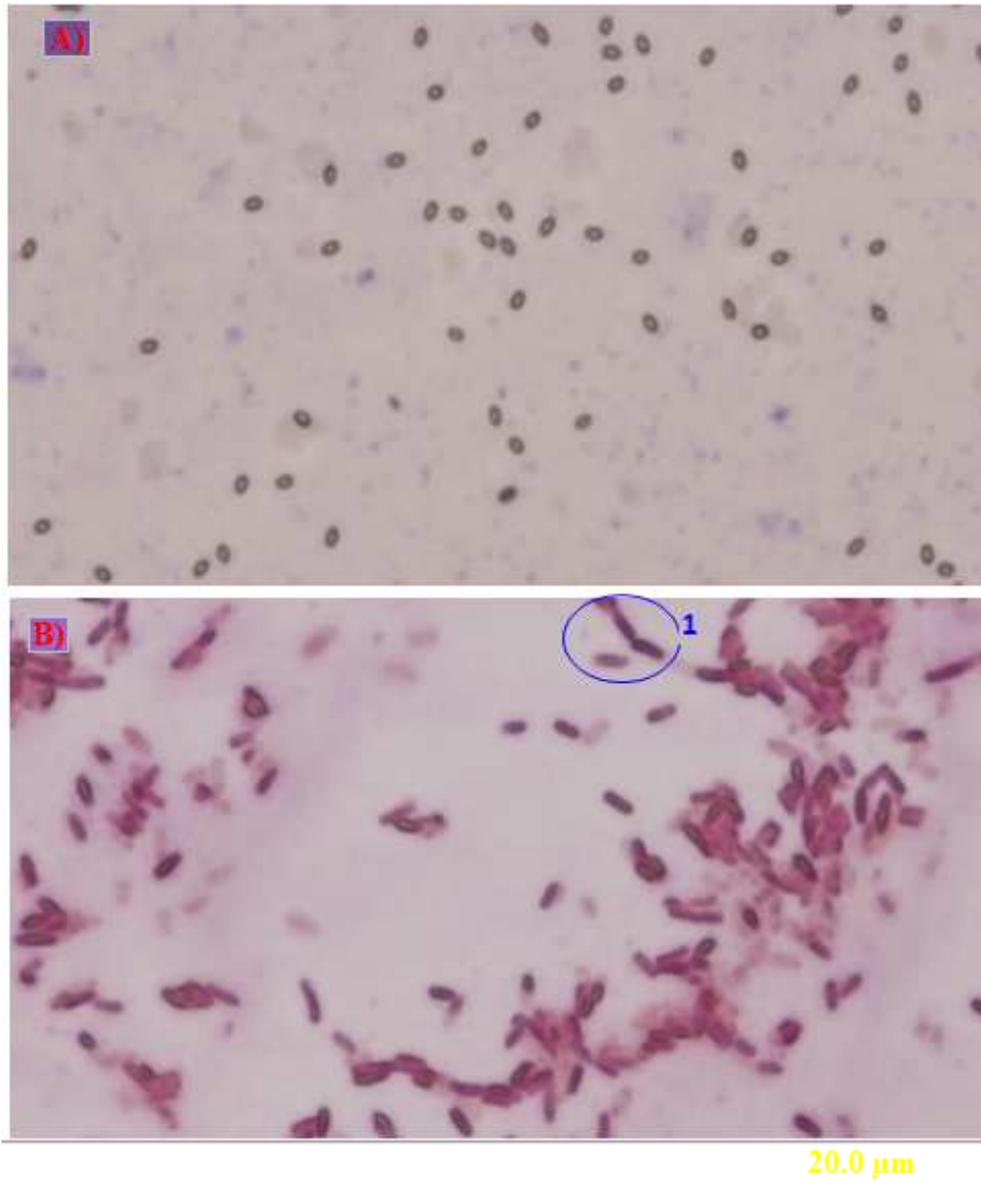
En la figura 32 se muestran las colonias que fueron seleccionadas para la realización de la tinción de Gram y posterior observación en el microscopio. 1- Colonia irregular, grande, de color naranja, con aspecto mucoso y con pequeñas curvaturas; 2- Colonia redonda, tamaño mediano, de color naranja y aspecto mucoso; 3- Colonia redonda, tamaño pequeño, color blanquecino (1, 2 y 3 corresponden a la placa de Agar nutritivo de la dilución  $10^{-1}$  de la muestra DN); 4- Colonia redonda, tamaño pequeño de color blanco y aspecto mucoso; 5- Colonia redonda, tamaño pequeño de color crema; 6- Colonia irregular, tamaño grande con curvaturas y de color crema-transparente. (4, 5 y 6 corresponden a la placa de Agar nutritivo de la dilución  $10^{-3}$  de la muestra N2); 7- Colonia irregular de tamaño pequeño, transparente y de aspecto mucoso (corresponden a la placa de Agar nutritivo de la dilución  $10^{-1}$  de la muestra NO); 8- Colonia redonda de tamaño grande, color amarillo-marrón y aspecto mucoso; 9- Colonia redonda tamaño pequeño, color blanca cremosa y aspecto mucoso; 10- Colonia redonda, tamaño pequeño de color amarillo-verdoso (8, 9 y 10 seleccionadas de la placa para medio específico de *Thiobacillus*, dilución  $10^{-1}$  de la muestra de Salida).

– **Microscopia.**



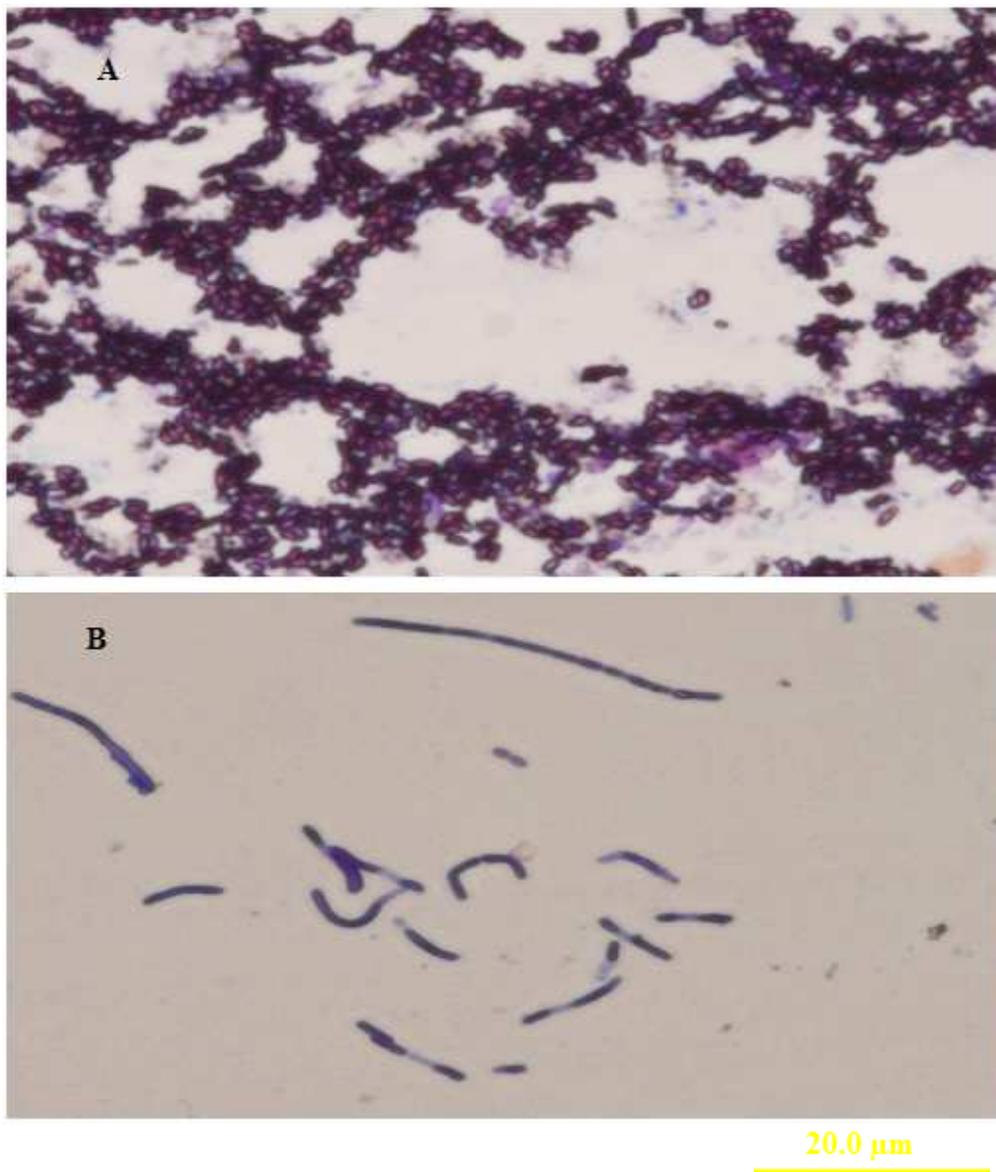
**Figura 33. Tinción de Gram (100X) (Colonias 1 y 2).**

En la Figura 33 se muestran las imágenes obtenidas por microscopia de las colonias 1 y 2 (Figura 32). A) Imagen de la colonia n° 1 de la dilución  $10^{-1}$  de la muestra DN en Agar nutritivo, se observa que es una Gram +, la forma bacteriana que presenta son bacilos pequeños y grandes con los extremos redondeados, 1a) dos bacilos en ángulo (en forma de letra V y L), 2a) diplobacilos; B) Imagen de la colonia n° 2 de la dilución  $10^{-1}$  de la muestra DN en Agar nutritivo, se observa que es Gram +, la forma bacteriana que presenta son bacilos pequeños con los extremos redondeados, 1b) dos bacilos en ángulo(en forma de letra V y L), 2b) diplobacilos.



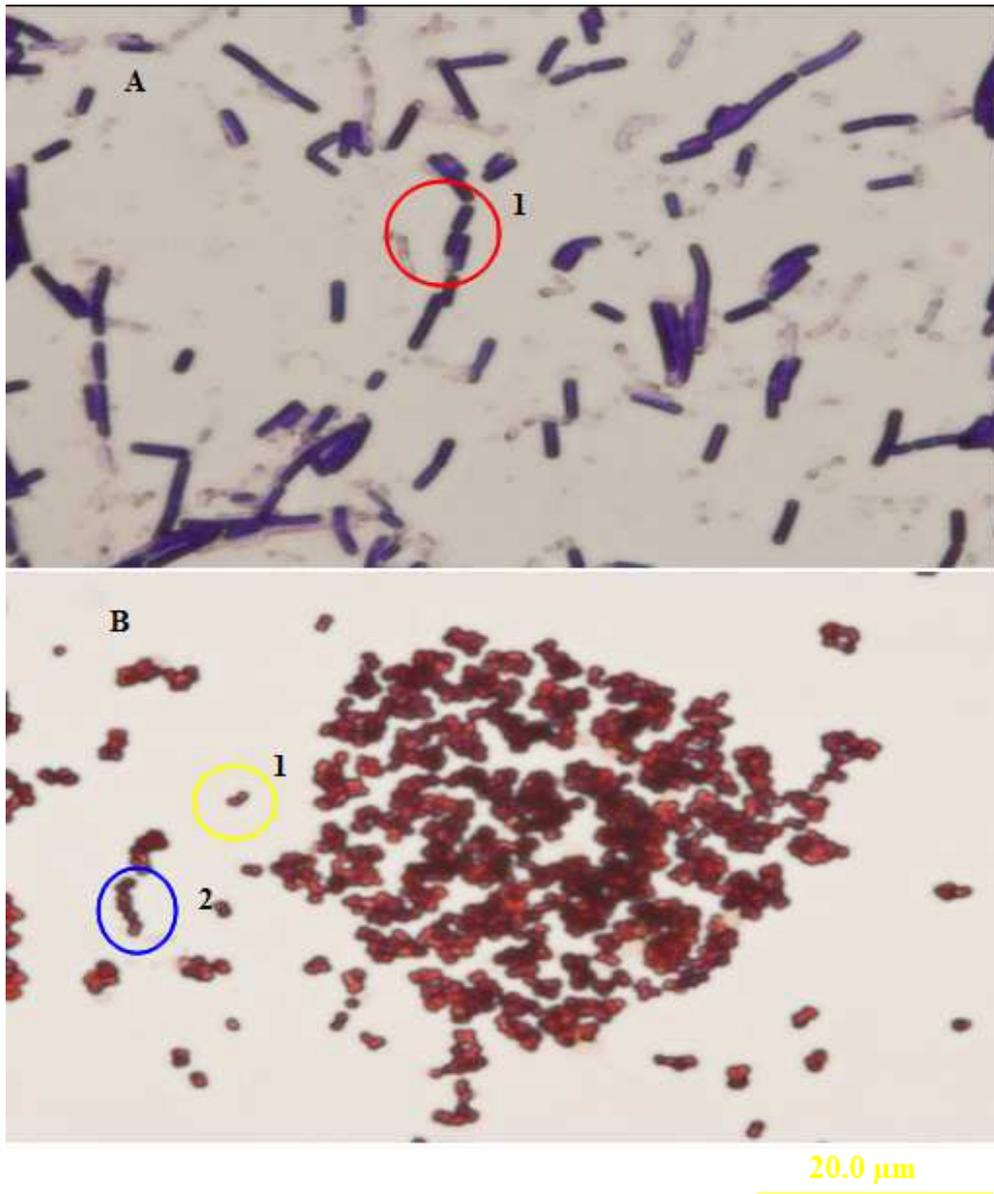
**Figura 34. Tinción de Gram (100X) (Colonias 3 y 4).**

En la Figura 34 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía de las colonias 3 y 4 (Figura 32). A) Imagen de la colonia n° 3 de la dilución  $10^{-1}$  de la muestra DN en Agar nutritivo, se observa que es una Gram -, la forma bacteriana que presenta son cocos; B) Imagen de la colonia n° 4 de la dilución  $10^{-3}$  de la muestra N2 en Agar nutritivo, se observa que es una Gram -, la forma bacteriana que presenta son bacilos pequeños con extremos redondeados, 1B) asociación de bacilos (estreptobacilos).



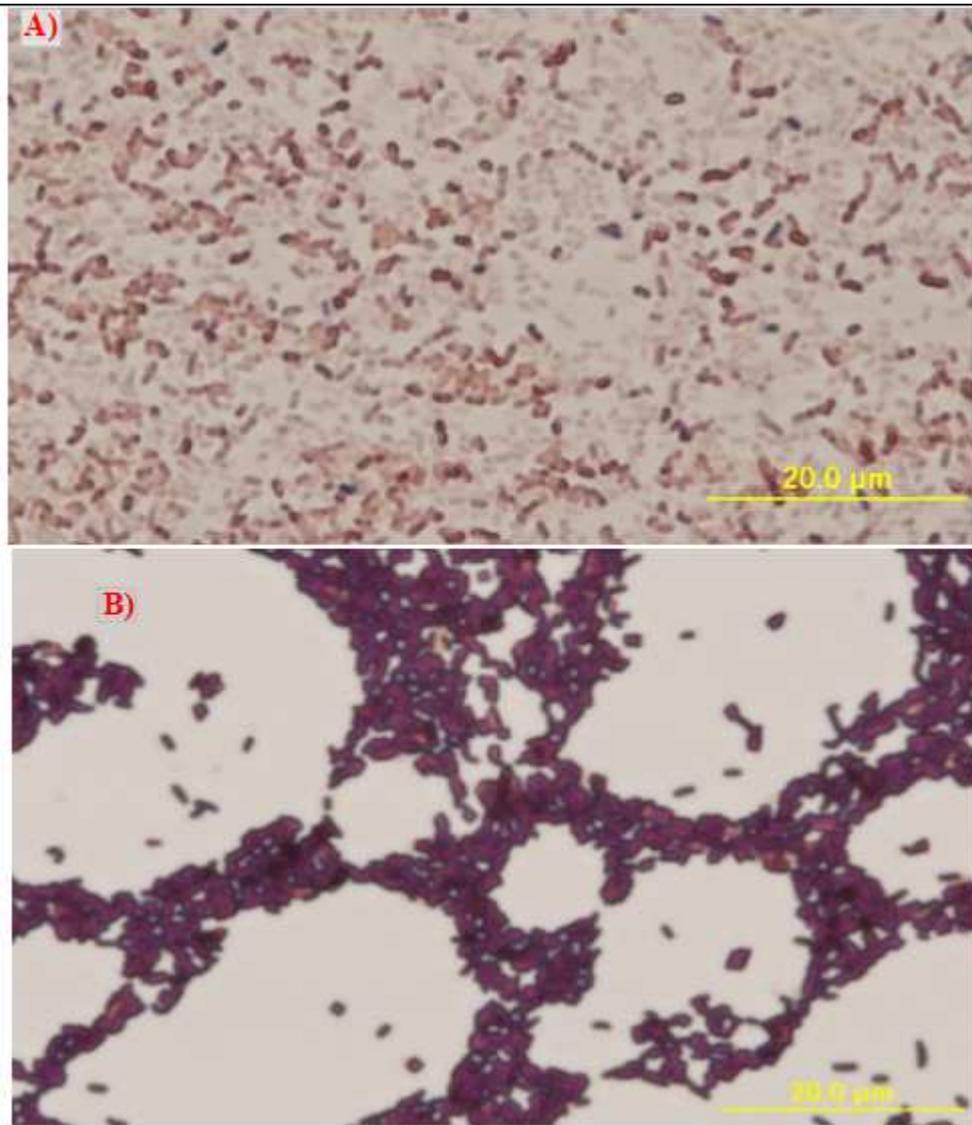
**Figura 35. Tinción de Gram (100X) (Colonias 5 y 6)**

En la Figura 35 se muestran las imágenes obtenidas por microscopia de las colonias 5 y 6 (Figura 32). A) Imagen de la colonia nº 5 de la dilución  $10^{-3}$  de la muestra N2 en Agar nutritivo, se observa que es una Gram +, la forma bacteriana que presenta son agrupaciones en forma de racimo; B) Imagen de la colonia nº 6 de la dilución  $10^{-3}$  de la muestra N2 en Agar nutritivo, se observa que es una Gram +, la forma bacteriana que presenta son bacilos con extremos redondeados, asociación de bacilos (estreptobacilos).



**Figura 36. Tinción de Gram (100X) (Colonias 7 y 8)**

En la Figura 36 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía de las colonias 7 y 8 (Figura 32). A) Imagen de la colonia n°7 de la dilución  $10^{-1}$  de la muestra NO en Agar nutritivo, se observa que es una Gram +, la forma bacteriana que presenta son bacilos grandes con los extremos redondeados, 1A) diplobacilos. B) Imagen de la colonia n° 8 de la muestra de Salida del medio específico para *Thiobacillus sp.*, se observa que es Gram – al igual que el género *Thiobacillus*, la forma bacteriana que presenta es la de coco formando agrupaciones en forma de diplococos (Figura 36 B1), estreptococos (Figura 36 B2) y en forma de racimos.



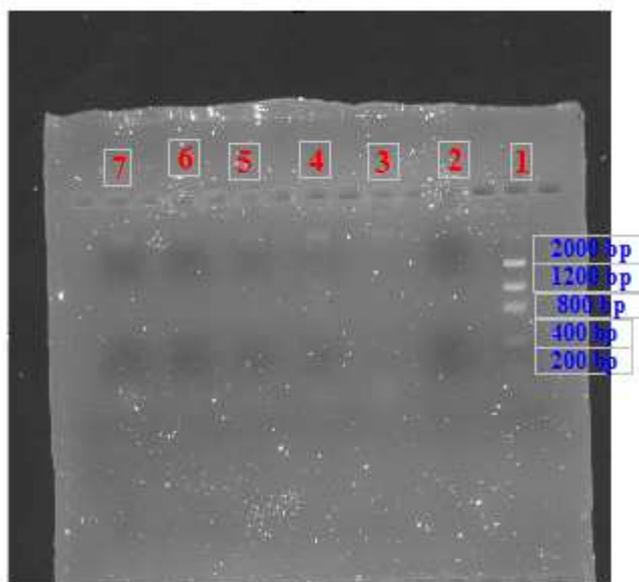
**Figura 37. Tinción de Gram (100X) (Colonias 9 y 10).**

En la Figura 37 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía de las colonias 9 y 10 (Figura 32). A) Imagen de la colonia nº10 de la muestra de Salida del medio específico para *Thiobacillus* sp., se observa que es una Gram -, la forma bacteriana que presenta son bacilos pequeños con los extremos redondeados, 1A) diplobacilos. B) Imagen de la colonia nº 9 de la muestra de Salida del medio específico para *Thiobacillus* sp., se observa que es Gram +, la forma bacteriana que presenta es de bacilo siendo un poco difícil distinguirlo por la agrupaciones que se aprecian en la imagen. Entre las especies del género *Thiobacillus* se puede encontrar en los procesos de desnitrificación, *Thiobacillus denitrificans* es un microorganismo aerobio facultativo, Gram -. Morfológicamente son bacilos cortos (1.0-3.0 µm), pueden ser móviles por medio de un flagelo polar, sus colonias son claras o poco opalescentes. El rango óptimo de pH de 6 a 8 y su temperatura óptima de crecimiento de 28- 32°C. Se encuentran en el suelo, barro, agua dulce especialmente en condiciones anóxicas. Por tanto, la colonia se podría corresponder con esta especie.

### 4.3 Técnicas Moleculares.

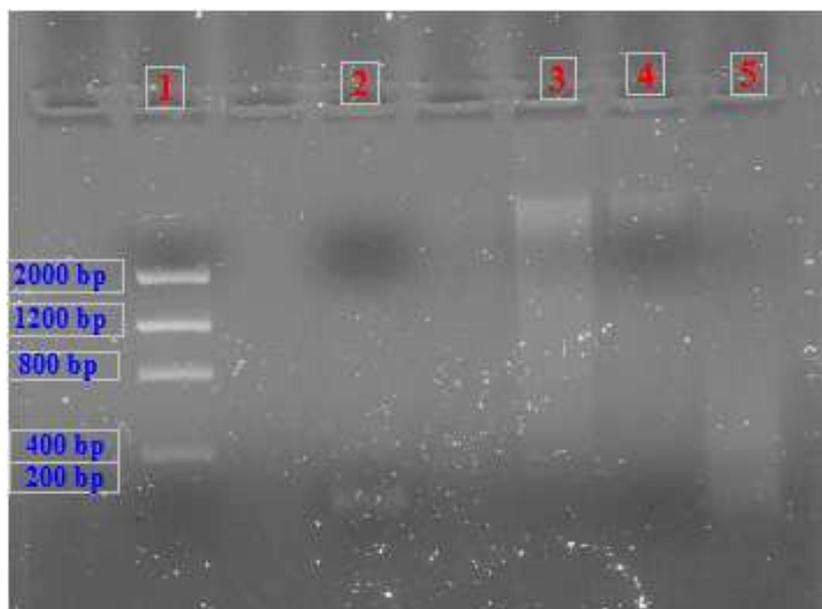
#### 4.3.1 Amplificación del gen 16 ARNr.

Los resultados de la extracción de ADN de las muestras de lixiviados y su posterior amplificación se muestran a continuación.



**Figura 38. Amplificación de los fragmentos del gen 16S ARNr visualizados en un gel de agarosa al 1%. De derecha a izquierda: 1-Marcador Low ADN Mass Ladder; 2- Entrada; 3- DN; 4-NO; 5-N1; 6-N2; 7- Salida.**

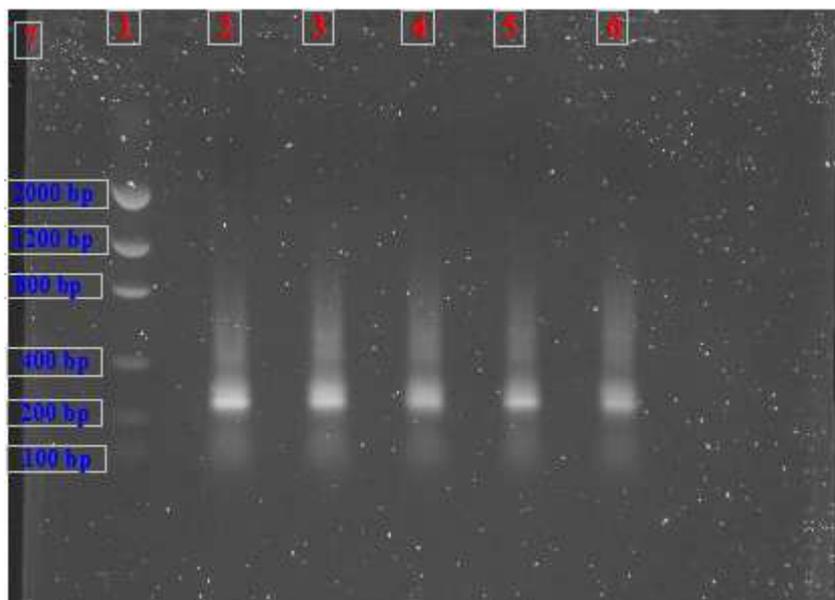
En la Figura 38 se muestra el resultado obtenido tras la electroforesis en gel de agarosa al 1% que se realizó para la verificación del producto de ADN amplificado, a partir del ADN extraído con el kit E.Z.NA Tissue ADN Spin (Omega) empleado para tejidos. Como se observa solo aparece el marcador Low ADN Mass Ladder. Sin embargo, no aparece ninguna banda correspondiente a la amplificación del gen ARNr 16S, esto es debido a que el kit utilizado como primera opción no sirve para las muestras de lixiviados, debido a que es específico para el aislamiento de ADN de células y tejidos animales. En este caso se probó con todas las muestras. La posible explicación es la presencia de inhibidores en las muestras que interferirían en la amplificación del ADN.



**Figura 39. Amplificación de los fragmentos del gen 16S ARNr visualizados en un gel de agarosa al 1%. De izquierda a derecha: 1-Marcador Low ADN Mass Ladder; 2- DN; 3-NO; 4-N1; 5-N2.**

En la Figura 39 se muestra el resultado obtenido tras la electroforesis en gel de agarosa al 1% que se realizó para la verificación del producto de ADN amplificado, a partir del ADN extraído con el kit de heces (Qiagen). Como se observa, sólo aparece el marcador Low ADN Mass Ladder. Nuevamente no aparece ninguna banda correspondiente a la amplificación del gen ARNr 16S, esto es debido a que el kit utilizado no sirvió para la extracción de ADN presente en las muestras de lixiviados, posiblemente porque no hay presencia de ADN de bacterias fecales, tal como se verificó en los cultivos de coliformes y *Streptococcus fecales*. Otra explicación es la presencia de inhibidores en las muestras y que interfirieran en la amplificación del ADN. En este caso, se probó con la muestras de lixiviados que presentaban una mayor carga microbiana (DN, NO, N1 y N2).

En la Figura 40 se muestra el resultado obtenido tras la electroforesis en gel de agarosa al 1% que se realizó para la verificación del producto de ADN amplificado de las muestras de lixiviados obtenido a partir de la extracción del ADN con el kit de suelos (Gene Matrix Soil ADN purification Kit). En este caso se probó con las muestras que presentan mayor carga microbiana y la muestra de Entrada. Como se observa aparece el marcador Low ADN Mass Ladder y una única banda en cada una de las muestras analizadas, todas estas bandas se encuentran a la altura de la banda de 200 bp del marcador utilizado.



**Figura 40. Amplificación de los fragmentos del gen 16S ARNr visualizados en un gel de agarosa al 1%. De izquierda a derecha: 1-Marcador Low ADN Mass Ladder; 2- Entrada; 3-DN; 4- NO; 5- N1; 6-N2. 7. Tamaño de bandas (bp) correspondientes al marcador.**

Por tanto, se concluyó que el kit necesario es el de suelos ya que elimina los ácidos húmicos que pudieran estar presentes en las muestras y que interfirieran en la amplificación del ADN.

Debido a que en los primeros geles de agarosa que se realizaron se observaba cierta degradación de ADN, tal como se puede apreciar en la figura 40, se probó a modificar las condiciones de la PCR para obtener un producto de alta calidad que se pudiera utilizar posteriormente en la técnica DGGE. Para ello, se jugó con la concentración de MgCl<sub>2</sub> y con la temperatura de hibridación de los cebadores. En el caso de MgCl<sub>2</sub> se probaron las concentraciones de 2 mM y a 2.5 mM; y para la temperatura de hibridación de los cebadores se probaron diferentes temperaturas: 57°, 59°, 61° y 63°C. Los mejores resultados se obtuvieron a una concentración de 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y una temperatura de hibridación de cebadores de 57°C. En la Figura 41 se muestra el resultado obtenido tras la electroforesis en gel de agarosa al 1% que se realizó para la verificación del producto de ADN amplificado en las condiciones óptimas de PCR, como se observa aparece el marcador Low ADN Mass Ladder y una única banda limpia de 200 bp sin degradación de ADN, en este caso se muestra la Entrada y la Salida.



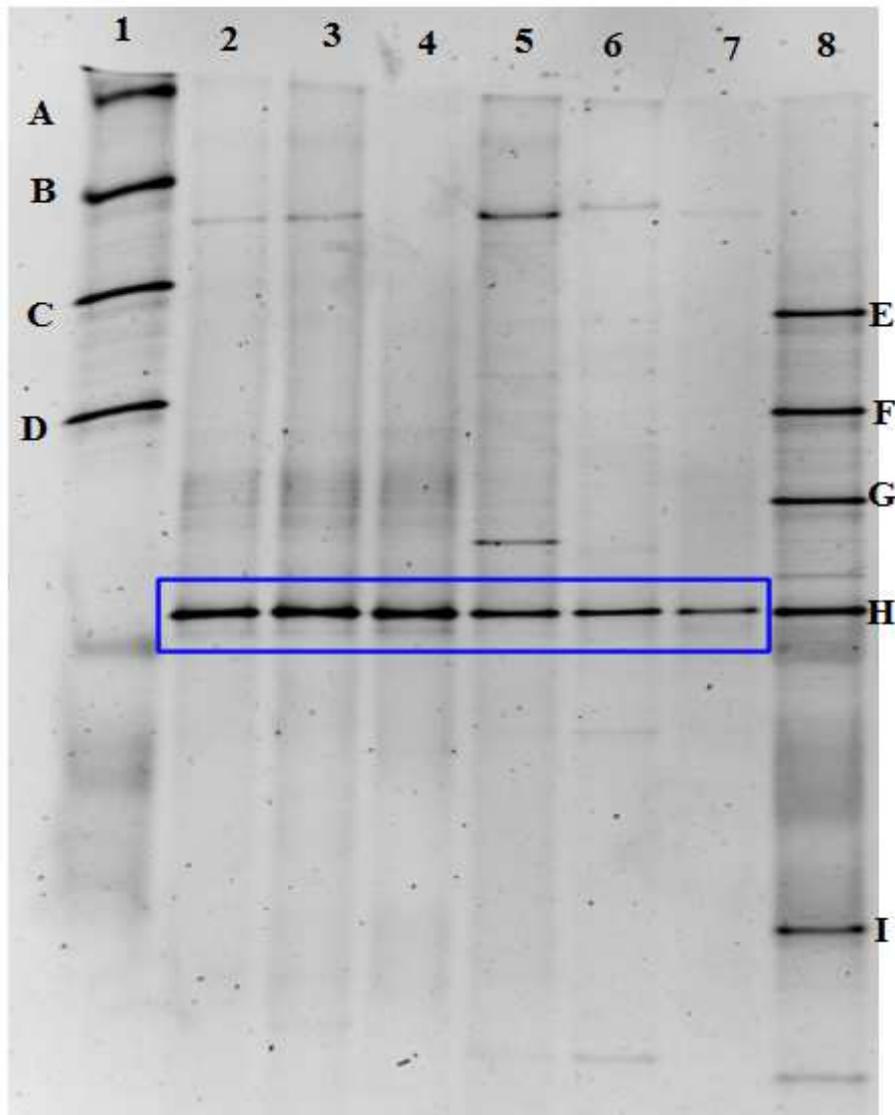
**Figura 41. Amplificación de los fragmentos del gen 16S ARNr visualizados en un gel de agarosa al 1%. 1-1-Marcador Low ADN Mass Ladder; 2- Entrada; 3-Salida.**

#### **4.3.2 Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE).**

Tras la amplificación del ADN y posterior verificación en gel de agarosa del producto de PCR, se pasó a la realización de la DGGE con un porcentaje de desnaturización de 40-60% obteniendo como resultado un patrón de bandas que se muestra en la Figura 42.

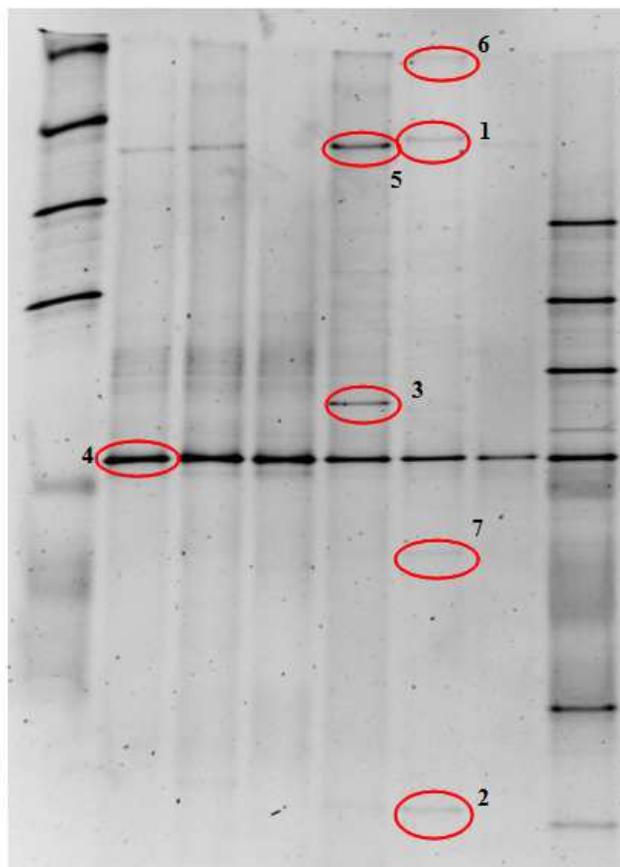
Se observa que cada una de las muestras tiene un diferente patrón de bandas, de modo que dicho patrón va cambiando en función del proceso de tratamiento biológico, lo que refleja un cambio en las comunidades bacterianas. Se aprecia que hay una banda que aparece con diferente intensidad en todas las muestras, pudiendo tratarse de una bacteria mayoritaria que se encuentra en todos los puntos de muestreo del tratamiento biológico de lixiviados, aunque en distinta concentración. También se aprecia que las muestras de Entrada y DN, presentan un patrón de bandas de bandas muy parecido. En cuanto a las muestras pertenecientes a las etapas de nitrificación NO, N1 y N2 se observa que hay cambios en las bandas que aparecen en el gel con lo que se podría correlacionar con los cambios de las bacterias implicadas en el proceso de nitrificación, es decir, las que transforman el amonio a nitritos y las que transforman los nitritos a nitratos.

Por último, la Salida es la muestra en la que se aprecia un menor número de bandas con respecto al resto, tal y como ya se observó con los recuentos en placa. Se observa también la aparición de bandas dobles por la degeneración de los primers (en la mayoría de las muestras analizadas).



**Figura 42.** Producto de amplificación del gen 16S ARNr en DGGE con un porcentaje de desnaturalización de 40 – 60 %. 1- Marcador con mezcla de ADN molde de cepas aisladas e identificadas previamente. A) *Lactococcus garvieae*; B) *Lactobacillus plantarum*; C) *Leuconostoc mesenteroides*; D) *Staphylococcus parauberis*. 2- Entrada; 3- DN; 4- NO; 5- N1; 6- N2; 7- Salida; 8- Marcador con mezcla de ADN molde de cepas aisladas e identificadas reviamente. E) *Enterococcus faecium*; F) *Enterococcus faecalis*; G) *Lactococcus lactis*; H) *Echerichia coli*; I) *Lactobacillus paracasei*.

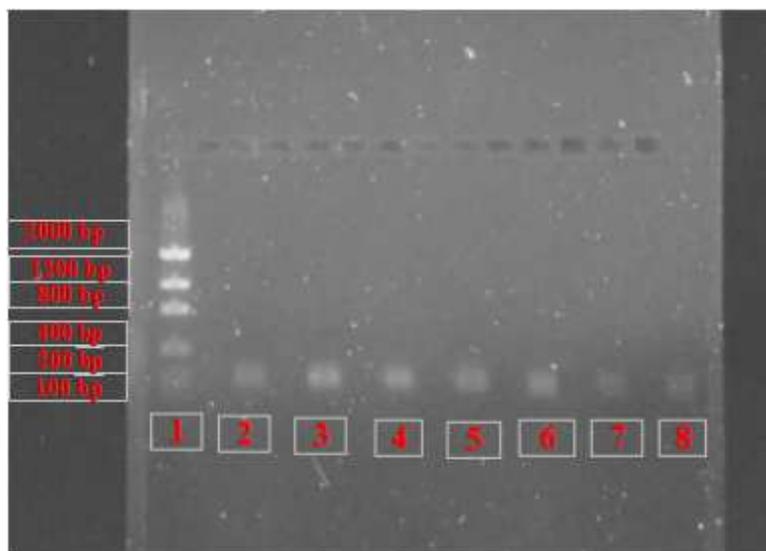
En la Figura 43 se muestran las bandas de los productos de amplificación en DGGE seleccionadas para su posterior secuenciación y posible análisis filogenético.



**Figura 43. Bandas seleccionadas de los productos de amplificación en DGGE.**

#### **4.3.3 Secuenciación.**

En la Figura 44 se muestra el resultado de la cuantificación del ADN perteneciente a las bandas de la DGGE seleccionadas (Figura 43). El marcador utilizado sirvió para estimar el tamaño de los fragmentos, la banda más pesada tiene una longitud de 2000 bp, la siguiente 1200 bp, a partir de aquí las bandas disminuyen hasta llegar a 100 bp. En este caso las bandas pertenecientes a las muestras 1, 6 y 7 presentaban una intensidad como la de la banda de 200 bp del marcador; y las bandas pertenecientes a las muestras 2,3, 4 y 5 presentaban una intensidad como la de la banda de 400 bp del marcador. Una vez determinado el tamaño se calculó la concentración del ADN en función de dicha intensidad para cada una de las muestras, siendo de 1.25 ng/ $\mu$ L para las bandas pertenecientes a la muestra 1, 6 y 7; y de 2.5 ng/ $\mu$ L para las bandas pertenecientes a la muestras 2, 3, 4 y 5. Al obtener una concentración baja de ADN fue necesario concentrar el ADN purificado de cada una de las bandas seleccionadas en la DGGE para poder ser utilizado en la secuenciación debido a que la concentración mínima requerida es de 50 ng en 9  $\mu$ L.



**Figura 44. Amplificación de los fragmentos del gen 16S ARNr visualizados en un gel de agarosa al 1%. 1- Marcador Low ADN Mass Ladder. ADN amplificado y purificado de las bandas seleccionadas en la DGGE; 2-Banda nº 1; 3- Banda nº 2; 4- Banda nº 3; 5- Banda nº 4; 6-Banda nº 5; 7-Banda nº 6; 8-Banda nº7.**

Un ejemplo de los resultados obtenidos en la secuenciación por electroforesis capilar se muestra en la Figura 45. Como resultado de la secuenciación se obtuvieron múltiples copias de cada posible fragmento terminando con un didesoxinucleótido marcado. Cada tipo de didesoxinucleótido emite una fluorescencia de una longitud de onda distinta que es captada por el sistema, que mediante el programa de ordenador interpreta los resultados y genera un electroferograma (Figura 45) con picos de colores ordenados según su tamaño. Como cada nucleótido emite fluorescencia de un tipo determinado, el equipo asigna a cada pico de color el nucleótido correspondiente, en este caso color verde para la Adenina (A), negro para la Guanina (G), azul para la Citosina (C) y rojo para la Timina (T). En este caso se puede apreciar que en la mayoría de los puntos aparecen dos picos de distinto color en un mismo ángulo, dificultando la secuenciación. Únicamente fue posible emplear en la identificación un fragmento de la secuencia obtenida a partir del electroferograma correspondiente a la banda 3, obteniéndose las siguientes correspondencias con sus respectivos porcentajes de semejanza: *Delftia tsuruhatensis* (96%), *Comamonas composti* (95%), *Acidovorax defluvii* (95%) y *Diaphorobacter nitroreducens* (94%), bacterias todas ellas relacionadas con procesos de tratamiento de aguas residuales, así como con procesos de compostaje (Shigematsu *et al.* 2013; Young *et al.* 2008; Schulze *et al.* 1999; Khan, 2002).

Por tanto, la secuenciación no dio buenos resultados, una posible mejora podría lograrse modificando los pasos de purificación de ADN de los geles. Otra alternativa posible sería recurrir a la clonación de los amplicones antes de su secuenciación o al empleo de técnicas de secuenciación masiva para poder analizar en toda su profundidad la diversidad que existe en el ecosistema de los lixiviados.



## **5. Conclusiones.**

1. Los lixiviados estudiados se caracterizan por ser lixiviados jóvenes fácilmente biodegradables, verificándose que el tratamiento biológico empleado reduce su carga orgánica por debajo de los límites legales establecidos para aguas residuales urbanas (Directiva 91/271/CEE).
2. Se comprobó que el proceso de nitrificación–desnitrificación resulta eficaz, reduciendo notablemente el nitrógeno amoniacal presente en los lixiviados.
3. Mediante técnicas de cultivo clásico se verificó la ausencia de coliformes totales y *Estreptococos* fecales. Asimismo, se constató la existencia de diferencias entre las muestras, en cuanto a la presencia de *Clostridios* sulfito reductores, *Thiobacillus* sp. y aerobios mesófilos.
4. Durante la puesta a punto de la técnica de DGGE se comprobó la necesidad de emplear un kit específico en la extracción estandarizada de DNA para proporcionar material genético susceptible de ser amplificado por PCR, debido posiblemente a la interferencia de los ácidos húmicos en el proceso de purificación de DNA.
5. Se determinaron las condiciones óptimas de PCR para la obtención de bandas de DNA limpias sin que existiese degradación.
6. La DGGE demostró que existen cambios en la comunidad bacteriana durante el proceso de tratamiento biológico, lo que se hace patente por las diferencias existentes entre los patrones de bandas de las diferentes muestras analizadas.
7. Finalmente, la secuenciación de las bandas de DGGE no dio buenos resultados, por lo que habría que modificar los pasos de purificación de ADN previos a dicha secuenciación para intentar una mejora. Alternativamente, se podría recurrir a la clonación de los amplicones antes de su secuenciación, o al empleo de técnicas de secuenciación masiva de amplicones para analizar en toda su profundidad la diversidad del ecosistema de los lixiviados.

## **6. Abreviaturas y símbolos.**

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMO	Amonio monooxigenasa
AOA	Archaea amonio oxidantes
AOB	Bacterias amonio oxidantes
AOX	Compuestos orgánicos halogenados
APS	Persulfato de amonio
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATH	Aliltiurea
BCG	Verde de Bromocresol
bp	Pares de bases
C	Citosina
CE	Comisión Europea
CI	Cromatografía Iónica
CV -I	Complejo cristal de violeta - iodo
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfato
DQO	Demanda química de oxígeno
FISH	Hibridación fluorescente in situ (Fluorescent In Situ Hybridization)
G	Guanina
G-C	Guanina-Citosina
H	High

HAO	Hidroxilamina oxidoreductasa
IC	Carbono inorgánico
Kb	Kilobase
KF	Agar Kenner Fecal
L	Low
Nar	Nitrato reductasa celular
Nap	Nitrato reductasa periplasmática
NDIR	Detector de infrarrojo no disperso
Nirk	Nitrito reductasa
NirS	Nitrito reductasa
NOB	Bacterias nitrito oxidantes
Nos	Óxido nitroso reductasa
Nor	Óxido nítrico reductasa
Nxr	Nitrito oxireductasa
OD	Oxígeno disuelto
OFL	Valor de medición inferior al intervalo de medida admisible
PAHs	Hydrocarburos policíclicos aromáticos
PCA	Agar para recuento en Placa (Plate Count Agar)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
r.p.m.	Revoluciones por minuto.
SD	Desviación estándar
SPS	Sulfite polymyxins ulfadiazine
SS	Sólidos en suspensión
T	Timina
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBE	Tris-borato-EDTA
TC	Carbono total

TOC	Carbono orgánico total
TTC	Cloruro de Tetrazoilo
UFC	Unidades formadoras de colonia
UFL	Valor de medición inferior al intervalo de medida admisible
UV	Ultravioleta

## **7. Bibliografía.**

Allen, M. (1996). *La Importancia para la Salud pública de los indicadores bacterianos que se encuentran en el agua potable. Reunión sobre la calidad del Agua Potable.* CEPIS. OPS. OMS.

Allison, E., McCaig, L., Anne, G., James, I., (2001). *Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16S Ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns.* Applied and Environmental Microbiology, 67(10). 4554-4559.

Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., (1995). *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation.* Microbiological Review 59, 143-169.

American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environmental Federation (WEF).(2005).“*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*”.20th Ed., Washington, D.C., USA.

Andrew,S., Whiteley, Bailey , M.J., (2000). *Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system.* Applied and Environmental Microbiology. 66 (6) 2400-2407.

Bauer, M.J., Herrmann, R., Martin, A., Zellmann, H., (1998). *Chemodynamics, transport behaviour and treatment of phthalic acid esters in municipal landfill leachate.* Water Science and Technology. 38, 185-192.

Bernet, N., Dangcong, P., Delgenes, J.P., Moletta, R.(2001). *Nitrification at low oxygen concentration in biofilm reactor.* Environmental Engineering-Asce.127, 266-271.

Bretschneider, H., Löcher, K., Eds. (1993). *Taschbuch der Wasserwirtschaft;* Paul Parey: Hamburg/Berlin.

Bruce, K., Hiorns, W., Holban, J., Osborn, A., Strike P., Ritchie D. (1992). *Amplification of DNA from populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction.* Applied Environmental Biotechnology. 58 (9) 3413-3416.

Christensen, T.H., Kjeldsen, P., Bjerg, P.L., Jensen, D.L., Christensen, J.B., Baun, A., Albrechtsen, H., Heron, G. (2001). *Biogeochemistry of landfill leachate plumes.* Applied Geochemistry 16, 659 – 718.

Curds, C.R., (1975). Protozoa. En: Curds C.R., Hawkes, H.A. (eds.), *Ecological aspects of used water treatment: vol. 1. The organisms and their ecology.* Academic Press, London, pp. 203-268.

Daims, H., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., Schleifer, K.H., y Wagner, M., (2001). *In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants.* Applied and Environmental Microbiology. 67:5273-5284.

Daims, H., Maixner, F., Schmid, M.C. (2009). the Nitrifying microbes: Ammonia oxidizers, nitrite oxidizers, and anaerobic ammonium oxidizers. En: Nielsen, P., Daims, H., Lemmer, H. (2009). *FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment: Identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH*. p 9-17. Ed. IWA Publishing. Londres, Reino Unido.

DeLong, E.F., (1992). *Archaea in coastal marine environments*. Proceedings of the National Academy of Sciences 89, 5685-5689.

Deng, Y., (2007). *Journal of Hazardous Materials* . 146: 334-340.

Edeline, F., (1987). *L'épuration des lixiviats de décharge*. Tribune de l'eau; 566(6), 57-65.

Eikelboom, D.H., (1975). *Filamentous organisms observed in activated sludge*. Water Research 9, 365-388.

El-Fadel, M., Bou-Zeid, E., Chahine, W., Alayli, B (2002). *Temporal variation of leachate quality from pre-sorted and baled municipal solid waste with high organic and moisture content*. Waste Management Journal. 22 , 269–282.

Easton, J. (1998). *The Development of a Risk Assessment Methodology to evaluate the adverse human health effect of pathogens found in sewage contaminate waters*. Environmental Health Engineering program. University of Alabama at Birmingham.

Ferrer, J., Seco A. (2007). *Tratamientos Biológicos de Aguas Residuales*. Editorial UPV. Valencia, España.

Grabińska-Łoniewska. A.(2005). *Microbial contamination of drinking-water distribution systems: problems and solutions*. European Centre of Excellence CEMERA, Warsaw, ISBN 83-922630-0-6, pp 1-77.

Grabińska-Łoniewska. A., Konillowicz-Kowalska, T., Wardzyńska, G., Boryn, K. (2007). *Occurrence of Fungi in water distribution system*. Polish Journal of Environmental Studies 16, 539-547.

Gilbride, K.A., Lee, D.Y., Beaudette, L.A. (2006). *Molecular techniques in wastewater: understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control*. Journal of microbiological methods 66, 1-20.

Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L., Field, K.G., (1990). *Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton*. Nature 345, 60-63.

Harrington, D.W., Maris, J.P., (1986). *The treatment of leachate: a UK perspective*. Water Pollution Control. 45-46.

- Hsi-Jien Chen , Yi-Zi Lin , Jen-Mao Fanjiang, Chihhao Fan. (2013). *Microbial community and treatment ability investigation in AOAO process for the optoelectronic wastewater treatment using PCR-DGGE biotechnology*. Biodegradation 24, 227–243.
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R., (1998). *Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity*. The Journal of Bacteriology 180, 4753- 4774.
- Janos, P., Herzogová, I., Rejnek, J., Hodslavská J., (2004). *Assessment of heavy metals leachability from metallo-organic sorbent-iron humate-with the aid of sequential extraction test*. Talanta. 62: 497-501.
- Kampschreur, M., (2010). *Dynamics of nitric oxide and nitrous oxide emission during nitrogen conversion processes*. PhD Thesis. Department of Biotechnology. Delft University of Technology, The Netherlands.
- Kang, H.K., Shin, H.S., Park, H., (2002). *Characterization of humic substances present in landfill leachate with different landfills ages and its implications*. Water Research. 36, 4043-4032.
- Khan, S.T., Hiraishi, A. (2002). *Diaphorobacter nitroreducens gen nov, sp nov, a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading denitrifying bacterium isolated from activated sludge*. The journal of general and applied microbiology. 48(6):299-308.
- Karthikeyan, Obuly P., Swati, M., Nagendran R., Kurian, Joseph. (2006). *Performance of bioreactor landfill with waste mined from a dumpsite*. Environmental Monitoring Assessment. 135: 141-151.
- Katayama Fujimura, Y., Kuraishi, H. (1980). *Characterization of Thiobacillus novellus and its thiosulfate oxidation*. Journal of General Applied Microbiology. 26, 357-367.
- Kazuya, W., Kanako, W., Yumiko, K., Kazuaki, S., Shigeaki, H., (2000). *Molecular Characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities*. Applied and Environmental Microbiology. 66 (11), 4803-4809.
- Kjeldsen, P., Barlaz, M.A., Rooker, A.P. (2002). *Critical evaluation of factors required to terminate the postclosure monitoring period at solid waste landfills*. Environmental Science & Technology. 36, 3457-3464.
- Kjeldsen, P., Barlaz, M.A., Rooker, A.P. (2002). *Present and long term composition of MSW landfill leachate: A review*. Environmental Science & Technology .32, 297-336.
- Koops, H., Pommerening –Roser, A. (2001). *Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species*. FEMS Microbiology Ecology. 37: 1-9.

Kurniawan T.A., Lo W., Chan G. (2005). *Physico-chemical treatments for removal of recalcitrant contaminants from landfill leachate*. Journal of Hazardous Materials 129, 80 – 100.

Lavín. (2013). La contaminación en la Industria Alimentaria. Apuntes de Tratamiento de efluentes y residuos en la industria alimentaria. Master de Biotecnología Alimentaria.

Lopes dos Santos, A., Peixoto, R., Rosado A.S.(2009). *New Approaches to understanding microbial diversity in wastewater, landfills and leachate treatment*. *Oecologia Brasiliensis* 13(4): 631-648.

Metcalf y Eddy, Inc. (1995). *Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización*. 3ª Edición. McGraw-Hill, New York, USA.

Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R., Lal, B. (2001). *Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated Soil*. Applied and Environmental Microbiology. 67(4). 1675-1681.

Mota, C., Ridenoure, J., Cheng., De los Reyes, F. (2005). *High levels of nitrifying bacteria in intermittently aerated reactors treating high ammonia wastewater*. FEMS Microbiology Ecology. 54: 391-400.

Moura A.,Tacaño M., Henriques I., Dias J., Ferreira, P., Correia, A (2009). *Characterization of bacterial diversity in two aerated lagoons of a wastewater treatment plant using PCR–DGGE analysis*. Microbiological Research 164 , 560-569 .

Muyzer, G.,De Waal, E.C.,Uitierlinden, A.G. (1993). *Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing*. Applied and Environmental Microbiology 59, 695-700.

OMS. (1995.) *Guías para la calidad del agua potable*. OMS. Ginebra.

Ontiveros, A.M.(1983). *Pseudomonas aeruginosa como indicador de la calidad bacteriológica del agua para uso recreacional*. Secretaría de Agricultura y Recursos Hídricos. México.

Paxéus, N. (2000). *Organic compounds in municipal landfill leachate*. Water Science and Technology. 42, 323-333.

Payment, P., Franco, E.(1993).*Clostridium perfringens and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts* . Applied and Environmental Microbiology , 59, 8, 2418-2424

Pesavento, M., Alberti, G., Biesuz, R. (2009). *Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: a review*. Analytica Chimica Acta; 631: 129-41.

Philippot, L. (2002). *Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes*. Biochimica

et Biophysica Acta 1577, 355-376. Applied and Environmental Microbiology 64, 3480-3485.

Pinhassi, J., Zweifel, U.L. y Hagstrom, A. (1997). *Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria*. Applied and Environmental Microbiology 63, 3359-3366.

Posso, D., Ghneim, T. (2008). *Uso de Marcadores Microsatélites para la Estimación de Diversidad Genética en Plantas*. Ediciones IVIC.

Primo, O., Rivero, M.J., Ortiz I. (2008). Journal of Hazardous Materials. 153: 834-842.

Purkhold, U; Wagner, M; Timmermann, G; et al. (2003). *16S rRNA and amoA-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53, 1485-1494.

Renou S., Givaudan J.G., Poulin S., Dirassouyan F., Moulin P. (2007). *Landfill leachate treatment: review and opportunity*. Journal of Hazardous Materials, 150, 468 – 493.

Renou, S., Poulain, S., Givaudan, J. G., Moulin, P. (2008). *Treatment process adapted to stabilized leachates: Lime precipitation-prefiltration-reverse osmosis*. Journal of membrane science 313(1-2), 9-22.

Robert, I., Andrew, S., Whiteley., O'Donnell, A., Bailey, M. (2000). *Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition*. Applied and Environmental Microbiology , 66, ( 12), 5488-5491.

Roberts, NC. (1982). *Pseudomonas inhibition of coliform group*. Abstract of the annual meeting of the American Society for Microbiology.

Robertson, L.A., Kuenen, J.G. (1984). *Aerobic denitrification: a controversy revived*. Archives of Microbiology 139, 347–354.

Rodríguez, F.J. (2003). *Procesos de potabilización del agua e influencia del tratamiento de ozonización*. Ediciones Díaz de Santos S.A.

Romanowski, G., Lorenz, M.G., Wasckernagel, W (1993). *Use of polymerase chain-reaction and electroporation of Echerichia- Coli to monitor the persistence of extracellular plasmid DNA introduced into natural soils*. Applied and Environmental Microbiology. 59, 3438-3446.

Sanz, J.L., Köchling, T., (2007). *Molecular biology techniques used in wastewater treatment: an overview*. Process Biochemistry 42, 119-133.

Schramm, A., de Beer, D., Wagner, M., Amman, R. (1998). *Identification and activities in situ of Nitrospira and Nitrospira spp. as dominant population in a nitrifying fluidized bed reactor*. Applied and Environmental Microbiology 64, 3480-3485.

Schramm, A., D. de Beer, A., Van den Heuvel, S., Ottengraf, S., Amann, R. (1999). *Microscale distribution of populations and activities of Nitrospira and Nitrospira spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microsensors*. Applied and Environmental Microbiology. 65: 3690-3696.

Schulze, R., Spring, S., Amann, R., Huber, I., Ludwig W, Schleifer KH, Kämpfer P. (1999). *Genotypic diversity of Acidovorax strains isolated from activated sludge and description of Acidovorax defluvii sp. nov.* Systematic and applied microbiology, 22(2):205-14.

Shigematsu, T., Yumihara, K., Ueda, Y. (2003). *Delftia tsuruhatensis sp. nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53, 1479–1483.

Sneath, P.H.A. (1986). *Endospore-forming Gram-positive rods and cocci*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, ed. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. pp. 1104-1207. Baltimore: Williams & Wilkins.

Soares, P., Carlos, S. (1996). *Pseudomonas aeruginosa como indicador em análises bacteriológicas de águas de abastecimento público*. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e ambiental. II-014.

Starosvetsky, J., Zukerman, U., Armon, R.H.(2013). *A simple medium modification for isolation, growth and enumeration of Acidithiobacillus thiooxidans (syn. Thiobacillus thiooxidans) from water samples*. Journal of Microbiological Methods 92, 178–182.

Suzuki, M.T., Rappe, M.S., Haimberger, Z.W., Winfield, H., Adair, N., Strobel, J., Giovannoni, S.J. (1997). *Bacterial diversity among small-subunit rRNA gene clones and cellular isolates from the same seawater sample*. Applied and Environmental Microbiology 63, 983-989.

Szpadt, R. (1988). *Municipal waste landfills, leachate characteristics*. Civil Engineering Municipal Management, 4, 72-76.

Tchobanoglous, G., Theisen H., Vigil, S.A. (1994). *Gestión Integral de Residuos Sólidos*. McGraw-Hill.

Thorndycroft, F.H., Butland, G., Richardson, D.J., Watmough, N.L. (2007). *A new assay for nitric oxide reductase reveals two conserved glutamate residues form the entrance to a proton-conducting channel in the bacterial enzyme*. Biochemical Journal. 401, 111-119.

Ueda, S., Earle, R.L. (1972). *Microflora of activated sludge*. Journal of General and Applied Microbiology 18, 239-248.

Wagner, M., Rath, G., Koops, H.P., Flood, J., Amann, R. (1996). *In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants*. Water Science of Technology. 34, 237-244.

Wells, G., Park, H., Yeung, C., Eggleston, B., Francis, C y Criddle, C. (2009). *Ammonia-oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge bioreactor: betaproteobacterial dynamics and low relative abundance of Crenarchaea*. Environmental Microbiology. 11(9): 2310-2328.

Weng, L.P., Temminghoff, E.J.M., Lofts S., Tipping, E., Van Riemsdijk, W.H. (2002). *Complexation with dissolved organic matter and solubility control of heavy metals in a sandy soil*. Environmental Science Technology; 36: 4.804-10.

Wesley Eckenfelder, W., Grau, P. *Activated Sludge Process Design and Control: Theory and Practice*. Water Quality Management Library. Pennsylvania, Estados Unidos. 1992.

Wiszniewski J., Robert D., Surmacz-Gorska J., Miksch K., Weber J.V. (2006). *Landfill leachate treatment methods: A review*. Environmental Chemical Letters 4, 51 – 61.

Yanyu, Wu., Shaoqi, Zhou., Dongyu, Chen., Rong, Zhao., Huosheng. Li., Yiming, Lin. (2011). *Transformation of metals speciation in a combined landfill leachate treatment*. Science of the Total Environmental.

Young, C.C., Chou, J. I., Arun, A.B., Yen, W.S. ( 2008). *Comamonas composti sp. nov., isolated from food waste compost*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 58, 251–256.

Zhang, D.J., Lu, P.L., Long, T.R., Verstraete, W. (2005). *The integration of methanogenesis with simultaneous nitrification and denitrification in a membrane bioreactor*. Process Biochemistry. 40, 541–547.

### **Consultas en Internet**

[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST\\_PROGRAMS=me gaBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=me gaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch) . Consultado el 12 de Julio 2013.

<http://www.cogersa.es/metaspaces/portal/14498/19173>. Consultado el 12 de Julio 2013.

<http://www.inese.es/html/files/pdf/amb/iq/454/12ARTICULODIC.pdf>. Consultado el 12 de Julio de 2013.

<http://www.ofiverde.unizar.es/documets/directiva1999-31-CE.pdf>. Consultado el 12 de Julio de 2013.

<http://pendientedemigracion.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/secuencia/Secuencia.ht>. Consultado el 12 de Julio de 2013.

[http://www.sct.uniovi.es/index.php?option=com\\_content&task=view&id=118&Itemid=122#secu](http://www.sct.uniovi.es/index.php?option=com_content&task=view&id=118&Itemid=122#secu) . Consultado el 12 de Julio de 2013.

<http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/03forma.htm> . Consultado el 12 de Julio de 2013.