

**Los humedales contruidos como  
sistemas para el tratamiento de  
agua residual industrial y  
urbana. Caracterización de las  
comunidades de bacterias  
presentes en estos ecosistemas**

**“Constructed wetlands for wastewater treatment: industrial and  
municipal. Characterization of the bacterial communities in these  
ecosystems”**

**PAULA ARROYO HERNÁNDEZ**

**Universidad de León**

**Dpto. De Biodiversidad y Gestión Ambiental, Área de Ecología**

**Memoria presentada para optar al grado de Doctor**

Dña. Paula Arroyo Hernández

León, Mayo de 2010

Dra. Gemma Ansola González, Profesora titular del Área de Ecología, Departamento de Biodiversidad y Gestión Ambiental, de la Universidad de León,

Dr. Luis Enrique Sáenz de Miera y Carnicer, Profesor titular del Área de Genética, Departamento de Biología Molecular, de la Universidad de León,

CERTIFICAN: que la tesis titulada

“Los humedales construidos como sistemas para el tratamiento de agua residual industrial y urbana. Caracterización de las comunidades de bacterias presentes en estos ecosistemas”,

ha sido realizada por Doña Paula Arroyo Hernández bajo su dirección y reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En León, a 13 de Mayo de 2010

Fdo: Dra. Gemma Ansola González

Fdo: Dr. Luis E. Sáenz de Miera y Carnicer

**Para MI FAMILIA,**

# Agradecimientos

Es difícil resumir en una página el apoyo que he tenido por parte de muchas personas para la realización de este trabajo. Sé que todos ellos saben que este trabajo es también en gran parte suyo.

Quiero citar en primer lugar a mis directores, Gemma Ansola y Luis Sáenz. Gracias por vuestra confianza, respeto, apoyo y disponibilidad. Son muchas las horas y el esfuerzo que habéis puesto en este trabajo.

A Estanislao de Luis su confianza en mí desde el primer día. Trabajar contigo siempre ha sido positivo y enriquecedor.

Al Área de Ecología y al de Genética donde siempre he recibido el apoyo de todos los profesores, laborales y becarios.

A la Diputación de León, y de forma particular al Servicio de Medio Ambiente y a la Escuela Taller de Medio Ambiente.

A mis compañeros tanto del Área de Ecología como del IMA, especialmente a Jose y Luis, con los que he compartido muchas cosas. Y también a mis amigos de siempre por su apoyo.

Finalmente, quiero agradecer mis padres y hermanos por todo lo que me habéis apoyado, por vuestro cariño y confianza, estando siempre cerca y dándome las fuerzas que necesitaba para seguir.

Y a Jorge. Por todo tu cariño, apoyo, por los ánimos que siempre me has dado y las aportaciones a este trabajo. Gracias por todos los momentos compartidos, y por los que seguro vendrán.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Sistemas naturales para la depuración de agua contaminada .....</b>	<b>1</b>
1.1. Contaminación de las aguas superficiales.....	1
1.2. La necesidad de depuración del agua residual.....	3
1.3. Sistemas naturales para la depuración del agua residual.....	6
1.4. Humedales artificiales.....	7
1.5. La contaminación del agua superficial con metales.....	9
1.6. Los humedales artificiales como sistemas para el tratamiento de agua contaminada con metales .....	11
<b>2. Las bacterias en los humedales artificiales .....</b>	<b>15</b>
2.1. Dominio Bacteria. (Filogenia del Dominio Bacteria) .....	15
2.2. El papel de las bacterias en la degradación/transformación de contaminantes orgánicos e inorgánicos en los humedales artificiales .....	18
2.2.1. Eliminación biológica de materia orgánica.....	19
2.2.2. Eliminación biológica de nitrógeno y fósforo.....	21
2.2.3. Amonificación, nitrificación, desnitrificación y reducción desasimilatoria del nitrato .....	21
2.2.4. Oxidación anaerobia del amonio (Anammox).....	23
2.2.5. Eliminación de fósforo .....	23
2.2.6. Eliminación de metales.....	24
2.3. Técnicas moleculares para el estudio de las comunidades de bacterias .....	25
2.3.1. Clonación y secuenciación.....	27
2.3.2. Técnicas de fingerprinting.....	28
2.3.3. Hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH) .....	29
2.4. Estructura y composición de las comunidades de bacterias en humedales artificiales.....	30
<b>BIBLIOGRAFÍA INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
<b>1. Plantas piloto .....</b>	<b>45</b>
1.1. Planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial.....	45
1.2. Planta piloto a escala real para el tratamiento de agua residual urbana .....	49
<b>2. Recogida de muestras.....</b>	<b>52</b>
2.1. De la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial.....	52
2.1.1. Muestreo de agua.....	52
2.1.2. Recogida de muestras para el análisis de las comunidades de bacterias...	53
2.2. De la planta piloto a escala real para el tratamiento de agua residual urbana.....	54
2.2.1. Muestreo de agua.....	54
2.2.2. Muestreo de sedimento.....	54
2.2.3. Muestreo de vegetación.....	56
2.2.4. Recogida de muestras para el análisis de las comunidades de bacterias...	58

<b>3. Métodos analíticos .....</b>	<b>59</b>
<b>4. Técnicas moleculares .....</b>	<b>62</b>
4.1. Extracción directa del DNA genómico .....	63
4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	63
4.3. Reacciones de ligación .....	64
4.4. Experimentos de transformación .....	64
4.5. Análisis rápido de plásmidos .....	65
4.6. Secuenciación .....	65
<b>5. Análisis de las secuencias .....</b>	<b>65</b>
5.1. Análisis comparativo de las secuencias con las bases de datos.....	65
5.2. Alineamiento .....	66
5.3. Análisis de la información filogenética.....	66
5.3.1. Composición .....	66
5.3.2. Riqueza y diversidad.....	67
5.3.3. Análisis comparativo.....	69
<b>6. Análisis de datos .....</b>	<b>70</b>
<b><i>BIBLIOGRAFÍA MATERIAL Y MÉTODOS.....</i></b>	<b><i>73</i></b>
<b><i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</i></b>	<b><i>77</i></b>
<b>1. Eliminación de metales pesados en el sistema piloto para el tratamiento de agua residual industrial .....</b>	<b>77</b>
<b>2. El MJEA® como Sistema a Escala Real para el Tratamiento de Agua Residual Urbana.....</b>	<b>87</b>
2.1. Características del Agua Residual.....	87
2.2. Características del Sedimento.....	99
2.3. Características de la Vegetación .....	104
2.4. Evaluación del MJEA® como sistema para la eliminación de metales pesados del agua residual .....	106
<b>3. Análisis de las Comunidades de Bacterias en Humedales Artificiales.....</b>	<b>108</b>
3.1. Composición de las comunidades de bacterias.....	111
3.1.1. Descripción de los taxones identificados en las comunidades de bacterias estudiadas.....	117
3.1.2. Composición de las comunidades de bacterias en la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial .....	153
3.1.3. Composición de las comunidades de bacterias en la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual urbana .....	157
3.2. Riqueza y diversidad de las comunidades de bacterias .....	161
3.3. Análisis comparativo de las comunidades de bacterias.....	169
<b><i>BIBLIOGRAFÍA RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</i></b>	<b><i>175</i></b>
<b><i>CONCLUSIONES .....</i></b>	<b><i>181</i></b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
Tabla 1. Contaminantes presentes en un agua residual y sus posibles efectos sobre las aguas receptoras.....	4
Tabla 2. Rangos de concentración de los principales contaminantes del agua residual urbana.....	5
Tabla 3. Comparación entre los sistemas de depuración de aguas intensivos y naturales .....	6
Tabla 4. Principales efectos sobre la salud humana de algunos metales pesados .....	10
<b>BIBLIOGRAFÍA INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
Tabla 5. Parámetros químicos medios del agua procedente de la Estación de Tratamiento de Agua Potable del Porma (ETAP del Porma, León).....	46
Tabla 6. Conjunto de microecosistemas utilizados en el experimento .....	48
Tabla 7. Relación de muestreos realizados en el sistema de tratamiento de agua residual industrial. Muestras de agua.....	52
Tabla 8. Relación de muestreos realizados en el sistema de tratamiento de agua residual industrial. Muestras para el análisis de las comunidades de bacterias...53	
Tabla 9. Relación de muestreos realizados en el MJEA®. Muestras de agua, sedimento y vegetación .....	57
Tabla 10. Relación de muestreos realizados en el sistema de tratamiento de agua residual urbana para el estudio de las comunidades de bacterias.....	59
Tabla 11. Técnicas analíticas utilizadas en el análisis de muestras de agua residual urbana.....	61
<b>BIBLIOGRAFÍA MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>73</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>
Tabla 12. Concentración media y desviación estándar de zinc en el afluente y en el efluente; índice de eliminación de este metal pesado en el agua y valor medio de pH en el efluente para cada tratamiento .....	78
Tabla 13. Concentración media y desviación estándar de arsénico en el afluente y efluente; índice de eliminación de este metaloide en el agua y valor medio de pH en el efluente para cada tratamiento .....	79
Tabla 14. Resultados obtenidos al aplicar el estadístico de contraste Kruskal-Wallis para identificar diferencias estadísticamente significativas en la eliminación de zinc y arsénico entre los distintos tratamientos .....	81
Tabla 15. Tratamientos, muestreo, índice de eliminación de zinc y valor medio de pH, en los muestreos en los que se ha calculado una eliminación negativa de este metal.....	81
Tabla 16. Tratamientos, muestreo, índice de eliminación de arsénico y valor medio de pH, en los muestreos en los que se ha medido una eficacia negativa en la eliminación de este metaloide .....	82
Tabla 17. Resultados de los contrastes no paramétricos en relación a la eficiencia en la eliminación de zinc entre los distintos tratamientos .....	83



Tabla 18. Resultados de los contrastes no paramétricos en relación a la eficiencia en la eliminación de arsénico entre los distintos tratamientos.....	83
Tabla 19. Resultados obtenidos en la prueba de Friedman para la identificación de diferencias significativas en la eliminación de zinc a lo largo del tiempo .....	84
Tabla 20. Resultados obtenidos en la prueba de Friedman para la identificación de diferencias significativas en la eliminación de arsénico a lo largo del tiempo .....	85
Tabla 21. Valores medios y desviación estándar de los parámetros físico-químicos monitorizados en las diferentes etapas del sistema piloto a escala real.....	87
Tabla 22. Valores medios y desviación estándar de los parámetros relativos a indicadores fecales monitorizados en las diferentes etapas del sistema piloto a escala real.....	88
Tabla 23. Eliminación media para diferentes parámetros químicos y microbiológicos en el MJEA® .....	93
Tabla 24. Eliminación media en cada etapa del MJEA® .....	94
Tabla 25. Concentración media y desviación estándar de los metales pesados estudiados en las distintas etapas del MJEA® .....	95
Tabla 26. Índice de eliminación medio y desviación estándar de los metales pesados estudiados en el agua del afluente y del efluente del MJEA® .....	96
Tabla 27. Índice de eliminación medio y desviación estándar de los metales pesados estudiados en el agua en las etapas del MJEA® .....	97
Tabla 28. Concentración media de metales pesados en el sedimento en peso seco y su desviación estándar .....	99
Tabla 29. Concentración de metales pesados en el sedimento del MJEA® en comparación con los datos presentados en otros estudios tanto en humedales artificiales como en humedal naturales.....	100
Tabla 30. Resultados de la prueba U de Mann-Whitney en la comparación de la concentración de metales pesados en el sedimento de las diferentes etapas del MJEA® .....	101
Tabla 31. Valores medios de pH, potencial Red-Ox y porcentaje de materia orgánica .....	101
Tabla 32. Concentración media de metales pesados en el sedimento en peso seco y su desviación estándar. Los datos se refieren al estrato orgánico y al estrato inorgánico del perfil muestreado .....	102
Tabla 33. Parámetros relacionados con los sedimentos acumulados en los ecosistemas artificiales del MJEA® .....	103
Tabla 34. Cantidad en kilogramos de metales pesados acumulados en los sedimentos de los ecosistemas artificiales del MJEA® .....	103
Tabla 35. Valores límite de metales pesados en lodos procedentes de instalaciones de depuración de agua residual de acuerdo con el Anexo I B del Real Decreto 1310/1990, y concentraciones medias de estos metales pesados en los sedimentos del MJEA® .....	103
Tabla 36. Concentración media en peso seco y desviación estándar de los metales pesados estudiados en la parte aérea de <i>Typha latifolia</i> , <i>Iris pseudacorus</i> y <i>Salix atrocinerea</i> .....	104
Tabla 37. Concentración media en peso seco y desviación estándar de los metales pesados estudiados en la parte subterránea de <i>Typha latifolia</i> , <i>Iris pseudacorus</i> y <i>Salix atrocinerea</i> .....	104

Tabla 38. Ratios de acumulación, parte aérea/parte subterránea, de metales pesados en la biomasa de <i>Typha latifolia</i> , <i>Iris pseudacorus</i> y <i>Salix atrocinerea</i> .....	105
Tabla 39. Cantidad estimada de metales pesados eliminados del sistema de tratamiento mediante la poda y recogida de <i>Typha latifolia</i> a lo largo de los 9 años de funcionamiento del sistema.....	106
Tabla 40. Número de secuencias obtenidas para cada uno de los microecosistemas estudiados en la planta piloto a pequeña escala .....	109
Tabla 41. Número de secuencias obtenidas para cada uno de los ambientes estudiados en la planta piloto a escala real. ....	109
Tabla 42. Resultados obtenidos en el análisis de correspondencias realizado para las comunidades de bacterias presentes en la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial y los taxones, a nivel de orden, identificados.....	154
Tabla 43. Número de secuencias obtenidas y su afiliación a nivel de filo, clase y orden, en las comunidades de bacterias presentes en los tratamientos control. ....	154
Tabla 44. Número de secuencias obtenidas y su afiliación a nivel de filo, clase y orden, en las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de <i>Typha latifolia</i> en los tratamientos de la planta piloto a pequeña escala. ....	155
Tabla 45. Número de secuencias obtenidas y su afiliación a nivel de filo, clase y orden, en las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de <i>Phragmites australis</i> en los tratamientos de la planta piloto a pequeña escala.....	156
Tabla 46. Resultados obtenidos en el análisis de correspondencias realizado para las comunidades de bacterias presentes en la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial y los taxones, a nivel de orden, identificados. Se presenta la varianza explicada por todos los ejes o dimensiones.....	158
Tabla 47. Número de secuencias obtenidas y su afiliación en las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de <i>Typha latifolia</i> a finales de verano y de invierno y a la rizosfera de <i>Salix atrocinerea</i> a finales de verano y de invierno. ....	159
Tabla 48. Número de secuencias obtenidas y su afiliación a nivel de filo, clase y orden, en las comunidades de bacterias en el sedimento de la laguna de micrófitos.....	160
Tabla 49. Número de secuencias obtenidas y su afiliación a nivel de filo, clase y orden, en las comunidades de bacterias en el agua de la laguna de micrófitos y en el agua del humedal artificial plantado con <i>Typha latifolia</i> . ....	161
Tabla 50. Número de OTUs observados, índice de dominancia de Simpson, índice de diversidad de Shanon-Wiener y riqueza estimada para las comunidades de bacterias estudiadas en la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial.....	166
Tabla 51. Número de OTUs obsevados, índice de dominancia de Simpson, índice de diversidad de Shanon-Wiener y riqueza estimada para las comunidades de bacterias estudiadas en la planta piloto a escala real para el tratamiento de agua residual urbana.....	168
Tabla 52. Resultados del análisis comparativo de cada comunidad con el resto de comunidades estudiadas. La tabla muestra el valor del estadístico Weighted UniFrac para cada comunidad de bacterias de los distintos tratamientos de la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial.....	169
Tabla 53. Resultados del análisis comparativo de cada comunidad con el resto de comunidades estudiadas. La tabla muestra el valor del estadístico Weighted	

UniFrac para cada comunidad de bacterias de los distintos tratamientos de la planta piloto para el tratamiento de agua residual urbana.....	169
Tabla 54. Resultados del Análisis de Componentes Principales.....	171

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
Figura 1. <i>Árbol filogenético universal esquemático inferido a partir de análisis comparativos de secuencias del gen codificante para el rRNA 16S.....</i>	16
Figura 2. <i>Esquema conceptual no basado en datos concretos.....</i>	17
Figura 3. <i>Árbol filogenético del dominio Bacteria.....</i>	18
Figura 4. <i>Principales reacciones químicas catalizadas por bacterias en el ciclo del nitrógeno en los humedales artificiales.....</i>	21
Figura 5. <i>Estrategias de análisis de comunidades de bacterias.....</i>	27
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
Figura 6. <i>Detalle de la planta piloto experimental para el tratamiento de agua residual industrial sintética en la segunda fase de funcionamiento.....</i>	47
Figura 7. <i>Esquema general de la planta piloto en la segunda fase de funcionamiento.....</i>	48
Figura 8. <i>Localización del municipio de Cea en la provincia de León.....</i>	49
Figura 9. <i>Etapas del MJEA® para el tratamiento del agua residual urbana de la localidad de Bustillo de Cea.....</i>	50
Figura 10. <i>Perfil de la primera balsa, laguna de micrófitos.....</i>	50
Figura 11. <i>Perfil del humedal artificial con <i>Typha latifolia</i>.....</i>	51
Figura 12. <i>Perfil de los humedales artificiales con <i>Iris pseudacorus</i> y <i>Salix atrocinerea</i>.....</i>	51
Figura 13. <i>Puntos de muestreo de agua residual en los diferentes ecosistemas artificiales del MJEA®.....</i>	55
Figura 14. <i>Muestreo del sedimento acumulado en la laguna de micrófitos.....</i>	56
Figura 15. <i>Secado de la biomasa subterránea y aérea de <i>Typha latifolia</i>.....</i>	57
Figura 16. <i>Esquema que muestra las diferentes fases del proceso realizado para la determinación de las comunidades de bacterias).....</i>	62
Figura 17. <i>Índices y modelos utilizados para el estudio de la riqueza específica y la diversidad de las comunidades de bacterias en este trabajo.....</i>	69
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>
Figura 18. <i>Diagrama de cajas de Tukey de la concentración de zinc en el efluente... 79</i>	79
Figura 19. <i>Diagrama de cajas de Tukey de la concentración de arsénico en el efluente.....</i>	80
Figura 20. <i>Eficiencia en la eliminación media de zinc en los diferentes tratamientos, a lo largo de las distintas fases del experimento.....</i>	84
Figura 21. <i>Eficiencia en la eliminación media de arsénico en los diferentes tratamientos, a lo largo de las distintas fases del experimento.....</i>	85

Figura 22. Diagramas de cajas de Tukey de parámetros físico-químicos e indicadores fecales. ....	92
Figura 23. Índice de eliminación de hierro, arsénico, manganeso y plomo en los tres etapas del humedal artificial.....	98
Figura 24. Productos de PCR del gen codificante para el rRNA 16S. ....	108
Figura 25. Análisis rápido de plásmidos.....	108
Figura 26. Árbol filogenético de las secuencias identificadas como cloroplastos y cianobacterias procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas. ....	110
Figura 27. Ejemplo de secuencia identificada como quimera o recombinante.....	111
Figura 28. Número de secuencias de las comunidades de bacterias presentes en el sustrato de los tratamientos control de la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial y filo en el que se clasifican.	112
Figura 29. Número de secuencias de las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de <i>Typha latifolia</i> en los tratamientos plantados con esta especie vegetal en la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial y filo en el que se clasifican. ....	113
Figura 30. Número de secuencias de las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de <i>Phragmites australis</i> en la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial y filo en el que se clasifican. ....	113
Figura 31. Número de secuencias de las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de <i>Typha latifolia</i> y <i>Salix atrocinerea</i> de la planta piloto para el tratamiento de agua residual urbana y filo en el que se clasifican.....	114
Figura 32. Número de secuencias de las comunidades de bacterias del sedimento de la laguna de micrófitos y comunidades de bacterias en el agua de la laguna de micrófitos y del humedal plantado con <i>Typha latifolia</i> de la planta piloto para el tratamiento de agua residual urbana y filo en el que se clasifican. ....	114
Figura 33. Riqueza definida a nivel de filo de las comunidades de bacterias estudiadas de acuerdo con los resultados obtenidos mediante en análisis comparativo con las bases de datos RDP, y GreenGenes y la clasificación filogenética realizada. ....	115
Figura 34. Iconografía utilizada en la elaboración de los árboles filogenéticos.....	117
Figura 35. Árbol filogenético esquemático de las secuencias identificadas como proteobacterias.....	118
Figura 36. Árbol filogenético esquemático de las secuencias afiliadas a la clase Alfabroteobacteria.....	119
Figura 37. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Alfabroteobacteria, orden Rhizobiales. ....	120

Figura 38. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Alfaproteobacteria, órdenes Rhodobacterales, Caulobacterales y Rhodospirillales.....	121
Figura 39. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Alfaproteobacteria, órdenes Sphingomonadales y Orden I.....	122
Figura 40. Árbol filogenético esquemático de las secuencias afiliadas a la clase Betaproteobacteria .....	123
Figura 41. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Betaproteobacteria, orden Burkholderiales.....	124
Figura 42. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Betaproteobacteria, orden Burkholderiales (II).....	125
Figura 43. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Betaproteobacteria, órdenes Nitrosomonadales, Neisseriales, Rhodocyclales y Orden I.....	126
Figura 44. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Betaproteobacteria, órdenes Hydrogenophilales, Methylophilales y otros órdenes sin identificar.....	127
Figura 45. Árbol filogenético esquemático de las secuencias afiliadas a la clase Gammaproteobacteria.....	128
Figura 46. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Gammaproteobacteria, órdenes Enterobacterales y Aeromonadales.....	129
Figura 47. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Gammaproteobacteria, orden Pseudomonadales.....	130
Figura 48. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Gammaproteobacteria, órdenes Methylococcales, Xanthomonadales, Legionellales, Thiotrichales y otros órdenes sin identificar.....	131
Figura 49. Árbol filogenético esquemático de las secuencias afiliadas a las clases Deltaproteobacteria y Epsilonproteobacteria.....	132
Figura 50. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a las clases Delta y Epsilonproteobacteria.....	133
Figura 51. Árbol filogenético esquemático de las secuencias afiliadas al filo Bacteroidetes y árbol expandido del filo Chlorobi.....	135
Figura 52. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Flavobacteria ...	136
Figura 53. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Bacteroidia.....	137
Figura 54. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Sphingobacteria.....	138
Figura 55. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al filo Acidobacteria.....	140
Figura 56. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a filo Fibrobacteres.....	141
Figura 57. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al filo Actinobacteria.....	142

Figura 58. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al filo Firmicutes.....	143
Figura 59. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al filo Cyanobacteria.....	144
Figura 60. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al filo Chloroflexi.....	146
Figura 61. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al filo Planctomycetes.....	147
Figura 62. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al filo Verrucomicrobia ..	148
Figura 63. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al filo Nitrospirae.....	149
Figura 64. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al filo Gemmatimonadetes.....	151
Figura 65. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al filo Synergistetes.....	151
Figura 66. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al filo Spirochaetes.....	151
Figura 67. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a filos sin individuos cultivados así como secuencias sin afiliación definida.....	152
Figura 68. Biplot del análisis de correspondencias realizado para las comunidades de bacterias de la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial y los distintos taxones.....	153
Figura 69. Biplot del análisis de correspondencias realizado para las comunidades de bacterias de la planta piloto para el tratamiento de agua residual urbana y los distintos taxones .....	157
Figura 70. Curvas de acumulación y curvas de rarefacción para comunidad de bacterias estudiada .....	164
Figura 71. Análisis cluster jerárquico de las comunidades de bacterias estudiadas	171
Figura 72. Diagramas biplot con los ejes I y II, y I y III del Análisis de Componentes Principales.....	172

# 1

# INTRODUCCIÓN

## **1. Sistemas naturales para la depuración de agua contaminada**

### **1.1. Contaminación de las aguas superficiales**

“El agua es un recurso natural escaso, indispensable para la vida y para el ejercicio de la inmensa mayoría de las actividades económicas; es irremplazable, no ampliable por la mera voluntad del hombre, irregular en su forma de presentarse en el tiempo y en el espacio, fácilmente vulnerable y susceptible de usos sucesivos.

Asimismo, el agua constituye un recurso unitario, que se renueva a través del ciclo hidrológico y que conserva, a efectos prácticos, una magnitud casi constante dentro de cada una de las cuencas hidrográficas del país”.

Con estas afirmaciones, que recogen la importancia del agua para la vida así como para el desarrollo económico y social de la población, comienza el preámbulo del Texto Refundido de la Ley de Aguas del Estado Español, aprobado por el Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio de 2001.



El agua es un recurso natural que en la actualidad se encuentra sometido a fuertes presiones que pueden condicionar tanto su disponibilidad como sus condiciones de calidad. La demanda social de agua de buena calidad para múltiples usos, desde el abastecimiento humano hasta la agricultura y la industria, debe coexistir con las funciones ecológicas propias del agua y de los ecosistemas acuáticos.

La calidad del agua es una variable fundamental del estado de los ecosistemas acuáticos, tanto desde el punto de vista de su caracterización ambiental, como desde la perspectiva de la planificación y gestión hidrológica, ya que delimita la aptitud del agua para mantener los ecosistemas y atender las diferentes demandas (Dimas *et al.*, 2004). Diversos factores pueden modificar las características del recurso y de los ecosistemas acuáticos, degradando así la calidad del agua y de dichos ecosistemas. La legislación europea y estatal define el término contaminación como *“la introducción directa o indirecta, como consecuencia de la actividad humana, de sustancias o calor en la atmósfera, el agua o el suelo, que puedan ser perjudiciales para la salud humana o para la calidad de los ecosistemas acuáticos, o de los ecosistemas terrestres que dependen directamente de ecosistemas acuáticos, y que causen daños a los bienes materiales o deterioren o dificulten el disfrute y otros usos legítimos del medio ambiente”* (Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de Octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas, Directiva Marco del Agua).

La contaminación del agua y con ella la perturbación y deterioro de los ecosistemas acuáticos, como consecuencia de los vertidos derivados de las actividades humanas, supone un grave riesgo para la salud y para el bienestar de las personas, así como un severo problema ambiental (Ruiz, 1998). Desde el punto de vista ambiental, la contaminación de las aguas no sólo tiene un efecto negativo sobre buena parte de la vegetación y la fauna asociadas al propio ecosistema acuático, sino que también ocasiona un desequilibrio perjudicial para todo el ecosistema terrestre que depende de estas masas de agua.

En la actualidad se estima en más de un millón el número de sustancias diferentes que llegan a los cauces naturales a partir de vertidos de origen antropogénico (Förstner *et al.* 1993), muchas de las cuales alteran el equilibrio de los ecosistemas y/o son nocivas para la salud pública.

La preocupación por el mantenimiento de los ecosistemas acuáticos en un buen estado ecológico ha sido puesta de manifiesto en los últimos años a través de la articulación de diferentes directivas europeas transpuestas al ordenamiento jurídico español. La política comunitaria ha tendido a unificar todas estas directrices en materia de aguas mediante la Directiva Marco del Agua la cual, finalmente ha englobado diferentes aspectos sectoriales relativos a la gestión y conservación de los ecosistemas acuáticos. Esta Directiva contempla otras leyes sobre el agua que no han sido derogadas, como las directivas sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas y la contaminación por nitratos, las normativas relativas a la autorización y utilización de pesticidas y la Directiva IPPC sobre la prevención y control integrados de la contaminación. Otras directivas europeas relacionadas con la calidad del agua son la directiva sobre las aguas destinadas al consumo humano (Directiva 98/83/CE del Consejo, de 3 de noviembre de 1998, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano) y la nueva Directiva 2006/7/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de febrero de 2006, relativa a la gestión de la calidad de las aguas de baño y por la que se deroga la Directiva 76/160/CEE, que comenzó a aplicarse en el año 2008.

## 1.2. La necesidad de depuración del agua residual

Los vertidos de aguas residuales se definen como cualquier material de desecho que las instalaciones industriales o energéticas, las ciudades o núcleos de población o las actividades agrícolas o ganaderas arrojan al agua. Las aguas residuales son por tanto, las aguas usadas que, procedentes de las viviendas, del sector servicios y de las industrias, son evacuadas por las instalaciones de saneamiento hasta el medio receptor. Estas aguas contienen una serie de sustancias que se incorporan al agua por los diferentes usos, provocando su contaminación. La legislación estatal recoge en el artículo 2 del Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas, las siguientes definiciones:

*“Aguas residuales urbanas: Las aguas residuales domésticas o la mezcla de éstas con aguas residuales industriales o con aguas de escorrentía pluvial.*

*Aguas residuales domésticas: Las aguas residuales procedentes de zonas de vivienda y de servicios, generadas principalmente por el metabolismo humano y las actividades domésticas.*

*Aguas residuales industriales: Todas las aguas residuales vertidas desde locales utilizados para cualquier actividad comercial o industrial, que no sean aguas residuales domésticas ni aguas de escorrentía pluvial.”*

Los aportes de aguas residuales a los cauces receptores son el origen de diversos problemas ambientales en estos ecosistemas acuáticos (Tabla 1). La legislación comunitaria así como la estatal exige procesos de depuración de estas aguas con el fin de disminuir el impacto ambiental que producen ya que la adecuada depuración de las aguas residuales es fundamental para la consecución de los objetivos establecidos por la Directiva Marco del Agua. De hecho, en algunos estados europeos donde las medidas de saneamiento empezaron a implantarse en los años setenta se ha producido la recuperación de la calidad físico-química de los cauces fluviales (Prat, 1997).

Pueden diferenciarse tres posibles tipos de vertidos en las aguas continentales según su origen. Son los siguientes:

### a. Vertidos industriales.

Su tipología es muy variada en función del tipo de industria considerada. Normalmente las industrias poseen sistemas eficaces de depuración del agua residual industrial.

Los principales problemas de contaminación que generan estos vertidos son la modificación del pH del agua; la disminución o eliminación del oxígeno disuelto en el agua, que afecta negativamente a los organismos acuáticos; eutrofización de las aguas promovida por la presencia de fósforo o nitrógeno en el agua, obstrucciones en las conducciones, abrasión y desgaste en las bombas y equipos diversos debido a materia en suspensión; problemas de toxicidad y bioacumulación por la presencia de metales pesados.

### b. Vertidos urbanos.

Las aguas residuales urbanas se caracterizan básicamente por su contaminación orgánica. Además, es frecuente que existan redes de saneamiento unitarias de forma que el alcantarillado arrastra todo tipo de sustancias: emisiones de los automóviles (hidrocarburos, metales, etc.), sales, ácidos, etc.

En general, el agua residual urbana contiene un 99% de agua y un 1% de materia sólida. Esta materia está constituida en un 70% por sustancias orgánicas como proteínas, grasas y carbohidratos; mientras que el 30% restante es materia mineral insoluble como arena, arcilla o grava (Tabla 2).

La materia orgánica de un agua residual urbana o doméstica está formada mayoritariamente por materia fecal. Además, también contiene hidratos de carbono (celulosa, almidón y azúcares), grasas y jabones (sales metálicas de los ácidos grasos), detergentes sintéticos, proteínas y sus productos de descomposición (urea, glicina y cisteína) así como hidróxido de amonio y sales amoniacaes procedentes de la descomposición de complejos orgánicos nitrogenados (Rivas Mijares, 1978; Knobelsdorf, 2005).

a. Vertidos agrícolas y ganaderos.

Los trabajos agrícolas producen vertidos de pesticidas, fertilizantes y restos orgánicos de animales y plantas que contaminan de una forma difusa pero muy importante las aguas superficiales y subterráneas. Las actividades ganaderas dan lugar a vertidos con alta carga orgánica, vertidos que en muchas ocasiones son directos ya que no van a la red de saneamiento, y por tanto son difíciles de controlar. En España se estima que el 65% de los 6000 vertidos directos que se realizan proceden del sector ganadero (Hispagua, 2006). El problema más acuciante en este sentido lo suponen los purines de cerdo con su alta carga orgánica nitrogenada.

Tabla 1. Contaminantes presentes en un agua residual y sus posibles efectos sobre las aguas receptoras (Dewisme, 1997).

<b>Contaminantes del agua</b>	<b>Impactos más significativos</b>
Sólidos en suspensión	Aumento de la turbidez del agua, alteración de la fotosíntesis y reducción de la producción. Sedimentación en el lecho del río, lo que puede provocar que quede cubierto.
Compuestos inorgánicos	Ecotoxicidad de algunos compuestos como las sales de algunos metales. Reacciones con sustancias disueltas en el agua que pueden formar compuestos tóxicos.
Conductividad	Concentraciones elevadas de sales pueden perjudicar gravemente la supervivencia de distintas especies de animales y vegetales.
Nutrientes	Crecimiento masivo de algas y bacterias (aumento de la turbidez del agua). Eutrofización.
Materia orgánica	Su descomposición puede provocar una disminución de la concentración de oxígeno disuelto en el agua hasta condiciones que pueden perjudicar la supervivencia de animales y plantas. Eutrofización. Emisión de metano en el caso de que tenga lugar una descomposición anaerobia.
Organismos patógenos (bacterias, virus y parásitos)	Aparición de enfermedades de transmisión hídrica asociadas a la contaminación microbiológica del agua. Posible contaminación de organismos.
Contaminación térmica	Alteración del ecosistema acuático. Modificación de la solubilidad del oxígeno en el agua.

Tabla 2. Rangos de concentración de los principales contaminantes del agua residual urbana (Metcalf y Eddy, 2003).

<b>Componente</b>	<b>Rango medio</b>	<b>Valor típico</b>
Sólidos totales (mg l <sup>-1</sup> )	375-1800	740
Sólidos sedimentables (mg l <sup>-1</sup> )	5-20	10
Demanda biológica de oxígeno (mg O <sub>2</sub> l <sup>-1</sup> )	110-400	210
Demanda química de oxígeno (mg O <sub>2</sub> l <sup>-1</sup> )	200-780	400
Carbono orgánico total (mg C l <sup>-1</sup> )	80-290	150
Nitrógeno total (mg N l <sup>-1</sup> )	20-85	40
Nitrógeno orgánico (mg N l <sup>-1</sup> )	8-35	20
Amonio (mg N l <sup>-1</sup> )	12-50	20
Nitritos y nitratos (mg N l <sup>-1</sup> )	0	0
Fósforo total (mg P l <sup>-1</sup> )	4-15	8
Fósforo orgánico (mg P l <sup>-1</sup> )	1-5	3
Fósforo inorgánico (mg P l <sup>-1</sup> )	3-10	5
pH	6,5-7,5	7
Alcalinidad (mg CaCO l <sup>-1</sup> )	50-200	100
Dureza (mg CaCO l <sup>-1</sup> )	180-350	240
Cloruros (mg Cl <sup>-</sup> l <sup>-1</sup> )	30-100	50
Grasas (mg l <sup>-1</sup> )	50-150	100

Por depuración del agua residual se entiende el conjunto de procesos y tratamientos físicos, químicos y/o biológicos a los que debe someterse el agua residual con el objetivo de reducir la carga contaminante presente hasta alcanzar unos determinados parámetros de calidad antes de su vertido final o de su reutilización. En función de las características del punto de vertido así como de los posteriores usos de ese agua, en el caso de la reutilización, los parámetros de calidad que deberán alcanzarse serán más o menos exigentes.

La Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas, transpuesta al ordenamiento jurídico español mediante el Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas; y el Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del citado Real Decreto-Ley y su modificación por el Real Decreto 2116/1998, de 2 de octubre, constituyen el marco normativo fundamental del tratamiento de las aguas residuales.

En la actualidad, se encuentra vigente el Plan Nacional de Calidad de las Aguas: Saneamiento y Depuración (2007-2015), elaborado para dar respuesta tanto a los objetivos no alcanzados por el anterior Plan Nacional de Saneamiento y Depuración (1995-2005), como a las nuevas necesidades planteadas por la Directiva Marco del Agua y por el Programa AGUA.

Otra norma destacable en relación con las aguas depuradas es el Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. Esta norma define el concepto de reutilización, introduce la denominación de aguas regeneradas, determina los requisitos necesarios para llevar a cabo la actividad de utilización de aguas regeneradas y los procedimientos para obtener la concesión exigida en la Ley e incluye disposiciones relativas a los usos admitidos y exigencias de calidad precisas en cada caso.

### 1.3. Sistemas naturales para la depuración del agua residual

Los cauces fluviales así como los humedales han sido desde antiguo receptores directos o indirectos de la mayor parte de los residuos líquidos generados por el hombre. Estos ecosistemas, gracias a los procesos de autodepuración que en ellos se suceden, han sido capaces de soportar e incluso depurar las cargas contaminantes que recibían. En la actualidad, el ritmo de generación de residuos líquidos así como las características cualitativas de los mismos, no hacen posible que pueda hablarse de procesos de autodepuración.

Por ello, el hombre ha desarrollado distintos sistemas para tratar y depurar las aguas residuales. Junto a los sistemas convencionales para el tratamiento del agua, se han desarrollado también los denominados sistemas naturales de depuración, también llamados sistemas blandos, extensivos o no convencionales.

Los sistemas naturales de depuración del agua son tecnologías resultado de un ejercicio de diseño ecológico tomando como fuente de partida e inspiración los ecosistemas acuáticos naturales (Martel *et al.*, 2006). En esencia, el funcionamiento de un sistema natural y el de un sistema convencional es el mismo. La diferencia fundamental entre ambos radica en la velocidad a la que ocurren los procesos de depuración. En un sistema convencional el proceso de depuración se realiza de forma secuencial y a velocidades altas para lo que se fuerza el sistema mediante el aporte de energía y, en algunos casos, de reactivos. En los sistemas naturales se trabaja a la velocidad natural propia de los procesos, sin gasto energético ni de otros reactivos. Se trata por tanto, de sistemas con una aireación natural y una baja concentración de bacterias, lo que conlleva la utilización de superficies de terreno grandes (sistemas extensivos) frente a la aireación mecánica, alta concentración de bacterias y poca superficie del reactor de los sistemas convencionales o intensivos. En los sistemas naturales el control del proceso es más complicado que en los tratamientos convencionales, ya que se dispone de menos posibilidades de actuación frente a las perturbaciones.

Tabla 3. Comparación entre los sistemas de depuración de aguas intensivos y naturales (Rodríguez-Roda *et al.*, 2008).

Sistemas intensivos	Sistemas naturales
Procesos artificiales y acelerados	Componentes naturales
Gasto económico importante debido a la necesidad de energía eléctrica para el mezclado y aporte de oxígeno	Obra civil limitada al movimiento de tierras
Mínima ocupación de espacio	Requerimiento significativo de ocupación del suelo
Necesidad de mano de obra y mantenimiento especializada	Necesidad de mano de obra con menor grado de especialización
Posibilidad de incidir y actuar sobre el proceso en un tiempo de reacción corto mediante la instalación de sistemas de monitorización y control automático	Mecanismos de depuración con mucha inercia. Poca posibilidad de afrontar perturbaciones de dinámica rápida
Elevado coste de mantenimiento debido a la cantidad de elementos eléctricos y mano de obra especializada	Integración en el medio natural

Los distintos tipos de sistemas naturales se pueden clasificar de múltiples formas, como por ejemplo en función de la intensidad del tratamiento o en función del tipo de biomasa activa. En unos casos, estos sistemas imitan las condiciones propias de los humedales naturales (humedales artificiales) o los procesos que de forma natural se dan en lagos y ríos (lagunajes). En otros casos se emplea el suelo como sistema natural para depurar (filtros verdes, zanjas, pozos y lechos filtrantes).

Con frecuencia estos sistemas o tecnologías no funcionan de forma independiente sino que se busca una combinación de los mismos para lograr el grado de depuración deseado.

#### **1.4. Humedales artificiales**

Los humedales son ecosistemas de ecotono o transición entre el medio terrestre y el medio acuático que funcionan como un enlace dinámico entre ambos medios. El Convenio de Ramsar (1971), ratificado por España en 1982, define en su artículo 1 a los humedales como: *“Extensiones de marismas, pantanos y turberas, o superficies cubiertas de agua, sean éstas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluidas las extensiones de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros”*.

Los humedales presentan una alta productividad. En ellos se desarrollan numerosos procesos biológicos debido a la acción de la energía solar, de los seres vivos y del suelo (Wetzel, 1993; Kadlec y Knight, 1996; Mitsch y Gosselink, 2000). Se encuentran entre los ecosistemas más productivos del mundo, proporcionando el soporte de agua y producción primaria del cual dependen para su supervivencia un número incontable de especies de plantas y animales. Su importancia radica tanto en sus grandes valores ecológicos, una vegetación y una fauna especializada, como en las fundamentales funciones que desempeñan en el ciclo del agua y de la materia orgánica, soporte de redes tróficas, reciclado de nutrientes y filtro biogeoquímico.

Imitando las condiciones propias de los humedales naturales, se han creado los humedales artificiales o construidos como sistemas pasivos de depuración de agua. En estos ecosistemas, al igual que en los humedales naturales, se combina un entramado complejo de procesos físicos, químicos y biológicos por medio de los cuales se produce la depuración del agua. Por ello, son considerados como un complejo biorreactor.

Los humedales naturales se han empleado como sistemas de tratamiento de aguas contaminadas. Sin embargo, sus altos valores ecológicos junto con las mejores oportunidades que ofrecen los artificiales para la depuración, diseñados buscando la optimización de los procesos de eliminación de contaminantes, desaconsejan en la actualidad su empleo con dicha finalidad (Verhoeven y Meuleman, 1999).

El desarrollo de los humedales artificiales como sistemas para la depuración del agua tiene su origen en los experimentos realizados por Seidel en los años 50 en el Instituto Max-Planck de Alemania. Seidel recogió en sus trabajos como el paso de agua contaminada a través de la vegetación en un humedal permitía la eliminación de grandes cantidades de materia orgánica e inorgánica, bacterias, e incluso hidrocarburos y metales pesados (Seidel, 1964; Seidel, 1966; Brix *et al.*, 2007). Posteriormente, los trabajos de Kickuth (1977) consiguieron comenzar a despertar el interés de la comunidad científica y tecnológica en Europa hacia el empleo de los humedales artificiales. Sin embargo, los estudios sobre humedales artificiales fueron escasos hasta la celebración de la Segunda Conferencia Internacional sobre humedales artificiales desarrollada en Cambridge en 1990 (Cooper y Findlater, 1990). Desde entonces, se han construido por todo el mundo con la finalidad de tratar una gama amplia de aguas contaminadas. Su aplicación más

extendida se centra en el tratamiento de aguas residuales domésticas (Kadlec y Knight, 1996; Brix y Arias, 2005), y aguas de origen industrial (Cooper *et al.*, 1996; Maine *et al.*, 2006). Pero también se emplean como tratamientos pasivos de focos de contaminación difusa como son los drenajes ácidos de minas (Sobolewski, 1999; Jing *et al.*, 2001) y los drenajes de carreteras (Mc Neill y Olley, 1998).

Los humedales artificiales están formados por lagunas o canales poco profundos (generalmente menos de 1 m) plantados con individuos de especies propias de zonas húmedas o encharcadas (macrófitos acuáticos).

Pueden clasificarse según el esquema clásico de Brix (1993) en función del tipo de macrófito dominante en el ecosistema:

- a. Sistemas con macrófitos flotantes. Este tipo de macrófitos presentan una alta diversidad tanto en sus formas como en el hábitat que ocupan. Así, estas plantas pueden estar enraizadas al sustrato con hojas flotantes (por ejemplo el jacinto de agua, *Eichornia crassipes*, o la lechuga de agua, *Pistia stratiotes*), o presentar pequeñas o inexistentes raíces (por ejemplo las lentejas de agua, *Lemna sp.* y *Spirodela polyrhiza*) (Brix y Schierup, 1989).
- b. Sistemas con macrófitos sumergidos. En este caso los macrófitos dominantes tienen su sistema fotosintético totalmente sumergido (por ejemplo, *Elodea nuttallii*). Estas plantas sólo crecerán adecuadamente en aguas bien oxigenadas por lo que no se trata del sistema más adecuado para el tratamiento de aguas residuales (Brix, 1993).
- c. Sistemas con macrófitos emergentes. En este caso, los macrófitos se encuentran enraizados al sustrato y su sistema fotosintético está por encima de la lámina de agua. Es el caso de especies como la enea (*Typha latifolia*), el carrizo (*Phragmites australis*), o el lirio amarillo (*Iris pseudacorus*). En función de la circulación del agua en el humedal se dividen en dos subtipos principales:
  - c.1. Humedales de flujo hidráulico superficial. Presentan una lámina de agua no muy profunda, de 1 metro como máximo, y generalmente en torno a 40 centímetros que fluye por encima del sustrato. Esta lámina está expuesta directamente a la atmósfera y circula preferentemente a través de los tallos de los macrófitos. Estos humedales forman parte del grupo de los sistemas de depuración natural de los basados en la acción de mecanismos que suceden en el agua (como los lagunajes) (García *et al.*, 2004).
  - c.2. Humedales de flujo hidráulico subsuperficial. El agua discurre en ellos a través de un medio granular muy permeable en contacto con los rizomas y las raíces de los macrófitos. La profundidad de la columna de agua se establece en torno a los 60 centímetros. Dentro de este tipo de humedales de flujo subsuperficial existen a su vez, dos modalidades diferentes: humedales con flujo horizontal y humedales con flujo vertical. Este tipo de humedales de flujo subsuperficial pueden considerarse como una modificación de los sistemas clásicos de infiltración en el terreno. Formarían por tanto, parte de los sistemas naturales de depuración basados en la acción del terreno (como los filtros verdes y los sistemas de infiltración-percolación) (García *et al.*, 2004).

Existen diferentes modificaciones y variaciones sobre este esquema clásico de tipología de humedales artificiales. Con el objetivo de mejorar la depuración del agua residual, se han desarrollado sistemas híbridos, formados por una combinación de varios tipos de humedales que funcionan en serie (Vymazal, 2005). De esta forma, pueden combinarse humedales con distintos flujos hidráulicos o humedales con otro tipo de sistemas de tratamiento de agua residual, ya sean sistemas blandos o sistemas convencionales. La selección del humedal más apropiado dependerá de las características del agua residual, de la superficie disponible, así como de las necesidades de mantenimiento y gestión para cada situación específica.

## 1.5. La contaminación del agua superficial con metales

Algunos de los compuestos químicos potencialmente más tóxicos que llegan a los ecosistemas acuáticos son los metales pesados. Si bien es cierto que algunos de ellos desempeñan un papel específico y esencial como microelementos para el desarrollo de determinadas funciones vitales en los seres vivos, la modificación de sus concentraciones, o el tipo de especie química que forman en un determinado medio, puede provocar graves perturbaciones en el ecosistema.

El aporte de metales al ciclo hidrológico tiene su origen en procesos litológicos o geoquímicos, así como, y en su mayor parte, a procesos y actividades de origen antrópico. La minería, actividades industriales como la fabricación de papel, el tratamiento y tinte de productos textiles, la industria del metal, los depósitos de residuos o vertederos, infraestructuras lineales como las carreteras y autopistas y las aguas residuales urbanas son algunas de las principales fuentes de emisión de metales al medio acuático. Las concentraciones de metales en el agua se encuentran directamente relacionadas con las actividades humanas y vertidos de efluentes (Geesey *et al.*, 1984; Behrendt, 1997).

Los metales pesados, de acuerdo con su definición clásica, son aquellos elementos químicos que poseen un peso atómico comprendido entre 63,55 (cobre) y 200,59 (mercurio), y que tienen un peso específico superior a  $4\text{g/cm}^3$ . Esta definición no es sin embargo, la que se emplea de forma generalizada, ya que existen metales que a pesar de ser ligeros, como el berilio o el aluminio, se consideran metales pesados. Incluso se suelen considerar como metales pesados algunos metaloides como el arsénico, o no metales como el selenio o el boro. Lo que sin duda, sí que define y aglutina a todos los llamados metales pesados es su alta toxicidad (muy severa en algunos metales con concentraciones muy pequeñas); su persistencia en el medio y los procesos de bioacumulación o biomagnificación que se producen en la cadena trófica.

El estudio de los metales pesados en el medio acuático debe su importancia a este conjunto de características, las cuales hacen de su presencia en los ecosistemas acuáticos un problema ambiental y de salud pública de primer orden (Tabla 4).



Tabla 4. Principales efectos sobre la salud humana de algunos metales pesados (Rayner-Canham, 2002).

<b>Metal</b>	<b>Efecto sobre la salud humana</b>
Aluminio	Daños en el sistema nervioso central. Demencia. Pérdida de memoria. Apatía. Temblores severos. Probable relación con la enfermedad de Alzheimer.
Arsénico	La exposición prolongada puede causar lesiones de la piel, cáncer de piel y cáncer de pulmón, entre otros. La ingesta de grandes dosis produce problemas gastrointestinales, cardiovasculares, disfunciones del sistema nervioso y finalmente, la muerte.
Berilio	Efectos perjudiciales sobre el hígado, bazo y riñones. Desórdenes respiratorios y del sistema linfático. Probable agente carcinogénico en humanos y animales.
Cadmio	Una alta exposición se relaciona con cáncer de pulmón. Acumulación en el riñón donde causa daños irreparables. Interfiere en el sistema hormonal y en la síntesis de enzimas. Degeneración ósea, osteoporosis, osteomalacia.
Cromo	Alergias y erupciones cutáneas. Malestar de estómago y úlceras. Problemas respiratorios. Debilitamiento del sistema inmune. Daño en los riñones y en el hígado. Alteraciones del material genético. Cáncer de pulmón.
Mercurio	Absorción de vapores de este metal en los pulmones, que se disuelve en la sangre, y se transporta al cerebro. Daños irreversibles en el sistema nervioso central. Daños en el sistema renal y cardiovascular. La metilación del mercurio produce metilmercurio, especie química con importantes efectos teratogénicos.
Níquel	Fallos respiratorios, asma y bronquitis crónica. Elevada probabilidad de ser un agente cancerígeno para cáncer de pulmón, nariz y laringe. Mareos. Reacciones alérgicas cutáneas. Desórdenes cardiovasculares.
Plomo	Interfiere en una amplia gama de procesos bioquímicos, causando desde anemia y jaquecas hasta insuficiencia renal, convulsiones, daño cerebral y neurológico, y en último término, la muerte. Daños en el feto y abortos.
Selenio	Disfunciones gastrointestinales. Daños en el hígado y en el bazo. Anemia. Problemas respiratorios. Se considera un probable agente carcinógeno y un posible agente teratogénico.

La creciente amenaza a la calidad del agua debido a determinadas sustancias consideradas como peligrosas llevó a la Unión Europea, en los años 70, a establecer una limitación de las emisiones con el objetivo de reducir la contaminación. En este contexto se redactó la Directiva 76/464/CEE relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la Unión Europea. En esta Directiva se establecen dos listas de contaminantes. En la Lista I se incluyen sustancias seleccionadas en función de su toxicidad, persistencia y bioacumulación, definidas con el fin de eliminar la contaminación que ocasionan. La Lista II recoge sustancias que tienen efectos nocivos sobre el ecosistema acuático, definidas con el fin de reducir la contaminación que provocan.

La Directiva anterior se incorporó al ordenamiento jurídico español para las aguas continentales mediante el artículo 254 del Reglamento de Dominio Público Hidráulico, aprobado por el Real Decreto 849/1986, de 11 de abril, con sus distintas modificaciones, en particular las introducidas mediante el Real Decreto 606/2003, de 23 de mayo. El Reglamento de Dominio Público Hidráulico establece un régimen jurídico diferente para las autorizaciones de vertido que contengan sustancias incluidas en la Lista I, que se corresponde con el anexo I de la Directiva, o en la Lista II,

que reproduce el contenido del anexo II de la norma comunitaria. Las sustancias peligrosas a que se refiere este Reglamento son las expresadas en el propio documento (relaciones I y II del anexo III) y ampliadas en: el Real Decreto 995/2000, de 2 de junio; la Orden de 12 de noviembre de 1987, modificada por las Órdenes de 13 de marzo de 1989, 27 de febrero de 1991, 28 de junio de 1991 y 25 de mayo de 1992 y la Decisión 2455/2001/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de noviembre de 2001.

En la actualidad la Directiva ha sido derogada por la Directiva 2006/11/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de febrero de 2006, relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la Unión Europea. En el ámbito estatal, el Real Decreto 907/2007, de 6 de julio, por el que se aprueba el Reglamento de la Planificación Hidrológica, establece en su artículo 51 las medidas respecto a las sustancias peligrosas, consistentes, entre otras, en el requisito de autorización de todos los vertidos de aguas residuales con sustancias peligrosas del anexo IV del citado reglamento que se limitarán conforme a lo establecido en el artículo 100.2 del texto refundido de la Ley de Aguas. Dichas autorizaciones considerarán los valores límite de emisión de las sustancias peligrosas que cuenten con regulación específica, así como las normas de calidad ambiental aprobadas reglamentariamente o las que en el futuro se aprueben. Además se considerarán las medidas para reducir progresivamente o eliminar las sustancias peligrosas del anexo IV y en particular las de la Lista II prioritaria.

La Directiva Marco del Agua define las sustancias prioritarias como aquellas que presentan un riesgo grave para el medio acuático o a través de él, y las sustancias peligrosas como aquellas sustancias o grupos de sustancias tóxicas, persistentes y que pueden causar bioacumulación, así como otras sustancias que entrañan un nivel de riesgo análogo, como los alteradores del sistema endocrino y los metales pesados. A finales del año 2008 la Unión Europea aprobó una Directiva relativa a las normas de calidad en la política de aguas (Directiva 2008/105/CE del Parlamento y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE). Esta Directiva, que aún no ha sido transpuesta al ordenamiento jurídico español, modifica el anexo X de la Directiva Marco del Agua que recogía el listado de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y lo sustituye por un nuevo listado. Este anexo X incluye como sustancias prioritarias entre los metales, el plomo y sus compuestos, y el níquel y sus compuestos; y como sustancias peligrosas prioritarias el cadmio y sus compuestos y el mercurio y sus compuestos.

## **1.6. Los humedales artificiales como sistemas para el tratamiento de agua contaminada con metales**

La descomposición y el reciclado de la materia orgánica presentan comportamientos semejantes en toda clase de ecosistemas. Sin embargo, la naturaleza no ha desarrollado mecanismos para eliminar factores ambientales que hayan operado raramente, como metales pesados, plaguicidas, etc. y que frecuentemente coinciden con la contaminación orgánica, complicando la dinámica de los respectivos ecosistemas (Margalef, 1983).

A diferencia de los compuestos orgánicos, que experimentan en los humedales artificiales diferentes procesos de degradación, los metales no pueden ser destruidos. Sin embargo, sí pueden ser transformados en formas más o menos móviles, y más o menos biodisponibles, al modificar sus características químicas y físicas (Kosolapov *et al.*, 2004).

En los humedales artificiales los metales que llegan con el agua residual se encuentran distribuidos fundamentalmente en el sedimento y en la columna de agua, y en menor medida en la vegetación. En la columna de agua los metales pueden encontrarse tanto en forma insoluble como en forma soluble, siendo esta última fracción la más biodisponible y tóxica para la biota (Dunbabin y Browmer, 1992). Las plantas del humedal juegan un papel fundamental en la creación de un ambiente que favorezca la eliminación de metales de la columna de agua, y aunque algunas plantas son buenas acumuladoras de metales (Zayed *et al.*, 1999), el porcentaje de metales retenido por las mismas generalmente supone una pequeña parte de la carga total en el humedal (Mays y Edwards, 2001; Ye *et al.*, 2001; Collins *et al.*, 2004; Wiessner *et al.*, 2006). Generalmente, la capa superior del sedimento del humedal constituye el depósito final de los metales en los humedales, favoreciendo así su retención en una forma estable y no biodisponible (Tarutis y Unz, 1996). De hecho, incluso en los sedimentos de los humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales urbanas, en los que se esperaría encontrar bajas concentraciones, se encuentran a menudo altas concentraciones de metales pesados (Santasio *et al.*, 1998). En este sentido, un aspecto importante del comportamiento de los humedales en relación a la eliminación de metales es su respuesta a largo plazo. Wieder (1989) y Wood y Shelley (1999) indican al respecto, que aunque se considera que los humedales presentan una capacidad finita para eliminar metales, se desconoce como predecir cuál es esa capacidad y que sucede cuando el humedal alcanza su punto de saturación. Únicamente los sistemas de humedales artificiales con una adecuada vegetación podrían permitir un funcionamiento correcto a largo plazo al generarse suficientes nuevos lugares para la eliminación de metales, aunque los sedimentos del humedal pueden extraerse periódicamente retirando los metales precipitados, el proceso encarece el mantenimiento del sistema (Eger y Wagner, 2003).

Es complicado definir con exactitud que procesos y reacciones experimentan los metales en los humedales artificiales (Matagi *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 2005), ya que los distintos mecanismos dependen unos de otros, por lo que el proceso global es muy complejo (Sheoran y Sheoran, 2006). La distribución de los metales entre el sedimento y la columna de agua se ve afectada por los cambios en las condiciones físico-químicas del humedal. De forma que, la potencial biodisponibilidad de estos elementos se ve favorecida de forma general por los siguientes factores:

- Disminución del pH. Cuando el pH disminuye se favorece la disolución de los hidróxidos metálicos y los carbonatos precipitados en el sedimento.
- Incremento del potencial Red-Ox. Este incremento provoca la disolución de los hidróxidos metálicos junto con aquellos otros metales que habían experimentado procesos de adsorción o co-precipitación con estos hidróxidos. Sin embargo, esta disminución del potencial Red-Ox favorece la formación de sulfuros metálicos muy insolubles que precipitan en el sedimento, por lo que disminuye su biodisponibilidad.
- Aumento de la salinidad. Al aumentar la salinidad, se incrementa la competencia entre los metales y elementos como el calcio y el sodio por los lugares de adsorción del sedimento.
- Incremento de la concentración de ligandos orgánicos, lo que favorece la formación de complejos solubles entre estos ligandos y los metales, perjudicando la adsorción de los metales por el sedimento.

Este entramado de procesos puede simplificarse y clasificarse en tres grandes grupos: físicos, químicos y biológicos. Sin embargo, con frecuencia los diferentes mecanismos se solapan y entrelazan unos con otros, por lo que no es sencillo estudiarlos de forma aislada y determinar la contribución de cada uno a la eliminación de cada metal respecto al total en el humedal.

La sedimentación se considera el principal proceso físico, a corto plazo, implicado en la eliminación de metales de la columna de agua (Mays y Edwards, 2001; Walker y Hurl, 2002). No es una reacción física simple y directa sino que requiere que otros procesos químicos como la precipitación y la co-precipitación ocurran con anterioridad.

La adsorción de iones metálicos es un proceso químico que se ve favorecido por un sustrato arcilloso u orgánico, así como por la capa de detritus presente en los humedales. Los iones metálicos adsorbidos al sustrato y/o al detritus experimentarán procesos de especiación en función de los cambios que se produzcan en el sedimento. Estos procesos son fundamentales en la biodisponibilidad y toxicidad de los metales (Batty *et al.*, 2002; Wiebner *et al.*, 2005). No existe coincidencia en la bibliografía sobre que metales presentan mayor tendencia al proceso de adsorción en los humedales artificiales (Sobolewski, 1999; Sheoran y Sheoran, 2006). Factores como el pH del agua, el tiempo de contacto, o la formación de óxidos e hidróxidos metálicos en el humedal condicionan también los procesos de adsorción (Brix, 1993; Matagi *et al.*, 1998).

El hierro, el manganeso y el aluminio pueden ser eliminados de la fracción líquida del humedal al oxidarse y formar óxidos e hidróxidos insolubles, dando lugar a las llamadas placas situadas en el entorno de las raíces de las plantas. Estos óxidos permiten a su vez, que otros metales puedan ser eliminados de la columna de agua, al actuar como adsorbentes y favorecer la co-precipitación de otros metales (Goulet y Pick, 2001). El cobre y el manganeso co-precipitan con los óxidos de hierro, el cobalto y el hierro con los óxidos de manganeso, y el níquel y el zinc con ambos óxidos (Noller *et al.*, 1994). El arsénico, metaloide de eliminación compleja, es también eliminado del agua por procesos de co-precipitación con óxidos de hierro (Dodds *et al.*, 1995).

La formación de precipitados y co-precipitados se considera poco importante en la eliminación de metales de la columna de agua a largo plazo. Los óxidos e hidróxidos de hierro, manganeso y aluminio son muy sensibles a las variaciones del potencial Red-Ox y del pH, re-disolviéndose en la fracción líquida al aumentar las condiciones anaerobias.

En humedales artificiales con altas concentraciones de carbonato, generalmente debido a un sustrato calizo y/o el metabolismo bacteriano, los metales disueltos en el agua pueden formar carbonatos que precipitan al sedimento. Aunque no es un mecanismo que elimine del agua un porcentaje alto de metales (Sobolewski, 1996 y 1999) ya que los carbonatos suponen una forma de transición o un paso intermedio en la eliminación de los metales al ser menos estables que otros compuestos, sí pueden constituir un importante paso inicial para su eliminación en algunos humedales.

La formación de sulfuros metálicos es el mecanismo dominante de eliminación de metales del agua a largo plazo (Schiffer, 1989; Debusk *et al.*, 1996; Groudev *et al.*, 1999; Collins *et al.*, 2004). Muchos metales pueden formar precipitados de sulfuro incluso con bajas concentraciones de sulfuro de hidrógeno. Estos sulfuros metálicos permanecerán en los sedimentos del humedal hasta que no sean oxidados, es decir, mientras que se mantenga un ambiente anaerobio en el sedimento. El proceso está íntimamente relacionado con la actividad de las bacterias reductoras de sulfato, que en su metabolismo producen sulfuro de hidrógeno, que posteriormente puede reaccionar con los metales.

La concentración de metales en las plantas varía en función de la morfología y fisiología de la especie (Guilizzoni, 1991). Las plantas flotantes y las sumergidas, las cuales pueden absorber elementos solubles directamente en la columna de agua, presentan mayores acumulaciones de metales que las emergentes (Mays y Edwards, 2001; Collins *et al.*, 2005). Dentro de las emergentes, las que enraízan en la parte superficial del sustrato presentan mayor absorción que las que tienen sus raíces en zonas más profundas, debido a la mayor exposición a los metales presentes en la interfaz sedimento-agua (Mudroch y Capobianco, 1978). La acumulación de los metales en las plantas dependerá de las diferentes vías de absorción así como de la función fisiológica del metal en la planta. La mayoría de los elementos presentan una concentración decreciente en las raíces, rizomas, tallos y finalmente hojas (Qian *et al.*, 1999; Vymazal *et al.*, 2009).

Si bien la absorción de metales por la planta no supone un porcentaje alto del total de metales en el humedal, su presencia favorece esta eliminación debido a la difusión de oxígeno al sustrato por la raíz, creando así zonas de oxidación local que permiten la formación de precipitados de los hidróxidos de hierro y manganeso. Los restos de las plantas que pasan a formar parte de la capa de detritus en el sedimento proveen de nuevas zonas favorables para los procesos de adsorción e intercambio catiónico, sirven también como nutrientes para los microorganismos (Gazea *et al.*, 1996; Collins *et al.*, 2005).

En la mayor parte de los principales mecanismos de eliminación de metales de la columna de agua, el metabolismo bacteriano está implicado directa o indirectamente, constituyendo por tanto, un mecanismo fundamental en las transformaciones de los metales en el humedal (Ye *et al.*, 2001; Fyson *et al.*, 1994; Ledin y Pedersen, 1996; Groudev *et al.*, 2001; Russell *et al.*, 2003; Hallberg y Johnson, 2005).

A pesar de que existen algunas experiencias desarrolladas con éxito del empleo de humedales artificiales para el tratamiento de drenajes ácidos de minería (Wieder, 1993), aguas industriales contaminadas con metales (Maine *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006), y aguas residuales urbanas (Scholz, 2003; Kröpfelová *et al.*, 2009) en otras ocasiones, los resultados no han sido satisfactorios (Lesley *et al.*, 2008).

La información sobre la eliminación y distribución de los metales en los humedales artificiales para el tratamiento de agua residual urbana es en la actualidad muy escasa (Kröpfelová *et al.*, 2009) y limitada a los metales más comunes en este tipo de agua (cadmio, cobre, hierro, níquel, plomo y zinc) (Vymazal y Krása, 2003). Actualmente, no existe ninguna publicación científica sobre el funcionamiento en España de estos sistemas de depuración en relación a su capacidad para eliminar metales pesados de agua residual urbana.

La necesidad de investigación sobre los mecanismos de eliminación de metales de la columna de agua, los cambios estacionales en el humedal y su repercusión, el comportamiento de los sistemas a largo plazo, las posibles implicaciones derivadas de la acumulación de metales en los humedales para los organismos acuáticos y las redes tróficas, así como aspectos relativos a un diseño y dimensionado que favorezcan la eliminación de los metales, ha sido resaltada por diferentes autores (Mays y Edwards, 2001; Scholz y Xu, 2002; Wiessner *et al.*, 2006).

## 2. Las bacterias en los humedales artificiales

### 2.1. Dominio Bacteria. (Filogenia del Dominio Bacteria)

A pesar de ser invisibles a simple vista para el ojo humano, los procariotas son un componente esencial de la biota en la Tierra. Funcionan como catalizadores únicos e indispensables de procesos y transformaciones en los ciclos biogeoquímicos. Además, producen en su metabolismo compuestos fundamentales para el mantenimiento de la atmósfera terrestre y representan una gran porción de la diversidad genética presente en la naturaleza (Whitman *et al.*, 1998).

Se denomina célula procariota (del griego πρό, pro = antes de y κάρυον, karion = núcleo) a aquella en la que la región nuclear, llamada nucleoide, no está rodeada por una membrana. Generalmente, consta de una única molécula de ADN. Además, su división no es mitótica. La célula eucariota (del griego εὖ, eu = bueno, bien y κάρυον, karyon = nuez, carozo, núcleo) presenta varias moléculas de ADN, contenido en un núcleo celular que se encuentra separado del citoplasma por una doble membrana permeable y se divide por mitosis.

Según indica Mayr (1998) en el año 1937 Chatton estableció la existencia de dos grupos principales de organismos, los procariotas, denominados también como bacterias, y los eucariotas, organismos con células nucleadas. Esta clasificación fue confirmada y mejorada por Stanier y Van Niel (1962), y aceptada ampliamente hasta la actualidad (Mayr, 1998).

La clasificación de los procariotas como grupo ha sido bastante caótica hasta tiempos muy recientes (Mayr, 1998). Esta clasificación se basaba en el empleo de criterios morfológicos y fisiológicos para así establecer los distintos grupos considerados. Es a partir del desarrollo de las técnicas moleculares a partir de 1960 cuando la clasificación de los procariotas comienza a apoyarse en la biología molecular siendo ésta, en la actualidad, la herramienta fundamental para establecer esta clasificación.

Los ácidos nucleicos y las proteínas, macromoléculas comunes a todos los seres vivos, cambian con el tiempo. Por ello, pueden considerarse como cronómetros moleculares o documentos de la historia evolutiva. Asumiendo que los cambios se producen al azar y que aumentan con el tiempo de manera lineal, las diferencias en la secuencia de los monómeros que integran macromoléculas homólogas, presentes en dos organismos, reflejan la distancia evolutiva existente entre ellas. Este concepto, introducido por Zuckerkandl y Pauling (1965), ha sido la base de los estudios realizados en las últimas décadas sobre relaciones filogenéticas entre los seres vivos.

Los primeros trabajos, realizados mediante técnicas moleculares en relación a la filogenia molecular de los procariotas, se llevaron a cabo con secuencias de proteínas (en concreto, ferredoxinas y citocromos), permitiendo establecer ciertas relaciones entre bacterias. A mediados de los años 70, Woese y sus colaboradores comenzaron a trabajar con análisis comparativos de los genes codificantes para el RNA de la subunidad pequeña de los ribosomas (rRNA 16S, o también denominada RNA SSU) como base para la determinación objetiva de las relaciones evolutivas entre los organismos, lo que permitía cuantificar la diversidad a partir de la divergencia entre secuencias mediante un árbol filogenético (Hugenholtz, 2002).

Los trabajos de Woese con el gen codificante para el rRNA 16S como reloj molecular establecen, por primera vez, una división de las formas de vida en tres dominios o linajes primarios (Figura 1): uno eucariótico (Eucarya) y dos procarióticos (Bacteria y Archaea) (Woese *et al.*, 1990). Woese definió también 11 linajes principales (phyla o divisiones) en el dominio Bacteria a partir de sus análisis de rRNA 16S de secuencias obtenidas de organismos cultivados en el laboratorio.

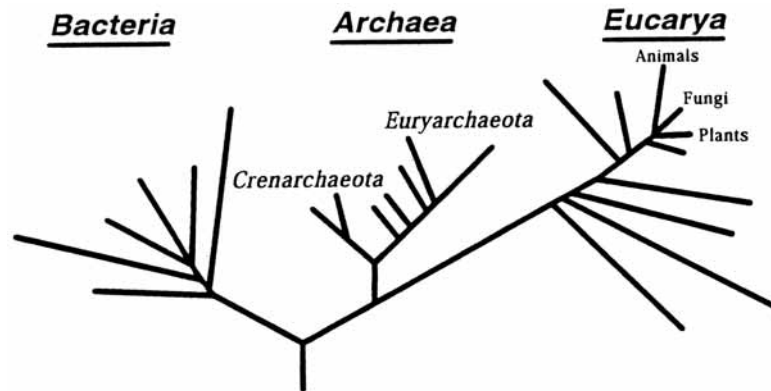


Figura 1. Árbol filogenético universal esquemático inferido a partir de análisis comparativos de secuencias del gen codificante para el rRNA 16S (Woese, 2000).

En la actualidad, el análisis comparativo de secuencias del gen ribosomal 16S es uno de los métodos más importantes en el estudio de la filogenia de las bacterias así como en su identificación (Ludwig *et al.*, 1998). Aunque existen cronómetros moleculares alternativos al rRNA 16S, hasta el momento éste es sin duda el más utilizado. Así, esta macromolécula presenta una serie de características que le convierten en el marcador más adecuado para reconstruir genealogías, construir el sistema de clasificación e identificar la diversidad ambiental. En primer lugar, es una molécula ubiquista, que presenta una funcionalidad constante, con fragmentos de evolución lenta y fragmentos de evolución o cambio rápido, y una estructura conservada universalmente. Otros dos factores de gran importancia que contribuyen al empleo de este gen ribosomal como reloj molecular son su obvia antigüedad y su función esencial y fundamental en la química celular así como su adaptación evolutiva con muchas otras (más de 100) proteínas y moléculas de RNAs. Estos dos últimos factores podrían ser los responsables de que el gen rRNA 16S fuera el menos susceptible de todos los genes al proceso de transferencia horizontal de genes (HGT) (Doolittle, 1999).

A mediados de la década de 1980, Pace y sus colaboradores comenzaron a trabajar en el estudio de la diversidad microbiana ambiental mediante el empleo de una técnica que permitía evitar el cultivo de los microorganismos para su identificación. El DNA se extraía directamente de una muestra ambiental. Posteriormente, las secuencias del gen rRNA 16S se aislaban a partir de la técnica recientemente desarrollada de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), y finalmente se realizaba la clonación y comparación de las secuencias obtenidas (genoteca) con otras secuencias ya conocidas.

Hoy en día existen más de 1.074.075 secuencias del gen 16S rRNA depositadas en la base de datos del Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/>) actualizada a fecha de 20 de agosto de 2009. Si bien es cierto, que una parte importante de estas secuencias se corresponden con clones ambientales para los cuales no hay un representante cultivado, y por tanto, no se encuentran descritas como especies. Además, se desconoce cuántas de las secuencias incluidas en las bases de datos existentes son erróneas, debido a los diferentes artefactos generados durante la PCR. Así, Hugenholtz y Huber (2003) indican que un número significativo de secuencias recombinantes (quimeras, formación de moléculas heterodúplex y errores de la Taq Polimerasa) de diverso origen se encuentran incluidas en las bases de datos públicas. De manera que estas secuencias que representan a especies no reales están siendo utilizadas de forma rutinaria en estudios filogenéticos.

La reconstrucción filogenética del árbol universal de la vida continúa hoy en día en proceso. Las críticas y desacuerdos en torno al árbol propuesto por Woese y su división en tres grandes dominios han sido y son numerosas. Por un lado, se argumentan razones de tipo metodológico basadas fundamentalmente en la generación de artefactos, debido a las diferentes tasas de evolución y mutación en los distintos linajes, lo que conduciría a errores en la colocación de la raíz del árbol así como en la longitud de las ramas (Doolittle, 1999). Por otro lado, los descubrimientos sobre la ubicuidad de la transferencia horizontal de genes (que no debe considerarse como un suceso excepcional o raro, sino frecuente) y la importancia del conjunto de elementos móviles en los procariotas, sugieren un dibujo del árbol de la vida nuevo y totalmente dinámico (Doolittle, 1999; Koonin y Wolf, 2008). De acuerdo con Koonin y Wolf (2008) el árbol procariótico estaría mejor representado por una red en la cual los nodos serían los genomas y las líneas representarían el flujo de genes entre ellos, siendo más o menos gruesas en función de la intensidad del flujo (Figura 2). Así, a nivel microscópico, la transferencia vertical de genes (transmisión de genes vía división celular) y la transferencia horizontal de genes vía conjugación, transducción o transformación se encuentran claramente diferenciadas. Mientras que a nivel macroscópico, es dudosa y complicada la diferenciación entre ambas y su importancia histórica. No obstante, la visión del árbol filogenético de los procariotas como una red, presenta zonas en las cuales la transferencia vertical es la herramienta más apropiada para explicar filogenias coherentes.

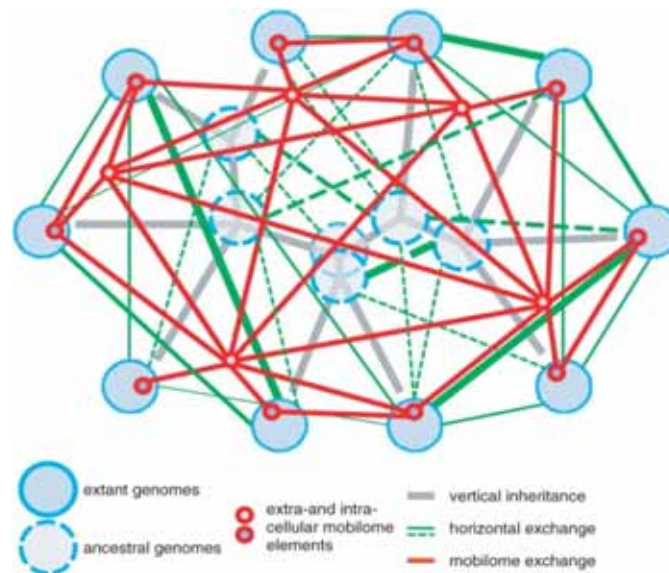


Figura 2. Esquema conceptual no basado en datos concretos. Los círculos azules representan genomas existentes (línea continua) o ancestrales (línea quebrada) de bacterias y arqueas. Los círculos rojos representan componentes móviles como plásmidos o fagos. Las líneas grises muestran una transferencia vertical de genes, mientras que las líneas verdes reflejan transferencia horizontal reciente (línea continua) o antigua (línea quebrada). Las líneas rojas indican el proceso continuo de intercambio de material genético entre los elementos móviles. El grosor diferente de las líneas refleja la intensidad en la transferencia de genes entre los respectivos elementos genéticos. Tomado de Koonin y Wolf (2008).

A pesar de estas consideraciones acerca de la clasificación de los procariotas, se considera en la actualidad que el dominio procariota presenta 36 Filos reconocidos taxonómicamente, 13 de los cuales se conocen únicamente por la presencia de secuencias ambientales (bacterias no cultivadas) (Figura 3).



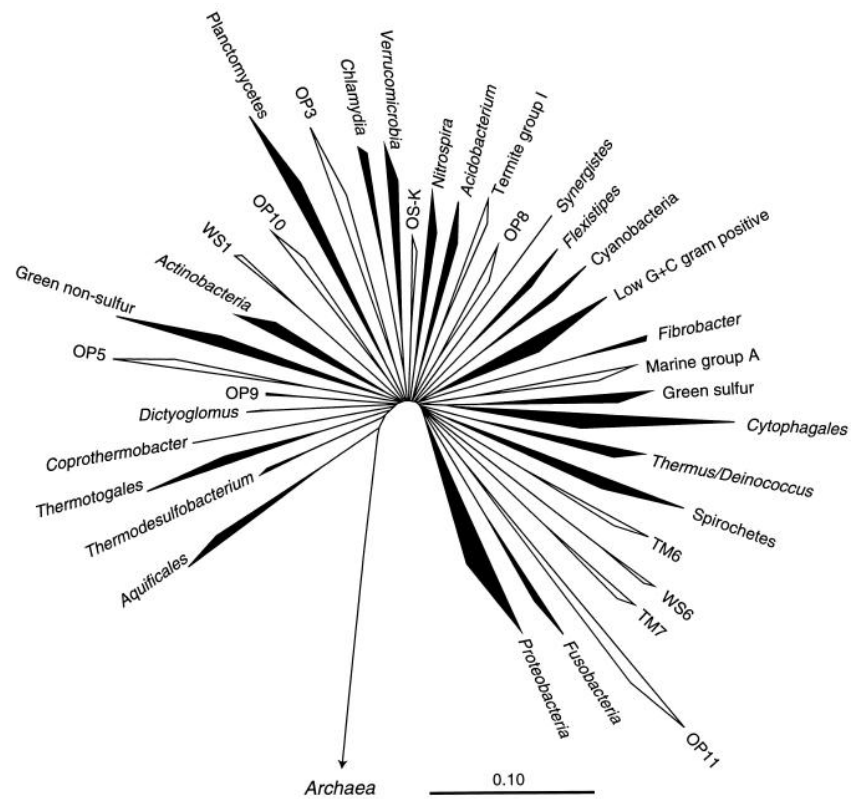


Figura 3. Árbol filogenético del dominio Bacteria (Hugenholtz *et al.*, 1998). Los filos con representantes cultivados se muestran en negro, mientras que aquellos que sólo cuentan con secuencias ambientales están representados en blanco. La barra representa 0,1 cambios por nucleótido.

## 2.2. El papel de las bacterias en la degradación/transformación de contaminantes orgánicos e inorgánicos en los humedales artificiales

La depuración del agua residual en los humedales artificiales se realiza mediante la acción combinada de distintos procesos que tienen lugar en la columna de agua, en las plantas y en el sustrato. El papel principal en el desarrollo de este conjunto de procesos lo realizan los microorganismos (Nogales *et al.*, 2001; Stottmeister *et al.*, 2003; Sleytr *et al.*, 2009). Entre ellos, se incluyen bacterias, hongos, algas y protozoos (Scholz, 2003), siendo dominantes las bacterias (Kirschner y Velimirov, 1999; Tietz *et al.*, 2007).

La participación de los macrófitos y del propio sustrato en los procesos de depuración es también relevante. Las plantas favorecen la sedimentación de sólidos, reducen el crecimiento de algas, absorben nutrientes, enriquecen el sustrato con oxígeno y sirven, junto con el sustrato, de soporte para el crecimiento de comunidades de bacterias (Brix, 1997). El sustrato del humedal contribuye además de forma notable a la depuración del agua por su importante aportación en la eliminación de fósforo mediante procesos de adsorción (Drizo *et al.*, 1999).

### 2.2.1. Eliminación biológica de materia orgánica

La eliminación de la materia orgánica del agua residual se debe fundamentalmente a la degradación biológica de la misma por parte de microorganismos a través de sus diferentes rutas metabólicas. Otros mecanismos de eliminación son cuantitativamente despreciables en relación a estas transformaciones biológicas (Vymazal *et al.*, 1998).

La transformación de moléculas complejas de materia orgánica a moléculas simples, permite a las bacterias heterótrofas obtener la energía necesaria para su anabolismo. En el caso de macromoléculas es necesaria una previa lisis de las mismas antes de ser introducidas al interior celular mediante transporte pasivo, facilitado o activo. Posteriormente serán metabolizadas, ya sea con el oxígeno como aceptor final de electrones (respiración aerobia), o en ausencia de oxígeno, con un compuesto orgánico como aceptor final (fermentación) o un compuesto inorgánico (respiración anaerobia).

Desde el punto de vista energético, las vías respiratorias son más eficaces que la fermentación, al obtener más cantidad de energía por molécula de sustrato original. Son las más importantes en la eliminación biológica del carbono orgánico en los sistemas de depuración del agua (Oria *et al.*, 2000). En la respiración anaerobia, partiendo de los mismos sustratos que la aerobia, se genera menos energía, debido a que todos los posibles aceptores de electrones tienen un potencial de reducción menor que el del oxígeno. Por ello, la respiración aerobia constituye el metabolismo más efectivo entre los realizados por las bacterias para la obtención de energía a partir de materia orgánica.

Las bacterias aerobias heterótrofas son las responsables de la degradación aerobia de la materia orgánica soluble de acuerdo con la siguiente reacción:  $(\text{CH}_2\text{O}) + \text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ .

Esta ecuación general se subdivide en varias fases. Inicialmente tiene lugar una hidrólisis extracelular de los polímeros orgánicos. En la segunda fase, los diferentes productos de la hidrólisis son transformados en un número pequeño de compuestos intermediarios. Estos compuestos orgánicos se oxidan hasta dióxido de carbono, por el metabolismo central, fundamentalmente, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Ciclo de Krebs). Los pares de electrones obtenidos se transfieren al  $\text{NAD}^+$  y  $\text{FAD}^+$ , dando lugar a  $\text{NADH}$  y  $\text{FADH}_2$ , que constituyen el poder reductor celular que es energía no utilizable directamente. En la tercera fase, los electrones y los protones del  $\text{NADH}$  y  $\text{FADH}_2$  son incluidos en la cadena transportadora de electrones y se genera ATP a partir de ADP. El ATP es ya energía en forma utilizable para la célula. Al final los electrones se combinan con oxígeno y protones para formar agua.

Son varios los géneros de bacterias aerobias que utilizan por esta vía la materia orgánica en los humedales artificiales. Entre ellas se encuentran los géneros *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Haliscomenobacter* y *Gordona*.

La degradación anaerobia de la materia orgánica es realizada por una población heterogénea de bacterias tanto facultativas como anaerobias estrictas. Este proceso incluye una hidrólisis previa de biopolímeros, la fermentación de azúcares y aminoácidos, así como la oxidación de ácidos grasos y alcoholes de cadena larga produciendo diversos alcoholes y ácidos grasos de cadena corta, además de hidrógeno molecular como subproducto de algunas reacciones. Estos productos intermedios pueden ser oxidados a acetato con producción de hidrógeno. El acetato puede transformarse en metano (metanogénesis acetoclástica) y el hidrógeno puede utilizarse para formar también metano (metanogénesis hidrogenotrófica).

Estos procesos se realizan a un ritmo mucho más lento que los de degradación aerobia. Sin embargo, en los casos en los que la concentración de oxígeno es baja debido a la alta carga de materia orgánica, la degradación anaerobia es la principal responsable de la eliminación de materia orgánica en el humedal (Cooper *et al.*, 1996).

Los grupos principales de bacterias involucradas en el proceso son:

Hidrólisis de biopolímeros: predominan bacterias de los géneros *Clostridium* y *Staphylococcus*, *Propionibacterium*, *Selenomonas* y *Bacteroides*.

Fermentación: predominan bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*; *Escherichia*, *Salmonella* y *Veillonella*.

Oxidación de ácidos grasos de cadena larga: con frecuencia bacterias de los géneros *Clostridium* y *Syntrophomonas*.

Acetogénesis. Participan bacterias anaerobias homoacetogénicas y organismos acetógenos productores obligados de hidrógeno (OPHA). Las homoacetogénicas son anaerobias estrictas y utilizan el dióxido de carbono como aceptor final de electrones, dando acetato como único producto de la respiración anaerobia (Madigan *et al.*, 1998). Dentro de ellas se encuentran bacterias del género *Clostridium*, y otras especies como *Acetobacterium woodii*, *Acetoanaerobium noterae* o *Acetogenium kivui* (Madigan *et al.*, 1998). Entre las bacterias OPHA sólo se han aislado un número limitado de especies: *Syntrophomonas sapovorans*, *Syntrophobacter wolinii*, *Syntromonas wolfei*, *Syntrophospora bryantii* y *Syntrophus buswellii*, requieren presiones parciales de hidrógeno bajas para convertir los ácidos grasos. A presiones relativamente altas la formación de acetato se reduce y aparecen ácidos grasos de 3 o 4 carbonos y etanol en lugar de metano. Existe así, una estrecha relación de simbiosis entre las acetógenas y las metanógenas (o sulfato-reductoras), ya que estas últimas ayudan a reducir la presión parcial de hidrógeno requerida por las acetógenas.

Metanogénesis. No es realizada por bacterias sino por arqueobacterias. Se subdividen en dos grupos, las que realizan la metanogénesis acetoclástica, entre ellas se encuentran los géneros *Methanosarcina* y *Methanosaeta*, y las que realizan la metanogénesis hidrogenotrófica, entre las que se encuentran *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, y *Methanobrevibacter* (Zehnder *et al.*, 1980; McCarthy y Cross, 1981).

La reducción del sulfato, mediante la participación de las bacterias sulfato reductoras, está estrechamente relacionada con el proceso de formación de metano, desempeñando ambos grupos un papel fundamental en la descomposición de la materia orgánica y en el ciclo del carbono en los humedales (Vymazal, 1995; Vymazal *et al.*, 1998), si bien la emisión de metano contribuye negativamente en el efecto invernadero, y la emisión de sulfuro de hidrógeno con la llamada lluvia ácida. El sulfato es utilizado como aceptor final de electrones por un conjunto de bacterias que utilizan ácidos orgánicos, ácidos grasos, alcoholes e hidrógeno como donadores de electrones (Madigan *et al.*, 1998). En ocasiones otros compuestos como el tiosulfato, el tetrato y el azufre elemental pueden ser también utilizados como aceptores de electrones. Las bacterias de este grupo compiten con las metanógenas por sus sustratos (hidrógeno), aunque sus características cinéticas las hacen más eficientes, lo que causa un menor rendimiento en la generación de metano y una producción de ácido sulfhídrico. Estas bacterias también compiten con las acetógenas por componentes como el propionato y butirato. Entre ellas se incluyen los géneros *Desulfobrevibacter*, *Desulfomonas* y *Desulfotomaculum*.

### 2.2.2. Eliminación biológica de nitrógeno y fósforo

El nitrógeno presente en un agua residual típica proviene principalmente de las conversiones metabólicas de los compuestos derivados de los excrementos (urea y proteínas). Alrededor del 60% está en forma orgánica y el 40% restante en forma amoniacal. El vertido de nitrógeno en los cauces naturales puede provocar efectos indeseables en el ecosistema acuático. Entre ellos, destaca por sus efectos perjudiciales en el medio la proliferación de algunas algas y plantas acuáticas, proceso conocido como eutrofización, y provocado por el enriquecimiento del medio en nitrógeno, fósforo y otros microelementos. Por otro lado, el amoníaco libre es tóxico para los peces y otros organismos acuáticos.

El nitrógeno puede encontrarse en los humedales con diferentes estados de oxidación, así como en forma particulada o en forma disuelta. La eliminación de las distintas formas del nitrógeno en los humedales tiene lugar fundamentalmente por medio de procesos biológicos entre los que se encuentra la acción de las bacterias (Figura 4) y en menor medida, la absorción por las plantas. Otros procesos que también intervienen en su eliminación son físico-químicos como la sedimentación y la adsorción. Se estima que entre el 60 y 70% del nitrógeno es eliminado por la acción de las bacterias, mientras que entre el 20 y el 30% se debe a la absorción por las plantas (Reddy y D'Angelo, 1997; Spiels y Mitsch, 2000).

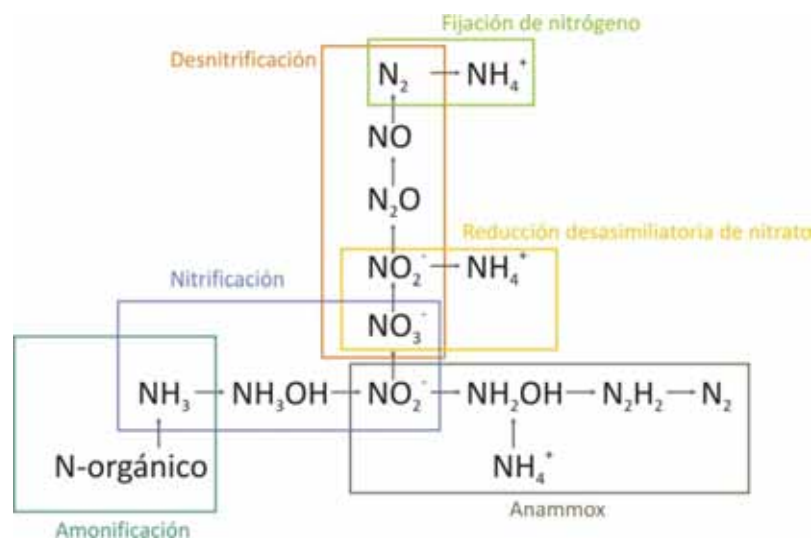


Figura 4. Principales reacciones químicas catalizadas por bacterias en el ciclo del nitrógeno en los humedales artificiales. Se indican mediante un recuadro los distintos procesos implicados. Modificado de Ruiz (2008).

### 2.2.3. Amonificación, nitrificación, desnitrificación y reducción desasimilatoria del nitrato

La amonificación es el proceso biológico de conversión del nitrógeno orgánico a amonio. Los contaminantes que contienen nitrógeno son rápidamente degradados tanto de forma aerobia como anaerobia en los humedales, dando lugar a la formación de nitrógeno amoniacal inorgánico. La amonificación tiene lugar cinéticamente a una mayor velocidad que el posterior proceso de nitrificación. Esta velocidad es mayor en las zonas aerobias y menor si el medio es más anaeróbico

(Lee *et al.*, 2009). Otros factores que afectan a la velocidad de amonificación son la temperatura, el pH, la relación C/N, la disponibilidad de nutrientes y la estructura del suelo (Reddy *et al.*, 1984).

El nitrógeno amoniacal experimenta en los humedales artificiales fenómenos de adsorción, absorción por las plantas y volatilización. No obstante, estos procesos contribuyen de forma limitada a su eliminación en relación a los procesos biológicos de nitrificación-desnitrificación y anammox (Lee *et al.*, 2009).

La nitrificación consiste en la oxidación quimiolitotrofica del amonio a nitrato. Este proceso tiene lugar en condiciones estrictamente aerobias, y se realiza en dos etapas: oxidación del amonio a nitrito y oxidación del nitrito a nitrato. Cada una de estas etapas se desarrolla gracias a la actividad de diferentes bacterias las cuales emplean el amonio o el nitrito como fuente de energía (bacterias amonio oxidantes y bacterias nitrito oxidantes respectivamente), el oxígeno como aceptor de electrones y el dióxido de carbono como fuente de carbono. Entre los géneros de bacterias amonio oxidantes se encuentran: *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosopira*, *Nitrosovibrio* y *Nitrosolobus*, todos ellos incluidos dentro de la Clase  $\beta$ -Proteobacteria del Filo Proteobacteria. En el caso de la oxidación del nitrito se encuentran bacterias de los géneros *Nitrospira*, *Nitrospina*, *Nitrococcus*, *Nitrocystis* y *Nitrobacter*, pertenecientes al Filo Proteobacteria, Clase  $\alpha$ -Proteobacteria (Ahn, 2006).

El mecanismo de desnitrificación biológica consiste en el empleo por parte de bacterias generalmente heterótrofas de compuestos oxidados del nitrógeno (nitrato y nitrito) como aceptor final de electrones en ambientes con escasa concentración de oxígeno, dando lugar a la formación de nitrógeno molecular. Mediante este proceso se estima que se elimina entre el 60 y 95% del nitrógeno total en los humedales (Lee *et al.*, 2009).

La mayor parte de las bacterias desnitrificantes son Gram-negativas y se sitúan filogenéticamente en las clases  $\alpha$  y  $\beta$ -Proteobacteria, entre ellas se encuentran los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus* y *Thiobacillus*. También hay bacterias Gram-positivas que realizan la desnitrificación como las incluidas en el género *Bacillus* del Filo Firmicutes y unas pocas arqueobacterias como las del género *Halobacterium* (Ahn, 2006). Si bien la desnitrificación es casi exclusivamente anaerobia o microaerófila, son escasos los anaerobios estrictos que la realicen, y las bacterias que realizan este proceso son anaerobias facultativas. Algunas bacterias aerobias, pueden también realizar el proceso de desnitrificación con altas concentraciones de oxígeno disuelto, siendo también la mayoría de ellas heterótrofas (Ahn, 2006). Entre estas bacterias están *Pseudomonas carboxydohydrogena* (Zumft, 1992), *Paracoccus denitrificans* (Ludwig *et al.*, 1993), y *Pseudomonas stutzeri* (Su *et al.*, 2001).

La ruta clásica de desnitrificación implica la participación de bacterias principalmente heterótrofas. Esto no excluye a algunos organismos autótrofos que también pueden realizar el proceso de desnitrificación, entre las que se encuentra el grupo de las *Nitrosomonas* capaces de realizar la nitrificación y la desnitrificación de forma simultánea (Schmidt *et al.*, 2003).

Cuando la concentración de nitrato es escasa el proceso llamado desasimilación reductora del nitrato puede verse favorecido frente a la desnitrificación. Este proceso, llevado a cabo por bacterias que presentan una enzima nitrato reductasa periplásmica específica (Ruiz, 2008), impide que el nitrato se reduzca finalmente a nitrógeno molecular.

#### 2.2.4. Oxidación anaerobia del amonio (Anammox)

El descubrimiento a principios de los 90 (ya postulado por Broda en 1977) a partir de cálculos termodinámicos) del proceso de oxidación anaerobia del amonio supuso una nueva vía en el estudio del ciclo del nitrógeno. En este proceso, bacterias litoautótrofas oxidan el amonio en condiciones anaerobias, utilizando el nitrito como aceptor de electrones, y produciendo nitrógeno gaseoso (Strous *et al.*, 1997; Jetten *et al.*, 1999; López, 2008).

La mayoría de las bacterias identificadas hasta el momento capaces de realizar el proceso anammox pertenecen al Filo Planctomycetes, Orden Planctomycetales (López, 2008). Se han identificado en plantas depuradoras de aguas residuales 3 especies: *Candidatus Brocadia anammoxidans* (Strous *et al.*, 1999), *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* (Schmid *et al.*, 2000), *Candidatus Brocadia fulgida* (Kartal *et al.*, 2004) y *Candidatus Anammoxoblobus propionicus* (Kartal *et al.*, 2007).

Además de los planctomycetes Lee *et al.* (2009) indican como bacterias anammox algunas del Filo Proteobacteria tales como *Thiobacillus senitrificans*, *Thiomicrospira denitrificans*, *Thisophaera ponotropha* y *Paracoccus denitrificans*.

En la actualidad se trabaja en el conocimiento del metabolismo de estos organismos. La presencia de hidroxilamina e hidracina como intermediarios químicos del proceso anammox estaba considerada como un importante estimulante del proceso (Strous *et al.*, 1999; Jetten *et al.*, 2005). Sin embargo, estudios recientes de Strous *et al.* (2006) han demostrada que es el óxido nítrico el que actúa como intermediario en este proceso.

La importancia de este grupo en la depuración del agua residual se debe a su alta eficacia en la eliminación de nitrógeno (Dong y Sun, 2007; Sun y Austin, 2007). En el caso de estaciones de depuración convencionales puede suponer un ahorro de hasta un 90% en los costes de operación debido a que estas bacterias no requieren de una fuente externa de materia orgánica (Chamchoi y Nitisoravut, 2007).

#### 2.2.5. Eliminación de fósforo

La presencia de fósforo en las masas de agua ha aumentado notablemente en los últimos años debido a su uso en abonos agrícolas, en actividades industriales y en detergentes y productos de uso doméstico. El fósforo presente en las aguas residuales urbanas procede fundamentalmente de la materia fecal humana (50-65%), de residuos alimentarios (10-15%), así como de los compuestos de fosfato inorgánico contenidos en los detergentes y otros productos de limpieza de uso doméstico (20-40%). De esta forma, el agua residual contiene generalmente una mezcla de fósforo inorgánico (fósforo soluble reactivo) junto con fósforo orgánico disuelto y fósforo particulado.

Las transformaciones del fósforo en los humedales son múltiples. Entre ellas se da adsorción y desorción, sedimentación, complejación, precipitación y disolución y co-precipitación con carbonato cálcico, absorción por parte de macrófitos y algas, y la absorción por parte de microorganismos (Vymazal y Kröpfelová, 2008).

La absorción del fósforo por parte de las bacterias se realiza de forma muy rápida. Richardson y Marshall (1986) indicaron que la toma de fósforo en los humedales por parte de la microbiota tenía en un período de tiempo inferior a una hora. Sin embargo, más del 90% del fósforo se devolvía al medio en las siguientes seis horas. La cantidad de fósforo acumulado por los microorganismos depende de la estructura trófica del propio humedal. De manera que en humedales menos

enriquecidos las bacterias podrían tomar más fósforo que en aquellos más eutrofizados (Richardson *et al.*, 1997; Vymazal y Kröpfelová, 2008).

Existen además algunas bacterias capaces de asimilar fósforo en proporciones superiores a las correspondientes a los requisitos nutritivos normales, almacenándolo en forma de gránulos de polifosfatos llamados volutina (Escaler y Mujeriego, 2001). El proceso, estudiado fundamentalmente en los sistemas convencionales de fangos activados, consta de dos fases. En la primera fase las bacterias requieren condiciones anaerobias y disponibilidad de compuestos orgánicos de bajo peso molecular como los ácidos grasos volátiles de cadena corta. Las bacterias almacenan estos compuestos orgánicos en forma de poli- $\beta$ -hidroxibutirato o polihidroxivalerato. La energía requerida para la síntesis de estos compuestos la proporcionan los polifosfatos acumulados por la célula, liberándose ortofosfatos al medio. En la segunda fase, en condiciones aerobias, las bacterias consumen los compuestos orgánicos almacenados anteriormente como fuente de energía y carbono así como para la acumulación en forma de polifosfatos de los ortofosfatos presentes en el medio. En esta fase, la concentración de fosfatos incorporados es mayor que la cantidad de fosfatos disueltos en la primera fase.

La eliminación biológica de fósforo se atribuye generalmente a las bacterias del género *Acinetobacter*. También se han identificado otros géneros en los cuales algunas bacterias pueden contener gránulos de polifosfatos. Se han descrito especies con estas características en los géneros *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Klebsiella*, *Moraxella* y *Pseudomonas*.

## 2.2.6. Eliminación de metales

La mayor parte de los procesos implicados en la eliminación de metales presentan alguna relación con el metabolismo bacteriano (Batty *et al.*, 2002), ya sea por transformación directa de los metales en formas insolubles o de manera indirecta mediante su metabolismo al generar productos que reaccionarán con los metales (Sobolewski, 1999).

Los procesos de reducción directa de los metales debido a la acción bacteriana favorecen la eliminación de estos metales de la columna de agua disminuyendo así su biodisponibilidad (Schiffer 1989; Sinicrope *et al.*, 1992; Fude *et al.*, 1994; Masscheleyn y Patrick, 1994; Adriano, 2001; Nelson *et al.*, 2002). Una revisión de este proceso para el cromo se recoge en Ohtake y Silver (1994).

Junto a los procesos de reducción directa de los metales, se describen procesos indirectos a partir de los cuales los metales son inmovilizados. Es el caso de las bacterias reductoras de sulfato que en ambientes anóxicos, con abundancia de sulfato y materia orgánica interactúan intensamente con muchos metales dando lugar a la formación de sulfuros metálicos muy insolubles. La reducción de sulfatos, nitratos, seleniatos y óxidos metálicos debido a la acción metabólica de las bacterias produce un incremento de la alcalinidad del sistema, favoreciendo la precipitación de otros metales en forma de hidróxidos metálicos y sulfuros (Russell *et al.*, 2003). En el caso de la reducción de sulfatos y formación de sulfuros metálicos se obtendría una ganancia neta de alcalinidad, aspecto importante ya que contribuye a evitar la acidificación del humedal.

En climas templados, la producción bacteriana de alcalinidad puede superar la acidificación generada por la hidrólisis metálica durante el verano. Sin embargo, esta actividad disminuye con las temperaturas más frías, de manera que si la adición de metales continúa puede provocar la acidificación del humedal impidiendo la producción bacteriana de alcalinidad en la siguiente estación y favoreciendo la movilización de metales precipitados en el sedimento, razón por la cual

fracasan algunos humedales artificiales en el tratamiento de agua contaminada con metales (Sobolewski, 1999).

Otro proceso mediado por el metabolismo bacteriano es la formación de fosfatos metálicos, a partir del fosfato generado por el metabolismo de especies del género *Citrobacter*, proceso revisado por Brierley (1990).

La secreción de algunos compuestos, por parte de bacterias, inducida por la presencia o ausencia de algunos metales, influye en la movilidad de los metales en el humedal (Ledin y Pedersen, 1996), es el caso de los procesos de complejación metálica. Dentro de estos procesos, el más estudiado es la formación de quelatos de hierro. La mayor parte de las bacterias tienen la capacidad de producir y secretar unas moléculas llamadas sideróforos para obtener el hierro que necesitan. Los sideróforos son agentes quelantes del hierro con una alta afinidad quelante por el hierro (III) y una baja afinidad por el hierro (II). Por medio de los sideróforos las bacterias son capaces de tomar el hierro (III) para después liberarlo en forma de hierro (II). Estos fenómenos de complejación no son exclusivos del hierro y se han estudiado agentes quelantes específicos para galio, cromo, aluminio, magnesio o manganeso (Birch y Bachofen, 1990).

Los procesos de biosorción, acumulación activa o pasiva de metales por parte de microorganismos, constituyen otra vía que permite la eliminación de metales de la columna de agua (Veglio y Beolchini, 1997).

### **2.3. Técnicas moleculares para el estudio de las comunidades de bacterias**

La investigación sobre la composición y diversidad de las comunidades de bacterias tanto en humedales naturales como en artificiales es importante para la caracterización de estos hábitats ya que los microorganismos son la pieza fundamental de muchos de los procesos que en ellos tienen lugar (Nogales *et al.*, 2001; Sleytr *et al.*, 2009). Sin embargo, son escasos los trabajos de investigación cuyo objetivo es obtener una descripción detallada de la biocenosis bacteriana en humedales artificiales (Tietz *et al.*, 2007), por lo que existe una importante carencia en la información y el conocimiento de este aspecto fundamental del funcionamiento de los procesos de degradación en estos ecosistemas.

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 aproximaciones novedosas 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 procariotas 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 procariotas conocidas en la actualidad constituye una pequeña parte de la diversidad real presente en la naturaleza (Amann *et al.*, 1995).

El desarrollo de diferentes 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 (Figura 5).

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 DNA. El FISH, CARD-FISH, la PCR-*in situ*, junto con el cultivo y aislamiento, actúan sobre las bacterias fijadas en un soporte y no requieren de una extracción previa de DNA. La extracción de DNA puede ser una limitación en el empleo de técnicas moleculares ya que en algunas muestras (principalmente del sedimento del humedal) esta extracción puede no ser representativa de la comunidad.

Otra dicotomía se establece entre las técnicas *fingerprinting*, basadas en la obtención de un patrón de bandas electroforéticas característico de una especie o grupo de especies, y la técnica de la secuenciación, mediante esta última se trata de conocer la propia secuencia de nucleótidos de un fragmento de DNA. Generalmente, ambos tipos de técnicas se realizan con amplificación por PCR. Con frecuencia las técnicas *fingerprinting* se combinan con una posterior secuenciación del DNA de las bandas obtenidas.

La necesidad de amplificación 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. Sin necesidad de amplificación se encuentran técnicas como el FISH, CARD-FISH, la hibridación y los biochips, si bien en estas dos últimas, es frecuente que sí se realice una amplificación con el objetivo de incrementar la intensidad de la señal.

En el caso de los métodos basados en la PCR, la secuencia a amplificar permite diferenciar entre las técnicas en las que se busca amplificar una secuencia inespecífica como es el caso de los RAPDs, otras en las que lo que se amplifica son genes de particular interés (normalmente relacionados con alguna ruta metabólica), o bien aquellas en las que se amplifican los genes ribosomales 23S y 16S (ARDRA, clonación y secuenciación y LH-PCR), o espaciadores ribosomales ITS (RISA y ARISA).

Este conjunto de técnicas ha permitido que en los últimos años se trabaje en ampliar el conocimiento del funcionamiento de los humedales artificiales ya sea mediante estudios dirigidos a un determinado grupo de bacterias (Harms *et al.*, 2003) o bien con estudios encaminados al conocimiento global de la composición de la comunidad (He *et al.*, 2007).

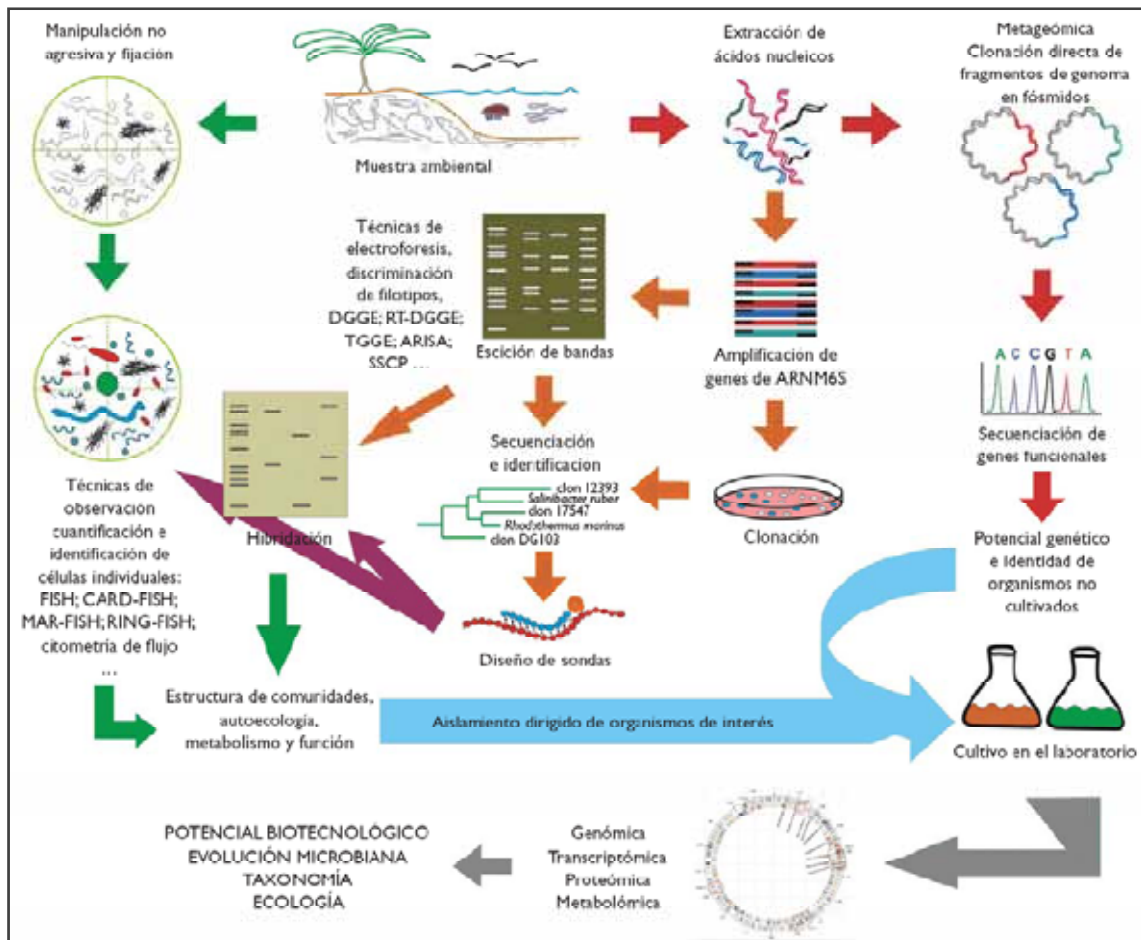


Figura 5. Estrategias de análisis de comunidades de bacterias. Tomado de Roselló y Antón (2009).

### 2.3.1. Clonación y secuenciación

La clonación y secuenciación se considera el mejor método exploratorio de todos los utilizados en ecología molecular ya que permite obtener información filogenética muy detallada y precisa, así como realizar acertadas estimas de diversidad, si el trabajo se realiza sobre un número suficiente de clones (Ruiz, 2008). Consiste en amplificar mediante la PCR fragmentos de una secuencia determinada, este conjunto de fragmentos polimórficos se aíslan mediante su inclusión en un vector de clonación. Los vectores recombinantes se utilizan para la transformación de células competentes que permiten el almacenamiento de la información genética deseada, la cual puede ser posteriormente secuenciada para conocer así la afiliación taxonómica de las diferentes bacterias. Las secuencias más utilizadas son los genes codificantes para RNA ribosomal 16S. La secuenciación de genes específicos es también una herramienta utilizada en estudios de comunidades de bacterias.

Este método permite por tanto, un estudio taxonómico muy preciso permitiendo la obtención de árboles filogenéticos de gran resolución. Cubre la mayoría de los microorganismos, incluyendo aquellos grupos minoritarios, y permite la identificación de organismos que no han podido ser aún cultivados. Otra ventaja es que permite el diseño de nuevas sondas y *primers*, que podrán ser utilizadas también en otros procedimientos. Sin embargo, la clonación y secuenciación es un método largo y complejo, no cuantitativo, con un coste económico alto, requiere de personal

especializado, y de un alto número de clones secuenciados para asegurar que la mayoría de las especies se han detectado.

Algunos ejemplos del empleo de este método, con clonación y secuenciación de los genes codificantes para el RNA ribosomal 16S, en estudios realizados en sistemas naturales de depuración del agua son los realizados por Haleen *et al.* (2000) sobre bacterias oxidantes del amonio en un humedal artificial, Chaturvedi *et al.* (2006) en el estudio de un humedal artificial para el tratamiento de agua residual procedente de una destilería, o He *et al.*, (2007) en un humedal artificial para el tratamiento de los drenajes ácidos de minería para el que realiza un estudio global de la diversidad de bacterias. En otros trabajos, se utilizan genes específicos, como Ruiz *et al.* (2007) en un estudio sobre la diversidad del gen *nirS* que codifica para una enzima nitrito reductasa, implicada en los procesos de desnitrificación, en un humedal artificial para el tratamiento de agua residual urbana.

### 2.3.2. Técnicas de fingerprinting

Estas técnicas fueron desarrolladas con el objetivo de facilitar un análisis más rápido de la comunidad de bacterias y principalmente de la dinámica poblacional de la comunidad, al poder analizar más sencillamente un gran número de muestras. Sin embargo, estas técnicas no aportan una estimación real de la diversidad genética (Muyzer y Smalla, 1998; Dahllorf, 2002).

En todas ellas, la primera etapa consiste en la extracción de ADN y amplificación mediante PCR. Las etapas siguientes permiten la discriminación de los distintos filotipos presentes en la muestra. Esta discriminación se realiza a partir de los patrones de migración electroforética realizada en geles de poliacrilamida, obteniéndose así un patrón que refleja la estructura de la comunidad. Las técnicas difieren entre ellas en la propiedad inherente a los genes amplificados que se utiliza para separar los distintos fragmentos.

#### **Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP*)**

Técnica basada en el análisis de restricción de los fragmentos amplificados (no se corresponde con la técnica clásica de RFLP en la que se utiliza la hibridación con sondas marcadas), también se conoce como ARDRA (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*) cuando se amplifican secuencias de genes ribosomales 16S. Las secuencias de diferentes especies presentan distintas dianas para enzimas de restricción, obteniéndose patrones de bandas de distinta longitud que pueden analizarse mediante electroforesis. Comunidades diferentes presentaran patrones de bandas también diferentes

El número de bandas obtenidas no indica el número de organismos diferentes por lo que este método no permite obtener una medida de la diversidad real de la muestra. No obstante, es un método adecuado como análisis exploratorio de las librerías de clones previo a la secuenciación de los mismos. Evitando secuenciar clones que presenten patrones de restricción repetidos.

Una modificación de los RFLP es la técnica t-RFLP (Terminal-Restriction-Fragment Length Polymorphism). La diferencia radica en el empleo de cebadores marcados con fluoresceína en la PCR. Esto permitirá que una vez obtenido el patrón de bandas electroforéticas, y mediante la excitación del compuesto fluorescente, se puedan identificar picos de fluorescencia que se correlacionarían con la abundancia de la secuencia. La técnica no permite la correlación entre cada pico y una especie de bacteria ya que la separación de las bandas se realiza en función del tamaño de la secuencia.

Estas técnicas se han utilizado en el estudio de las comunidades de bacterias en humedales artificiales para el tratamiento de drenajes ácidos de minería (Nicomrat *et al.*, 2008), de aguas residuales industriales (Ibeweke *et al.*, 2003), y de aguas residuales urbanas (Sleytr *et al.*, 2009).

### **Electroforesis en gel desnaturizante (DGE)**

La electroforesis en gel desnaturizante 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.

En función de si el gradiente desnaturizante que se crea en el gel de poliacrilamida en el que se analizan los productos de la PCR se consigue de forma física (aumento de la temperatura) o bien es un gradiente químico (incremento de la concentración de sustancias desnaturizantes) la técnica se denomina electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) o electroforesis en gel con gradiente de desnaturización (DGGE). 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 (sobre 500 pb de las secuencias ribosomales 16S) lo que dificulta los análisis filogenéticos y por tanto, la correcta caracterización de la comunidad. Junto a ello, 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).

Algunos estudios en los que se emplea este método en humedales artificiales son los realizados por Tietz *et al.* (2007) para bacterias oxidantes del amonio, Ibeweke *et al.* (2003) con agua residual industrial.

### **2.3.3. Hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH)**

Esta técnica consiste en el empleo de sondas fluorescentes (secuencias de entre 10 y 20 nucleótidos marcadas en su extremo con una sustancia fluorescente). Estas sondas reconocerán secuencias del gen ribosomal 16S u otros genes específicos en células fijadas y se producirá una hibridación *in situ* con las mismas. Posteriormente, los organismos positivos pueden observarse mediante microscopía de fluorescencia o con citometría de flujo. La especificidad de las sondas marcará el grado de identificación o detección al que se llegará con esta técnica.

Su principal limitación es su dependencia de la disponibilidad de sondas y su diseño no es sencillo, en muchas ocasiones incluso imposible, como por ejemplo en el caso de sondas específicas para ciertos grupos de bacterias que comparten determinadas rutas metabólicas (Sanz y Köchling, 2007). Además, para usar esta técnica, es preciso tener un conocimiento previo de las bacterias que se encontrarán en la muestra.

Una modificación de esta técnica es el CARD-FISH (Catalyzed reporter deposition Fluorescence In Situ Hybridization). Esta técnica resulta muy adecuada en el estudio de comunidades de bacterias en ecosistemas complejos ya que permite solventar los problemas del FISH relacionados con la intensidad de la señal fluorescente de las células hibridadas que frecuentemente se encuentra por debajo del límite de detección así como evitar altas señales de fondo.

Ejemplos del empleo de las técnicas de FISH y CARD-FISH en el estudio de las comunidades de bacterias en humedales artificiales son los trabajos de Yan *et al.* (2005) sobre bacterias oxidantes del amonio, y Nicomrat *et al.* (2006) en humedales artificiales para el tratamiento de drenajes ácidos de minería.

## **2.4. Estructura y composición de las comunidades de bacterias en humedales artificiales**

La estructura de las comunidades de bacterias en los humedales artificiales está determinada por diferentes factores ambientales y biológicos (Shapiro *et al.*, 2010). Esta estructura se define por la composición (identidad), abundancia y distribución de los taxones que forman las poblaciones.

La diversidad, característica emergente del nivel de organización de comunidad biológica, medida a través de sus diferentes índices, se ha utilizado frecuentemente en el estudio de la estructura de las comunidades de bacterias ya que la diversidad es un concepto central de la teoría ecológica y los índices de diversidad constituyen una elegante síntesis de la complejidad de una comunidad biológica (Lozupone *et al.*, 2007). La diversidad alfa de una comunidad se relaciona con la variedad dentro de la misma, siendo esta variedad resultado de dos componentes. El primer componente, la riqueza, indica el número de taxones presentes en la comunidad. El segundo componente, la equitabilidad o uniformidad, se refiere a cómo la abundancia se distribuye entre los taxones de la comunidad.

El estudio de las relaciones entre la estructura y la funcionalidad de las comunidades de bacterias, tanto en ecosistemas naturales como en ecosistemas artificiales (humedales artificiales) constituye en la actualidad un campo de gran interés científico (Bécares, 2009). La relación entre la diversidad de las comunidades de bacterias y la capacidad de depuración de estos sistemas naturales de depuración del agua residual se revela cada vez como más estrecha, por lo que en el diseño de estos sistemas se busca fomentar comunidades de bacterias con alta diversidad para conseguir procesos más eficientes (Ibeweke *et al.*, 2003).

En este contexto, es necesario ampliar la información referente a esta relación entre la estructura y la funcionalidad en los humedales artificiales con el objetivo final de mejorar su capacidad de depuración, ya que son muchos los aspectos aún desconocidos o controvertidos, como el efecto del sustrato (Gorra *et al.*, 2007) o de la vegetación (diversidad y/o biomasa) en la diversidad (diversidad de taxones y diversidad funcional) de las comunidades de bacterias (Calheiros *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010).

# BIBLIOGRAFÍA INTRODUCCIÓN

- Adriano D.C., 2001. Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability and Risk of Metals (second ed.), Springer, New York 867 pp.
- Ahn Y-H., 2006. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review. *Process Biochemistry* 41, 1709-1721.
- Amann R.I., Ludwig W. y Schleifer K.H., 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Review* 59, 143-169.
- Batty L.C., Baker A.J. y Wheeler B.D., 2002. Aluminium and phosphate uptake by *Phragmites australis*: the role of Fe, Mn and Al root plaques. *Annals of Botany* 89, 443-449.
- Bécares E., 2009. Biodiversity, pollutants and mediterranean wetlands. En: Bayona J.M. y García J. (editores) Book of Abstracts "3rd Wetland Pollutant Dynamics and Control - WETPOL2009-Barcelona", 19-20.
- Behrendt H., 1997. Detection of anthropogenic trends in time series loads using windows of discharges and long-term means. Report of the ICES/OSPAR workshop on the identification of statistical methods for temporal trends, ICES 25-26.2.1997, ICES CM 1997/Env: 11, Ref. D+E. Annex 5, 20-29.
- Birch L. y Bachofen R., 1990. Complexing agents from microorganisms. *Experientia* 46, 827-834.
- Boon N., de Windt W., Verstraete W. y Top E.M., 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS* 39, 101-112.
- Brierley C.L., 1990. Metal Immobilization Using Bacteria. En: Ehrlich H.L. y Brierly C.L. (eds.), *Microbial Mineral Recovery*. New York, NY, McGraw-Hill Book Publishing Company, 303-323.
- Brix H. y Arias C.A., 2005. Danish guidelines for small-scale constructed wetland systems for onsite treatment of domestic sewage. *Water Science and Technology* 51, 1-9.
- Brix H. y Schierup H.H., 1989. The use of aquatic macrophytes in water pollution control. *Ambio* 18, 100-107.
- Brix H., 1993. Wastewater treatment in constructed wetlands: system design, removal processes, and treatment performance. En: Moshiri G.A. (ed.), *Constructed wetlands form water quality improvement*. pp. 9-22. CRC press, Boca Raton, Florida, Estados Unidos.
- Brix H., 1997. Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands?. *Water Science and Technology* 35, 11-17.
- Brix H., Koottatep T. y Laugesen C.H., 2007. Wastewater treatment in tsunami affected areas of Thailand by constructed wetlands, *Water Sci. Technol.* 56, 69-74.
- Broda E., 1977. Two kind of lithotrophs missing in nature. *Zeitschrift fur allgemeine Mikrobiologie* 17, 491-493.

- Calheiros C., Duque A.F., Moura A., Henriques I.S., Correia A., Rangela A.O.O.S. y Castro P.M.L., 2009. Substrate effect on bacterial communities from constructed wetlands planted with *Typha latifolia* treating industrial wastewater. *Ecological Engineering* 35, 744-753.
- Chamchoi N. y Nitorisavut S., 2007. Anammox enrichment from different conventional sludges. *Chemosphere* 66, 2225-2232.
- Chaturvedi S., Chandra R. y Rai V., 2006. Isolation and characterization of *Phragmites australis* (L.) rhizosphere bacteria from contaminated site bioremediation of colored distillery effluent. *Ecological Engineering* 27, 202-207.
- Chen T.Y., Kao C.M., Yeh T.H., Chien H.Y y Chao A.C., 2006. Application of a constructed wetland for industrial wastewater treatment: A pilot-scale study. *Chemosphere* 64, 497-502.
- Collins B.S., McArthur J.V. y Sharitz, R.R., 2004. Plants effects on microbial assemblages and remediation of acidic coal pile runoff in mesocosm treatment wetlands. *Ecological Engineering* 23, 107-115.
- Collins B.S., Sharitz R.R. y Coughlin, D.P., 2005. Elemental composition of native wetland plants in constructed mesocosm treatment wetlands. *Bioresource Technology* 96, 937-948.
- Cooper F.P. y Findlater B.C. (Eds.), 1990. *Constructed Wetlands in Water Pollution Control. Proceedings of the IAWPRC Meeting, Cambridge, September 1990.*
- Cooper P.F., Job G.D., Green M.B. y Shutes R.B.E., 1996. Reed beds and constructed wetlands for wastewater treatment. WRC plc, Swindon, United Kingdom, 202 pp.
- 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.
- Dahllof I., 2002. Molecular community analysis of microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 213-217.
- Debusk T., Laughlin Jr R., Schartz L., 1996. Retention and compartmentalization of lead and cadmium in wetland microcosms. *Water, Science and Technology* 30(11), 2707-2717.
- DeLong E.F., 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 5685-5689.
- Dewisme E., 1997. Características de las aguas residuales. En: XV Curso sobre tratamiento de las aguas residuales y explotación de estaciones depuradoras. CEDEX. Madrid, España.
- Dimas M., Estrela T., Ordíñez P. y Krinner W., 2004. *Las aguas continentales en la Unión Europea.* Centro de publicaciones Secretaría General Técnica. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid. 390 pp.
- Dong Z. y Sun T., 2007. A potential new process for improving nitrogen removal in constructed wetlands promoting coexistence of partial nitrification and Anammox. *Ecological Engineering* 31, 69-78.
- Doolittle W.F., 1999. Phylogenetic classification and the universal tree. *Science* 284, 2124-2128.
- Drizo, A., Frost C.A., Grace J. y Smith K.A., 1999. Physico-chemical screening of phosphate-removing substrates for use in constructed wetland systems. *Water Research* 33, 3595-3602.

- Dunbabin J.S. y Browmer K.H., 1992. Potential use of constructed wetlands for treatment of industrial wastewaters containing metals. *Science of Total Environment* 111, 151-168.
- Eikelboom D.H., 1975. Filamentous organisms observed in activated sludge. *Water Research* 9, 365-388.
- Escaler M.I. y Mujeriego R., 2001. Eliminación biológica de nutrientes (nitrógeno y fósforo) mediante un proceso discontinuo de fangos activados. *Ingeniería del Agua* 1, 67-77.
- Förstner U., Ahlf W. y Calmano W., 1993. Sediment quality, objectives and criteria development in Germany. *Water Science and Technology* 28, 307-316.
- Fude L., Harris B., Urrutia M.M. y Beveridge T.J., 1994. Reduction of Cr(VI) by a consortium of sulfate-reducing bacteria (SRB III). *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1525-1531.
- Fyson A., Kalin M. y Adrian L.W., 1994. Arsenic and nickel removal by wetland sediments. En: *Proceedings of the International land reclamation and mine drainage conference, Third international conference on the abatement of acidic drainage, vol. 1. Pittsburgh, PA, pp. 109-118.*
- García J., Bayona J.M. y Morató J., 2004. Depuración con sistemas naturales: humedales construidos. *IV Congrés Ibèric de Gestió i Planificació de l'Aigua*, Diciembre, Tortosa, España.
- Gazea B., Adam K. y Kontopoulos A., 1996. A review of passive systems for the treatment of acid mine drainage. *Mineral Engineering* 9, 23-42.
- Geesey G.G., Borstad L. y Chapman P.M., 1984. Influence of flow-related events on concentration and phase distribution of metals in the lower Fraser River and a small tributary stream in British Columbia, Canada. *Water Resources* 18, 233-238.
- Gilbride K.A., Lee D.-Y. 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. y Field K.G., 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345, 60-63.
- Gorra R., Coci M., Ambrosoli R. y Laanbroek H.J., 2007. Effects of substratum diversity and stability of ammonia oxidizing communities in a constructed wetland used for wastewater treatment. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1442-1452.
- Goulet R.R. y Pick, F.R., 2001. Changes in dissolved and total Fe and Mn in a young constructed wetland: implications for retention performance. *Ecological Engineering* 17, 373-384.
- Groudev S.N., Bratcova S.G. y Komnitsas, K., 1999. Treatment of waters polluted with radioactive elements and heavy metals by means of a laboratory passive system. *Minerals Engineering* 12, 261-270.
- Groudev S.N., Georgiev P.S., Angelov A.T., Spasova I.I. y Mitrov T., 2001. Treatment of metal-contaminated waters by a pilot-scale constructed wetland. En: *International symposium Universitaria Ropet, Petrosani, Rumania.*



- Guilizzoni P., 1991. The role of heavy metals and toxic materials in the physiological ecology of submersed macrophytes. *Aquatic Botanic* 41, 87-109.
- Haleem D.A.E., Von Wintzingerode F., Moter A., Moawad H. y Gobel U.B., 2000. Phylogenetic analysis of rhizosphere-associated beta-subclass proteobacterial ammonia oxidizers in a municipal wastewater treatment plant based on rhizoremediation technology. *Letters in Applied Microbiology* 31, 34-38.
- Hallberg K.B. y Johnson D.B., 2005. Microbiology of a wetland ecosystem constructed to remediate mine drainage from a heavy metal mine. *Science of the Total Environment* 338, 53-66.
- Harms G., Layton A., Dionisi H., Gregory I., Garrett V., Hawkins S., Robinson K. y Sayler G., 2003. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environ Sci Technol* 37, 343-351.
- He Z., Xiao S., Xie X., Zhong H., Hu Y., Li Q., Gao F., Li G., Liu J. y Qiu G., 2007. Molecular diversity of microbial community in acid mine drainages of Yunfu sulfide mine. *Extremophiles* 11, 305-314.
- Hispagua, 2006. Vertidos en aguas continentales en España. Monográficos Hispagua. En <http://hispagua.cedex.es/documentacion/especiales/contaminacion/consecuencias.htm>
- Hugenholtz P., 2002. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology* 3, Reviews 0003.1-0003.8.
- Hugenholtz P., Goebel B.M. y Pace N.R., 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *The Journal of Bacteriology* 180, 4753-4774.
- Hugenholtz, P. y Huber, T., 2003. Chimeric 16S rDNA sequences of diverse origin are accumulating in the public databases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 289-293.
- Ibekwe A.M., Grieve C.M. y Lyon S.R., 2003. Characterization of microbial communities and composition in constructed dairy wetland wastewater effluent. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5060-5069.
- Jetten M.S.M., Schmid M.C., Van de Pas-Schoonen K.T., Sinninghe Damsté J.S. y Strous M., 2005. Anammox organisms: enrichment, cultivation and environmental analysis. *Methods in Enzymology* 397, 34-57.
- Jetten M.S.M., Strous M., Van de Pas\_Schoonen K.T., Schalk J., Van Dongen L., Van de Graaf A.A., Logemann S., Muyzer G., Van Loosdrecht M.C.M. y Kuenen J.G., 1999. The anaerobic oxidation of ammonia. *FEMS Microbiology Reviews* 22, 421-437.
- Jing S.R., Lin Y.F., Lee D.Y. y Wang T.W., 2001. Nutrient removal from polluted river water by using constructed wetlands. *Bioresource Technology* 76, 131-135.
- Kadlec R.H. y Knight R.L., 1996. *Treatment wetlands*. Ed. Lewis, Chelsea, Michigan, Estados Unidos, 893 pp.
- Kartal M.B., Rattray J., Van Niftrik L.A., Van de Vossenberg J., Schmid M.C., Webb R.I., Schouten S., Fuerst J.A., Damsté J.S., Jetten M.S.M. y Strous M., 2007. Candidatus *Anammoxoglobus*

- propionicus* a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 30, 39-49.
- Kickuth R., 1977. Degradation and incorporation of nutrient from rural wastewater by plant rhizosphere under limnic condition. En: Utilization of manure by land spreading. Comm. of the Europ. Communities, EUR 5672e, London.
- Kirschner A.K.T. y Velimirov B., 1999. Benthic bacterial secondary production measured via simultaneous <sup>3</sup>H-thymidine and <sup>14</sup>C-leucine incorporation, and its implications for the carbon cycle of a shallow macrophyte-dominated backwater system. *Limnology and Oceanography* 44, 1871-1881.
- Knobelsdorf Miranda J., 2005. Eliminación biológica de nutrientes en un ARU de baja carga orgánica mediante el proceso VIP. Tesis doctoral, Escola Tècnica Superior d'enginyers de camins canals i ports de Barcelona, Universidad Politècnica de Catalunya. España.
- Koonin E.V. y Wolf Y.I., 2008. Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Research* 36, 6688-6719.
- Kosolapov D.B., Kusch M.B., Vainshtein A.V., Vatsourina A., Wießner M. y Kästner R.A.M., 2004. Microbial Processes of Heavy Metal Removal from Carbon-Deficient Effluents in Constructed Wetlands. *Engineering in Life Sciences* 4, 403-411.
- Kröpfelová L., Vymazal J., Svehla J. y Stíchová J., 2009. Removal of trace elements in three horizontal sub-surface flow constructed wetlands in the Czech Republic. *Environmental Pollution* 157, 1186-1194.
- Ledin M. y Pedersen K., 1996. The environmental impact of mine wastes – Roles of microorganisms and their significance in treatment of mine wastes. *Earth-Science Reviews* 41, 67-108.
- Lee C., Fletcher T.D. y Sun G., 2009. Nitrogen removal in constructed wetland systems. *Engineering in Life Sciences* 9, 11-22.
- Lesley B., Daniel H., Paul Y., 2008. Iron and manganese removal in wetland treatment systems: Rates, processes and implications for management. *Science of the Total Environment* 394, 1-8.
- López Castillo H., 2008. Desarrollo del proceso Anammox para el tratamiento de lixiviados: puesta en marcha y aplicación. Tesis doctoral, Laboratorio de ingeniería química y ambiental, Universidad de Gerona. España.
- Lozupone C.A, Hamady M., Kelley S.T. y Knight R., 2007. Quantitative and qualitative  $\beta$  diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 1576–1585.
- Ludwig W., Mittenhuber G. y Friedrich C.G., 1993. Transfer of *Thiosphaera pantotropha* to *Paracoccus denitrificans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 43, 363-367.
- Ludwig W., Strunk O., Klugbauer S., Klugbauer N., Weiznegger M., Neumaier J., Bachleitner M. y Schleifer K.H., 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* 19, 554-568.
- Madigan M.T, Martinko J.M. y Parker J., 1998. Brock Biología de los microorganismos. Octava edición. Prentice Hall, United Kingdom, 986 pp.

- Maine M.A., Suñe N., Hadad H., Sánchez G. y Bonetto C., 2006. Nutrient and metal removal in a constructed wetland for wastewater treatment from a metallurgic industry. *Ecological Engineering* 26, 341-347.
- Margalef R., 1983. *Limnología*. Ed. Omega. Barcelona, España, 1010 pp.
- Martel G., Vera L., Salas J.J. y Sardón N., 2006. En: *Gestión sostenible del agua residual en entornos rurales*. Cap. 1. Proyecto DEPURANAT, cofinanciado por el programa INTERREG IIIB-ESPACIO ATLÁNTICO. Ed. Instituto Tecnológico de Canarias. España, 300 pp.
- Masscheleyn P.H. y Patrick W.H., 1994. Selenium, arsenic and chromium redox chemistry in wetland soils and sediments. En: Adriano D.C., Chen Z.S. y Yang S.S. (editores). *Biogeochemistry of trace elements*, 615-625 pp.
- Matagi S.V., Swai D. y Mugabe R., 1998. A review of heavy metal removal mechanisms in wetlands. *African Journal of Tropical Hydrobiology and Fisheries* 8, 23-35.
- Mayr E., 1998. Two empires or three?. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9720-9723.
- Mays P.A. y Edwards G.S., 2001. Comparison of heavy metal accumulation in a natural wetland and constructed wetlands receiving acid mine drainage. *Ecological Engineering* 16, 487-500.
- McCarthy, A.J. y Cross T., 1981. A note on a selective isolation medium for the thermophilic actinomycete *Thermomonospora chromogena*. *Journal of Applied Bacteriology*. 51, 299-302.
- McNeill A. y Olley S., 1998. The effects of motorway runoff on watercourses in south-west Scotland. *Water and Environment Journal* 12, 433-439.
- Metcalf y Eddy, 2003. *Wastewater engineering. Treatment and reuse*. 4 edición. Ed. McGraw-Hill. New Cork, Estados Unidos, 1819 pp.
- Mitsch, W.J. y Gosselink J.G., 2000. *Wetlands*. 3 edición. Wiley and sons, New York, Estados Unidos, 920 pp.
- Murdoch A. y Capobianco J., 1978. Study of selected metals in marshes on Lake St. Clair, Ontario. *Arch. Hydrobiol.* 84, 87-108.
- Muyzer G. y Smalla K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 127-141.
- Nelson E.A., Specht W.L., Bowers J.A. y Gladden J.B. 2002. Constructed wetlands for removal of heavy metals from NPDES outfall effluent. Tech. Rep. WSRC-TR-2002-00600. Savannah River Technology Center, Westinghouse Savannah River Co., Aiken, SC.
- Nicomrat D., Dick W.A. y Tuovinen O.H., 2006. Assessment of the microbial community in a constructed wetland that receives acid coal mine drainage. *Microb. Ecol.* 51, 83-89.
- Nicomrat D., Dick W.A., Dopson M. y Tuovinen O.H., 2008. Bacterial phylogenetic diversity in a constructed wetland system treating acid coal mine drainage. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 312-321.

- Nogales B., Moore E.R., Llobet-Brossa E., Rossello-Mora R., Amann R. y Timmis K.N., 2001. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Appl. Environ. Microb.* 67, 1874-1884.
- Noller B.N., Woods P.H. y Ross, B.J., 1994. Case studies of wetland filtration of mine waste water in constructed and naturally occurring systems in northern Australia. *Water Science and Technology* 29, 257-266.
- Ohtade H. y Silver S., 1994. Bacterial detoxification of toxic chromate. En: *Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals*. Ed. Cahvolhry G.R., Dioscorides, Portland, OR, 528 pp.
- Oria L.I., Martínez J. y Arnáiz C., 2000. Tratamiento biológico de aguas residuales I: eliminación de carbono orgánico. *Tecnología de Agua* 198, 20-27.
- 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.
- Prat N., 1997. Estado ecológico de los ecosistemas acuáticos en España. En: [www.us.es/ciberico/narcisprat.pdf](http://www.us.es/ciberico/narcisprat.pdf).
- Qian J., Zayed A., Zhu Y., Yu M., Terry N., 1999. Phytoaccumulation of trace elements by wetlands plants: III. Uptake and accumulation of ten trace elements by twelve plant species. *Journal of Environmental Quality*. 28, 1448-1445.
- Rayner-Canham R., 2002. *Química inorgánica descriptiva*. 2 edición. Editorial Prentice Hall, 595 pp.
- Reddy K.R. y D'Angelo E.M., 1997. Biogeochemical indicators to evaluate pollutant removal efficiency in constructed wetlands. *Water Science and Technology* 35, 1-10.
- Reddy K.R., Patrick W.H. y Lindau C.W., 1984. Nitrification-denitrification at the plant root-sediment interface in wetlands. *Limnology and Oceanography* 34, 1004-1013.
- Richardson C.J. y Marshall P.E., 1986. Processes controlling the movement, storage, and export of phosphorus in a fen peatland. *Ecological Monographs* 56, 279-302.
- Richardson C.J., Qian S., Craft C.B. y Qualls R.G., 1997. Predictive models for phosphorus retention in wetlands. *Wetlands Ecology and Management* 4, 159-175.
- Rivas Mijares G., 1978. *Tratamiento de aguas residuales*. 20 edición. Ed. Vega. Madrid, España, 534 pp.
- Rodríguez-Roda I., Comas J. y Poch M., 2008. Contaminación del agua: origen, control y monitoreo. En: *Evaluación y prevención de riesgos ambientales en Centroamérica*. Eds. Andrés P. y Rodríguez, R. Documenta Universitaria. Gerona, España.
- Roest K., Heiling H.G.H.J., Smidt H., de Vos V.M., Stams A.J.M. y Akkermans A.D.L., 2005. Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill wastewater. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, 175-185.
- Rosselló-Móra, R., Antón, J., 2009. Procariotas: Arqueas y Bacterias. En: Vargas P. y Zardoya R. (editores), *El árbol de la vida*. Editorial Reverté, 3-17 pp.

- Ruiz J.M., 1998. Aspectos económicos relacionados con la calidad de las aguas. Aplicación al caso de España. En: Congreso ibérico sobre gestión y planificación de las aguas. El agua a debate desde la Universidad. Hacia una nueva cultura del agua. Zaragoza, España.
- Ruiz Rueda O., 2008. Nitrifying and denitrifying bacterial communities in the sediment and rhizosphere of a free water surface constructed wetland. Tesis doctoral, Instituto de Ecología Acuática, Universidad Gerona. España.
- Ruiz Rueda O., Trias R., García-Gil L.J. y Bañeras L., 2007. Diversity of the nitrite reductase gene *nirS* in the sediment of a free-water surface constructed wetland. *International microbiology* 10, 253-260.
- Russell R.A., Holden P.J., Wilde K.L. y Neilan B.A., 2003. Demonstration of the use of *Scenedesmus* and *Carteria* biomass to drive bacterial sulphate reduction by *Desulfovibrio alcoholovorans* isolated from an artificial wetland. *Hydrometallurgy* 71, 227-234.
- Santasiero A., Veschetti E., Donati G., Ottaviani M., 1998. Heavy metal distribution in wastewater from a treatment plant. *Microquimical Journal* 59, 219-227.
- Sanz J.L. y Köchling T., 2007. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: an overview. *Process Biochemistry* 42, 119-133.
- Schiffer D.M., 1989. Water quality variability in a Central Florida wetland receiving highway runoff. En: Davis, F.E. (ed.), *Waters: Laws and management*. American water research association, Bethesda, MD, pp. 7A-1-7A-11.
- Schmid M.C., Twachtmann U., Klein M., Strous M., Juretschko S., Jetten M., Metzger J.W., Schleifer K.H. y Wagner M., 2000. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Systematic and Applied Microbiology* 23, 93-106.
- Schmid M.C., Walsh K., Webb R., Rijpstra W.I., van de Pas-Schoonen K., Verbruggen M.J., Hill T., Moffett B., Fuerst J., Schouten S., Damsté J.S., Harris J., Shaw P., Jetten M. y Strous M., 2003. Candidatus "*Scalindia brodae*", sp. nov., Candidatus "*Scalindia wagneri*", sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 26, 529-538
- Scholz M. y Xu J., 2002. Performance comparison of experimental constructed wetlands with different filter media and macrophytes treating industrial wastewater contaminated with lead and copper. *Bioresources Technology* 83, 71-79.
- Scholz M., 2003. Performance predictions of mature experimental constructed wetlands which treat urban water receiving high loads of lead and copper. *Water Research* 37, 1270-1277.
- Seidel K., 1964. Abau von *Bacterium coli* durch höhere Pflanzen, *Naturwissenschaften* 51, 395 pp.
- Seidel K., 1966. Reinigung von Gewässern durch höhere Pflanzen, *Naturwissenschaften* 53, pp. 289-297.
- Shapiro O.H., Kushmaro A., Brenner A., 2010. Bacteriophage predation regulates microbial abundance and diversity in a full-scale bioreactor treating industrial wastewater. *The ISME Journal* 4, 327-336.

- Sheoran A.S., Sheoran V., 2006. Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wetlands: a critical review. *Minerals Engineering* 19, 105-116.
- Sinicrope T., Langis R., Gergberg R. M., Busnardo M. J. y Zedler J. B., 1992, Removal of Metals by Wetlands Mesocosms Subjected to Different Hydroperiods. *Ecological Engineering* 1, 309-322.
- Sleytr K., Tietz A., Langergraber G., Haberla R. y Sessitschb A., 2009. Diversity of abundant bacteria in subsurface vertical flow constructed wetlands. *Ecological Engineering* 35, 1021-1025.
- Sobolewski A., 1996. Metal species indicate the potential of constructed wetlands for long-term treatment of mine drainage. *Ecological Engineering* 6, 259-271
- Sobolewski A., 1999. A review of processes responsible for metal removal in wetlands treating contaminated mine drainage. *International Journal of Phytoremediation* 1 (1), 19-51.
- Spiels D.J. y Mitsch W.J., 2000. The effects of season and hydrologic and chemical loading on nitrate retention in constructed wetlands: a comparison of low- and high-nutrient riverine systems. *Ecological Engineering* 14, 77-91.
- Stanier R.Y. y Van Niel C.B., 1962. The concept of a bacterium. *Arch Mikrobiol* 42, 17-35.
- Stottmeister U., Wießner A., Kusch P., Kappelmeyer U., Kaestner M. y Bederski O., 2003. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnology Advances* 22, 93-117.
- Strous M., Fuerst J.A., Kramer H.M., Logemann G., Muyzer K.T., Van de Pas-Schoonen, Webb R., Kuenen J.G. y Jetten M.S.M., 1999. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400, 446-449.
- Strous M., Gerven E.V., Zheng P., Kuenen J.G. y Jetten M.S.M., 1997. Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process in different reactor configurations. *Water Research* 31, 1955-1962.
- Strous M., Pelletier E., Mangenot S., Rattei T., Lehner A., Taylor M.W., Horn M., Daims H., Bartol-Mavel D., Wincker P., Barbe V., Fonknechten N., Vallenet D., Segurens B., Schenowitz-Truong C., Médigue C., Collingro A., Snel B., Dutilh B.E., Op den Camp H.J., van der Drift C., Cirpus I., Van de Pas-Schoonen K.T., Harhangi H.R., Van Niftrik L., Schmid M., Keltjens J., Van de Vossenberg J., Kartal B., Meier H., Frishman D., Huynen M.A., Mewes H.W., Weissenbach J., Jetten M.S., Wagner M. y Le Paslier D., 2006. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*, 440, 790-794.
- Su J.J., Liu B.Y. y Liu C.Y., 2001. Comparison of aerobic denitrification under high oxygen atmosphere by *Thiosphaera pantotropha* ATCC35512 and *Pseudomonas stutzeri* SU2 newly isolated from the activated sludge of piggery wastewater treatment system, *Journal Applied Microbiology* 90, 457-462.
- Sun G. y Austin D., 2007. Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in lab-scale constructed wetlands: evidence from a mass balance study. *Chemosphere* 68, 1120-1128.
- Suzuki M.T., Rappe M.S., Haimberger Z.W., Winfield H., Adair N., Strobel J. y 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.

- Tarutis Jr. W.J. y Unz, R.F., 1996. Biogeochemical fate of coal mine drainage pollutants in constructed wetlands. *Curr. Top. Wetland Biogeochem.* 2, 40-51.
- Tietz A., Kirschner A., Langergraber G., Sleytr K. y Haberl R., 2007. Characterisation of microbial biocoenosis in vertical subsurface flow constructed wetlands. *Science of the Total Environment* 380, 163-172.
- Ueda S. y Earle R.L., 1972. Microflora of activated sludge. *Journal of General and Applied Microbiology* 18, 239-248.
- Veglio F. y Beolchini F., 1997. Removal of toxic metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy*, 44, 301-316.
- Verhoeven J.T.A. y Meuleman A.F.M., 1999. Wetlands for wastewater treatment: opportunities and limitations. *Ecological Engineering* 12, 5-12.
- Vymazal J. y Kröpfelová L., 2008. Wastewater treatment in constructed wetlands with horizontal sub-surface flow. En: Alloway B.J. y Trevors J.T. (editores). *Environmental Pollution Series* nº 14. Springer, 566 pp.
- Vymazal J., 1995. *Algae and element cycling in wetlands*. CRC Press/Lewis Publisher, Boca Raton, Florida, Estados Unidos, 689 pp.
- Vymazal J., 2005. Horizontal sub-surface flow and hybrid constructed wetlands systems for wastewater treatment. *Ecological Engineering* 25, 478-490.
- Vymazal J., Brix H., Cooper P.F., Haberl R., Perfler R. y Laber J., 1998. Removal mechanisms and types of constructed wetlands. En: Vymazal J., Brix H., Cooper P.F., Green M.B. y Haberl R. (eds.), *Constructed wetlands for wastewater treatment in Europe*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, 17-66 pp.
- Vymazal J. y Krása P., 2003. Distribution of Mn, Al, Cu and Zn in a constructed wetland receiving municipal sewage. *Water Science and Technology* 46, 299-305.
- Vymazal J., Kröpfelová L., Svehlac J., Chrastný V. y Stíchova J., 2009. Trace elements in *Phragmites australis* growing in constructed wetlands for treatment of municipal wastewater. *Ecological Engineering* 35, 303-309.
- Walker, D.J., Hurl, S. 2002. The reduction of heavy metals in a stormwater wetland. *Ecological Engineering* 18, 407-414.
- Wetzel R.G., 1993. Constructed wetlands: scientific foundations are critical. En: Moshiri, G.A. (ed.), *Constructed Wetlands for Water Quality Improvement*. CRC Press, Boca Raton, Florida, Estados Unidos, 3-7 pp.
- Whitman W.B., Coleman D.C. y Wiebe W.J., 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 6578-6583.
- Wiebner A., Kappelmeyer U., Kusch P. y Kastner, M., 2005. Influence of the redox condition dynamics on the removal efficiency of a laboratory-scale constructed wetland. *Water Research* 29, 248-256.
- Wieder R.K., 1989. A survey of constructed wetlands for acid coal mine drainage treatment in the eastern United States. *Wetlands* 9, 299-315.

- Wieder R.K., 1993. Ion input/output budgets for five wetlands constructed for acid coal mine drainage treatment. *Water, Air and Soil Pollution* 71, 231-270.
- Wiessner A., Kusch P., Buddhawong S., Stottmeister U., Mattusch J. y Kästner, M., 2006. Effectiveness of various small-scale constructed wetlands designs for the removal of iron and zinc from acid mine drainage under field conditions. *Engineering Life Science* 6, 584-592.
- Woese C.R., 2000. Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 8392-8396.
- Woese C.R., Kandler O. y Wheelis M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 4576-4579.
- Wood T. y Shelley M., 1999. A dynamic model of bioavailability of metals in constructed wetland sediments. *Ecological Engineering* 12, 231-252.
- Yan L., Inamori R., Gui P., Xu K-G., Kong H-N, Matsurnura M. y Inamori Y., 2005. Distribution characteristics of ammonia-oxidizing bacteria in the *Typha latifolia* constructed wetlands using fluorescent in situ hybridization (FISH). *Journal of Environmental Science* 17, 993-997.
- Ye Z.H., Whiting S.N., Qian J.H., Lytle C.M., Lin Z.Q. y Terry N., 2001. Wetlands and aquatic processes, trace elements removal from coal ash leachate by a 10 years old constructed wetland. *Journal of Environmental Quality* 30, 1710-1719.
- Zayed A., Zhy Y.L., Yu M. y Terry, N., 1999. Phytoaccumulation of trace elements by wetlands plants. III. Uptake and accumulation of ten trace elements by twelve plant species. *Journal of Environmental Quality* 28, 1448-1455.
- Zehnder A.J.B., Huser B.A., Brock T.D. y Wuhrmann K., 1980. Characterization of an acetate-decarboxylating, non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Archives of Microbiology* 124, 1-11.
- Zhang C.B., Wang J., Liu W.L., Zhu S.X., Ge H.L., Chang S.X., Chang J. y Ge, Y., 2010. Effects of plant diversity on microbial biomass and community metabolic profiles in a full-scale constructed wetland. *Ecological Engineering* 36, 62-68.
- Zhang X.L., Yan X., Gao P.P., Wang L.H., Zhou Z.H. y Zhao L.P., 2005. Optimized sequence retrieval from single bands of temperature gradient gel electrophoresis profiles of the amplified 16S rDNA fragments from an activated sludge system. *Journal of Microbiological Methods*. 60, 1-11.
- Zuckerkindl E. y Pauling L., 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology* 8, 357-366.
- Zumft W.G., 1992. The denitrifying prokaryotes. En: Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H. (ed.), *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology isolation identification applications*. Vol. 1, (2ª edición), New York, NY: Springer-Verlag, 1992, pp. 554-582.







# OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es aportar información relevante sobre el funcionamiento de los humedales artificiales como sistemas para el tratamiento de agua residual.

Este estudio se centra en tres aspectos para los que existe un escaso conocimiento:

- El funcionamiento a largo plazo de los humedales artificiales como sistemas maduros para el tratamiento de agua residual urbana.
- La sostenibilidad de los humedales artificiales como sistemas para el tratamiento de agua residual con metales.
- La caracterización de las comunidades de bacterias presentes en estos sistemas de depuración.

Para alcanzar estos objetivos generales, se han desarrollado diversos objetivos específicos:

- Evaluar distintos diseños de humedales artificiales en relación a su capacidad para eliminar metales pesados, utilizando arsénico y zinc como modelo, de la fracción líquida de agua residual industrial, mediante el empleo de un sistema piloto a pequeña escala.
- Estudiar el comportamiento de un sistema a escala real para el tratamiento de agua residual urbana después de ocho años de funcionamiento, en relación a su capacidad de depuración de distintos contaminantes, entre los que se incluyen metales pesados.
- Evaluar la concentración total de metales pesados acumulados en los sedimentos de las distintas balsas del sistema a escala real y estudiar la posible utilización de estos lodos para su reutilización como abono en la agricultura.
- Conocer la cantidad de metales retenida por la vegetación del sistema a escala real.
- Caracterizar la composición (identificación de los taxones), y estimar la diversidad de las comunidades de bacterias presentes en el sistema piloto a pequeña escala, para el tratamiento de agua residual industrial, en cada una de sus distintas combinaciones de diseño, mediante la formación de librerías de clones, cloración y secuenciación
- Caracterizar la composición (identificación de los taxones), y estimar la diversidad de las comunidades de bacterias presentes en el sistema a escala real, para el tratamiento de agua residual urbana, utilizando la misma metodología que para el sistema piloto a pequeña escala.

# 3

## MATERIAL Y MÉTODOS

### **1. Plantas piloto**

En este trabajo se han utilizado dos plantas piloto de humedales artificiales, una de ellas se ha construido a pequeña escala y se ha utilizado para el estudio de los humedales artificiales como sistemas para el tratamiento de agua residual industrial con metales pesados. La segunda de estas plantas es una planta construida a escala real que desde el año 1995 funciona como sistema de tratamiento de agua residual urbana de una localidad de la provincia de León.

#### **1.1. Planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial**

Se ha diseñado y construido una planta piloto en el Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad, de la Universidad de León, para el desarrollo de este estudio.

El sistema está formado por una serie de cubetas de PVC, cada una de las cuales constituye un microecosistema y una unidad experimental. Estas unidades experimentales se han diseñado a

partir de la combinación de distintos factores (diseño experimental factorial). Se ha trabajado con tres cubetas iguales, que han funcionado como réplicas, para cada tipo de microecosistema obtenido de la combinación de factores.

El agua utilizada en el experimento ha sido agua residual sintética o artificial preparada en un tanque de 1000 litros. Para ello, se ha realizado una disolución en agua potable (Tabla 5) de hidrogenoarseniato de disodio heptahidrato ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) y nitrato de zinc ( $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ), para obtener una concentración media de  $20 \text{ mg l}^{-1}$  de arsénico y  $15 \text{ mg l}^{-1}$  de zinc en disolución. Mediante la adición de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) se ha obtenido un pH en la disolución de 4,00. Estas concentraciones de metales así como el pH del agua han sido definidos en función de las características del agua residual procedente de una planta de tratamiento de mineral y balsas de decantación de una explotación minera situada en el Principado de Asturias.

Tabla 5. Parámetros químicos medios del agua procedente de la Estación de Tratamiento de Agua Potable del Porma (ETAP del Porma, León) que se ha empleado como disolvente en la mezcla preparada como agua residual industrial. Datos facilitados por el Laboratorio Municipal de León.

Parámetro	Valor
pH	7,8
Cloro combinado ( $\text{mg l}^{-1}$ )	0,07
Cloro libre residual ( $\text{mg l}^{-1}$ )	0,70
Cloruros ( $\text{mg l}^{-1}$ )	5,3
Oxidabilidad ( $\text{mgO}_2 \text{ l}^{-1}$ )	1,6
Hierro ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	50
Manganeso ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	0,0
Arsénico ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	0,0
Sodio ( $\text{mg l}^{-1}$ )	2,1
Amonio ( $\text{mg l}^{-1}$ )	0,0
Sulfato ( $\text{mg l}^{-1}$ )	7,0
Nitrato ( $\text{mg l}^{-1}$ )	1,50

La incorporación de agua a cada uno de los distintos ecosistemas se ha realizado mediante un sistema de riego por goteo en continuo controlado por un programador. La instalación se ha mantenido en funcionamiento durante 10 meses, desde abril hasta septiembre del año 2004 y 2005. Durante los meses de invierno, se detectaron problemas de congelación en los microtubos para el riego, por lo que durante este periodo el sistema no estuvo operativo. Las condiciones de insolación, temperatura y humedad fueron las mismas para todas las unidades experimentales.

En la primera parte del ensayo se ha trabajado durante dos meses con la combinación de los siguientes factores: caudal ( $1 \text{ ml min}^{-1}$  y  $2 \text{ ml min}^{-1}$ ), flujo hidráulico (subsuperficial y superficial) y tipo de sustrato (arrita y grava silíceas). Ninguno de los dos sustratos empleados presentaba en su composición materia orgánica. Los sustratos seleccionados han sido arlita y grava silícea. La arlita es arcilla expandida con una estructura altamente porosa (46 % de porosidad) que se fabrica a partir de arcilla pura, su diámetro oscila en un rango de entre 1 y 2 cm. El tamaño de la grava silícea ha sido de "lentejuela", con un diámetro entre 0,5 y 1 cm.

La mitad de las cubetas (12) han contado con un flujo superficial. Se han rellenado con grava o arlita hasta una altura de 35 cm y tienen la salida de efluente a una altura de 55 cm, lográndose así un flujo superficial. La otra mitad de las cubetas (12) se han rellenado con el sustrato hasta 55 cm

de altura, presentando un flujo subsuperficial, con entrada por la parte superior y salida por la parte inferior. El tiempo de retención hidráulica medio ha sido de 2 horas para las cubetas con flujo superficial, y de 1 hora en las cubetas con flujo subsuperficial (Tabla 6).

La segunda parte del ensayo se ha realizado entre junio y agosto de 2005. En esta etapa se ha eliminado el factor caudal, y se ha incorporado el factor presencia o ausencia de vegetación. Para ello, se han plantado 12 individuos de *Typha latifolia* (enea) en otras 12 cubetas para obtener 12 microecosistemas con vegetación y 12 como controles (sin vegetación). La planta utilizada se obtuvo de individuos cultivados al efecto en la Escuela Taller de Medio Ambiente de la Diputación de León procedentes de planta recogida en humedales naturales localizados en la provincia de León y que en el momento de la plantación presentaban un adecuado desarrollo. La recogida de muestras comenzó 30 días después de la plantación.

*Typha latifolia* es un macrófito emergente. Se trata de una planta arraigada en un sustrato sumergido o encharcado en agua y con una parte de su cuerpo vegetativo por encima de la lámina de agua (parte aérea). La parte sumergida presenta gran desarrollo. Por tanto, en esta etapa se ha trabajado con la combinación de los siguientes factores: flujo hidráulico (subsUPERFICIAL y superficial), tipo de sustrato (arilita y grava silíceas), presencia/ausencia de vegetación (*Typha latifolia*) (Tabla 6 y Figuras 6 y 7).

La tercera fase del ensayo se ha realizado manteniendo los mismos factores que en la anterior (flujo hidráulico, tipo de sustrato, presencia/ausencia de vegetación), con la diferencia del tipo de planta empleada, ya que en esta ocasión se ha trabajado con *Phragmites australis* (carrizo) que al igual que *Typha latifolia* es una planta acuática hidrófita emergente (Tabla 6).

La plantación de *Phragmites australis* se realizó a partir de individuos cultivados para este fin por la Escuela Taller de Medio Ambiente. La planta presentaba en el momento de la plantación un adecuado desarrollo. La toma de muestras comenzó 30 días después de la plantación del carrizo.

En la segunda y tercera fase del experimento se ha añadido al agua un fertilizante NPK 18+11+18 (Universol, Water Soluble Fertilizer, 3:2:3) ya que el contenido en nutrientes del agua se consideró escaso para el buen crecimiento de la planta. Por cada 1000 litros de agua se añadió 1 kg de dicho fertilizante.

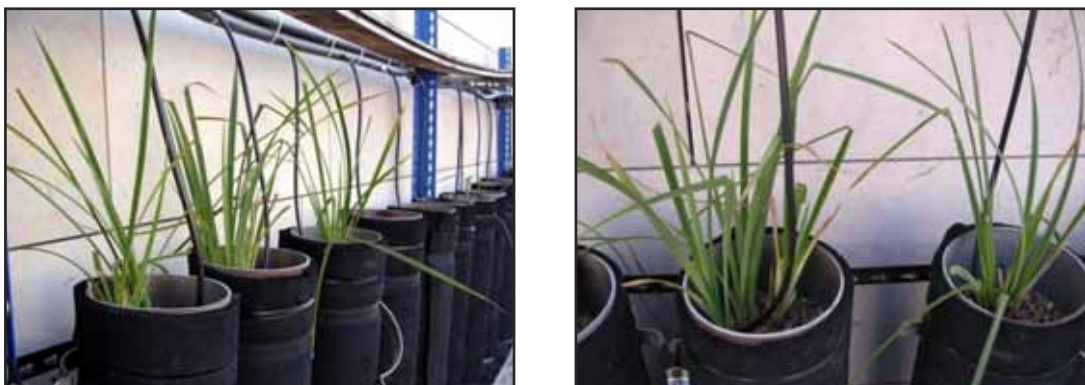


Figura 6. Detalle de la planta piloto experimental para el tratamiento de agua residual industrial sintética en la segunda fase de funcionamiento.

Tabla 6. Conjunto de microecosistemas utilizados en el experimento, diseñados mediante la combinación de los factores estudiados. Cada microecosistema está constituido por 3 réplicas de cada unidad experimental.

Microecosistema	Factores			
	Caudal	Sustrato	Flujo hidráulico	Vegetación
<b>AFC</b>	1 ml min <sup>-1</sup>	arlita (A)	superficial (F)	sin vegetación (C)
<b>GFC</b>	1 ml min <sup>-1</sup>	grava silíceea (G)	subsuperficial (S)	sin vegetación (C)
<b>ASC</b>	1 ml min <sup>-1</sup>	arlita (A)	superficial (F)	sin vegetación (C)
<b>GSC</b>	1 ml min <sup>-1</sup>	grava silíceea (G)	subsuperficial (S)	sin vegetación (C)
<b>MAFC</b>	2 ml min <sup>-1</sup>	arlita (A)	superficial (F)	sin vegetación (C)
<b>MGFC</b>	2 ml min <sup>-1</sup>	grava silíceea (G)	subsuperficial (S)	sin vegetación (C)
<b>MASC</b>	2 ml min <sup>-1</sup>	arlita (A)	superficial (F)	sin vegetación (C)
<b>MGSC</b>	2 ml min <sup>-1</sup>	grava silíceea (G)	subsuperficial (S)	sin vegetación (C)
<b>MAFT</b>	2 ml min <sup>-1</sup>	arlita (A)	superficial (F)	<i>Typha latifolia</i> (T)
<b>MGFT</b>	2 ml min <sup>-1</sup>	grava silíceea (G)	subsuperficial (S)	<i>Typha latifolia</i> (T)
<b>MAST</b>	2 ml min <sup>-1</sup>	arlita (A)	superficial (F)	<i>Typha latifolia</i> (T)
<b>MGST</b>	2 ml min <sup>-1</sup>	grava silíceea (G)	subsuperficial (S)	<i>Typha latifolia</i> (T)
<b>MAFP</b>	2 ml min <sup>-1</sup>	arlita (A)	superficial (F)	<i>Phragmites australis</i> (P)
<b>MGFP</b>	2 ml min <sup>-1</sup>	grava silíceea (G)	subsuperficial (S)	<i>Phragmites australis</i> (P)
<b>MASP</b>	2 ml min <sup>-1</sup>	arlita (A)	superficial (F)	<i>Phragmites australis</i> (P)
<b>MGSP</b>	2 ml min <sup>-1</sup>	grava silíceea (G)	subsuperficial (S)	<i>Phragmites australis</i> (P)

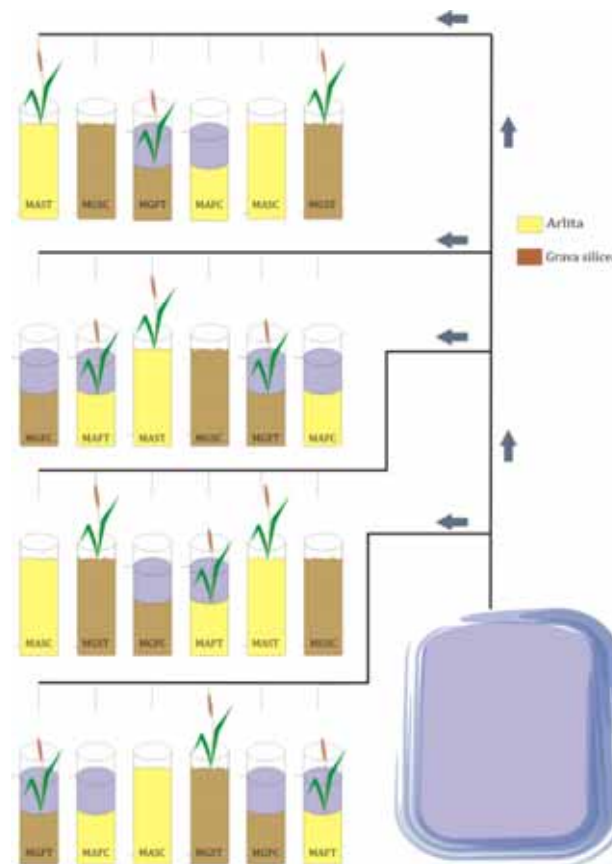


Figura 7. Esquema general de la planta piloto en la segunda fase de funcionamiento. Factores estudiados: tipo de sustrato, arlita (A) y grava (G); flujo hidráulico, superficial, lámina de agua de 20 cm por encima del sustrato (F) y subsuperficial, sin lámina superficial de agua (S); y vegetación, tratamientos control sin vegetación (C) y tratamientos plantados con *Typha latifolia* (T).

## 1.2. Planta piloto a escala real para el tratamiento de agua residual urbana

La localidad de Bustillo de Cea se encuentra situada en el noroeste de la península ibérica, al este de la provincia de León, en el municipio de Cea (Figura 8). Se trata de una pequeña población de 122 habitantes (nomenclátor 2009, Instituto Nacional de Estadística) y 450 habitantes equivalentes en su máximo estacional, en la que el sector primario, agricultura y ganadería, constituye la base de la economía local.

La Diputación Provincial de León y el Ayuntamiento de Cea promovieron en el año 1995 un proyecto de construcción de una depuradora de macrófitos para el tratamiento del agua residual de la localidad de Bustillo de Cea. Esta planta, comenzó a funcionar en el año 1999 y en la actualidad sigue depurando el agua de la localidad.

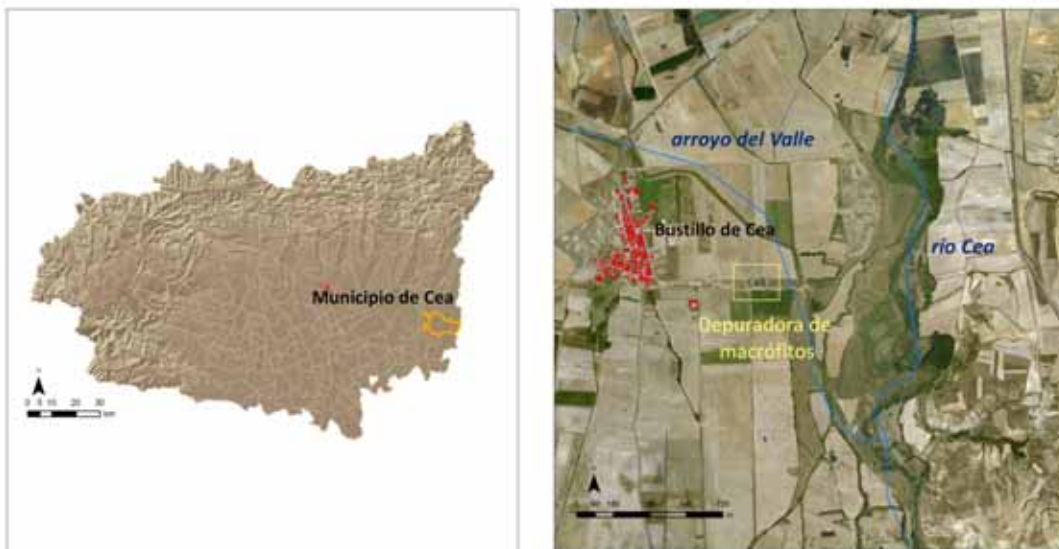


Figura 8. Localización del municipio de Cea en la provincia de León. Mapa de situación del núcleo de Bustillo de Cea, la planta depuradora, y el lugar de vertido, en el arroyo del Valle.

La instalación ocupa una superficie de 890 m<sup>2</sup>. El diseño de este humedal artificial está inspirado en el sistema llamado mosaico jerarquizado de ecosistemas artificiales (MJEA®). Este sistema fue desarrollado originariamente en Bélgica (Radoux y Kemp, 1982) y busca aprovechar y aplicar las distintas adaptaciones de las plantas acuáticas a la depuración del agua residual (Ansola *et al.*, 2003).

La instalación de Bustillo de Cea se desarrolló en base al sistema del núcleo de Lallaing, Francia (Radoux *et al.*, 1995; 1997). El sistema funciona por gravedad, sin ningún bombeo de agua, a pesar de la escasa pendiente existente en el emplazamiento. Su diseño se realizó para una población de 250 habitantes en invierno, llegando a 400 durante los meses estivales (Caminero, 1996).

El agua residual, antes de entrar en el humedal, circula por un pretratamiento constituido por una balsa de decantación y unas rejillas de desbaste. A partir de este pretratamiento, el agua entra en el propio MJEA®, el cual está constituido por cuatro ecosistemas a modo de ecosistemas acuáticos artificiales que funcionan en serie como diferentes etapas en la depuración (Figura 9).





Figura 9. Etapas del MJEA® para el tratamiento del agua residual urbana de la localidad de Bustillo de Cea, provincia de León. 1- Entrada del agua residual. 2- Pretratamiento. 3- Laguna de micrófitos, BW, (primera etapa). 4- Balsa con flujo superficial plantada con *Typha latifolia*, BMT, (segunda etapa). 5- Balsa con flujo superficial plantada con *Iris pseudacorus*, BMS, (tercera etapa). 6- Balsa con flujo superficial horizontal plantado con *Salix atrocinerea*, BMS, (cuarta etapa).

El primero de los ecosistemas que configuran el MJEA® (primera etapa) es una laguna que reconstruye un ecosistema acuático con micrófitos. La superficie de la lámina de agua en la cota normal es de 230 m<sup>2</sup>, el volumen admisible hasta esta cota es de 217,50 m<sup>3</sup>, y el volumen de efluente en la cota normal de funcionamiento de 156,50 m<sup>3</sup>. La profundidad de la laguna es variable, oscilando entre 1,5 m en la zona de entrada del agua, 0,5 m en la zona central, y 1 m en la zona de salida del agua (Figura 10).



Figura 10. Perfil de la primera balsa, laguna de micrófitos (BW). Redibujado a partir del Plano 6. Estado final de las balsas, del Proyecto básico y de ejecución de la depuradora de macrófitos de Bustillo de Cea. 1.- Nivel del agua con aportación de agua de lluvia. 2.- Nivel del agua en condiciones normales.

La segunda balsa reconstruye un sistema semiacuático con flujo superficial (segunda etapa). En esta balsa se realizó una plantación con *Typha latifolia* (15 plantas por m<sup>2</sup>). Las plantas fueron recogidas en zonas naturales cercanas a la instalación. La superficie de la balsa es de 210 m<sup>2</sup> (superficie en la cota de relleno de arena), el volumen de efluente en la cota normal es de 100,87 m<sup>3</sup>, y el volumen admisible total hasta la cota máxima es de 181,92 m<sup>3</sup> (Figura 11).

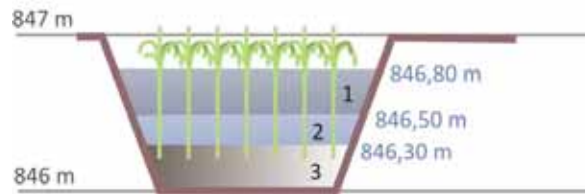


Figura 11. Perfil del humedal artificial con *Typha latifolia* (BMT). Redibujado a partir del Plano 6 Estado final de las balsas, del Proyecto básico y de ejecución de la depuradora de macrófitos de Bustillo de Cea. 1.- Nivel del agua con aportación de agua de lluvia. 2.- Nivel del agua en condiciones normales. 3.- Lecho de arena de diámetro máximo 20mm.

El tercer ecosistema reconstruye, al igual que la segunda balsa, un sistema semiacuático con flujo superficial (tercera etapa de depuración). En este humedal se realizó una plantación con *Iris pseudacorus* (15 plantas por  $m^2$ ) recogidas en humedales naturales cercanos al emplazamiento de la depuradora. La superficie de este humedal es de  $87,5 m^2$ , el volumen de efluente en la cota normal es de  $11,4 m^3$ , y el volumen admisible total hasta la cota máxima es de  $52,5 m^3$ . El último ecosistema (cuarta etapa de depuración), constituye un humedal de flujo horizontal subsuperficial. Se realizó una plantación con *Salix atrocinerea*, sobre un sustrato de grava de tamaño entre 20 y 60 mm. La superficie de este humedal es de  $362,5 m^2$  (Figura 12).

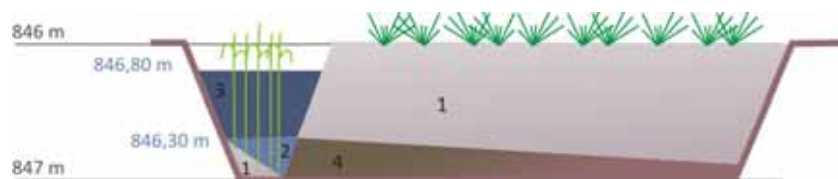


Figura 12. Perfil de los humedales artificiales con *Iris pseudacorus* y *Salix atrocinerea* (BMS). Redibujado a partir del Plano 6 Estado final de las balsas, del Proyecto básico y de ejecución de la depuradora de macrófitos de Bustillo de Cea. 1.- Lecho de arena de diámetro máximo 20mm. 2.- Nivel del agua en condiciones normales. 3.- Nivel del agua con aportación de agua de lluvia. 4.- Lecho de grava de diámetro entre 20 y 60 mm.

El agua residual que entra a la instalación, y tras su paso por un pre-tratamiento (desbaste y desarenado), llega a un distribuidor a partir del cual es conducido hasta la laguna de micrófitos en la que permanece un periodo medio de 5 días. A continuación, el agua discurre hasta el humedal plantado con *Typha latifolia* en el que se encuentra un tiempo medio de 3,2 días, de esta balsa pasa al humedal plantado con *Iris pseudacorus* y de ahí, percola a través del sustrato de gravas del último humedal hasta ser recogido en un emisario, que finalmente vierte a un pequeño arroyo, afluente del río Cea. El tiempo medio de retención en el sistema con lirio amarillo y filtro de gravas es de 3,3 días.

## 2. Recogida de muestras

La recogida y almacenamiento de todas las muestras se ha realizado de acuerdo con las especificaciones señaladas en la Orden MAM/3207/2006, de 25 de septiembre, por la que se aprueba la instrucción técnica complementaria MMA-EECC-1/06, determinaciones químicas y microbiológicas para el análisis de las aguas; así como por las recogidas en el manual de referencia "Standard methods for the examination of water and wastewater" (APHA-AWWA-WEF, 2005) método 1060 A. Introduction, B. Collection of samples y C. Sample storage and preservation; y en las siguientes Normas Europeas ISO:

- ISO 5667-1:1980 – Calidad del agua. Muestreo. Parte 1: Guía para el diseño de los programas de muestreo.
- ISO 5667-2:1991 – Calidad del agua. Muestreo. Parte 2: Guía para las técnicas de muestreo.
- ISO 5667-3:1980 – Calidad del agua. Muestreo. Parte 3: Guía para la conservación y manipulación de las muestras.
- ISO 5667-13:1997 – Calidad del agua. Muestreo. Parte 13: Guía para el muestreo de lodos procedentes de aguas residuales y de las instalaciones de tratamiento del agua.
- ISO 5667-14:1998 – Calidad del agua. Muestreo. Parte 14: Guía para el aseguramiento de la calidad en el muestreo y la manipulación de las muestras ambientales del agua.

### 2.1. De la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial

#### 2.1.1. Muestreo de agua.

Se han recogido muestras de agua procedentes de la entrada y salida de cada uno de los microecosistemas (Tabla 7). La periodicidad del muestreo ha sido de entre 10 y 15 días, realizándose todos ellos entre las 10 y las 13 de la mañana. El material empleado en el muestreo ha sido de polipropileno lavado con ácido nítrico diluido al 33%.

Tabla 7. Relación de muestreos realizados en el sistema de tratamiento de agua residual industrial. Muestras de agua. Ver Tabla 5 para más detalle.

<b>PLANTA PILOTO EXPERIMENTAL PARA EL TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL INDUSTRIAL</b>	
<b>Tipo de Muestra</b>	Muestra de agua
<b>Temporalidad de muestreo</b>	Cada 15 días.
<b>Nº de puntos de muestreo</b>	48 (3 réplicas de cada una de los 16 microecosistemas)
<b>Descripción puntos de muestreo</b>	Entrada y salida de agua de cada uno de los microecosistemas
<b>Número total de muestras</b>	5 en AFC, GFC, ASC, GSC; 5 en MAFT, MGFT, MAST, MGST; 8 en MAFP, MGFP, MASP, MGSP; 18 en MAFC, MGFC, MASC, MGSC.
<b>Parámetros medidos <i>in situ</i></b>	pH, temperatura
<b>Parámetros analizados en laboratorio</b>	Arsénico y zinc en disolución

### 2.1.2. Recogida de muestras para el análisis de las comunidades de bacterias.

Se han recogido muestras de las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de *Typha latifolia* y *Phragmites australis*. La rizosfera, definida como la parte del sedimento directamente influenciada por la acción de las raíces de las plantas, constituye un importante ambiente en los procesos de eliminación de metales pesados del agua, ya que influye en la movilidad de los mismos (Jacob y Otte, 2003).

Una vez extraídas las plantas de las cubetas, se ha cortado la parte subterránea (rizomas y raíces junto con el sedimento adherido a las mismas) y se ha llevado al laboratorio para su análisis. Las muestras de las tres réplicas se han mezclado para obtener una única muestra para su análisis. El muestreo se ha realizado al final del verano.

Con el objetivo de estudiar el efecto de la vegetación sobre las comunidades de bacterias en estos microecosistemas, los 15 cm más superficiales del sustrato de las cubetas que funcionaron como controles sin vegetación y un caudal de 2ml/min, se han extraído y llevado al laboratorio para el estudio de las bacterias adheridas al mismo (Tabla 8).

Tabla 8. Relación de muestreos realizados en el sistema de tratamiento de agua residual industrial. Muestras para el análisis de las comunidades de bacterias. Ver Tabla 5 para más detalle.

<b>PLANTA PILOTO EXPERIMENTAL PARA EL TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL INDUSTRIAL</b>	
<b>Tipo de Muestra</b>	Rizosfera de <i>Typha latifolia</i> y el sedimento asociado a la misma
<b>Temporalidad de muestreo</b>	Una vez al final del verano
<b>Número de puntos de muestreo</b>	12 (3 réplicas de cada tipo de microecosistema)
<b>Muestras obtenidas para su estudio</b>	4 muestras: MAFT, MGFT, MAST y MGST
<b>Tipo de Muestra</b>	Rizosfera de <i>Phragmites australis</i> y el sedimento asociado a la misma
<b>Temporalidad de muestreo</b>	Una vez al final del verano
<b>Número de puntos de muestreo</b>	12 (3 réplicas de cada tipo de microecosistema)
<b>Muestras obtenidas para su estudio</b>	4 muestras: MAFP, MGFP, MASP y MGSP
<b>Tipo de Muestra</b>	Sustrato
<b>Temporalidad de muestreo</b>	Una vez al final del verano
<b>Número de puntos de muestreo</b>	12 (3 réplicas de cada tipo de microecosistema)
<b>Muestras obtenidas para su estudio</b>	4 muestras: MAFC, MGFC, MASC y MGSC

## 2.2. De la planta piloto a escala real para el tratamiento de agua residual urbana

### 2.2.1. Muestreo de agua.

Con una periodicidad mensual (de enero de 2006 a octubre de 2009) se ha realizado una toma de muestras de agua en la planta para el tratamiento de agua residual urbana de la localidad de Bustillo de Cea, lo que resulta en un total de 46 muestreos. Todos los muestreos se llevaron a cabo entre las 09:00 y las 13:00 de la mañana.

Las muestras se recogieron en botes de muestreo de vidrio o polipropileno en función del parámetro a analizar. En el caso de los análisis microbiológicos, la muestra se ha recogido en botes de vidrio previamente autoclavados en el laboratorio. Para el análisis de metales, las muestras se tomaron en botes de polipropileno lavados con ácido nítrico diluido al 33%. El transporte de las muestras hasta el laboratorio se realizó en condiciones refrigeradas mediante neveras portátiles.

La toma de muestras se ha realizado en cinco puntos de la instalación: Punto 1- Entrada de agua a la planta. Punto 2- Salida del pretratamiento, Punto 3- Zona de la laguna donde se sitúa la tubería de salida, Punto 4- Zona del humedal con *Typha latifolia* en la que se encuentra la salida de la balsa, Punto 5- Salida del humedal artificial con *Iris pseudacorus* y filtro de gravas con *Salix atrocinerea* (Figura 13).

### 2.2.2. Muestreo de sedimento.

A lo largo de los 9 años de funcionamiento del sistema se ha realizado anualmente una extracción del lodo acumulado en la balsa de decantación (pretratamiento). Esta extracción ha sido gestionada por la Junta Vecinal de la localidad de Bustillo de Cea y se ha llevado a cabo mediante un camión cisterna propiedad de la Diputación Provincial de León. En el conjunto del mosaico jerarquizado de ecosistemas artificiales no se ha realizado, en estos 9 años de funcionamiento de la instalación, ninguna extracción del sedimento acumulado en las diferentes balsas que conforman el mosaico.

Con el objeto de evitar confusiones sobre el término sedimento, se precisa que, se entiende por sedimento la materia depositada en el fondo del ecosistema. Este sedimento se origina fundamentalmente a partir de la decantación de sólidos así como de los restos de vegetación en el caso de que ésta exista (Lesage *et al.*, 2007).

Se han realizado dos muestreos en otoño del sedimento de la laguna de micrófitos del sistema. La recogida de muestras se ha realizado en la zona de entrada del agua residual, en la zona intermedia, y en la zona de salida. Para ello, se ha utilizado un *corer* cilíndrico de 5,3 cm de diámetro y 100 cm de largo, el cual se ha introducido en la laguna para recoger muestra a dos profundidades (Figura 14). El primer estrato se ha tomado de la parte más superficial del sedimento, entre 0 y 5 centímetros de profundidad. El segundo, se ha recogido entre los 5 y los 30 centímetros. El perfil obtenido (30 centímetros) se considera representativo de la profundidad total del sedimento acumulado en la laguna de acuerdo a los trabajos realizados por Vymazal y Krása (2003). La toma de muestras se ha realizado por triplicado de acuerdo con Vesik y Allaway (1997). El volumen total de sedimento acumulado en la laguna ha sido cubicado realizando una medida de la altura de sedimento en 5 puntos.

Siguiendo el mismo protocolo se han recogido muestras de sedimento en los humedales artificiales plantados con *Typha latifolia* e *Iris pseudacorus*, y se ha realizado una medida del volumen total de sedimento acumulado en cada balsa.



Punto 1 de muestreo de agua. Entrada de agua residual a la instalación.



Punto 2 de muestreo de agua. Salida del pretratamiento.



Punto 3 de muestreo de agua, laguna de micrófitos (BW) en la zona donde se sitúa la salida del agua (primera etapa).



Punto 4 de muestreo de agua (segunda etapa, BMT). Salida del humedal artificial con *Typha latifolia*.



Punto 5 de muestreo de agua, salida del humedal artificial con *Iris pseudacorus* (tercera etapa, BMS) y humedal artificial con *Salix atrocinerea* (cuarta etapa, BMS).



Punto de vertido del agua depurada, Arroyo del Valle, afluente del río Cea.

Figura 13. Puntos de muestreo de agua residual en los diferentes ecosistemas artificiales del MJEA®.



Figura 14. Muestreo del sedimento acumulado en la laguna de micrófitos. Detalle del perfil de sedimento obtenido en el muestreo realizado con un corer cilíndrico.

### 2.2.3. Muestreo de vegetación.

Se han recogido muestras de la vegetación del sistema a finales de verano. Para ello, se han muestreado los humedales plantados con *Typha latifolia*, *Iris pseudacorus* mediante un cuadrado de muestreo de 0,50 x 0,50 cm. La vegetación comprendida en el interior del cuadrado de muestreo ha sido recogida en su totalidad. Para asegurar la repetitividad del dato y teniendo en cuenta la alta variabilidad en la concentración de metales detectada entre las hojas de una misma planta (Weiss *et al.*, 2003), se han recogido tres réplicas de cada especie vegetal muestreada, de forma que se ha recogido tres veces toda la vegetación comprendida en el cuadrado de muestreo, para posteriormente juntar esas tres réplicas, y seleccionar una tercera parte de la muestra total de *Typha latifolia* y de la muestra de *Iris pseudacorus*. El porte arbóreo de *Salix atrocinerea* ha condicionado el método de muestreo de esta especie. De forma que en este caso, se han seleccionado al azar tres individuos, a los cuales se les ha efectuado una poda de las ramas y se han cortado algunas raíces. Al igual que para *Typha latifolia* e *Iris pseudacorus*, las muestras procedentes de los distintos individuos de *Salix atrocinerea* muestreados se han homogeneizado y se ha seleccionado una fracción para su posterior secado y análisis.

Una vez en el laboratorio, toda la vegetación recogida se ha subdividido en biomasa aérea: tallo, hojas y fruto; y biomasa subterránea: raíces y rizomas y se han lavado con abundante agua del grifo y finalmente con agua desionizada (Figura 15).

En la tabla siguiente (Tabla 9) se presenta de forma sintética el total de muestreos realizados en el sistema a escala real de Bustillo de Cea para el tratamiento de agua residual urbana.

Tabla 9. Relación de muestreos realizados en el MJEA®. Muestras de agua, sedimento y vegetación. Las letras indican: BW laguna de micrófitos, BMT balsa con flujo superficial plantada con *Typha latifolia*, BMS balsa con flujo superficial plantada con *Iris pseudacorus*.

PLANTA PILOTO EXPERIMENTAL PARA EL TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL URBANA	
<b>Tipo de Muestra</b>	Muestras de agua
<b>Temporalidad de muestreo</b>	Mensual. De enero 2006 a octubre 2009
<b>Número total de muestreos</b>	46
<b>Puntos de muestreo</b>	Ver Figura 13
<b>Parámetros medidos <i>in situ</i></b>	pH, temperatura, oxígeno disuelto, potencial Red-Ox, sólidos disueltos totales, conductividad
<b>Parámetros analizados en laboratorio</b>	Sólidos suspendidos totales, sólidos volátiles, demanda química y demanda biológica de oxígeno, nitrógeno total Kjeldahl, amonio, fósforo total, coliformes totales y fecales, estreptococos fecales, metales pesados disueltos
<b>Tipo de Muestra</b>	Muestras de sedimento
<b>Temporalidad de muestreo</b>	Dos muestreos en otoño en BW, BMT y BMS.
<b>Número total de muestreos</b>	2
<b>Puntos de muestreo</b>	BW, BMT y BMS (ver Figura 13)
<b>Parámetros medidos <i>in situ</i></b>	pH, potencial Red-Ox
<b>Parámetros analizados en laboratorio</b>	Materia orgánica, metales pesados
<b>Tipo de Muestra</b>	Muestras de vegetación
<b>Temporalidad de muestreo</b>	Una muestra a finales de verano
<b>Número total de muestreos</b>	1 muestreo de <i>Typha latifolia</i> , 1 muestreo de <i>Iris pseudacorus</i> , 1 muestreo de <i>Salix atrocinerea</i>
<b>Puntos de muestreo</b>	BW, BMT y BMS (ver Figura 13)
<b>Parámetros medidos <i>in situ</i></b>	Cobertura de la vegetación en cada ecosistema
<b>Parámetros analizados en laboratorio</b>	Biomasa aérea, biomasa subterránea, metales pesados



Figura 15. Secado de la biomasa subterránea (fotografía izquierda) y aérea (fotografía derecha) de *Typha latifolia*.



#### 2.2.4. Recogida de muestras para el análisis de las comunidades de bacterias.

Se han estudiado las comunidades de bacterias presentes en tres ambientes dentro del mosaico jerarquizado de ecosistemas artificiales: el agua residual, el sedimento, y la rizosfera de la vegetación.

Para el estudio de las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de las plantas se han recogido diferentes individuos (entre 10 y 15) de *Typha latifolia*. Las plantas se escogieron al azar en el humedal artificial plantado con esta especie vegetal.

Este muestreo se ha realizado en dos ocasiones, la primera a finales del verano, una vez que la planta había completado su ciclo vital, y un segundo muestreo a finales de invierno, momento en el que la vegetación del sistema comienza su desarrollo. Una vez extraída la planta se ha cortado la parte subterránea (rizomas y raíces) junto con el sedimento adherido a la misma, y se ha llevado al laboratorio para su análisis.

Este mismo protocolo de muestreo se ha aplicado para el muestreo de las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de *Salix atrocinerea*. En este caso, se han elegido al azar tres ejemplares de *Salix atrocinerea* en cada uno de los dos muestreos realizados. Estos individuos se han arrancado del sustrato de gravas para recoger sus raíces y rizomas y el sedimento asociado a las mismas.

Para el estudio de las bacterias presentes en el sedimento de la laguna de micrófitos se han tomado muestras de sedimento a finales del verano, en dos puntos, zona de entrada del agua residual y zona de salida del agua residual. Las muestras se han tomado mediante un *corer* cilíndrico (5,3 cm de diámetro y 100 cm de largo) que se introdujo en el sedimento hasta una profundidad de 15 centímetros. Las muestras se han recogido por triplicado, y posteriormente se han mezclado en el laboratorio para obtener una muestra representativa de cada uno de los dos puntos indicados.

Finalmente, el muestreo de las bacterias presentes en el agua residual, realizado a finales de verano, se han tomado muestras de agua en cinco puntos de la laguna de micrófitos y agua del humedal artificial con *Typha latifolia*. Las muestras fueron mezcladas, obteniéndose finalmente una muestra representativa de agua de los dos ecosistemas (Tabla 10).

Tabla 10. Relación de muestreos realizados en el sistema de tratamiento de agua residual urbana para el estudio de las comunidades de bacterias.

<b>PLANTA PILOTO EXPERIMENTAL PARA EL TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL URBANA</b>	
<b>Tipo de muestra</b>	Agua
<b>Temporalidad de muestreo</b>	Una vez en verano
<b>Número total de muestreos</b>	1
<b>Puntos de muestreo</b>	BW y BMT (ver Figura 13)
<b>Muestras obtenidas para su estudio</b>	Bacterias agua residual de la laguna de micrófitos (BWL), Bacterias agua residual humedal artificial plantado con <i>Typha latifolia</i> (BWT)
<b>Tipo de muestra</b>	Sedimento
<b>Temporalidad de muestreo</b>	Una vez en verano
<b>Número total de muestreos</b>	2
<b>Puntos de muestreo</b>	Zona de entrada y zona de salida del agua residual en la laguna de micrófitos (BW)
<b>Muestras obtenidas para su estudio</b>	Comunidad de bacterias presentes en el sedimento de la laguna de micrófitos en la zona de entrada de agua (BSI) y zona de salida (BSO)
<b>Tipo de Muestra</b>	Rizosfera y sedimento asociado de <i>Typha latifolia</i> y <i>Salix atrocinerea</i>
<b>Temporalidad de muestreo</b>	Un muestreo a finales de verano y un muestreo a finales de invierno
<b>Número puntos de muestreo</b>	2
<b>Puntos de muestreo</b>	BMT y BMS (ver Figura 13)
<b>Muestras obtenidas para su estudio</b>	Comunidad de bacterias asociada a la rizosfera de <i>Typha latifolia</i> en verano (BMTS) y en invierno (BMTW), comunidad de bacterias asociada a la rizosfera de <i>Salix atrocinerea</i> en verano (BMSS) y en invierno (BMSW)

### 3. Métodos analíticos

En la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial se ha realizado una medida *in situ* en el agua de entrada y salida de cada microecosistema de los siguientes parámetros:

- pH. Esta medida se ha obtenido con un pHmetro portátil WTW pH330/SET 1, Nr 100 787, provisto de un electrodo WTW Sentix 41.
- Conductividad y sólidos disueltos totales. Se han medido con un conductivímetro WTW modelo LF 330/SET, Nr 300204 equipado con una sonda WTW tetraCon 325.
- Temperatura. La medida de temperatura se ha tomado con las dos sondas anteriormente descritas, pues todas ellas cuentan con un sensor térmico. De esta forma, se consideró como valor final la media de las dos medidas.

En el MJEA® se realizó una medida mensual *in situ* del agua residual, en cada uno de los 5 puntos de muestreo de agua (ver Figura xxx), para los siguientes parámetros:

- pH, conductividad, sólidos disueltos totales y temperatura. Parámetros medidos con los aparatos especificados para el análisis del agua residual industrial.
- Oxígeno disuelto. Medida realizada con un oxímetro portátil WTW Oxi330i/SET, provisto con un electrodo WTW Oxicell 325.
- Red-Ox. En la medida del potencial Red-Ox se empleó el medidor Redox PCE-228.

Cada uno de estos parámetros fue medido tres veces en cada muestreo con el objeto de asegurar la repetitividad del dato.

Las muestras procedentes de la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial se han filtrado inmediatamente a través de un filtro de membrana de ésteres de celulosa de entre 7-12  $\mu\text{m}$  de porosidad, se han acidificado con ácido nítrico y almacenado a 4°C hasta su análisis. El contenido de arsénico y zinc en disolución de las muestras ha sido analizado por el personal del Laboratorio de Técnicas Instrumentales mediante la técnica de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), con digestión de 0,3 g de la muestra en 10 ml de ácido nítrico al 65% en un horno microondas a 200 °C durante 25 minutos, previa digestión a 100 °C durante 5 minutos.

Las muestras recogidas en la planta piloto para el tratamiento de agua residual urbana se han fijado y almacenado a 4°C de acuerdo a los protocolos establecidos en APHA-AWWA-WEF (2005). Posteriormente se han analizado en los laboratorios del Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad de la Universidad de León, para los siguientes parámetros siguiendo los protocolos establecidos en APHA-AWWA-WEF (2005) (Tabla 11).

El análisis del contenido en metales pesados disueltos en el agua residual urbana se ha realizado siguiendo el mismo protocolo realizado con las muestras procedentes de la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial. De forma que una vez recibida la muestra en los laboratorios del Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad de la Universidad de León, se ha filtrado, acidificado y almacenado a 4°C hasta su análisis. En estas muestras se ha analizado la concentración de As, B, Cd, Cr, Cu, Zn, Hg, Mn, Ni, Pb en disolución mediante la técnica de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Se ha analizado también la concentración de Fe, utilizándose en este caso la técnica espectroscopía de emisión atómica con plasma (ICP-AES).

Tabla 11. Técnicas analíticas utilizadas en el análisis de muestras de agua residual urbana.

Parámetro		Técnica	APHA-AWWA-WEF (2005)	Unidades
Nombre	Acrónimo			
Sólidos suspendidos totales	SST	Gravimetría	Met 2540 – B. <i>Total solids dried at 103-105°C.</i>	mg l <sup>-1</sup>
Sólidos suspendidos volátiles	SSV	Gravimetría	Met 2540-E. <i>Fixed and volatile solids ignited at 550°C.</i>	mg l <sup>-1</sup>
Demanda química de oxígeno (dicromato)	DQO	Reflujo cerrado dicromato	Met 5220-C. <i>Closed reflux, titrimetric method.</i>	mg O <sub>2</sub> l <sup>-1</sup>
Demanda biológica de oxígeno 5 días 20°C	DBO <sub>5</sub>	Manométrica	Met 5210-B. <i>5-Day BOD Test.</i>	mg O <sub>2</sub> l <sup>-1</sup>
Amonio	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Titrición	Met 4500-NH <sub>3</sub> -B. <i>Preliminary distillation step.</i> Met 4500-NH <sub>3</sub> -C. <i>Titrimetric method.</i>	mg N l <sup>-1</sup>
Nitrogeno total Kjeldahl	NTK	Titrición	Met 4500-Norg-B. <i>Macro-Kjeldahl method.</i>	mg N l <sup>-1</sup>
Fósforo total	PT	Espectrofotometría	Met 4500-P-E. <i>Ascorbic acid method.</i>	mg P l <sup>-1</sup>
Coliformes totales	CT	Filtración en membrana	Met 9222-B. <i>Standard total coliform membrane filter procedure.</i>	UFC 100 ml <sup>-1</sup>
Coliformes fecales	CF	Filtración en membrana	Met 9222-D. <i>Fecal coliform membrane filter procedure.</i>	UFC 100 ml <sup>-1</sup>
Estretococos fecales	EF	Filtración en membrana	Met 9230. <i>Fecal streptococcus and enterococcus groups.</i>	UFC 100 ml <sup>-1</sup>

En cuanto al sedimento acumulado en el MJEA®, se han medido *in situ* el pH y el potencial Red-Ox del sedimento en la laguna de micrófitos, en la balsa plantada con *Typha latifolia*, y en la balsa plantada con *Iris pseudacorus*. Estos parámetros se han definido para los dos estratos de sedimento definidos en el muestreo (0-5 cm, 5-30 cm). Las medidas se han realizado por triplicado con un medidor portátil de pH y potencial Red-Ox para lodos (PCE group PCE-228 pH-meter pH/mV).

Las muestras de sedimento se han llevado para su estudio a los laboratorios del Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad de la Universidad de León, en donde para cada una de ellas se ha realizado una homogeneización y se ha determinado su contenido en materia orgánica mediante gravimetría (APHA-AWWA-WEF, 2005). Para realizar el análisis del contenido en metales, se ha realizado un secado de una porción homogénea de cada muestra a 45°C con el objetivo de evitar una pérdida de mercurio por volatilización, y otra porción a 70°C hasta peso constante para todos los demás metales estudiados (Vymazal *et al.*, 2009). Las muestras secas y trituradas con un mortero de ágata se llevaron al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León, para su análisis mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) del contenido en As, B, Cd, Cr, Cu, Zn, Hg, Mn, Ni, Pb; y espectrometría de emisión atómica con plasma (ICP-AES) para determinar el Fe.

Las muestras de vegetación (*Typha latifolia*, *Iris pseudacorus* y *Salix atrocinerea*), procedentes del sistema a escala real para el tratamiento de agua residual urbana, se han secado y analizado para conocer su concentración en metales pesados siguiendo el mismo protocolo que para los sedimentos. Para conocer la biomasa vegetal de cada humedal, las muestras recogidas al efecto se secaron a 105°C hasta peso constante (APHA-AWWA-WEF, 2005).

## 4. Técnicas moleculares

Para caracterizar las comunidades de bacterias presentes en los sistemas de depuración de agua residual estudiados, se ha recurrido a las técnicas moleculares de clonación y secuenciación, identificando las diferentes especies presentes en cada tratamiento por la secuencia de sus genes codificantes para los RNA ribosomales 16S.

El proceso realizado se resume a continuación de forma esquemática (Figura 16) y se describe de forma más detallada posteriormente.

### Pasos realizados para la determinación de la composición de la comunidad bacteriana

- Extracción directa del DNA.
- Mediante la técnica de la PCR se ha amplificado simultáneamente el gen codificante para el RNA ribosomal 16S de las diferentes especies presentes en la muestra.
- Se han aislado amplificadores de distintas especies por su inclusión en el vector pGEM. Los vectores recombinantes se han utilizado para la transformación de células competentes de *Escherichia coli*.
- Colonias transformantes aisladas fueron utilizadas para la secuenciación de los insertos.
- Crecimiento de las bacterias para su secuenciación.
- Secuenciación de los insertos de los clones seleccionados.
- Identificación de las bacterias mediante comparación de las secuencias con la base de datos GenBank.



Figura 16. Esquema que muestra las diferentes fases del proceso realizado para la determinación de las comunidades de bacterias. Modificado de Amann *et al.* (1995).

#### 4.1. Extracción directa del DNA genómico

Para la extracción del DNA genómico se ha utilizado un Kit comercial específico para extracción de DNA de suelo (Power Soil™ DNA Isolation Kit, MO BIO, Laboratories, Inc.), el cual proporciona una alta eficacia en la retirada de inhibidores de PCR y limita efectos de saturación, al tener una gran capacidad de unión de ADN (20 µg) (Paz *et al.*, 2007).

El kit de extracción se ha usado directamente con las muestras de sedimento, mientras que para las muestras de la rizosfera y del agua es necesario obtener previamente un pellet de bacterias. Para ello, se ha realizado un lavado de las raíces y el sustrato asociado con solución salina (agua destilada con 0,9% de cloruro de sodio). Se han eliminado los restos de sustrato y raíces por filtración y se han tomado 8 ml de lavado, por último se ha obtenido un pellet de bacterias por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos. Cuando la cantidad de pellet era escasa se ha repetido este procedimiento. Con el pellet obtenido, se inicia el protocolo especificado en el Kit comercial de extracción de DNA de suelo.

Para las muestras de agua procedentes del sistema para el tratamiento de agua residual urbana, se ha realizado en primer lugar una centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos de 2 litros de agua. Si la cantidad de pellet obtenido era escasa, se ha realizado una nueva centrifugación de 1 litro de agua. Con el pellet obtenido, se ha llevado a cabo el protocolo especificado en el Kit comercial de extracción de DNA de suelo.

Para las muestras de sedimento, se ha aplicado directamente el protocolo propuesto en el Kit comercial (Power Soil™ DNA Isolation Kit), añadiendo una cantidad de muestra de 0,10 gramos a diferencia de lo especificado en el manual (0,25 gramos).

Cada muestra de pellet de bacterias procedentes de las muestra de agua y de rizosfera de las plantas así como 0,10 gramos de sedimento para cada muestra estudiada, se introdujeron en los tubos Powerbead mediante los cuales se realiza un rápido mezclado de cada muestra. La lisis celular se realiza mecánicamente y químicamente utilizando las diferentes soluciones aportadas por el Kit. El DNA extraído se recoge en una matriz, siendo finalmente lavado de la misma.

La cantidad de DNA extraído en cada muestra se ha cuantificado por medio de la espectrofotometría a 260nm (Spectrophotometer ND 1000, NanoDrop). Se ha comprobado mediante electroforesis la calidad y cantidad del DNA usando un gel a una concentración del 1% de agarosa en tampón TAE 1X (40 mM tris (hidroximetil) aminometano, 1,14 µl/l ácido acético glacial, 1 mM EDTA, pH 7,8). Las muestras se han cargado con glicerol (0,025%) y azul de bromofenol (50%) y los geles se visualizan en un transiluminador de luz ultravioleta tras su revelado en bromuro de etidio (10 µl de Bromuro de Etidio por cada 500 ml de agua destilada).

#### 4.2. 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 DNA particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original.

Mediante esta técnica, los fragmentos de DNA codificante para el rRNA 16S han sido amplificados utilizando los cebadores o primers universales 27f y 907r del gen ribosomal 16S y un termociclador de Applied Biosystems, modelo Gene Amp PCR System 9700.

Se han realizado reacciones de polimerización de 25  $\mu$ l, para ello se realiza una mezcla que contiene agua destilada (hasta completar 25  $\mu$ l en cada ración); 2,5  $\mu$ l de Buffer termofílica DNA polimerasa 10x, sin magnesio; 2,5  $\mu$ l dNTP, mezcla de nucleótidos, con una concentración de 0,2 mM; 2,5  $\mu$ l de primer rRNA 16S 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), en concentración 50 picomolar; 2,5  $\mu$ l de primer rRNA 16S 907f (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3'), en concentración 50 picomolar; 1,5  $\mu$ l de Cloruro de magnesio 50 mM y 0,625  $\mu$ l de Taq DNA polimerasa (Promega, Taq DNA polymerase in Storage Buffer A). A esta mezcla se adicionan 100ng/25  $\mu$ l de DNA extraído de la muestra.

La PCR se ha iniciado con una desnaturalización a 80°C durante 5 minutos y a partir de aquí 28 ciclos con las siguientes temperaturas: desnaturalización del DNA a 94°C durante 45 segundos, hibridación de las cadenas de DNA a 53°C, 60 segundos y 90 segundos a 72°C. Tras los 28 ciclos de amplificación se ha mantenido la muestra a 72°C durante 7 minutos para finalizar la extensión de las cadenas.

El éxito de las reacciones se comprueba mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Como control se ha utilizado el marcador sintético 1 kb Plus DNA Ladder.

### 4.3. Reacciones de ligación

Una vez amplificados los fragmentos de las distintas especies presentes en la muestra, se ha procedido a la ligación de los amplificados. Se ha utilizado el kit pGEM®-T-easy de Promega. Se realizaron mezclas llevándolas a 10 $\mu$ l en las siguientes cantidades: 5  $\mu$ l Rapid Ligation Buffer; 1  $\mu$ l vector pGEM®- (50ng); 1  $\mu$ l T4 DNA Ligase (3 Weiss units/ $\mu$ l) y 3  $\mu$ l de producto de PCR. Se incubó 12 horas a temperatura ambiente.

### 4.4. Experimentos de transformación

Una vez aislados los amplificados por su inclusión en el vector pGEM-T, los vectores recombinantes se han utilizado para la transformación de células competentes de la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*. Las células competentes se obtuvieron según el protocolo INOUE, mediante el empleo de cloruro de calcio (Inoue *et al.*, 1990) y se conservan a -80°C.

Tubos con 50-100  $\mu$ l con células competentes DH5 $\alpha$ , se descongelan 5 minutos en hielo y se mezclan con los 10  $\mu$ l de ligación. Esta mezcla se incubó en hielo durante 20 minutos. Luego la muestra se somete a un choque térmico a 42°C durante 45-50 segundos, seguida de una incubación en hielo durante 2 minutos. Se agrega 1 ml de medio LB líquido (medio Luria-Betani: 10g Bactotripton, 5g extracto de levadura, 10 g NaCl, y pH 7,5) y se incubó durante 1 hora y 30 minutos a 37°C con agitación constante a 150 rpm. Finalmente se agrega 75  $\mu$ l del IPTG (Isopropil-Beta-D-Tiogalactopiranos, 0,1M) y 75  $\mu$ l de X-Gal (5-Bromo-4Cloro-3-Indol-B-D Galactopiranos, 5% en N,N-dimetilformamida p/v) y se siembra en placas con medio sólido LB (se agrega 15 g de agar por cada litro de medio líquido LB) suplementado con ampicilina (concentración final 100mg l<sup>-1</sup>). Las placas se incuban a 37°C durante 24 horas.

Las colonias transformadas serán aquellas que hayan adquirido resistencia a la ampicilina. Las colonias azules no recombinantes corresponden a las células transformadas con el vector que lleva el gen de la  $\beta$ -galactosidasa funcional y produce por inducción con IPTG dicha enzima capaz de hidrolizar al X-Gal y generar color azul. Las colonias blancas recombinantes corresponden a las células transformadas con el vector que lleva un gen de la  $\beta$ -galactosidasa no funcional por inserción de un fragmento de DNA dentro del mismo.

#### 4.5. Análisis rápido de plásmidos

Esta técnica es utilizada para comprobar qué colonias blancas obtenidas por el método de transformación llevan el producto de la PCR y cuáles no.

Cada colonia se resuspende en 50  $\mu$ l de EDTA (0,01M pH8) y se agita en el vortex. Se mezcla con 50  $\mu$ l de Cracking Buffer (0,2 g sacarosa, 900  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 40  $\mu$ l NaOH 5M, 50  $\mu$ l SDS 10%) y se le somete a incubación a 70°C durante 5 minutos. Se deja reposar la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añade 1,5  $\mu$ l KCl (4M) y 2  $\mu$ l de Bromofenol (0,4%) y se agita en vortex. La muestra se incubaba en hielo durante 5 minutos luego de lo cual se procederá a centrifugar a 14000 rpm durante 4 minutos. Finalmente se incubaba en hielo durante 5 minutos o más.

Se observa el tamaño de los plásmidos para su selección mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, utilizando como control negativo plásmidos sin inserto (procedentes de colonias azules).

#### 4.6. Secuenciación

La secuenciación de los insertos de los clones seleccionados se ha realizado utilizando los servicios de secuenciación automática del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León.

Un total de 50 clones para cada una de las muestras estudiadas se secuenciaron en ambas direcciones, utilizando el Kit Thermo SequenaseY Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo con las especificaciones indicadas por el fabricante, en un secuenciador automático (MEGABACE 500, Amersham Bioscience). Para evitar que una misma bacteria esté artificialmente sobrerrepresentada en el análisis, se ha evitado seleccionar más de 10 clones de una misma PCR, de este modo los clones estudiados pueden considerarse una muestra de la composición de las comunidades presentes en las muestras. Esto permite encontrar una relación entre el número de clones de una especie o taxón con su frecuencia relativa en la comunidad.

Las secuencias de DNA obtenidas fueron editadas y revisadas con ayuda del editor de alineamiento del programa informático Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versión 4 (Tamura *et al.*, 2007).

### 5. Análisis de las secuencias

#### 5.1. Análisis comparativo de las secuencias con las bases de datos

Una vez revisadas las secuencias estudiadas se compararon con las depositadas en la base de datos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando el método BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.* 1997). En el caso de que las secuencias se identificaran como quimeras (mezcla de secuencias de especies distintas) o como cloroplastos, se procedió a la secuenciación de un nuevo clon. En las últimas muestras analizadas (MAFP, MASP, BWL y BWT) se han escogido nuevos clones para sustituir a los rechazados por tratarse de quimeras o cloroplastos.

Actualmente, son numerosas las entradas en la base de datos del GenBank cuyo origen es "bacteria no cultivada" y rara vez el programa BLASTN proporciona una entrada de bacterias identificadas. Por ello, para la búsqueda de las secuencias de bacterias más similares a las obtenidas, se ha



recurrido al empleo de la herramienta “Align” de la aplicación web Greengenes: 16S rDNA data and tolos (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>) (DeSantis *et al.*, 2006a).

La herramienta “Align” realiza en primer lugar un alineamiento del conjunto de secuencias mediante el algoritmo NAST (Nearest alignment space termination) (DeSantis *et al.*, 2006b). Los parámetros introducidos para este alineamiento han sido 700 de longitud mínima (mínimo número de nucleótidos que deben alinearse con el conjunto de secuencias de la base de datos), y un umbral de similitud del 80% con el conjunto de secuencias de la base de datos, de forma que las secuencias que no presenten al menos un 80% de similitud no se incluyen en el alineamiento.

Simultáneamente, la herramienta “Align” permite realizar una búsqueda de los “vecinos más próximos” (near-neighbors) en su propia base de datos, mediante la medida de similitud Simrank. De esta forma, se obtiene finalmente un archivo con el conjunto de secuencias estudiadas alineadas, y un archivo con las secuencias de bacterias no identificadas así como las secuencias de bacterias identificadas más similares a las estudiadas.

## 5.2. Alineamiento

Se ha realizado un alineamiento múltiple de todas las secuencias estudiadas y un alineamiento múltiple de las secuencias estudiadas junto con las secuencias más parecidas obtenidas (identificadas y no identificadas). Estos alineamientos permiten asegurar que las posiciones nucleotídicas comparadas son homólogas con todas las secuencias. El método de alineamiento utilizado ha sido el alineamiento progresivo CLUSTAL-W2 (Thompson *et al.*, 1994), y se ha mejorado a ojo con ayuda del editor del programa MEGA versión 4.

Con el objetivo de conseguir un mejor alineamiento de las secuencias, se ha decidido realizar de forma conjunta el alineamiento de las secuencias obtenidas en el estudio de la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial junto con la colección de secuencias obtenidas en el estudio de la planta piloto a escala real para el tratamiento de agua residual urbana.

## 5.3. Análisis de la información filogenética

### 5.3.1. Composición

#### Reconstrucción Filogenética

Para la clasificación de las secuencias estudiadas se ha realizado un análisis filogenético con el programa informático MEGA versión 4. Con la finalidad de obtener un mejor resultado, en este análisis se han incluido todas las secuencias de DNA obtenidas en el estudio, tanto de la planta piloto a pequeña escala como de la planta piloto a escala real, así como secuencias más similares obtenidas de la base de datos de la aplicación web Greengenes. Por ello, los árboles filogenéticos elaborados incluyen clones procedentes de las dos plantas de tratamiento de agua residual estudiadas (sistema piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial y sistema piloto a escala real para el tratamiento de agua residual urbana).

El método escogido para el análisis filogenético ha sido un cálculo de distancias entre parejas de secuencias siguiendo el modelo evolutivo de sustitución no estacionario LogDet (Tamura Kumar) (Lake, 1994), diseñado para corregir la desigualdad en la frecuencia de bases de las secuencias (Felsenstein, 2004). La distancia LogDet se define como menos el logaritmo neperiano del

determinante de la matriz de divergencia obtenida de la comparación de bases entre cada dos secuencias.

La construcción de árboles filogenéticos se ha realizado de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining, modelo y método implementados en el programa MEGA versión 4. Este método es puramente algorítmico, representando una buena aproximación heurística para encontrar el árbol de evolución mínima más corto. Secuencialmente encuentra vecinos que minimizan la longitud total del árbol. Es un método rápido que proporciona un único árbol filogenético.

La robustez de los árboles obtenidos (árbol filogenético con toda la colección de secuencias y árboles para cada Filo de bacterias) se ha evaluado por medio de la técnica de remuestreo bootstrap (Felsenstein, 1985), con 1000 réplicas. Esta técnica indica si el árbol obtenido está soportado por el conjunto de datos estudiados o si ese árbol es un resultado marginal casi igual a otros posibles árboles (Baldauf, 2003). Se realiza cogiendo aleatoriamente submuestras del conjunto de secuencias, con las que se construyen diferentes árboles y se calcula para cada árbol la frecuencia con la que aparecen los nodos del árbol en cada una de estas submuestras aleatorias.

### Otras clasificaciones

De forma complementaria, se han clasificado las secuencias obtenidas mediante el software del Ribosomal Database Project (RDP) (Cole *et al.* 2007) disponible en internet (<http://rdp.cme.msu.edu/>), y su herramienta "Classifier" (Wang *et al.* 2007) con un umbral de confianza del 80%. Así como, mediante el software de Greengenes (DeSantis *et al.*, 2006b) con su aplicación "Classify a batch of sequences against multiple taxonomies", también disponible en internet ([http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-NAST\\_align.cgi](http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-NAST_align.cgi)), que realiza una comparación con el alineamiento múltiple prokMSA (alineamiento múltiple de las secuencias de 16S DNA disponibles en las bases de datos públicas) para encontrar los vecinos más próximos (near-neighbours) usando la medida de similitud de Simrank.

Esta aplicación del software Greengenes exige que previamente se haya realizado un alineamiento de las secuencias a clasificar mediante la herramienta "Align".

### 5.3.2. Riqueza y diversidad

Para estudiar los aspectos de las comunidades de bacterias relacionados con su riqueza y diversidad alfa (comprende información sobre el número de taxones en un área de muestreo pequeña así como la información de su abundancia relativa o uniformidad) se han definido previamente unas unidades taxonómicas operativas (OTUs) en base a cinco distancias genéticas diferentes: 0,01; 0,05; 0,10; 0,20 y 0,40. Los OTUs funcionan como unidades de clasificación, y permiten agrupar, en un mismo OTU, todas las secuencias situadas a una distancia filogenética inferior a la determinada, sin considerar si ese OTU es una especie, un género o cualquier otra entidad biológica. De forma que, si se considera la distancia filogenética de 0,01, todas las secuencias incluidas en un OTUs se sitúan a una distancia inferior a 0,01. Al aumentar la distancia filogenética utilizada para definir los OTUs, el número de OTUs distintos es lógicamente menor.

Una vez definidos los OTUs, se ha evaluado la calidad del muestreo realizado. Para ello se han realizado curvas de acumulación y de rarefacción para uno de los ambientes analizados en la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial y en la planta piloto a escala real para el tratamiento de agua residual industrial. Las curvas de acumulación muestran el número de OTUs acumulados conforme se va aumentando el esfuerzo de muestreo en una comunidad, de manera que la riqueza aumentará hasta que llegue un momento en el cual aunque se incremente el esfuerzo de muestreo, el número de OTUs alcanzará un máximo y se estabilizará (Espinosa, 2003).

Las curvas de rarefacción muestran el número de OTUs estadísticamente esperado según se incrementa el esfuerzo de muestreo, representan así la expectativa estadística para las correspondientes curvas de acumulación. En este trabajo las curvas de rarefacción se han calculado para 1000 submuestreos aleatorios.

El estudio de la diversidad alfa (riqueza y uniformidad de una comunidad particular que se considera homogénea) de las comunidades de bacterias estudiadas se ha realizado mediante el empleo de índices de riqueza y de índices de estructura de la comunidad (Figura 17), algunos de los cuales son estimadores no-paramétricos, también llamados de libre distribución ya que no asumen un tipo de distribución del conjunto de datos, ni una serie de supuestos a priori que los ajusten a un modelo determinado (Smith y Van Belle, 1984; Palmer, 1990; Colwell y Coddington, 1994).

La riqueza se basa únicamente en el número de tipos u OTUs presentes, sin tener en cuenta la abundancia de los mismos. La forma ideal de medir esta riqueza es contar con un inventario completo para conocer el número total de OTUs. En el caso de comunidades muy diversas, como las comunidades de bacterias, esta situación ideal es muy difícil de alcanzar, por lo que se recurre a índices de riqueza obtenidos a partir de un muestreo de la comunidad.

Esta riqueza se ha estudiado mediante las curvas de rarefacción y el estimador no paramétrico Jakknife de primer orden, basado en el número de OTUs que ocurren solamente en una muestra. Este estimador permite reducir el sesgo de los valores estimados para reducir la subestimación del verdadero número de especies en una comunidad con base en el número representado en una muestra reduciendo el sesgo del orden  $1/m$  (Palmer, 1990; Krebs, 1989). En el trabajo se ha utilizado el estimador Jackknife 1 de acuerdo a lo descrito por Burnham y Overton (1979).

Los índices basados en la estructura de una comunidad de bacterias reflejan la distribución proporcional del valor de abundancia de cada especie. En este trabajo se ha utilizado el índice de dominancia de Simpson, que muestra la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una muestra sean del mismo OTU (Brown y Bowman, 2001); el índice de equidad de Shannon-Wiener, que mide el grado promedio de incertidumbre en predecir a que OTU pertenecerá un individuo escogido al azar de una colección (Magurran, 1988; Peet, 1974; Baev y Penev, 1995; Moreno y Halffter, 2001) asumiendo que los individuos son seleccionados al azar y que todos los OTUs están representados en la muestra; y el modelo no paramétrico de Chao 1 que utiliza la relación marcaje-liberación-recaptura para estimar la diversidad como riqueza total de OTUs al agregar un factor de corrección al número observado de especies (Chao, 1984; Chao *et al.*, 1993).

Estos análisis de riqueza y diversidad de las comunidades de bacterias estudiadas se han realizado mediante el software MOTHUR ([http://www.mothur.org/wiki/Main\\_Page](http://www.mothur.org/wiki/Main_Page)) desarrollado para estudios de ecología microbiana (Schloss *et al.*, 2009).

### Rarefacción

$$E(S) = \sum 1 - ((N-N_i) \times n^{-1}) / (N \times n^{-1})$$

$E(S)$  = número esperado de OTUs;  $N$  = número total de OTUs que en una muestra;  $N_i$  = número de bacterias del  $i$ ésimo OTU;  $n$  = tamaño de la muestra estandarizado.

### Índice de Simpson

$$D = \sum (N_i \times (N_i - 1) / n \times (n - 1)),$$

$N$  = número total de OTUs que en una muestra;  $N_i$  = número de bacterias del  $i$ ésimo OTU;  $n$  = tamaño de la muestra estandarizado.

### Índice de Shannon-Wiener

$$H' = -\sum p_i \ln p_i$$

$p_i$  = abundancia proporcional del OTU  $i$ , es decir, número de bacterias del OTU  $i$  entre el total de bacterias de la muestra.

### Chao 1

$$S_{\text{Chao1}} = S_{\text{obs}} + (n_1^2 \times (2n_2))^{-1}$$

$S_{\text{Chao1}}$  = riqueza total de OTUs,  $S_{\text{obs}}$  = número de OTUs observado,  $n_1$  = número de OTUs observados una vez,  $n_2$  = número de OTUs raros observados dos veces.

Figura 17. Índices y modelos utilizados para el estudio de la riqueza específica y la diversidad de las comunidades de bacterias en este trabajo.

## 5.3.3. Análisis comparativo

Las diferencias entre las comunidades de bacterias estudiadas se han analizado mediante la herramienta UniFrac (Lozupone y Knight, 2005). Esta herramienta permite realizar distintos análisis estadísticos en un contexto filogenético.

Se han identificado las diferencias significativas de composición y estructura entre las distintas comunidades de bacterias analizadas, utilizando los estadísticos Weighted UniFrac y P test (Martin, 2002), con 100 réplicas o permutaciones, ambos implementados en el software UniFrac (<http://bmf2.colorado.edu/unifrac/index.psp>).

El estadístico UniFrac utiliza el algoritmo UniFrac, de forma que las comunidades son significativamente diferentes si el valor del algoritmo UniFrac para el árbol filogenético real es mayor que el valor que se esperaría si las secuencias se distribuyeran aleatoriamente entre las comunidades. Para ello, se realiza 100 veces una distribución aleatoria de las secuencias entre las diferentes comunidades y se calcula cada vez el valor del algoritmo. El algoritmo UniFrac mide la diferencia entre dos comunidades en relación a la longitud de las ramas que son únicas para una comunidad o para otra. En este trabajo se ha utilizado una variante de este algoritmo, Weighted UniFrac, que pondera unas u otras ramas en función de datos de abundancia, de forma que no considera únicamente la riqueza sino también la abundancia relativa de las bacterias.

El P test también utiliza la información filogenética de las comunidades estudiadas para identificar si estas comunidades son significativamente diferentes. En este caso, el P test estima la similaridad entre las comunidades como el número de cambios parsimónicos que se requerirían para explicar la distribución de las secuencias entre las diferentes comunidades en el árbol filogenético.

Otra aplicación implementada en el software UniFrac empleada en este trabajo ha sido “Cluster Environments”, la cual desarrolla un análisis cluster jerárquico (UPGMA) de las comunidades a partir de una matriz de distancias generada calculando los valores por parejas del algoritmo Weighted UniFrac. La robustez de este análisis cluster jerárquico se ha evaluado mediante el método estadístico de remuestreo Jackknife, con 100 réplicas.

Finalmente, se ha realizado un Análisis de Componentes Principales (ACP) que es una técnica estadística multivariante de síntesis de la información o reducción de la dimensión (número de variables), que permite encontrar los factores subyacentes más explicativos tras un conjunto de datos, que mejor expliquen la variabilidad de estos datos. La elección de los factores se realiza de tal forma que el primero recoja la mayor proporción posible de la variabilidad original; el segundo factor debe recoger la máxima variabilidad posible no recogida por el primero, y así sucesivamente. Del total de factores se elegirán aquéllos que recojan el porcentaje de variabilidad que se considere suficiente. A éstos se les denominará componentes principales. Este análisis se ha realizado mediante el software UniFrac, que en este caso toma como dato de partida la matriz de distancias por parejas generada con el algoritmo Weighted UniFrac.

## 6. Análisis de datos

Para el estudio de la eficiencia en la eliminación de contaminantes del agua residual, tanto en la planta piloto a pequeña escala como en la planta piloto a escala real, se ha definido como Índice de eliminación la siguiente expresión:

$$\text{Índice de eliminación de un contaminante} = \left( \frac{\text{concentración contaminante efluente} - \text{concentración contaminante afluente}}{\text{concentración contaminante afluente}} \right) \times 100.$$

El Índice de eliminación medio se ha calculado como la media del Índice de eliminación en cada muestreo.

En el caso de que la concentración del elemento estudiado se encontrara en una muestra por debajo del límite de detección del equipo, se le asignó un valor correspondiente a la mitad de ese límite de detección, con el objeto de poder realizar un tratamiento estadístico de los datos, y minimizar el error nominal de tipo I (Clarke, 1998).

Los resultados obtenidos en la planta piloto a pequeña escala, así como los del sistema a escala real de Bustillo de Cea, no se han ajustado a los requisitos de distribución de datos establecidos por la estadística paramétrica: distribución normal e igualdad de varianzas. La prueba de Levene, ha sido el estadístico empleado para comparar la igualdad de varianzas y la normalidad de la distribución se ha evaluado con la prueba de significación de Shapiro-Wilk en el caso de muestras de pequeño tamaño ( $n < 30$ ), o con el test de Kolmogorov-Smirnov, con un nivel de significación de Lilliefors, para muestras de mayor tamaño ( $n > 30$ ).

Con el objeto de determinar si los datos de eliminación de zinc o arsénico en la planta piloto a pequeña escala proceden de la misma población muestral (no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos en los distintos tratamientos), o sí al menos los resultados de un tratamiento difieren significativamente del resto, se ha realizado la prueba de Kruskal-Wallis, que constituye una alternativa no paramétrica al uso del análisis de la varianza de un factor (ANOVA) con los datos reemplazados por categorías. Esta prueba es una extensión para tres o más grupos de la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney (equivalente no paramétrico de la prueba t para la diferencia de dos medias cuando las muestras son independientes), la cual se ha utilizado en el

análisis de los tratamientos agrupados en dos muestras independientes. Ambas pruebas se basan en categorías o rangos, por lo que la medida de tendencia central que se compara es la mediana.

La prueba de Friedman se ha utilizado para estudiar si el índice de eliminación de cada metal pesado en cada tratamiento de la planta piloto a pequeña escala varía significativamente en los diferentes muestreos, es decir, si la eliminación del metal pesado varía a lo largo del tiempo. Esta prueba es un diseño de bloques aleatorios, de forma que los resultados obtenidos para un tratamiento se dividen en bloques, estando conformado cada bloque por los resultados de cada muestreo.

Para el análisis de los datos obtenidos en la planta piloto para el tratamiento de agua residual urbana se han utilizado los análisis ya descritos: pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney.

En cuanto al análisis de datos relativos a las comunidades de bacterias estudiadas, se ha realizado un análisis de correspondencias (AC) con los datos de riqueza y abundancia de los diferentes taxones (a nivel de orden) obtenidos a partir de la reconstrucción de los árboles filogenéticos. El análisis de correspondencias, técnica descriptiva multivariante de ordenamiento, ha permitido obtener una representación gráfica bidimensional de las comunidades de bacterias analizadas junto con los taxones (órdenes) en los que se han clasificado las diferentes bacterias que conforman dichas comunidades. Los taxones y las comunidades de bacterias se distribuyen a lo largo de los ejes, la mayor o menor distancia entre los distintos taxones y comunidades refleja las relaciones de dependencia y semejanza entre las categorías.

El estudio de la riqueza y diversidad de las comunidades de bacterias, realizado en un contexto filogenético de acuerdo a lo desarrollado en el apartado 5.3.2 Riqueza y Diversidad, se ha completado realizando un tratamiento estadístico de los resultados obtenidos. Para ello, se han utilizado las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney que han permitido estudiar si los datos de diversidad y riqueza obtenidos para las distintas comunidades de bacterias analizadas son significativamente distintos entre sí.

Todos los análisis estadísticos se han realizado con el paquete estadístico SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS Inc., 2006). En el caso de identificarse "outlayers", éstos se han estudiado de forma individualizada, y se han eliminado de los datos en los casos en los que se ha estimado oportuno.



# BIBLIOGRAFÍA MATERIAL Y MÉTODOS

- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Shang J., Zhang Z., Miller W. y Lipman D.J., 1997. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search program. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.
- Amann R.I., Ludwig W. y Schleifer K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 51, 143-169.
- Ansola G., González J.M., Cortijo R. y de Luis E., 2003. Experimental and full-scale pilot plant constructed wetlands for municipal wastewaters treatment. *Ecological Engineering* 21(1), 43-52.
- APHA-AWWA-WEF, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21 edición, Centennial Edition, 1368 pp.
- Baev P.V. y Penev L.D., 1995. BIODIV: program for calculating biological diversity parameters, similarity, niche overlap, and cluster analysis. Version 5.1. Pensoft, Sofia-Moscow, 57 pp.
- Baldauf S.L., 2003. Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *TRENDS in Genetics*, 19, 345-351.
- Barlett J.M. y Stirling D., 2003. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology* 226, 3-6.
- Brown M.V. y Bowman J.P., 2001. A molecular phylogenetic survey of sea-ice microbial communities (SIMCO). *FEMS Microbial Ecology* 35, 267-275.
- Burnham K.P. y Overton W.S., 1979. Robust estimation of population size when capture probabilities vary among animals. *Ecology* 60, 927-936.
- Caminero B., 1996. Memoria. Depuradora de Macrófitos en Bustillo de Cea. Primera Fase. Promotores: Diputación Provincial de León, Ayuntamiento de Cea. Valladolid.
- Chao A., 1984. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* 11, 265-270.
- Chao A., Ma M.C. y Yang M.C.K., 1993. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. *Biometrika* 80, 193-201.
- Clarke J.U., 1998. Evaluation of censored data methods to allow statistical comparisons among very small samples with below detection limits observations. *Environmental Science and Technology* 32, 177-183.
- Cole J.R., Chai B., Farris R.J., Wang Q., Kulam-Syed-Mohideen A.S., McGarrell D.M., Bandela A.M., Cardenas E., Garrity G.M. y Tiedj J.M. 2007 The ribosomal database project (RDP-II): introducing my RDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Research* 35, D169-D172.



- Colwell R.K. y Coddington J.A., 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* 345, 101-118.
- DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Keller K., Brodie E.L., Larsen N., Piceno Y.M., Phan R. y Andersen G.L., 2006a. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucleic Acids Research* 34, 394-399.
- DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Larsen N., Rojas M., Brodie E.L., Keller K., Huber T., Dalevi D., Hu P. y Andersen G.L., 2006b. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5069-72.
- Espinosa E., 2003. ¿Cuántas especies hay?. Los estimadores no paramétricos de Chao. *Elementos: ciencia y cultura*, 52, 53-56.
- Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Felsenstein J., 2004. *Inferring Phylogenies*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 664pp.
- Inoue H., Nojima H. y Okayama H., 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Jacob D.L. y Otte M.L., 2003. Conflicting processes in the wetland plant rhizosphere: metal retention or mobilization?. *Water, Air and Soil Pollution* 3, 91-104.
- Krebs C.J., 1989. *Ecological methodology*. Harper Collins Publications, 654 pp.
- Lake J.A., 1994. Reconstructing evolutionary trees from DNA and protein sequences: paralinear distances. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 1455-1459.
- Lesage E., Rousseau D.P.L., Meers E., Van de Moortel A.M.K., Du Laing G., Tack F.M.G., De Pauw N. y Verloo M.G., 2007. Accumulation of metals in the sediment and reed biomass of a combined constructed wetland treating domestic wastewater. *Water Air and Soil Pollution* 183, 253-264.
- Lozupone C. y Knight R., 2005. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 8228-8235.
- Magurran A.E., 1988. *Ecological diversity and its measurement*. Princeton University Press, New Jersey, 179 pp.
- Martin A.P., 2002. Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity. 241 of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3673-3682.
- Moreno C.E. y Halfpeter G., 2001. Spatial and temporal analysis of the  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  diversities of bats in a fragmented landscape. *Biodiversity and Conservation* 10, 367-382.
- Palmer M.E.W., 1990. The estimation of species richness by extrapolation. *Ecology* 71, 1195-1198.
- Paz L., Bosch J., Rubio X., Tejado C., Potes E. y Gosá A., 2007. Estudio preliminar de la presencia del hongo patógeno de anfibios *Batrachochytrium dendrobatidis* en espacios de interés ecológico del País Vasco. *Gobierno Vasco, Dirección de Biodiversidad*, 33 pp.
- Peet R.K., 1974. The measurement of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 5, 285-307.

- Radoux M. y Kemp, D., 1982. Approche écologique et expérimentale des potentialités épuratrices de quelques hélophytes: *Phragmites australis* (cav.) Trin. Ex Steud. *Typha latifolia* L. et *Carex acuta* L. Trib. Cebedeau 465-466, 325-340.
- Radoux M., Cadelli D. y Nemcova, M., 1995. A mosaic of artificial ecosystems as a wastewater treatment plant: evaluation of the pilot plant of Lallaing (France). En: Ramadori R., Cingolani L. y Cameroni, L. (editores.), Proceedings of Natural and Constructed Wetlands for Wastewater Treatment and Reuse. Experiences, Goals and Limits. Perugia, pp. 275-284.
- Radoux M., Cadelli D. y Nemcova, M., 1997. A comparison of purification efficiencies of various constructed ecosystems (aquatic, semiaquatic and terrestrial) receiving urban wastewaters. En: Vymazal, J. (editores.), Nutrient Cycling and Retention in Wetlands. Kluwer, Dordrecht. Wetlands Ecology and Management 4, 201-217.
- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R.A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C.J., Sahl J.W., Stres B., Thallinger G.G., Van Horn D.J. y Weber C.F., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology 75, 7537-7541.
- Smith E.P. y Van Belle G., 1984. Nonparametric estimation of species richness. Biometrics 40, 119-129.
- Staley J.T., 1997. Biodiversity: are microbial species threatened?. Current Opinion in Biotechnology 8, 340-345.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. y Kumar S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24, 1596-1599.
- Thomson J.D., Higgins D.G. y Gibson, T.J., 1994 Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choices. Nucleic Acids Research 22, 4673-4680.
- Vesk P. y Allaway W., 1997. Spatial variation of copper and lead concentrations of water hyacinth plants in a wetland receiving urban run-off. Aquatic Botany 59, 33-44.
- Vymazal J. y Krása P., 2003. Distribution of Mn, Al, Cu and Zn in a constructed wetland receiving municipal sewage. Water Science and Technology 48, 299-305.
- Vymazal J., Kröpfelová L., Svehla J., Chrástný V. y Stíchova J., 2009. Trace elements in *Phragmites australis* growing in constructed wetlands for treatment of municipal wastewater. Ecological Engineering 35, 303-309.
- Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M. y Cole J.R. 2007 Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Applied and Environmental Microbiology 73, 5261-5267.
- Weider R.K., 1989. A survey of constructed wetlands for acid coal mine drainage treatment in the eastern United States. Wetlands 9, 299-315.
- Weis J.S., Windham L. y Weis P., 2003. Patterns of metal accumulation in leaves of the tidal marsh plants *Spartina alterniflora* Loisel and *Phragmites australis* Cav. Trin ex Steud. over the growing season. Wetlands 23, 459- 65.





# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 1. Eliminación de metales pesados en el sistema piloto para el tratamiento de agua residual industrial

Los diferentes microecosistemas, resultado de la combinación de los factores estudiados, han sido evaluados en relación a su capacidad para eliminar zinc y arsénico de un agua residual industrial fabricada de forma artificial.

Los experimentos realizados en la planta piloto a pequeña escala se han desarrollado conforme a los objetivos planteados inicialmente. El desarrollo de tejidos vegetales por parte de las especies utilizadas (*Typha latifolia* y *Phragmites australis*) ha sido desigual. En *Phragmites australis* este desarrollo ha resultado adecuado. Sin embargo, *Typha latifolia* ha presentado un desarrollo vegetal escaso, si bien no fue necesario replantar ningún individuo, ya que todos sobrevivieron al experimento.

Las siguientes tablas (Tablas 12 y 13) recogen los resultados obtenidos en cada microecosistema, en relación a su capacidad para eliminar del agua arsénico y zinc en disolución.

El afluente, preparado artificialmente en un tanque de 1000 litros, se ha analizado en cada muestreo así como el efluente de cada microecosistema. El pH del afluente se mantuvo en 4,00 a lo largo de todas las fases del experimento. Las concentraciones medias de zinc y arsénico en el afluente, aunque varían ligeramente entre muestreos, no difieren significativamente en ningún caso ( $p=0,892$ , para el zinc;  $p=0,991$ , para el arsénico).

Tabla 12. Concentración media y desviación estándar (DE) de zinc en el afluente y en el efluente; índice de eliminación y desviación estándar (DE) de este metal pesado en el agua, y valor medio y desviación estándar de pH en el efluente para cada tratamiento. Las letras indican: A, sustrato arlita; G, sustrato grava; F, flujo superficial; S, flujo subsuperficial; C, tratamiento sin vegetación; T, tratamiento con *Typha latifolia*; P, tratamiento con *Phragmites australis*; M, caudal 2 ml min<sup>-1</sup>. Estos códigos se utilizarán en tablas sucesivas. Para más explicación consultar Tabla 6.

Microecosistema	Afluente Zn (mg l <sup>-1</sup> ) media ± DE	Efluente Zn (mg l <sup>-1</sup> ) media ± DE	Índice de eliminación Zn, media ± DE	pH, media ± DE
AFC	13,39 ± 5,17	8,26 ± 3,30	37,84 ± 13,09	4,18 ± 1,35
GFC	13,39 ± 5,17	10,27 ± 4,62	25,66 ± 15,89	4,53 ± 1,38
ASC	13,39 ± 5,17	8,78 ± 2,09	42,83 ± 16,55	4,97 ± 1,62
GSC	13,39 ± 5,17	9,25 ± 2,76	47,12 ± 23,25	5,03 ± 1,56
MAFC	15,39 ± 6,51	9,29 ± 3,52	40,18 ± 19,48	5,19 ± 1,68
MGFC	15,39 ± 6,51	9,06 ± 3,08	36,02 ± 25,06	4,89 ± 1,76
MASC	15,39 ± 6,51	11,36 ± 4,64	27,11 ± 20,01	5,15 ± 1,60
MGSC	15,39 ± 6,51	8,98 ± 5,38	30,48 ± 27,20	4,82 ± 1,73
MAFT	13,63 ± 1,90	8,63 ± 2,00	37,16 ± 8,58	6,41 ± 0,65
MGFT	13,63 ± 1,90	7,89 ± 2,22	40,16 ± 23,04	6,44 ± 0,54
MAST	13,63 ± 1,90	10,68 ± 1,97	25,98 ± 11,85	5,93 ± 0,61
MGST	13,63 ± 1,90	7,31 ± 3,13	45,43 ± 22,60	6,33 ± 0,75
MAFP	15,39 ± 6,51	7,74 ± 3,53	48,32 ± 14,68	5,48 ± 1,91
MGFP	15,39 ± 6,51	6,88 ± 5,12	55,72 ± 24,52	6,24 ± 0,60
MASP	15,39 ± 6,51	8,59 ± 3,30	34,91 ± 18,78	5,18 ± 1,81
MGSP	15,39 ± 6,51	11,29 ± 5,04	27,38 ± 7,91	4,63 ± 1,63

Tabla 13. Concentración media y desviación estándar (DE) de arsénico en el afluente y efluente; índice de eliminación y desviación estándar de este metaloide en el agua, y valor medio y desviación estándar (DE) de pH en el efluente para cada tratamiento. Consultar tablas 6 y 12 para mayor información.

Microecosistema	Afluente As (mg l <sup>-1</sup> ) media ± DE	Efluente As (mg l <sup>-1</sup> ) media ± DE	Índice de eliminación As, media ± DE	pH, media ± DE
AFC	19,95 ± 2,16	16,96 ± 3,35	15,50 ± 9,17	4,18 ± 1,35
GFC	19,95 ± 2,16	17,88 ± 2,86	10,67 ± 6,69	4,53 ± 1,38
ASC	19,95 ± 2,16	14,95 ± 5,88	26,35 ± 6,69	4,97 ± 1,62
GSC	19,95 ± 2,16	16,30 ± 3,99	18,72 ± 15,96	5,03 ± 1,56
MAFC	19,73 ± 3,68	17,33 ± 3,51	13,00 ± 10,11	5,19 ± 1,68
MGFC	19,73 ± 3,68	17,05 ± 3,55	13,75 ± 8,59	4,89 ± 1,76
MASC	19,73 ± 3,68	17,78 ± 3,83	10,08 ± 7,22	5,15 ± 1,60
MGSC	19,73 ± 3,68	17,59 ± 4,00	11,04 ± 10,39	4,82 ± 1,73
MAFT	20,52 ± 1,88	19,23 ± 1,56	8,93 ± 3,88	6,41 ± 0,65
MGFT	20,52 ± 1,88	18,43 ± 2,52	10,42 ± 5,77	6,44 ± 0,54
MAST	20,52 ± 1,88	18,15 ± 2,18	11,69 ± 3,91	5,93 ± 0,61
MGST	20,52 ± 1,88	18,73 ± 1,09	9,89 ± 6,01	6,33 ± 0,75
MAFP	19,11 ± 5,23	15,50 ± 3,73	17,56 ± 8,19	5,48 ± 1,91
MGFP	19,11 ± 5,23	14,71 ± 4,00	22,77 ± 7,25	6,24 ± 0,60
MASP	19,11 ± 5,23	16,11 ± 3,76	14,69 ± 7,61	5,18 ± 1,81
MGSP	19,11 ± 5,23	15,92 ± 4,08	16,26 ± 7,92	4,63 ± 1,63

Los resultados presentados en las tablas anteriores (Tabla 11 y 12) muestran las diferencias de funcionamiento de la planta piloto en todos los microecosistemas (Figuras 18 y 19), reflejadas en las desviaciones estándar obtenidas, particularmente en el índice de eliminación. Altas variaciones a lo largo del tiempo en la concentración media de metales, así como en la eliminación de los mismos en humedales artificiales, son frecuentes de acuerdo con los datos presentados por distintos autores (Knox *et al.*, 2006; Kröpfelová *et al.*, 2009).

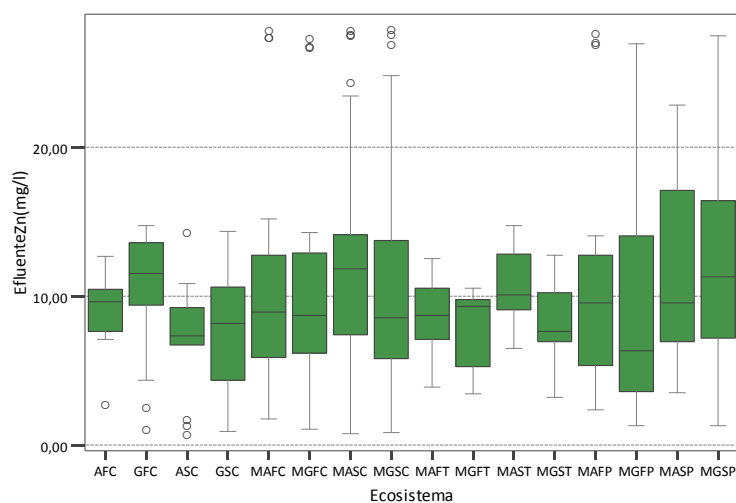


Figura 18. Diagrama de cajas de Tukey. Las cajas representan los valores de concentración de zinc en el efluente situados entre el primer y el tercer cuartil. La línea horizontal de la caja muestra la mediana. Las líneas verticales indican el rango de concentraciones obtenidas, exceptuando los *outlayers* marcados con círculos. AFC, ASC, GFC, GSC, N=5; MAFC, MGFC, MASC, MGSC, N=18; MAFT, MGFT, MAST, MGST, N=5; MAFP, MGFP, MASP, MGSP, N=8. Para más información consultar Tabla 6.

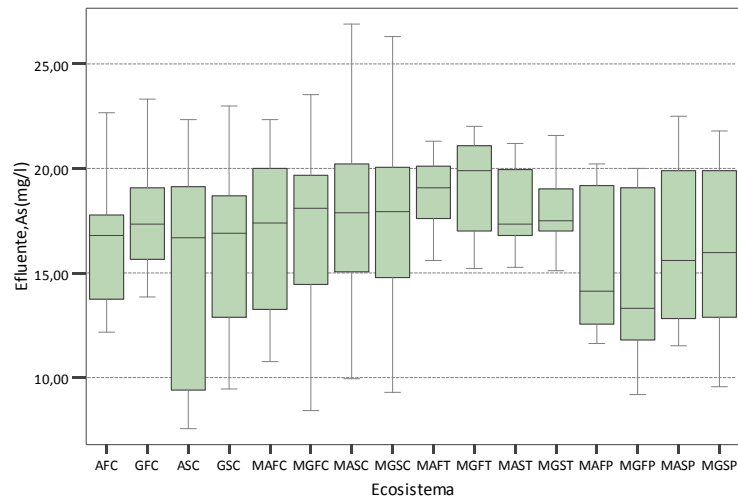


Figura 19. Diagrama de cajas de Tukey. Las cajas representan los valores de concentración de arsénico en el efluente situados entre el primer y el tercer cuartil. La línea horizontal de la caja muestra la mediana. Las líneas verticales indican el rango de concentraciones obtenidas, exceptuando los *outlayers* marcados con círculos. AFC, ASC, GFC, GSC, N=5; MAFC, MGFC, MASC, MGSC, N=18; MAFT, MGFT, MAST, MGST, N=5; MAFP, MGFP, MASP, MGSP, N=8. Para más información consultar Tabla 6.

Las concentraciones de zinc y de arsénico en el efluente han sido significativamente distintas ( $p < 0,001$ ) a la que estos elementos presentan en el afluente. Es decir, hay una variación significativa en las concentraciones de zinc y arsénico entre la entrada de agua residual industrial a los tratamientos y la salida de agua residual tras su paso por los humedales artificiales a pequeña escala. No obstante, las concentraciones del efluente, que han variado en el rango de 7-11 mg l<sup>-1</sup> de zinc, y 15-19 mg l<sup>-1</sup> de arsénico, continúan siendo elevadas. De forma que, estos efluentes, particularmente debido a la concentración de arsénico, no permitirían dar cumplimiento a los objetivos de calidad para los cauces fluviales establecidos en el Real Decreto 995/2000, de 2 de junio, por el que se fijan objetivos de calidad para determinadas sustancias contaminantes y se modifica el Reglamento de Dominio Público Hidráulico, aprobado por el Real Decreto 849/1986, de 11 de abril. El Real Decreto 995/2000 establece en su Anexo I, titulado "Sustancias Preferentes y Objetivos de Calidad", una concentración de arsénico total 50 µg l<sup>-1</sup>, y de zinc entre 30 y 500 µg l<sup>-1</sup> (en función de la dureza del agua).

Para el conjunto de tratamientos, la eliminación de zinc ha sido significativamente mayor ( $p < 0,001$ ) que la de arsénico, lo que está en consonancia con otros estudios realizados al respecto (Stolz y Greger, 2002; Vymazal *et al.*, 2005).

El tratamiento que más zinc ha eliminado del agua ha sido el constituido por la combinación de un caudal de 2 ml min<sup>-1</sup>, flujo subsuperficial, sustrato de grava, y *Phragmites australis* (MGFP) con un índice de eliminación de 56, seguido por el tratamiento conformado por esta misma combinación de factores con la excepción del sustrato (MAFP), y para el que se ha obtenido un índice de eliminación de zinc del agua de 48. Por el contrario, los sistemas menos eficaces han sido el tratamiento con caudal de 1 ml min<sup>-1</sup>, flujo subsuperficial, sustrato de grava, y sin vegetación (GFC) con un índice de eliminación medio de 26, seguido por el tratamiento con caudal de 2 ml min<sup>-1</sup>, flujo superficial, sustrato de arlita, y plantado con *Typha latifolia* (MAST), el cual ha presentado también un índice de eliminación de zinc del agua de 26. El contraste de Kruskal-Wallis indica que el índice de eliminación de zinc ha sido significativamente diferente entre los distintos tratamientos (Tabla 14).

A diferencia del zinc, para el cual todos los tratamientos eliminan este metal del agua con valores del índice de eliminación entre 25 y 55, en el caso del arsénico, el índice de eliminación varía en un rango inferior, entre 9 y 26. El sistema más eficaz ha sido el tratamiento con caudal de 1 ml min<sup>-1</sup>, flujo superficial, sustrato de arlita y sin vegetación (ASC), seguido por el sistema con caudal de 2 ml min<sup>-1</sup>, flujo subsuperficial, sustrato de grava, y *Phragmites australis* (MGFP) con un índice de eliminación medio 23. Como sistemas menos eficaces, se han identificado los tratamientos con *Typha latifolia*, caudal de 2 ml min<sup>-1</sup>, flujo subsuperficial y sustrato de arlita (MAFT) seguido por el tratamiento plantado con el mismo macrófito y con caudal de 2 ml min<sup>-1</sup>, pero con sustrato de grava y flujo superficial (MGST), para los cuales se ha obtenido un índice de eliminación inferior a 10. Al igual que en el caso del zinc, los distintos tratamientos evaluados han presentado diferencias estadísticamente significativas en cuanto a su capacidad de modificar la concentración de arsénico del efluente en relación al afluente (Tabla 14).

Tabla 14. Resultados obtenidos al aplicar el estadístico de contraste Kruskal-Wallis para identificar diferencias estadísticamente significativas (\*) en la eliminación de zinc y arsénico entre los distintos tratamientos. La significación del contraste para los dos índices es inferior a 0,05, por lo que hay una evidencia estadística de que los resultados obtenidos en los distintos tratamientos son diferentes. Consultar Tabla 6 para más información.

	Índice de eliminación de arsénico	Índice de eliminación de zinc
Chi-cuadrado	49,799	44,484
Grados de libertad	15	15
Significación	0,031*	<0,001*

Tanto en el caso del zinc como del arsénico, se han medido en determinados muestreos rendimientos negativos en alguno de los tratamientos, de forma que la concentración del metal en el agua no ha disminuido, sino que se ha visto incrementada debido a la redisolución del metal (Tabla 15 y 16). La bibliografía no recoge datos sobre eliminaciones negativas de zinc en humedales artificiales. No ocurre lo mismo en el caso del arsénico, ya que situaciones de redisolución de este metal pesado en el agua, están ampliamente descritas (Walker y Hurl 2002; Vymazal 2003; Lesage 2006; Kröpfelová *et al.*, 2009). Los resultados muestran como la redisolución de zinc, de forma que la concentración del efluente supera la del afluente, se ha detectado únicamente en los tratamientos definidos como control (sin vegetación). Esta situación se repite para el arsénico, aunque en este caso con una excepción, ya que un tratamiento plantado con *Typha latifolia*, ha presentado una concentración media de arsénico en el efluente superior a la del afluente.

Tabla 15. Tratamientos, muestreo, índice de eliminación de zinc, y valor medio de pH, en los muestreos en los que se ha calculado una eliminación negativa de este metal. Los datos muestran la media de las tres réplicas y su desviación estándar. Consultar Tabla 6 para más información.

Microecosistema	Muestreo	Índice de eliminación de Zn ± DE	pH ± DE
MAFC	Junio	-13,65 ± 75,25	7,03 ± 0,40
MAFC	Agosto	-6,67 ± 1,29	6,14 ± 0,03
MGFC	Julio	-16,38 ± 3,05	6,60 ± 1,15



Tabla 16. Tratamientos, muestreo, índice de eliminación de arsénico, y valor medio de pH, para los casos en los que se ha medido una eficacia negativa en la eliminación de este metaloide. Los datos muestran la media de las tres réplicas y su desviación estándar. Consultar Tabla 6 para más información.

Microecosistema	Muestreo	Índice de eliminación de As $\pm$ DE	pH $\pm$ DE
MAFC	Julio	-4,28 $\pm$ 0,93	7,22 $\pm$ 0,07
MGFC	Julio	-2,14 $\pm$ 3,78	5,81 $\pm$ 0,32
MGSC	Julio	-2,98 $\pm$ 7,75	5,75 $\pm$ 2,73
MAFT	Julio	-5,55 $\pm$ 0,30	5,42 $\pm$ 0,11

La eliminación de zinc en los distintos tratamientos ha sido inferior a los resultados recogidos en la bibliografía para sistemas de tratamiento a escala real, ya sea en plantas a escala real con flujo superficial (Ye *et al.*, 2001; O'Sullivan *et al.*, 2004), o en combinaciones de sistemas (August *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos en microecosistemas o sistemas a pequeña escala deben ser interpretados y comparados con sistemas a escala real con precaución (Fraser y Keddy, 1997), particularmente en el caso de microecosistemas con vegetación, ya que en estos microecosistemas se obvian las interacciones entre distintos individuos, por ejemplo en la insolación que recibe la planta, que puede verse afectada por las plantas vecinas. Más importante aún, son los aspectos relacionados con el crecimiento del sistema radicular, ya que en relación a un crecimiento normal, las raíces tienden a aglutinarse en el espacio de la cubeta (Brisson y Chazarenc, 2009).

En el caso de otros sistemas a pequeña escala, Maine *et al.* (2006) presentan unos resultados comparables a los obtenidos en los tratamientos evaluados, con una eliminación máxima de zinc de 59% en un sistema de flujo superficial. Sin embargo, otros estudios en plantas a pequeña escala indican mayores eliminaciones de zinc. Así, Wiessner *et al.* (2006) indican porcentajes de eliminación de zinc que oscilan entre el 65 y el 70% en tratamientos con *Juncus effusus* y flujo superficial, incrementándose hasta el 77% en los tratamientos con *Juncus effusus* y flujo subsuperficial. En otro estudio realizado en un sistema a pequeña escala, se recoge una eliminación de zinc del 100%, mediante dos tratamientos, uno con arena y grava como sustrato, *Cyperus alternifolius*, y flujo subsuperficial vertical, y otro con arena y grava, *Villarsia exaltata*, y flujo subsuperficial vertical reverso (Cheng *et al.*, 2002).

Los dos caudales (1 y 2 ml min<sup>-1</sup>) empleados en el experimento no han ofrecido diferencias significativas en cuanto a los resultados obtenidos en la eliminación de zinc y arsénico del agua residual (Tablas 17 y 18). No obstante, el caudal de 1 ml min<sup>-1</sup> se ha empleado únicamente en la primera fase del trabajo ya que se consideró un caudal insuficiente para el mantenimiento adecuado de las especies vegetales utilizadas.

La adsorción de iones metálicos a la materia orgánica y/o a partículas de arcilla, constituye un mecanismo de eliminación de metales del agua, especialmente efectivo para el cobre, el plomo y el zinc (Mitsch y Gosselink, 1993). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo, no han indicado diferencias significativas en la eliminación de zinc y de arsénico entre los dos sustratos empleados (Tablas 17 y 18) a pesar de que la arlita es un material fabricado a partir de arcilla.

Del análisis de los datos obtenidos, se observa que el factor presencia o ausencia de vegetación, así como la especie vegetal empleada, no permite establecer diferencias significativas al considerar la eliminación de zinc. Por el contrario, si se identifican diferencias significativas en la eliminación de arsénico en función de este parámetro (Tablas 17 y 18), alcanzándose las eficiencias más altas en

los sistemas con *Phragmites australis*. En los humedales construidos, los restos procedentes de la vegetación, constituyen un aporte de materia orgánica al sedimento, que favorecerá los procesos de adsorción de los iones metálicos. En los tratamientos con vegetación evaluados en el experimento, el aporte de materia orgánica resultó mínimo, debido al breve período de funcionamiento, no cubriendo el experimento la senectud de la planta, época de mayor aportación de restos de vegetación al sedimento, por lo que se sugiere que la baja eficacia detectada en los distintos tratamientos puede ser debida en parte a la ausencia de este proceso.

El factor flujo hidráulico, superficial o subsuperficial vertical, sí ha permitido identificar diferencias significativas entre los tratamientos (Tablas 17 y 18). Estas diferencias han sido más acentuadas en la eliminación de zinc, al ser la significación de contraste muy baja ( $p=0,007$ ). Así, los tratamientos con flujo hidráulico superficial, más aerobios por tanto, presentan una mayor capacidad de eliminar zinc. En el caso del arsénico, con una significación de contraste de 0,049, no se ha identificado tan claramente esta diferencia entre los dos tipos de flujo.

Tabla 17. Resultados de los contrastes no paramétricos en relación a la eficiencia en la eliminación de zinc (índice de eliminación de zinc) entre los distintos tratamientos. La tabla muestra el valor del estadístico U de Mann-Whitney, el valor del estadístico W de Wilcoxon (versión equivalente del estadístico U), la tipificación de ambos (Z) y la significación (\*).

Variable de agrupación	U de Mann-Whitney	W de Wilcoxon	Z	Significación asintótica
Caudal	7439,00	61724,00	-1,92	0,055
Sustrato	17607,00	35185,00	-0,66	0,507
Flujo hidráulico	15394,00	34115,00	-2,72	0,007*
Presencia/Ausencia de vegetación	15900,50	45061,50	-1,16	0,247
Especie vegetal	2006,00	3087,00	-0,88	0,379

Tabla 18. Resultados de los contrastes no paramétricos en relación a la eficiencia en la eliminación de arsénico (índice de eliminación de arsénico) entre los distintos tratamientos. La tabla muestra el valor del estadístico U de Mann-Whitney, el valor del estadístico W de Wilcoxon (versión equivalente del estadístico U), la tipificación de ambos (Z) y la significación (\*).

Variable de agrupación	U de Mann-Whitney	W de Wilcoxon	Z	Significación asintótica
Caudal	8475,00	62431,00	-292,00	0,771
Sustrato	18036,50	37342,50	-0,09	0,931
Flujo hidráulico	15979,00	34700,00	-2,01	0,049*
Presencia/Ausencia de vegetación	14146,00	42826,00	-2,72	0,007*
Especie vegetal	1078,00	2159,00	-4,93	0,001*

La eliminación de zinc a lo largo del tiempo, ha resultado errática e inestable, por lo que no puede definirse una tendencia clara en ninguno de los tratamientos (Figura 20). Alta inestabilidad en la eliminación de zinc en humedales artificiales está recogida en la bibliografía (Wiessner *et al.*, 2006). De acuerdo con los resultados obtenidos en la prueba de Friedman, la eliminación de zinc ha variado de forma significativa entre muestreos en los tratamientos control con un caudal de 2 ml min<sup>-1</sup> y en los tratamientos plantados con *Phragmites australis*, estos dos grupos de tratamientos son los que más tiempo estuvieron en funcionamiento por lo que puede suponerse que en los primeros meses de funcionamiento de un microecosistema su comportamiento en cuanto a su capacidad de modificar la concentración de zinc del afluente es similar, mientras que en períodos de funcionamiento más prolongado, esta capacidad varía de forma significativa (Tabla 19).

Tabla 19. Resultados obtenidos en la prueba de Friedman para la identificación de diferencias significativas (\*) en la eliminación de zinc a lo largo del tiempo para los distintos tratamientos.

Microecosistemas	AFC	GFC	ASC	GSC	MAFC	MGFC	MASC	MGSC
N	5	5	5	5	18	18	18	18
Grados de libertad	4	4	4	4	17	17	17	17
Significación asintótica	0,241	0,082	0,107	0,145	0,007*	0,002*	0,018*	0,007*

Microecosistemas	MAFT	MGFT	MAST	MGST	MAFP	MGFP	MASP	MGSP
N	5	5	5	5	8	8	8	8
Grados de libertad	4	4	4	4	7	7	7	7
Significación asintótica	0,223	0,112	0,187	0,264	0,039*	0,008*	0,050*	0,013*

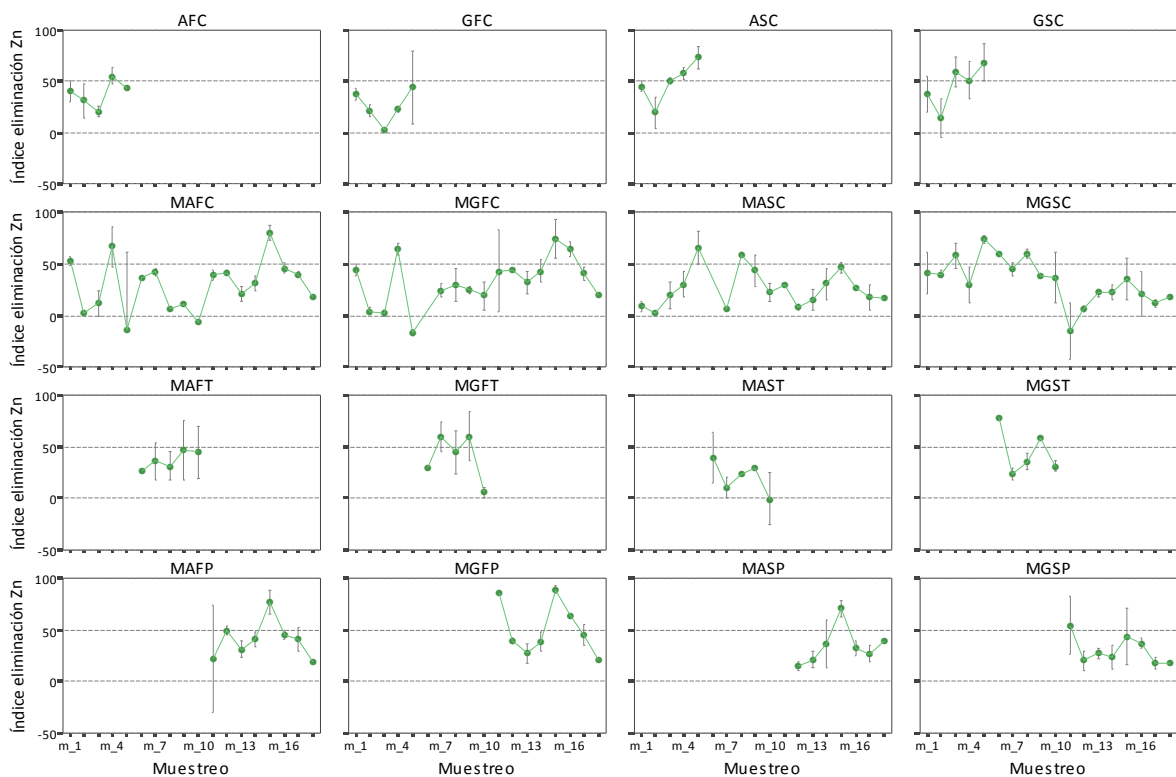


Figura 20. Eficiencia en la eliminación media de zinc en los diferentes tratamientos, a lo largo de las distintas fases del experimento. Los gráficos muestran el valor medio de las réplicas +/- la desviación estándar.

A diferencia de la eliminación de zinc, la eliminación de arsénico a lo largo del tiempo no ha presentado diferencias en los tratamientos control (Tabla 20). Únicamente se ha identificado una variación estadísticamente significativa en los tratamientos con caudal de  $2 \text{ ml min}^{-1}$  plantados con *Phragmites australis*, para los cuales la eliminación de arsénico en los últimos muestreos es significativamente más eficiente que en los primeros.

El índice de eliminación de arsénico mostró en los diferentes muestreos realizados un comportamiento menos inestable que en el caso del índice de eliminación de zinc, tal y como se refleja en la siguiente figura (Figura 21).

Tabla 20. Resultados obtenidos en la prueba de Friedman para la identificación de diferencias significativas (\*) en la eliminación de arsénico a lo largo del tiempo para los distintos tratamientos.

Ecosistemas	AFC	GFC	ASC	GSC	MAFC	MGFC	MASC	MGSC
N	5	5	5	5	18	18	18	18
Grados de libertad	4	4	4	4	17	17	17	17
Significación asintótica	0,223	0,156	0,092	0,308	0,058	0,061	0,056	0,051

Ecosistemas	MAFT	MGFT	MAST	MGST	MAFP	MGFP	MASP	MGSP
N	5	5	5	5	8	8	8	8
Grados de libertad	4	4	4	4	7	7	7	7
Significación asintótica	0,607	0,145	0,494	0,097	0,011*	0,011*	0,010*	0,012*

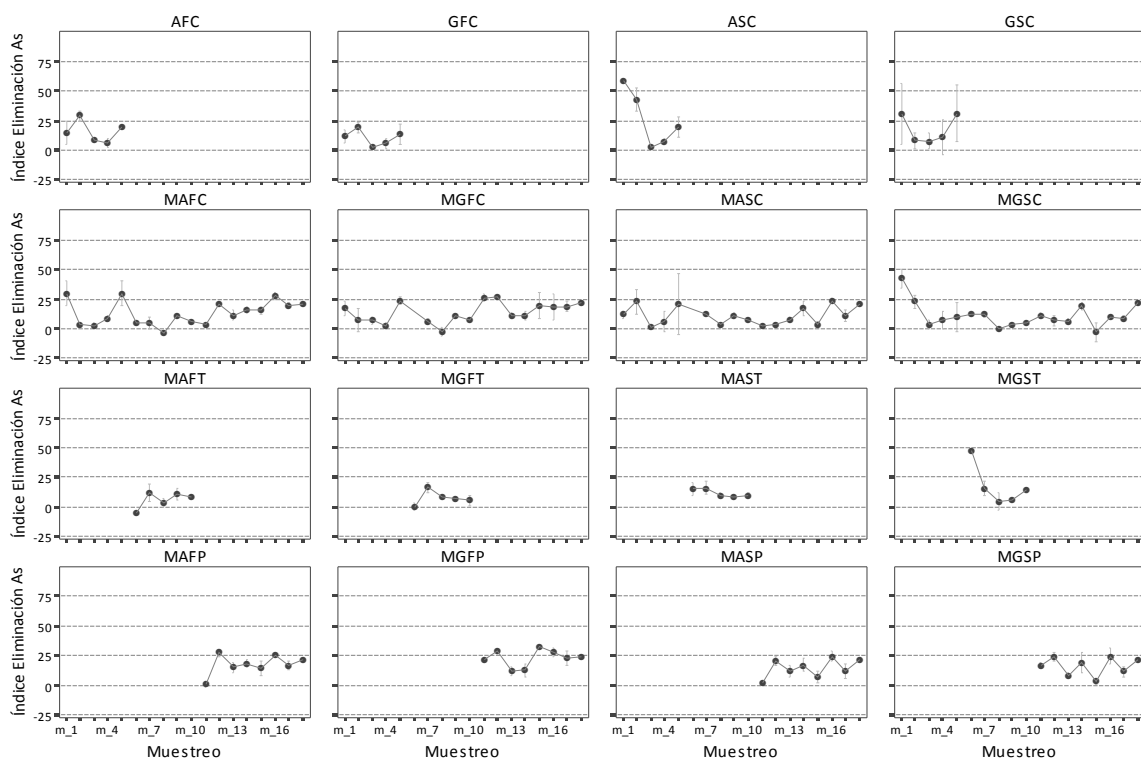


Figura 21. Eficiencia en la eliminación media de arsénico en los diferentes tratamientos, a lo largo de las distintas fases del experimento. Los gráficos muestran el valor medio de las réplicas +/- la desviación estándar.

Todos estos resultados parecen sugerir que, entre los factores estudiados, en el diseño de un humedal artificial para el tratamiento de agua residual industrial con altas concentraciones de zinc y arsénico, principalmente el flujo hidráulico superficial o subsuperficial, conformando un humedal aerobio o anaerobio respectivamente, constituiría un factor clave en el diseño del sistema. Este factor está íntimamente relacionado con las comunidades de bacterias que se desarrollan en los microecosistemas, las cuales constituyen directa o indirectamente la variable que determina el funcionamiento y respuesta del humedal en la eliminación de metales de la columna de agua (Batty *et al.*, 2002; Hallberg y Johnson, 2005).

La presencia de vegetación en los humedales artificiales es también un factor citado en la bibliografía como fundamental en la eliminación de metales, no tanto por la eliminación directa por acumulación de metales en las plantas sino por su influencia en el desarrollo de las comunidades de bacterias asociadas a su rizosfera, así como por su función como lugares de precipitación y sedimentación (Wildeman, 1993; Gazea *et al.*, 1996; Zayed *et al.*, 1999; Mays y Edwards, 2001; Ye *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos en este trabajo experimental muestran que este factor permite establecer diferencias significativas en la eliminación de arsénico, presentando los tratamientos plantados con *Phragmites australis*, la especie vegetal que mejor desarrollo vegetativo presentó entre las dos empleadas, los resultados de eliminación de arsénico de la columna de agua más altos. Por el contrario, no se identificaron diferencias entre tratamientos para la eliminación de zinc considerando este factor.

## 2. El MJEA® como Sistema a Escala Real para el Tratamiento de Agua Residual Urbana

El diseño y construcción de un humedal artificial determina qué procesos y mecanismos ocurrirán en el ecosistema. Las características de los cuatro componentes principales que participan en la depuración del agua residual (agua, sustrato/sedimento, vegetación y las poblaciones de bacterias) han sido estudiadas para el MJEA® localizado en Bustillo de Cea (León).

### 2.1. Características del Agua Residual

Los resultados de la monitorización del sistema a escala real para el tratamiento del agua residual de la localidad de Bustillo de Cea indican que el sistema ha permitido alcanzar los objetivos establecidos por la legislación aplicable durante el periodo comprendido entre los años 2006 a 2009 (Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas) (Figura 22). Los datos medios de los parámetros físico-químicos y microbiológicos (bacterias fecales) se presentan en las siguientes tablas (Tablas 21 y 22).

Tabla 21. Valores medios y desviación estándar de los parámetros físico-químicos monitorizados en las diferentes etapas del sistema piloto a escala real. Número de muestras (N)= 46. Las letras indican: BW, laguna de micrófitos; BMT, humedal artificial superficial plantado con *Typha latifolia*; BMS, humedal artificial de flujo superficial seguido por humedal artificial de flujo subsuperficial horizontal plantado con *Iris pseudacorus* y *Salix atrocinerea* respectivamente.

Parámetro	Afluente, media ± DE	Entrada BW, media ± DE	Entrada BMT, media ± DE	Entrada BMS, media ± DE	Efluente, media ± DE
Caudal (l min <sup>-1</sup> )	32,08 ± 21,91				28,35 ± 30,20
Tª (°C)	13,69 ± 5,03	13,69 ± 7,04	15,53 ± 5,44	14,04 ± 4,14	11,77 ± 4,22
Cond (µS cm <sup>-1</sup> )	737,10 ± 325,65	677,78 ± 388,10	673,14 ± 420,10	637,15 ± 445,57	554,11 ± 225,65
E <sub>H</sub> (mV)	-74,86 ± 106,76	-34,07 ± 99,14	-57 ± 94,11	-51,71 ± 120,27	-3,68 ± 122,62
OD (%)	27,17 ± 19,82	71,87 ± 57,02	31,57 ± 24,18	42,32 ± 54,63	61,71 ± 21,03
pH	7,16 ± 0,84	7,30 ± 1,02	6,57 ± 0,62	5,96 ± 1,24	7,15 ± 0,75
SDT (mg l <sup>-1</sup> )	535,69 ± 374,78	524,67 ± 254,75	618,29 ± 322,32	570,71 ± 274,54	408,97 ± 159,01
DQO (mgO <sub>2</sub> l <sup>-1</sup> )	145,27 ± 100,31	111,82 ± 66,57	101,75 ± 60,27	80,42 ± 47,25	41,52 ± 28,91
DBO <sub>5</sub> (mgO <sub>2</sub> l <sup>-1</sup> )	99,59 ± 71,17	58,57 ± 39,86	42,16 ± 28,16	34,50 ± 25,31	13,95 ± 15,01
SST (mg l <sup>-1</sup> )	82,02 ± 71,68	46,73 ± 32,68	45,35 ± 34,54	43,44 ± 27,90	17,33 ± 16,49
SSV (mg l <sup>-1</sup> )	56,05 ± 48,63	40,71 ± 43,36	33,50 ± 28,19	33,36 ± 22,86	10,25 ± 7,60
NTK (mgN l <sup>-1</sup> )	42,01 ± 31,91	34,11 ± 20,46	25,06 ± 13,17	22,30 ± 14,17	19,59 ± 15,12
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mgN l <sup>-1</sup> )	29,74 ± 48,33	22,31 ± 15,61	16,18 ± 9,74	16,02 ± 11,50	12,19 ± 7,92
PT (mgP l <sup>-1</sup> )	5,93 ± 4,93	5,01 ± 4,43	4,64 ± 3,96	3,37 ± 2,24	3,01 ± 1,78

Tabla 22. Valores medios y desviación estándar de los parámetros relativos a indicadores fecales monitorizados en las diferentes etapas del sistema piloto a escala real. Número de muestras, N= 36.

<b>Etapas MJEA®</b>	<b>CT (UFC 100ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>CF (UFC 100ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>EF (UFC 100ml<sup>-1</sup>)</b>
Afluente, media ± DE	3,01E+06 ± 3,79E+6	5,9E+05 ± 9,93E+5	2,52E+05 ± 4,17E+5
Entrada BW, media ± DE	2,95E+06 ± 5,27E+6	3,90E+05 ± 7,27E+5	1,49E+05 ± 2,14E+5
Entrada BMT, media ± DE	6,24E+05 ± 1,30E+5	5,41E+04 ± 1,03E+5	1,76E+04 ± 2,16E+4
Entrada BMS, media ± DE	1,60E+05 ± 2,62E+5	2,70E+04 ± 5,94E+4	9,26E+03 ± 1,31E+3
Efluente, media ± DE	3,39E+04 ± 1,04E+5	6,09E+03 ± 1,17E+3	1,17E+03 ± 1,90E+3

A lo largo del año 2006 se han identificado tres muestreos en los cuales el efluente presenta una no conformidad con lo establecido en la Directiva 91/271/CEE. En los muestreos de febrero, septiembre y octubre el valor de la demanda biológica de oxígeno a los 5 días (DBO<sub>5</sub>) en el efluente ha sido de 48, 60 y 30 mg l<sup>-1</sup> respectivamente, frente a lo establecido en el “Anexo 1. Requisitos de los vertidos de aguas residuales”, en el que se fija un valor de 25 mgO<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> como valor máximo. Sin embargo, en el “Anexo III. Métodos de referencia para el seguimiento y evaluación de resultados”, de la citada Directiva, se indica que el valor de la concentración de este parámetro en las muestras no conformes, tomadas en condiciones normales de funcionamiento, no deberá desviarse del 100%. Por tanto, en el año 2006 únicamente el muestreo de septiembre ha superado el valor establecido. En el caso de los sólidos suspendidos totales, en ese mismo mes de septiembre se ha superado el umbral establecido, y se ha alcanzado un valor en el efluente de 44 mg l<sup>-1</sup>, valor que no se desvía del 150% establecido por la legislación. Además, el Anexo III de la Directiva indica que si la serie de muestras tomada en un año es de 12, se permite un máximo de 2 muestras no conformes, por lo que los resultados obtenidos en el año 2006 han permitido cumplir lo establecido en la legislación (Figura 22).

En el muestreo de septiembre de 2008, el efluente ha presentado un valor de demanda biológica de oxígeno a los 5 días (DBO<sub>5</sub>) de 26 mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup>, valor que no se desvía del 100%, al estar la muestra recogida en condiciones normales de funcionamiento de la instalación. Además, ésta sería una única muestra no conforme, estando permitidas, para una serie de 12 muestreos anuales, un total de 2 muestras no conformes. Por ello, los resultados alcanzados por el MJEA® en este año 2008 han cumplido con lo establecido en la legislación vigente.

En los años 2007 y 2009 no se han obtenido en ningún muestreo valores no conformes, por lo que el funcionamiento del MJEA® se ha adecuado igualmente a los parámetros legalmente establecidos.

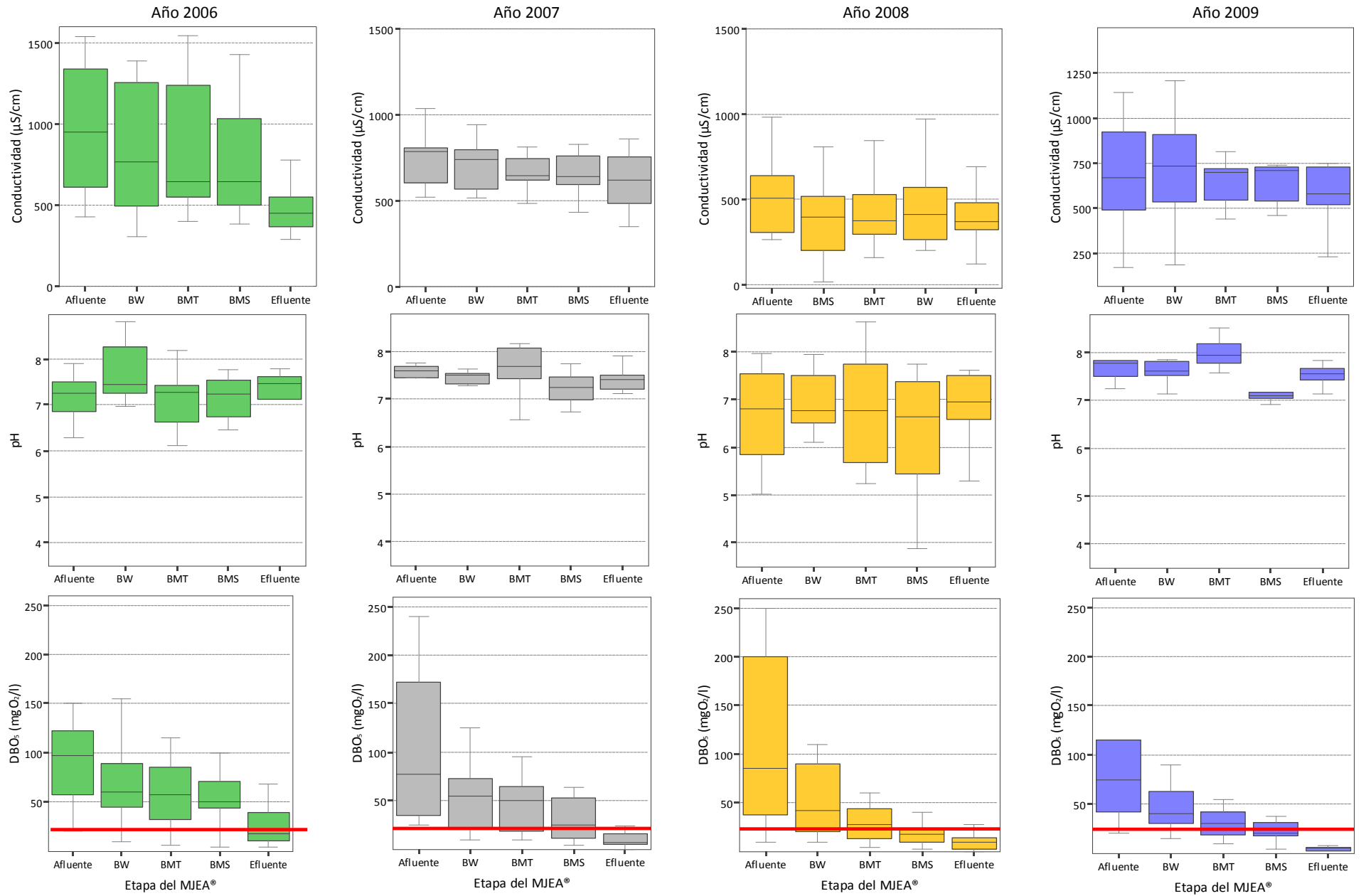
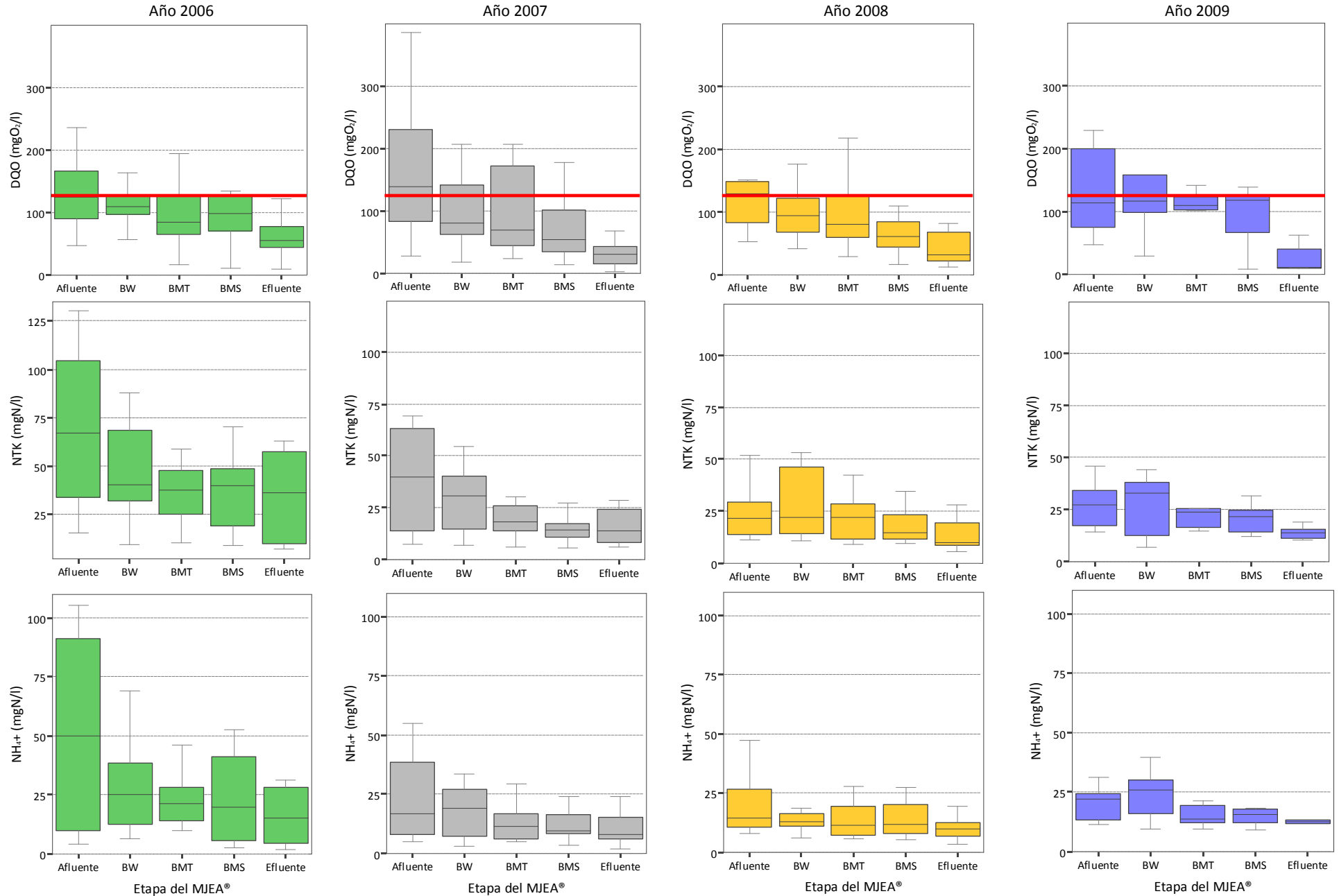


Figura 22. Diagramas de cajas de Tukey para los parámetros físico-químicos e indicadores fecales del sistema de tratamiento de agua residual urbana. Continúa en las siguientes páginas.





Etapa del MJEA®  
 Figura 22 (continúa en las siguientes páginas).

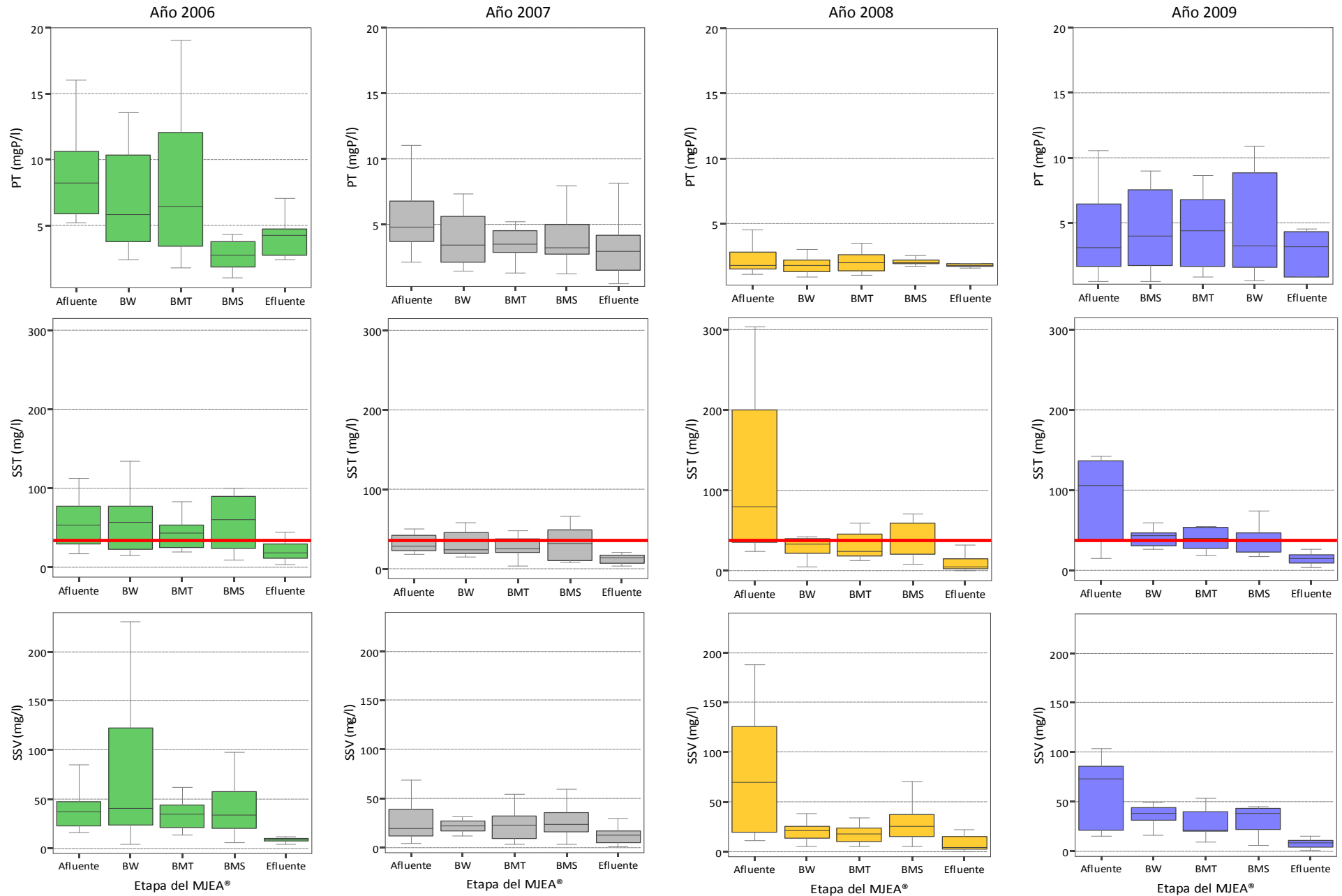


Figura 22 (continúa en la siguiente página).

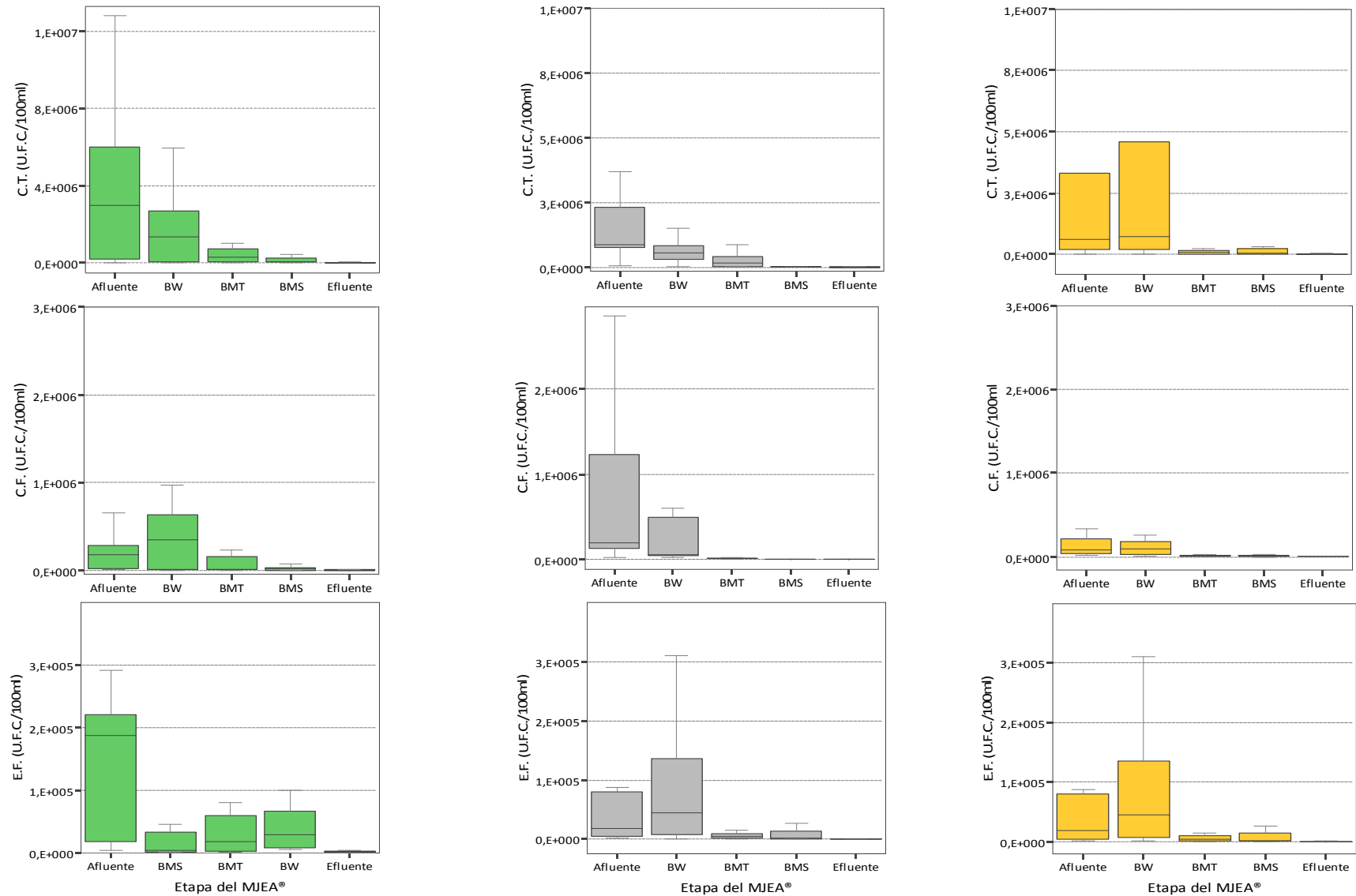


Figura 22. Diagramas de cajas de Tukey de parámetros físico-químicos e indicadores fecales. Las cajas representan los valores de los parámetros estudiados en las etapas del MJEA® situados entre el primer y el tercer cuartil. La línea horizontal de la caja muestra la mediana. En verde se presentan los datos del año 2006 (N=12), en gris los datos del año 2007 (N=12), en naranja los datos del año 2008 (N=12), y en azul los datos del año 2009 (N=10). La línea roja marca el valor máximo admitido de acuerdo a la Directiva 91/271/CEE. Las letras indican: BW, laguna de micrófitos; BMT, humedal artificial superficial plantado con *Typha latifolia*; BMS, humedal artificial de flujo superficial seguido por humedal artificial de flujo subsuperficial horizontal plantado con *Iris pseudacorus* y *Salix atrocinerea* respectivamente.

La comparación de los resultados de eliminación de la contaminación alcanzada por el sistema en estos 46 muestreos con los resultados obtenidos en el primer año de funcionamiento de la instalación (Ansola *et al.*, 2003), muestra que la eliminación media de sólidos totales, nitrógeno Kjeldahl, amonio, y materia orgánica (demanda biológica y química de oxígeno) fue más alta en el período de 2006 a 2009 que en el año 1999 (Tabla 23). La eliminación de nitrógeno, amonio y materia orgánica generalmente mejora en los humedales artificiales con el paso del tiempo, probablemente debido al crecimiento y consolidación de las comunidades de bacterias (Arceivala y Asoleka, 2006). En el caso de la eliminación de indicadores fecales (coliformes totales y fecales, y estreptococos fecales) los resultados alcanzados son comparables a los obtenidos en el primer año de funcionamiento del sistema. Únicamente, la eliminación media de fósforo ha decrecido en relación al comienzo del funcionamiento de la planta. La eliminación de fósforo en los humedales no es tan efectiva como la de otros parámetros, tal y como sucede en el sistema estudiado. Además, la eliminación de fósforo, es más efectiva en los primeros años de funcionamiento (primer y segundo año) debido al desarrollo de la vegetación y la expansión de la cobertura vegetal, así como a la mayor capacidad de adsorción del sustrato (Kadlec y Knight, 1996).

Tabla 23. Eliminación media, calculada como la media de la eliminación en cada muestreo, para diferentes parámetros químicos y microbiológicos en el MJEA®. Número de muestras (N)= 46. La última columna recoge los datos referentes al funcionamiento del sistema en el primer año de funcionamiento (año 2001-2002).

<b>Parámetro (unidades)</b>	<b>Índice de eliminación, media ± DE</b>	<b>Eliminación (%) Ansola <i>et al.</i> (2003)</b>
DQO (mgO <sub>2</sub> l <sup>-1</sup> )	70,47 ± 28,46	59,47
DBO <sub>5</sub> (mgO <sub>2</sub> l <sup>-1</sup> )	83,39 ± 21,01	61,44
SST (mg l <sup>-1</sup> )	69,92 ± 32,48	60,93
SSV (mg l <sup>-1</sup> )	71,75 ± 28,73	
NTK (mgN l <sup>-1</sup> )	47,24 ± 30,52	35,59
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mgN l <sup>-1</sup> )	41,45 ± 26,53	33,04
PT (mgP l <sup>-1</sup> )	27,63 ± 28,18	34,84
CT (UFC 100 ml <sup>-1</sup> )	96,97 ± 6,85	96,45
CF (UFC 100ml <sup>-1</sup> )	96,32 ± 5,98	
EF (UFC 100ml <sup>-1</sup> )	93,59 ± 13,99	91,73

Estos resultados de eficiencias alcanzadas en la depuración del agua residual, son similares a los obtenidos en otros sistemas de depuración para el tratamiento de agua residual urbana basados en humedales artificiales (Kadlec y Knight, 1996; Puigagut *et al.*, 2007).

Las diferentes etapas que configuran el MJEA® se han estudiado de forma individualizada en cuanto a su capacidad de eliminar contaminantes del agua residual. Los resultados obtenidos se recogen en la siguiente tabla (Tabla 24).

Tabla 24. Eliminación media en cada etapa del MJEA®. Los valores se han calculado como la media de la eliminación en cada muestreo para el agua de entrada y salida del ecosistema. Número de muestras parámetros físico-químicos, N=46. Número de muestras indicadores fecales, N=36.

Parámetro (unidades)	Índice de eliminación, pretratamiento, media $\pm$ DE	Índice de eliminación, BW, media $\pm$ DE	Índice de eliminación, BMT, media $\pm$ DE	Índice de eliminación, BMS, media $\pm$ DE
DQO (mgO <sub>2</sub> l <sup>-1</sup> )	13,43 $\pm$ 56,91	19,76 $\pm$ 20,75	21,90 $\pm$ 23,14	39,50 $\pm$ 28,84
DBO <sub>5</sub> (mgO <sub>2</sub> l <sup>-1</sup> )	25,45 $\pm$ 33,33	28,05 $\pm$ 25,84	28,31 $\pm$ 26,73	54,97 $\pm$ 33,82
SST (mg l <sup>-1</sup> )	24,05 $\pm$ 68,02	21,74 $\pm$ 26,27	17,89 $\pm$ 23,97	57,67 $\pm$ 26,73
SSV (mg l <sup>-1</sup> )	24,70 $\pm$ 59,45	25,06 $\pm$ 27,24	19,14 $\pm$ 25,98	62,13 $\pm$ 28,59
NTK (mgN l <sup>-1</sup> )	12,76 $\pm$ 27,84	23,48 $\pm$ 19,21	15,04 $\pm$ 16,07	18,53 $\pm$ 18,55
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mgN l <sup>-1</sup> )	13,73 $\pm$ 42,00	23,10 $\pm$ 24,06	15,51 $\pm$ 25,00	20,31 $\pm$ 22,98
PT (mgP l <sup>-1</sup> )	7,25 $\pm$ 22,19	9,75 $\pm$ 15,72	19,10 $\pm$ 26,63	15,42 $\pm$ 20,68
CT (UFC 100 ml <sup>-1</sup> )	10,95 $\pm$ 61,23	64,59 $\pm$ 31,35	56,71 $\pm$ 36,01	73,62 $\pm$ 26,20
CF (UFC 100ml <sup>-1</sup> )	26,85 $\pm$ 32,42	74,62 $\pm$ 26,11	42,43 $\pm$ 36,91	64,66 $\pm$ 31,07
EF (UFC 100ml <sup>-1</sup> )	24,27 $\pm$ 23,37	68,13 $\pm$ 34,37	46,14 $\pm$ 37,98	72,28 $\pm$ 30,93

Estos resultados, junto a los presentados en anteriores tablas (Tablas 21 y 22) que recogían los valores medios de diferentes parámetros en cada etapa del MJEA®, muestran como el sistema permite reducir progresivamente del agua residual la materia orgánica, los nutrientes, y las bacterias fecales.

La primera etapa del sistema está constituida por un pretratamiento. En esta etapa se han eliminado principalmente sólidos en suspensión, totales y volátiles, así como materia orgánica, reflejada en la disminución de la demanda biológica de oxígeno a los cinco días (DBO<sub>5</sub>), siendo la concentración de salida del pretratamiento para los sólidos totales y la DBO<sub>5</sub> significativamente inferior a la de entrada ( $p=0,015$  y  $p=0,002$  respectivamente, U de Mann-Whitney).

Después del paso del agua residual por el pretratamiento, llega a continuación a la laguna de micrófitos (BW) en la cual se favorecen procesos de degradación anaerobia de la materia orgánica y los nutrientes. Tras su paso por esta etapa, el agua residual ha presentado una concentración de salida significativamente inferior a la de entrada en nitrógeno total kjeldahl (NTK) ( $p=0,040$ ), de coliformes totales, fecales y estreptococos fecales ( $p=0,002$ ,  $p=0,001$ ,  $p=0,001$  respectivamente, U de Mann-Whitney).

El humedal artificial de flujo libre plantado con *Typha latifolia* (BMT) es la etapa que ha alcanzado una mayor eliminación de fósforo total, si bien esta diferencia no es estadísticamente significativa, frente a la eliminación de fósforo en las otras etapas del MJEA®.

Finalmente, el agua pasa al conjunto constituido por el humedal artificial de flujo libre plantado con *Iris pseudacorus* y el humedal subsuperficial plantado con *Salix atrocinerea* (BMS). En esta última etapa, la concentración del agua residual afluyente presenta valores significativamente inferiores a los de entrada en el caso de la demanda química y biológica de oxígeno, sólidos totales y volátiles, e indicadores microbiológicos (CT, CF y EF), ( $p<0,001$ , U de Mann-Whitney).

La concentración de metales pesados en las aguas residuales urbanas es generalmente baja, sin embargo, y debido a que la información a este respecto es muy limitada en la bibliografía, se ha realizado un análisis en el MJEA® de Bustillo de Cea. Las características del ecosistema acuático receptor del vertido, en este caso un pequeño arroyo empleado para el riego por los agricultores del entorno, incrementan el interés de conocer y evaluar esta información.

Los metales pesados estudiados han sido cadmio, cromo, cobre, hierro, manganeso, níquel, plomo, zinc y mercurio. Se incluyen también dos elementos, arsénico (metaloide) y boro (no metal), que si bien no son estrictamente, desde un punto de vista químico, metales pesados, si se consideran con frecuencia como tales debido a su potencial toxicidad, su persistencia en el medio, y a los procesos de bioacumulación que pueden producir en la cadena trófica.

En algunos análisis las concentraciones de cadmio, hierro, arsénico, plomo y cromo han sido inferiores al límite de detección del elemento. En el caso del mercurio, para el total de mediciones realizadas (46 muestreos con 5 puntos de muestreo), el 85% de los resultados obtenidos se ha encontrado por debajo del límite de detección ( $<0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ ) del elemento, por ello, no se presentan en los resultados valores medios de concentración del metal, ni la eficiencia del sistema en su eliminación.

Los metales con una mayor concentración media en el afluente fueron el boro, el hierro, y el manganeso (Tabla 25). Siendo también estos tres metales los que mayor concentración media presentaron en el efluente. Por el contrario, metales como el plomo y el cadmio, presentaron muy bajas concentraciones, sin llegar a alcanzar una concentración media en el afluente de  $1 \mu\text{g l}^{-1}$ .

Tabla 25. Concentración media y desviación estándar (DE) de los metales pesados estudiados en las distintas etapas del MJEA® de Bustillo de Cea. Número de muestras (N)= 46.

Parámetro ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Afluente, media $\pm$ DE	Entrada BW, media $\pm$ DE	Entrada BMT, media $\pm$ DE	Entrada BMS, media $\pm$ DE	Efluente, media $\pm$ DE
As	2,77 $\pm$ 1,27	2,75 $\pm$ 1,40	2,68 $\pm$ 1,21	2,49 $\pm$ 1,08	4,38 $\pm$ 2,34
B	123,83 $\pm$ 82,29	109,92 $\pm$ 78,88	129,83 $\pm$ 102,50	129,94 $\pm$ 91,12	112,87 $\pm$ 67,19
Cd	0,95 $\pm$ 2,29	1,99 $\pm$ 4,03	1,87 $\pm$ 3,91	2,12 $\pm$ 4,47	1,91 $\pm$ 4,25
Cr	3,07 $\pm$ 5,50	1,86 $\pm$ 1,85	2,36 $\pm$ 2,51	2,67 $\pm$ 2,65	1,31 $\pm$ 1,22
Cu	7,00 $\pm$ 5,35	7,62 $\pm$ 6,65	7,51 $\pm$ 6,03	5,22 $\pm$ 3,96	5,14 $\pm$ 4,43
Fe	91,80 $\pm$ 68,20	83,29 $\pm$ 74,76	89,26 $\pm$ 58,91	100,46 $\pm$ 88,16	114,50 $\pm$ 109,89
Mn	85,82 $\pm$ 53,01	81,49 $\pm$ 51,12	89,46 $\pm$ 59,30	108,43 $\pm$ 48,30	173,58 $\pm$ 98,26
Ni	3,04 $\pm$ 1,87	3,02 $\pm$ 1,80	3,58 $\pm$ 2,46	3,20 $\pm$ 1,81	3,01 $\pm$ 2,48
Pb	0,45 $\pm$ 0,44	0,43 $\pm$ 0,41	0,43 $\pm$ 0,34	0,40 $\pm$ 0,38	0,30 $\pm$ 0,25
Zn	43,93 $\pm$ 32,49	50,17 $\pm$ 37,09	33,80 $\pm$ 16,99	35,57 $\pm$ 24,46	32,67 $\pm$ 22,42

Dentro de las sustancias preferentes recogidas en el Anexo I, del Real Decreto 995/2000, de 2 de junio, por el que se fijan objetivos de calidad para determinadas sustancias contaminantes y se modifica el Reglamento de Dominio Público Hidráulico, se incluyen arsénico, cadmio, cromo, cobre, níquel, plomo y zinc. Los valores máximos admitidos para garantizar los objetivos de calidad establecidos en este Anexo I no han sido superados en ninguno de los análisis realizados, ni por tanto, en los valores medios anuales.

La baja concentración en el agua residual de Bustillo de Cea de metales pesados garantiza que su reutilización como agua para riego una vez depurada no conlleve a este respecto, ningún riesgo para la salud pública.

Los resultados calculados para la eficiencia del sistema en su conjunto se presentan en la Tabla 25. Estos resultados muestran un amplio rango de eficiencias entre los distintos elementos estudiados, oscilando el índice de eliminación entre 31 (cobre) y -91 (manganeso). En general, los resultados muestran que el sistema ha sido menos eficaz en la eliminación de metales del agua que otros humedales artificiales empleados para el tratamiento de agua residual urbana (Kröpfelová *et al.* 2009; Cheng *et al.* 2002; Ye *et al.* 2001). Incluso en el caso del cobre, el metal eliminado del agua de

forma más eficiente por el sistema, la eliminación alcanzada es menor que la presentada en otros estudios (Lesage *et al.*, 2007; Gersber *et al.*, 1984) en los que se indica una eliminación de cobre en humedales subsuperficiales de flujo horizontal de más del 90%. Esta baja eficiencia del sistema podría ser en parte consecuencia de la metodología de análisis realizada, ya que los datos presentados por otros estudios se refieren a muestras sin filtrar, mientras que los datos de este trabajo, indican concentraciones de metales disueltos. Los resultados presentados por otros autores incluyen en sus cálculos de eliminación de metales del agua el conjunto de metales asociados a los sólidos suspendidos que son filtrados y retenidos en los humedales (Sobolewski, 1999), mientras que los datos de este trabajo, no consideran esta fracción de metales. Al ser la sedimentación el principal proceso a corto plazo en la eliminación de metales pesados del agua (Mays y Edwards, 2001; Walker y Hurl, 2002, Sheoran y Sheoran, 2006), es posible que las eficiencias calculadas para el MJEA<sup>®</sup>, que no incluyen esa fracción sedimentable a corto plazo, se vean disminuidas.

El Índice de eliminación de cada metal pesado, recogido en la Tabla 26, se ha calculado a partir de las eficiencias medias obtenidas en cada muestreo. Algunos elementos, manganeso (-91), arsénico (-63), hierro (-52) y níquel (-10) presentan índice de eliminación negativo, debido a que la concentración de ese metal pesado fue mayor en el efluente que en el afluente. Una eficiencia negativa en la eliminación de hierro y níquel del agua no está recogida en la bibliografía. Por el contrario, se han encontrado altas eficiencias en la eliminación de estos dos metales han sido evaluadas (Lesage 2006; Wiessner *et al.* 2006; Lesley *et al.* 2008; Kröpfelová *et al.* 2009). El incremento en la concentración de manganeso y arsénico en el efluente sí es un hecho constatado en diferentes tipos de humedales artificiales (Walker y Hurl 2002; Vymazal 2003; Lesage 2006; Kröpfelová 2009).

Tabla 26. Índice de eliminación medio y desviación estándar (DE) de los metales pesados estudiados en el agua del afluente y del efluente del MJEA<sup>®</sup> de Bustillo de Cea. Número de muestras (N)= 46.

Parámetro	Índice de eliminación, media ± DE
As	-62,81 ± 86,01
B	3,47 ± 26,12
Cd	16,90 ± 43,13
Cr	12,07 ± 56,91
Cu	31,10 ± 54,68
Fe	-51,79 ± 78,64
Mn	-91,01 ± 65,17
Ni	-10,15 ± 31,89
Pb	17,75 ± 26,89
Zn	20,08 ± 32,45

La concentración de los distintos metales pesados analizados no varía de forma significativa entre las etapas del MJEA<sup>®</sup> ( $p > 0,05$ , prueba U de Mann-Whitney). Sin embargo, y aunque las concentraciones de los metales no sean significativamente diferentes, sí se identifican diferencias en el comportamiento de las distintas etapas del MJEA<sup>®</sup> en relación a su capacidad para eliminar metales pesados del agua (Tabla 27).

Tabla 27. Índice de eliminación medio y desviación estándar (DE) de los metales pesados estudiados en el agua en las etapas del MJEA® de Bustillo de Cea. Número de muestras (N)= 46.

Parámetro (µg l <sup>-1</sup> )	BW, Índice de eliminación, media ± DE	BMT, Índice de eliminación, media ± DE	BMS, Índice de eliminación, media ± DE
As	4,57 ± 14,82	3,69 ± 10,68	-96,30 ± 84,84
B	-6,71 ± 17,45	3,62 ± 5,33	3,09 ± 18,15
Cd	-0,71 ± 62,68	30,64 ± 36,10	11,21 ± 38,17
Cr	5,30 ± 57,04	11,63 ± 47,11	21,56 ± 41,10
Cu	-0,36 ± 40,99	19,32 ± 30,28	1,95 ± 37,74
Fe	11,29 ± 27,28	-27,43 ± 41,39	-24,56 ± 79,58
Mn	3,48 ± 49,27	-22,81 ± 40,37	-80,41 ± 57,77
Ni	-5,98 ± 23,15	-0,54 ± 18,22	-3,00 ± 27,47
Pb	-5,07 ± 15,07	11,34 ± 27,66	15,80 ± 23,92
Zn	7,15 ± 37,41	5,59 ± 37,33	8,66 ± 43,64

La laguna de micrófitos (BW) es el ecosistema en el que más metales presentan un índice de eliminación negativo, es decir, la laguna de micrófitos estaría funcionando como una fuente y no como un sumidero de boro, cadmio, cobre, níquel y plomo. Por el contrario, en la laguna de micrófitos tiene lugar una eliminación de hierro de la columna de agua que es significativamente superior a la eliminación de este metal en las otras etapas del MJEA® ( $p=0,037$ ; prueba U de Mann-Whitney), en las cuales no se consigue reducir la concentración de hierro en el agua, sino que ésta se ve incrementada, obteniéndose así un índice de eliminación negativo (Figura 23).

La última etapa del sistema (BMS) presenta un índice de eliminación de arsénico significativamente diferente al índice de eliminación en la laguna de micrófitos (BW) y en el humedal artificial de flujo libre (BMT) ( $p<0,001$ ; prueba U de Mann-Whitney). Mientras que la eliminación de arsénico en las dos primeras etapas del MJEA® (BW y BMT) da lugar a un índice de eliminación positivo, la última etapa del MJEA® (BMS) presenta un índice de eliminación negativo, es decir, se ha producido un alto lavado de arsénico (-96,3), de forma que tras el paso del agua residual por esta etapa, la concentración en arsénico aumenta significativamente (Figura 23).

Este ecosistema (BMS) presenta un comportamiento similar al del arsénico con el manganeso, metal para el que se ha calculado un índice de eliminación de -80,4, diferenciándose significativamente este ecosistema (BMS) de los otros dos ecosistemas artificiales del MJEA® ( $p<0,001$ ; prueba U de Mann-Whitney), (Figura 23). Otros autores han obtenido también eficiencias negativas en la eliminación de manganeso en humedales subsuperficiales de flujo horizontal, como Lesage (2006) que indica un incremento en la concentración de manganeso de 79 µg l<sup>-1</sup> a 169 µg l<sup>-1</sup> y de 0,71 µg l<sup>-1</sup> a 5,6 µg l<sup>-1</sup> trabajando en un humedal artificial de flujo subsuperficial horizontal en Bélgica; Vymazal *et al.* (2005) de 109 µg l<sup>-1</sup> a 402 µg l<sup>-1</sup> en el caso del manganeso para un HA-FH localizado en la República Checa, y Kröpfelová *et al.* (2009) en tres humedales artificiales de flujo subsuperficial horizontal situados en la República Checa, una eficiencia de -21,9 %, -18,8 % y -25,5 % para el manganeso, siendo las concentraciones medias de este metal en el afluente de 202 µg l<sup>-1</sup>, 85 µg l<sup>-1</sup> y 192 µg l<sup>-1</sup> respectivamente; y -55,1 %, -35,7 % y -79,1 %, con concentraciones en el afluente de 2,45 µg l<sup>-1</sup>, 1,15 µg l<sup>-1</sup>, y 1,39 µg l<sup>-1</sup>, para el arsénico.

En el caso del plomo, se han identificado diferencias significativas en su eliminación ( $p=0,017$ ; prueba U de Mann-Whitney) entre la laguna de micrófitos (BW), con un índice de eliminación medio negativo (-5,1), y la última etapa del sistema (BMS) (15,8). La eliminación de plomo en humedales artificiales de acuerdo con los datos presentados por otros autores, es generalmente



más elevada. Kröpfelová *et al.* (2009) indican para dos humedales artificiales de flujo subsuperficial horizontal una eficiencia de 78% y 84,2%, con unas concentraciones medias en el afluente de 13,2  $\mu\text{g l}^{-1}$  y 15,6  $\mu\text{g l}^{-1}$ , en cada caso, siendo ambas concentraciones superiores a la concentración media en el afluente del MJEA® de Bustillo de Cea (0,45  $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Estos resultados son muy similares a los aportados por otros autores (Nelson *et al.*, 2006) quienes muestran una eliminación de 89-83% de plomo, en un sistema de humedales artificiales de flujo superficial, habiéndose añadido al sustrato en su materia orgánica. Por el contrario, Scholes *et al.*, (1998) obtuvieron una alta eficiencia negativa para el plomo (-180%) trabajando con un humedal artificial de flujo superficial y una concentración media de entrada de 7,7  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Estos mismos autores, recogen para un humedal artificial cercano, de flujo horizontal en condiciones de caudal normales, seguido por un humedal de flujo superficial en condiciones de alto caudal, una eliminación del 65%, con una concentración media en el afluente de 2,9  $\mu\text{g l}^{-1}$ ; lo que refleja la alta disparidad de resultados recogidos en la bibliografía en cuanto a la eficiencia de un humedal artificial para eliminar plomo de la columna de agua.

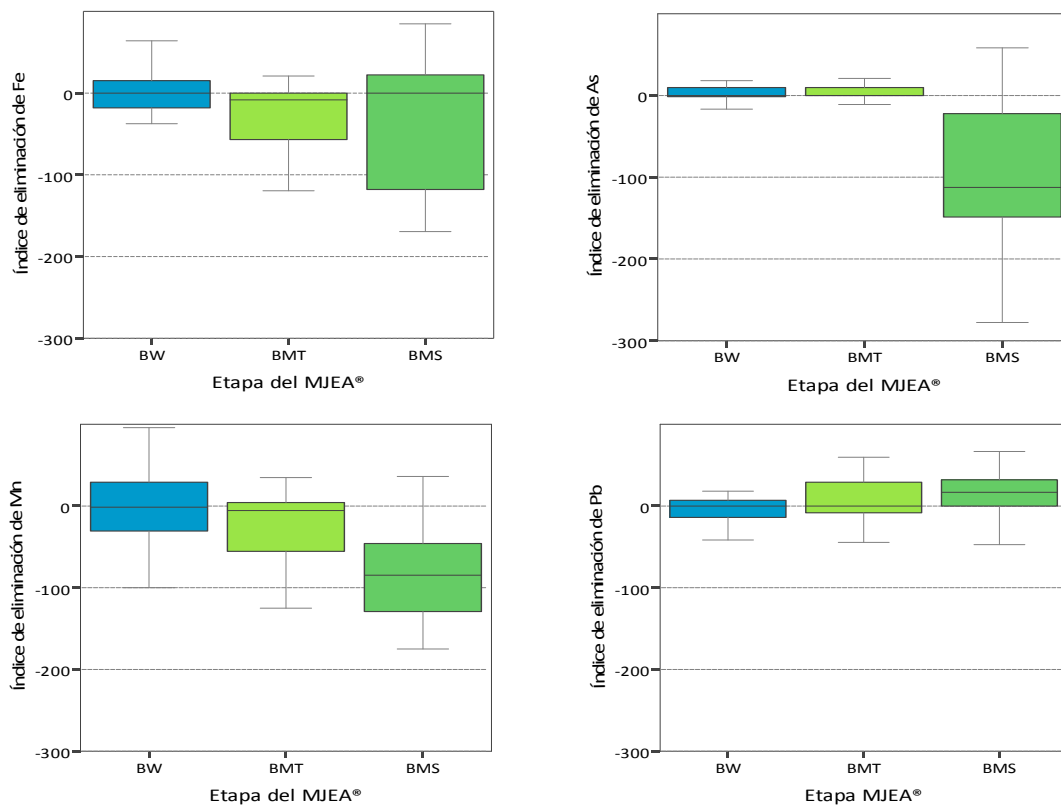


Figura 23. Diagrama de cajas de Tukey. Los gráficos representan el Índice de eliminación de hierro, arsénico, manganeso y plomo en los tres etapas del humedal artificial. Las cajas muestran los valores situados entre el primer y el tercer cuartil. La línea horizontal de la caja indica la mediana. N=46.

## 2.2. Características del Sedimento

Se han analizado las concentraciones de metales pesados en el sedimento de estos ecosistemas artificiales. El metal pesado acumulado en mayor concentración ha sido el hierro, seguido por manganeso, cobre, plomo, cromo, níquel, arsénico, boro, zinc, cadmio y mercurio (Tabla 28). Este patrón general se ha repetido en las tres etapas del MJEA® (BW, BMT y BMS).

Tabla 28. Concentración media de metales pesados en el sedimento en peso seco y su desviación estándar (DE) en la laguna de micrófitos (BW), en el humedal de flujo superficial plantado con *Typha latifolia* (BMT), y en la etapa constituida por el humedal de flujo superficial plantado con *Iris pseudacorus* seguido por el humedal de flujo horizontal plantado con *Salix atrocinerea* (BMS). Los datos se refieren al estrato orgánico (0-5 cm) y al estrato inorgánico (5-30 cm) del perfil muestreado. Número de muestras (N)= 6.

Parámetro (mg/kg, peso seco)	BW, media ± DE	BMT, media ± DE	BMS, media ± DE
As	12,88 ± 1,31	14,71 ± 2,44	15,26 ± 1,00
B	7,24 ± 3,55	7,02 ± 3,18	6,64 ± 0,65
Cd	0,50 ± 0,04	0,32 ± 0,04	0,44 ± 0,08
Cr	26,97 ± 3,44	23,56 ± 3,06	27,06 ± 2,76
Cu	59,47 ± 4,24	38,97 ± 7,63	63,93 ± 11,72
Fe	2,14E+04 ± 1,94E+03	2,25E+04 ± 2,45E+03	2,11E+04 ± 2,95E+03
Hg	0,22 ± 0,05	0,17 ± 0,02	0,21 ± 0,03
Mn	2,32E+02 ± 0,44E+02	1,78E+02 ± 9,15	1,70E+02 ± 0,40E+02
Ni	19,75 ± 1,67	19,09 ± 1,30	21,12 ± 1,36
Pb	37,23 ± 3,99	23,88 ± 3,42	31,51 ± 9,48
Zn	6,16E+02 ± 0,66E+02	4,03E+02 ± 0,40E+02	5,42E+02 ± 1,17E+02

Estos resultados se han comparado con los obtenidos en otros estudios realizados en humedales artificiales, así como con datos relativos a la acumulación de metales en humedales naturales (Tabla 29). A pesar de la dificultad para realizar comparaciones debido a la disparidad de los datos, las concentraciones de metales pesados en los sedimentos del MJEA® se encuentran en unos rangos comparables a los obtenidos por otros autores.

Tabla 29. Concentración de metales pesados (mg/kg, peso seco) en el sedimento del MJEA® en comparación con los datos presentados en otros estudios tanto en humedales artificiales como en humedal naturales. Las letras indican: HAS, humedal artificial de flujo superficial o libre; HA-FH, humedal artificial de flujo subsuperficial horizontal, HA-FV, humedal artificial de flujo subsuperficial vertical. Se incluyen también los datos obtenidos en este trabajo, siendo la laguna de micrófitos (BW) y el humedal plantado con *Typha latifolia* (BMT) humedales artificiales de flujo superficial o libre (HAS), y el humedal artificial plantado con *Iris pseudacorus* (BMS) seguido por el humedal artificial plantado con *Salix atrocinerea* un humedal artificial de flujo libre seguido por un humedal artificial de flujo subsuperficial horizontal (HAS, HA-FH).

Ecosistema	As	B	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
BW <sup>1</sup>	12,8	7,2	0,5	27,0	59,5	21,4E+3	232,6	19,8	37,2	615,5
BMT <sup>1</sup>	14,7	7,0	0,3	23,6	39,0	22,5E+3	178,8	19,1	23,9	403,9
BMS <sup>1</sup>	15,3	6,6	0,4	27,1	63,9	21,1E+3	170,5	21,1	31,5	542,6
HA-FH <sup>2,3</sup>	0,2-2,5		0,2-2,5	26-41	15-288	23E+3-35E+3	261-947	32-42	14-262	65-934
HA-FH <sup>4a</sup>			27,5		110	400	434	45,4	155	273
HA-FH <sup>4b</sup>			0,5-3,4	10-35	4-127			7-30	4-25	13-402
HA-FH <sup>5</sup>			0,3-4	38-259	17-143		21-218	28-71	73-90	52-490
HA-FH <sup>6a</sup>			1,2	17	201	14.000	165	24	98	662
HA-FV <sup>6b</sup>			0,5-0,9	29-41	52-139	19E+3-21E+3	632-1265	40-46	44-95	181-355
HAS <sup>7a</sup>	3,2	<0,006		<0,005	0,49	350,0	241	<0,03	1,0	1,4
HAS <sup>7b</sup>	32	1,39		<0,005	1,30	240,0	123	0,69	2,0	2,5
H. natural <sup>7c</sup>	1,43	<0,006		<0,005	0,90	314,0	66	0,85	1,3	3,7

Superíndices: 1.- Datos de este estudio: etapas del MJAE® después de 9 años de funcionamiento. 2,3.- Vymzal y Krása (2003) y Vymzal (2003): humedal artificial de flujo horizontal, sustrato de gravas, para el tratamiento de agua residual urbana, después de 3 años de funcionamiento (Chequia). 4. Gschlöbl y Stuble (2000): humedal artificial de flujo horizontal con sustrato de arena y grava (4a) y con sustrato de arena (4b) para el tratamiento de agua residual urbana, después de 10 años de funcionamiento (Alemania). 5.- Obarska-Pempkowiak y Klimkowska (1999): combinación de humedal artificial de flujo horizontal seguido por una serie de canales, para el tratamiento de agua residual urbana, después de 5 años de funcionamiento (Polonia). 6.- Lesage *et al.*, (2007): combinación de un humedal artificial de flujo vertical (6a) seguido por un humedal artificial de flujo vertical (6b) para el tratamiento de agua residual urbana, después de 4 años de funcionamiento (Bélgica). 7.- Mays y Edwards (2001): humedal artificial de flujo superficial para el tratamiento de agua residual industrial, después de 6-7 años de funcionamiento (7a), humedal artificial de flujo superficial para el tratamiento de drenajes ácidos de minería, después de 6-7 años de funcionamiento (7b), humedal natural empleado como control en el estudio (7c) (Estados Unidos).

Las diferentes etapas del MJEA® han acumulado metales pesados en su sedimento en diferente concentración. Así, el sedimento de la laguna de micrófitos (BW) ha presentado una concentración significativamente superior de cadmio, cobre, mercurio, plomo y zinc que el humedal artificial plantado con *Typha latifolia* (BMT), así como una mayor concentración, estadísticamente significativa, de manganeso frente a la última etapa del MJEA® (BMS), (Tabla 30). El sedimento del humedal artificial plantado con *Typha latifolia* (BMT) no ha presentado una concentración mayor, de forma estadísticamente significativa, de ninguno de los metales pesados estudiados. EL sedimento de la última etapa del MJEA® (BMS) sí ha presentado una concentración más alta, estadísticamente significativa, de arsénico que el sedimento de la laguna de micrófitos (BW), y de cobre y de níquel que el humedal plantado con *Typha latifolia* (BMT) (Tabla 30).

Tabla 30. Resultados de la prueba U de Mann-Whitney en la comparación de la concentración de metales pesados en el sedimento de las diferentes etapas del MJEA®. Se muestran los resultados para los que el nivel de significación ( $p < 0,05$ ) es estadísticamente significativo.

Estadístico	BW-BMT					BW-BMS		BMT-BMS
	Cd	Cu	Hg	Pb	Zn	Mn	As	Ni
U de Mann-Whitney	0,000	0,000	3,000	0,000	0,000	5,000	1,000	1,000
Z	-2,777	-2,777	-2,315	-2,777	-2,777	-2,006	-2,623	-2,021
Sig. asintótica	0,005	0,005	0,021	0,005	0,005	0,045	0,009	0,043

En los tres ecosistemas artificiales estudiados, la capa superior del sedimento (0-5 cm, capa orgánica) ha presentado un pH más bajo, y un potencial Red-Ox más alto, que la capa inorgánica inferior (5-30 cm) (Tabla 31), si bien no se han identificado diferencias estadísticas para estos parámetros entre los dos estratos del sedimento de cada ecosistema ( $p < 0,050$ ; prueba de U de Mann-Whitney). Este patrón se corresponde al identificado por otros autores (Knox *et al.*, 2006) en el sedimento de humedales naturales y artificiales. Generalmente, las reacciones de reducción en el sedimento de ecosistemas acuáticos hacen que el sedimento disminuya su acidez, haciéndose por tanto más básico.

El estrato orgánico (0-5 cm) ha presentado en todos los ecosistemas un mayor contenido de materia orgánica, aunque no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos estratos. Knox *et al.* (2006) sí identifican diferencias significativas en el contenido de materia orgánica entre las distintas capas de sedimento de un humedal artificial subsuperficial para el tratamiento de agua residual industrial. Sin embargo, la estratificación del sedimento presentada por estos autores difiere de la realizada en este trabajo, ya que consideran un estrato superior orgánico (0-2 cm) con un alto contenido en materia orgánica (54,4-65,5%), seguido por un estrato también orgánico (3-5 cm) pero de menor contenido en materia orgánica (11,8-16,7%), y dos estratos inorgánicos (6-10 cm, 11-20 cm) con menor contenido en materia orgánica (3 y <3%, respectivamente).

Tabla 31. Valores medios de pH, potencial Red-Ox y porcentaje de materia orgánica. Número de muestras laguna de micrófitos (BW) (N)= 6. Número de muestras humedales artificiales (BMT y BMS) (N)= 4.

Ecosistema	pH, media $\pm$ DE	Red-Ox, media $\pm$ DE	Materia orgánica (%), media $\pm$ DE
BW, 0-5 cm	6,52 $\pm$ 0,06	-195,00 $\pm$ 16,31	31,12 $\pm$ 4,46
BW, 5-30 cm	6,60 $\pm$ 0,04	-202,33 $\pm$ 15,37	21,74 $\pm$ 1,39
BMT, 0-5 cm	6,51 $\pm$ 0,06	-187,25 $\pm$ 40,28	31,42 $\pm$ 5,46
BMT, 5-30 cm	6,83 $\pm$ 0,04	-202,75 $\pm$ 46,87	27,24 $\pm$ 2,79
BMS, 0-5 cm	6,52 $\pm$ 0,08	-224,50 $\pm$ 45,96	36,39 $\pm$ 0,78
BMS, 5-30 cm	6,70 $\pm$ 0,07	-229,50 $\pm$ 50,20	33,74 $\pm$ 2,94

La distribución de los metales pesados en el sedimento presenta un patrón común en todos los ecosistemas, de forma que el estrato orgánico acumula una mayor concentración de todos los metales pesados estudiados que el estrato inorgánico (Tabla 32). El boro es la única excepción a este patrón, ya que su concentración media en la capa orgánica de la laguna de micrófitos (BW) y del humedal artificial con *Iris pseudacorus* y *Salix atrocinerea*, es inferior a su concentración en la capa inorgánica. No obstante, únicamente se han identificado diferencias significativas en la concentración de metales pesados entre las dos capas en el sedimento de la laguna de micrófitos

(BW). Así, la concentración de mercurio, manganeso y zinc ha sido significativamente superior en la capa orgánica que en la inorgánica ( $p=0,014$ ; prueba U de Mann-Whitney).

Tabla 32. Concentración media de metales pesados en el sedimento en peso seco y su desviación estándar (DE) en la laguna de micrófitos (BW), en el humedal de flujo superficial plantado con *Typha latifolia* (BMT), y en la etapa constituida por el humedal de flujo superficial plantado con *Iris pseudacorus* seguido por el humedal de flujo horizontal plantado con *Salix atrocinerea* (BMS). Los datos se refieren al estrato orgánico (0-5 cm) y al estrato inorgánico (5-30) del perfil muestreado. Número de muestras (N)= 6.

Parámetro (mg kg <sup>-1</sup> )	BW		BMT		BMS	
	0-5 cm, media ± DE	5-30 cm, media ± DE	0-5 cm, media ± DE	5-30 cm, media ± DE	0-5 cm, media ± DE	5-30 cm, media ± DE
As	13,48 ± 1,15	12,13 ± 1,19	16,48 ± 2,29	12,94 ± 0,25	15,72 ± 1,37	14,80 ± 0,56
B	5,90 ± 1,62	8,93 ± 4,82	7,70 ± 4,44	6,33 ± 2,98	6,58 ± 0,41	6,69 ± 1.046,77
Cd	0,52 ± 0,04	0,48 ± 0,01	0,36 ± 0,09	0,29 ± 0,09	0,47 ± 0,08	0,41 ± 0,09
Cr	27,76 ± 2,67	25,99 ± 4,43	26,12 ± 0,16	21,01 ± 1,36	28,76 ± 3,37	25,56 ± 0,05
Cu	61,20 ± 4,33	57,30 ± 3,42	45,54 ± 0,82	32,40 ± 1,16	73,75 ± 3,42	54,10 ± 3,80
Fe	21E+03 ± 1E+03	21E+03 ± 3E+03	24E+03 ± 4E+02	20E+03 ± 1E+03	24E+03 ± 6E+02	18E+03 ± 3E+02
Hg	0,26 ± 0,05	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,23 ± 0,08	0,19 ± 0,03
Mn	265,74 ± 10,83	191,40 ± 33,15	180,45 ± 10,11	177,21 ± 11,75	181,50 ± 48,93	160,45 ± 45,18
Ni	19,85 ± 1,68	19,62 ± 1,88	19,96 ± 0,72	18,22 ± 1,25	21,94 ± 1,20	20,29 ± 1,16
Pb	38,89 ± 3,40	35,17 ± 4,09	26,52 ± 2,11	21,24 ± 1,64	34,62 ± 12,44	28,40 ± 8,73
Zn	657,48 ± 66,60	573,53 ± 21,92	436,80 ± 10,89	370,91 ± 16,50	555,30 ± 129,54	529,85 ± 153,94

Vymazal y Krása (2003) en un humedal subsuperficial de flujo horizontal, no encuentran diferencias significativas en la acumulación de metales en función de la profundidad del sedimento, estableciendo las distintas capas estudiadas entre 0 y 15 cm, 16 y 30 cm, y 31 y 50 cm. Sin embargo, Knox *et al.* (2006), considerando la estratificación del sedimento anteriormente comentada (4 capas, dos orgánicas y dos inorgánicas) si identifican diferencias significativas, de forma que las capas orgánicas (hasta 5 cm de profundidad) acumulan mayor concentración de metales, tal y como ocurre para algunos metales pesados en este trabajo. Parece, por tanto, fundamental en el estudio de la acumulación de metales pesados en el sedimento, considerar de forma diferenciada la capa orgánica superior del mismo (hasta 5 cm) y la capa inferior inorgánica.

A lo largo de los 10 años de funcionamiento del MJEA® la capa de sedimento acumulado en los ecosistemas artificiales del MJEA® ha alcanzado en la laguna de micrófitos (BW) un espesor medio de 45 cm en la zona de entrada del agua residual y 25 cm en la zona de salida. En el humedal artificial de flujo libre plantado con *Typha latifolia* (BMT) el espesor medio de la capa de sedimento es de 20 cm. En el humedal de flujo libre plantado con *Iris pseudacorus* la capa de sedimento presenta un espesor medio de 15 cm. De acuerdo con el dimensionado de la instalación (ver Material y Métodos) la cantidad de sedimento acumulado en cada uno de estos ecosistemas artificiales es de 46 m<sup>3</sup> en la laguna de micrófitos (BW), 40 m<sup>3</sup> en el humedal con *Typha latifolia*, y 9 m<sup>3</sup> en el humedal con *Iris pseudacorus* (Tabla 32). Estos datos permiten calcular cual es la cantidad de metales pesados acumulados actualmente en el sedimento de la instalación (Tablas 33 y 34).

Tabla 33. Parámetros relacionados con los sedimentos acumulados en los ecosistemas artificiales del MJEA® de Bustillo de Cea.

Ecosistema artificial	Volumen sedimento fresco (dm <sup>3</sup> )	Volumen de sedimento fresco (dm <sup>3</sup> )/peso sedimento fresco (kg)	Peso sedimento fresco (kg)/peso sedimento seco (kg)	Peso sedimento seco (kg)
BW	46.000	0,9	0,05	2070
BMT	40.000	0,8	0,04	1280
BMS	9.000	0,8	0,04	288

Tabla 34. Cantidad en kilogramos de metales pesados acumulados en los sedimentos de los ecosistemas artificiales del MJEA® de Bustillo de Cea.

Metal pesado (kg)	BW	BMT	BMS
As	26,66	21,10	4,39
B	15,00	9,86	2,49
Cd	1,04	0,46	0,13
Cr	55,84	33,43	7,79
Cu	123,19	58,29	17,69
Fe	44.238,20	31.334,00	6.088,32
Hg	0,46	0,22	0,06
Mn	481,69	230,98	49,24
Ni	40,88	25,55	6,08
Pb	77,07	33,95	9,07
Zn	1.283,75	559,10	156,26

Los lodos procedentes de instalaciones de depuración de agua residual constituyen un subproducto cuyo empleo en la agricultura está definido en el Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario. En este Real Decreto se establece que estos sedimentos constituyen una *“fuente de materia orgánica y de elementos fertilizantes para su utilización en la actividad agraria, que resulta ser la vía más adecuada para su eliminación, al permitir su incorporación a los ciclos naturales de la materia y la energía”*. El Anexo I B de este Real Decreto recoge el valor límite de concentración de metales pesados en los lodos destinados a su utilización agraria. Estos valores no son superados en ningún caso por los obtenidos para los sedimentos del MJEA® que por tanto, podrían ser utilizados como abono en la agricultura una vez deshidratados y mineralizados (Tabla 35).

Tabla 35. Valores límite de metales pesados en lodos procedentes de instalaciones de depuración de agua residual de acuerdo con el Anexo I B del Real Decreto 1310/1990, y concentraciones medias de estos metales pesados en los sedimentos del MJEA®. Datos en mg/kg de materia seca.

Metal	Valor límite. Suelos con pH menor de 7	Valor límite. Suelos con pH mayor de 7	Concentración media BW	Concentración media BMT	Concentración media BMS
Cd	20	40	0,5	0,3	0,4
Cr	1000	1500	26,9	23,6	21,2
Cu	1000	1750	59,3	39,0	64,0
Hg	16	25	0,2	0,2	0,2
Ni	300	400	19,7	19,1	20,3
Pb	750	1200	37,0	23,9	28,4
Zn	2500	4000	615,5	403,9	542,6

### 2.3. Características de la Vegetación

Los resultados de la concentración de metales pesados acumulados en la biomasa aérea y subterránea de las tres especies vegetales del MJEA® se presentan en las siguientes tablas (Tabla 36 y 37).

Tabla 36. Concentración media en peso seco y desviación estándar (DE) de los metales pesados estudiados en la parte aérea (tallo, ramas y hojas) de *Typha latifolia*, *Iris pseudacorus* y *Salix atrocinerea*. (N)= 3. Límite de detección arsénico 0,300 mg kg<sup>-1</sup>, límite de detección cadmio 0,013 mg kg<sup>-1</sup>, límite de detección mercurio 0,05 mg kg<sup>-1</sup>.

Metal (mg kg <sup>-1</sup> )	Parte aérea <i>T. latifolia</i> , media ± DE	Parte aérea <i>I. pseudacorus</i> , media ± DE	Parte aérea <i>S. atrocinerea</i> , media ± DE
As	<0,30	0,89 ± 0,01	<0,30
B	16,29 ± 2,87	10,44 ± 0,23	36,00 ± 0,60
Cd	<0,013	<0,013	0,08 ± 0,01
Cr	1,70 ± 0,50	0,92 ± 0,02	0,40 ± 0,03
Cu	1,96 ± 0,87	4,50 ± 0,08	3,68 ± 0,30
Fe	186,65 ± 24,11	1,24E+03 ± 0,90	206,65 ± 8,70
Hg	<0,05	<0,05	<0,05
Mn	154,10 ± 29 98	82,92 ± 1,02	286,71 ± 5,81
Ni	1,07 ± 0,05	1,51 ± 0,02	0,97 ± 0,02
Pb	0,46 ± 0,27	0,94 ± 0,05	0,25 ± 0,02
Zn	2,90 ± 0,60	29,74 ± 1,60	19,26 ± 0,86

Tabla 37. Concentración media en peso seco y desviación estándar (DE) de los metales pesados estudiados en la parte subterránea (raíces y rizomas) de *Typha latifolia*, *Iris pseudacorus* y *Salix atrocinerea*. (N)= 3. Límite de detección arsénico 0,300 mg kg<sup>-1</sup>, límite de detección cadmio 0,013 mg kg<sup>-1</sup>, límite de detección mercurio 0,05 mg kg<sup>-1</sup>.

Metal (mg kg <sup>-1</sup> )	Parte subterránea <i>T. latifolia</i> , media ± DE	Parte subterránea <i>I. pseudacorus</i> , media ± DE	Parte subterránea <i>S. atrocinerea</i> , media ± DE
As	3,72 ± 1,80	3,04 ± 0,15	4,80 ± 6,88
B	7,59 ± 2,43	16,03 ± 1,13	20,09 ± 0,99
Cd	0,05 ± 0,02	<0,013	0,20 ± 0,04
Cr	1,93 ± 0,30	1,24 ± 0,05	3,61 ± 0,06
Cu	4,72 ± 1,45	4,07 ± 0,04	28,49 ± 0,18
Fe	4,56E+03 ± 0,68E+03	1,10E+03 ± 9,19	4,52E+03 ± 0,11E+03
Hg	<0,05	<0,05	0,11 ± 0,01
Mn	50,57 ± 0,60	34,19 ± 0,75	307,90 ± 8,06
Ni	1,94 ± 0,45	1,59 ± 0,02	7,61 ± 0,11
Pb	3,95 ± 0,52	1,43 ± 0,03	4,17 ± 0,02
Zn	63,30 ± 4,19	39,31 ± 0,77	184,50 ± 4,90

Los metales pesados que mayores concentraciones han presentado en la parte aérea de *Typha latifolia* e *Iris pseudacorus* han sido hierro y manganeso, seguidos por boro en *Typha latifolia* y zinc en *Iris pseudacorus*. En *Salix atrocinerea* la concentración más alta en la parte aérea ha sido la del manganeso, seguido por hierro y el boro.

En cuanto a la parte subterránea, el hierro ha sido en las tres especies vegetales el metal pesado con una mayor concentración, seguido por zinc y plomo en *Typha latifolia*, zinc y manganeso en *Iris pseudacorus*, y manganeso y zinc en *Salix atrocinerea*.

La acumulación de mercurio en los tejidos vegetales fue inferior al límite de detección ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) en todas las muestras, con la excepción de las raíces de los sauces, para los cuales se determinó una concentración media de  $108,19 \pm 0,90 \mu\text{g/kg}$  biomasa seca.

En la siguiente tabla (Tabla 38) se muestran los ratios entre parte aérea/parte subterránea para los distintos metales pesados evaluados. Los resultados muestran un ratio mayor de uno, mayor concentración en la parte aérea que en la subterránea, de boro, cobre, hierro y manganeso en alguna especie vegetal, todos ellos son micronutrientes esenciales en el desarrollo vegetal. En otros casos, se ha encontrado una mayor concentración de metales en la parte subterránea, situación descrita por Gries y Garbe (1989) con *Phragmites australis*, Vymazal y Krása (2003) y Vymazal (2003) con *Phalaris arundinacea*, y Karspicak *et al.*, (2001) para *Anemopsis californica*, *Scirpus spp.*, y *Typha domingensis*. De acuerdo con Weis y Weis (2004) la acumulación de metales en la biomasa subterránea supone una ventaja ambiental frente a la acumulación en la biomasa aérea, ya que su biodisponibilidad es menor.

Tabla 38. Ratios de acumulación, parte aérea/parte subterránea, de metales pesados en la biomasa de *Typha latifolia*, *Iris pseudacorus* y *Salix atrocinerea*.

Parámetro	Ratio parte aérea <i>Typha latifolia</i> /parte subterránea	Ratio parte aérea <i>Iris pseudacorus</i> /parte subterránea	Ratio parte aérea <i>Salix atrocinerea</i> /parte subterránea
As	0,08	0,29	0,06
B	2,15	0,65	1,79
Cd	0,20	0,33	0,40
Cr	0,88	0,74	0,11
Cu	0,42	1,11	0,13
Fe	0,04	1,12	0,05
Mn	3,05	2,43	0,93
Ni	0,55	0,95	0,13
Pb	0,01	0,66	0,06
Zn	0,05	0,76	0,10

Las labores de mantenimiento del sistema incluyen la poda anual de la vegetación, preferentemente de *Typha latifolia*, de forma que a comienzos de invierno se realiza una labor de poda y recogida de la parte aérea de este macrófito. Las otras especies vegetales (*Iris pseudacorus* y *Salix atrocinerea*), con un crecimiento vegetativo muy inferior al de *Typha latifolia*, se gestionan mediante una poda de baja intensidad de aclareo y retirada de hojas y ramas secas. Teniendo en consideración que la biomasa aérea en peso fresco de esta especie en el humedal ha sido de  $1,54 \text{ g (cm}^2\text{)}^{-1}$ , la biomasa en peso seco de  $0,48 \text{ g (cm}^2\text{)}^{-1}$ , y la cobertura de *Typha latifolia* en el humedal del 70% de la superficie del mismo, la poda y recogida de esta especie ha permitido la eliminación del sistema a lo largo de los 9 años de funcionamiento en una cantidad que oscila entre menos de 1 gr de mercurio o cadmio y 12,6 kg de hierro (Tabla 39).



Tabla 39. Cantidad estimada de metales pesados eliminados del sistema de tratamiento mediante la poda y recogida de *Typha latifolia* a lo largo de los 9 años de funcionamiento del sistema.

Metal pesado (kg)	Poda y recogida <i>Typha latifolia</i>
As	0,02
B	1,1
Cd	0,001
Cr	0,11
Cu	0,13
Fe	12,6
Hg	0,001
Mn	10,40
Ni	0,007
Pb	0,03
Zn	0,20

#### 2.4. Evaluación del MJEA® como sistema para la eliminación de metales pesados del agua residual

La planta piloto para el tratamiento de agua residual de la localidad de Bustillo de Cea constituye en la actualidad, después de 9 años de funcionamiento, un sistema de depuración natural maduro. La mayor parte de los estudios sobre la eliminación de metales del agua en estos ecosistemas artificiales, están realizados en humedales con un corto período de tiempo de funcionamiento. En este trabajo, la madurez del sistema permite evaluar su estabilidad a largo plazo en relación a su capacidad para eliminar metales pesados de la fracción líquida. Las concentraciones de metales pesados en el afluente no son elevadas, tal y como cabría esperar encontrar en el agua residual de una pequeña localidad rural de 450 habitantes-equivalentes.

El sedimento acumulado en las distintas etapas del sistema, y particularmente la capa orgánica superior del mismo, permite retirar del agua residual y acumular una fracción notable de metales pesados seguidos, funcionando así como un sumidero o depósito de metales.

La poda y recogida de la biomasa aérea de *Typha latifolia*, labor realizada anualmente, no resulta ser un método eficaz para la eliminación de metales del sistema, ya que la concentración de los mismos en *Typha latifolia* es relativamente baja.

Los datos referentes a la concentración de metales en el agua muestran algunas particularidades. La laguna de micrófitos, con un pH medio más básico que el resto de los ecosistemas (pH 7,30 frente a pH 6,57 y 5,96 de los dos humedales artificiales) elimina del agua hierro y manganeso, frente al comportamiento de los dos humedales, para los cuales el sedimento se comportaría como una fuente de estos dos elementos. La precipitación de hidróxidos de hierro y manganeso podría favorecer la eliminación de estos metales de la columna de agua en la laguna de micrófitos, debido al pH más básico así como a unas condiciones menos reductoras, particularmente en el caso de la última etapa del sistema (humedal artificial subsuperficial plantado con sauces). Es en esta última etapa del MJEA® donde tiene lugar un aumento mayor de la concentración de metales en disolución fundamentalmente de manganeso, con un Índice de eliminación de -80, siendo la solubilización de estos metales en sedimentos anaerobios un fenómeno frecuente (Goulet y Pick, 2001; Nelson *et al.*, 2006). La precipitación de hidróxidos de hierro y manganeso favorece la co-precipitación de otros

metales, de forma que, bajo condiciones anaerobias, los metales que pudieran haber co-precipitado (níquel, zinc y arsénico), pasarían igualmente de nuevo a disolución.

La última etapa del sistema, constituida por un humedal artificial de flujo libre y un humedal artificial subsuperficial, constituye la etapa más reductora del conjunto. La formación de sulfuros metálicos insolubles, en un ambiente anaerobio, es un importante mecanismo de eliminación de metales de la columna de agua. La formación de sulfuros metálicos podría ser el mecanismo dominante, que permite que en esta última etapa del MJEA® se eliminen boro, cadmio, cromo, cobre, plomo y zinc. Mientras que estas condiciones reductoras, junto a un pH del agua ácido, no favorecerían la formación de hidróxidos de hierro y manganeso. Finalmente, en el caso del arsénico, es frecuente que en condiciones reductoras, pase a disolución (Hallberg y Johnson, 2005).

### 3. Análisis de las Comunidades de Bacterias en Humedales Artificiales

La importancia e influencia de la composición y estructura de las comunidades de bacterias presentes en un humedal artificial en los procesos de depuración del agua residual es citada por numerosos autores (Larsen y Greenway, 2004; Sleytr *et al.*, 2009; Iasur-Kruh *et al.*, 2009). En gran parte de los trabajos se recurre a evidencias circunstanciales para corroborar este aspecto, siendo escasos los estudios en los que se establece una relación directa entre la composición y estructura de las comunidades de bacterias y su implicación en los procesos de depuración del agua residual (Faulwetter *et al.*, 2009).

Se presentan a continuación los resultados del estudio de las comunidades de bacterias presentes en la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial así como en la planta piloto a escala real para el tratamiento de agua residual urbana.

Para el análisis de las comunidades de bacterias en las dos plantas de depuración estudiadas se ha realizado la extracción directa de DNA genómico de las 12 muestras procedentes de la planta piloto a pequeña escala y 8 muestras de la planta piloto a escala real. Se ha realizado un total de 112 PCRs, de cada PCR se han comprobado al menos 15 clones mediante la técnica de análisis rápido de plásmidos hasta completar 50 clones de cada muestra evitando que más de 10 clones procedan de la misma PCR (Figuras 24 y 25).

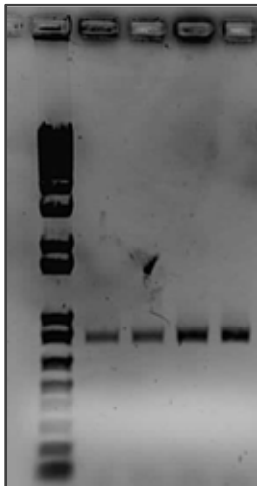


Figura 24. Productos de PCR del gen codificante para el rRNA 16S. Primera línea marcador sintético 1kb Plus DNA Ladder, el resto DNA de muestras procedentes de los tratamientos plantados con *Typha latifolia* en la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial (MAFT, MGFT, MAST, MGST).

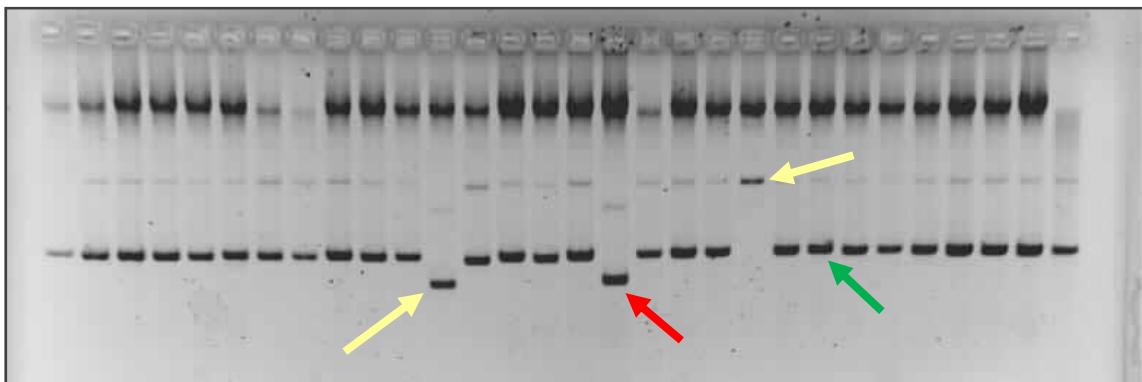


Figura 25. Análisis rápido de plásmidos. La flecha verde indica el tamaño de los plásmidos con el fragmento del DNA del gen rRNA 16S. La flecha roja indica el control negativo (plásmidos sin inserto). Las flechas amarillas indican plásmidos rechazados.

Las tablas siguientes recogen el número de secuencias analizadas en cada microecosistema (Tablas 40 y 41). Con las 50 secuencias de cada muestra puede realizarse una estima de la composición y diversidad de la comunidad de bacterias establecida en cada uno de los distintos ambientes estudiados.

Tabla 40. Número de secuencias obtenidas para cada uno de los microecosistemas estudiados en la planta piloto a pequeña escala. Se incluyen también el número de secuencias procedentes de cloroplastos o procesos de recombinación durante la amplificación. Consultar tablas 6 y 8 para mayor información.

**Planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial**

Microecosistema	Nº secuencias de bacterias	Nº secuencias de cloroplasto o de recombinantes	Total secuencias obtenidas
MAFC	44	6	50
MGFC	44	6	50
MASC	50	-	50
MGSC	50	-	50
MAFT	49	1	50
MGFT	43	7	50
MAST	28	22	50
MGST	37	13	50
MAFP	51	1	52
MGFP	49	1	50
MASP	50	1	51
MGSP	48	2	50

Tabla 41. Número de secuencias obtenidas para cada uno de los ambientes estudiados en la planta piloto a escala real. Se incluyen también el número de secuencias procedentes de cloroplastos o procesos de recombinación durante la amplificación. Las siglas indican: BMTS, muestra de la rizosfera de *Typha latifolia* en verano; BMTW, muestra de la rizosfera de *Typha latifolia* en invierno; BMSS, muestra de la rizosfera de *Salix atrocinera* en verano; BMSW, muestra de la rizosfera de *Salix atrocinera* en invierno; BSI, muestra de sedimento en la zona de entrada de agua de la laguna de micrófitos; BSO, muestra de sedimento en la zona de salida de agua de la laguna de micrófitos; BWL, muestra de agua de la laguna de micrófitos; BWT, muestra de agua del humedal artificial plantado con *Typha latifolia*.

**Planta piloto a escala real para el tratamiento de agua residual urbana**

Microecosistema	Nº secuencias de bacterias	Nº secuencias de cloroplasto o de recombinantes	Total secuencias obtenidas
BMTS	50	-	50
BMTW	50	-	50
BMSS	50	-	50
BMSW	50	-	50
BSI	47	3	50
BSO	50	-	50
BWL	42	11	53
BWT	36	27	63

Algunos de los clones obtenidos se han eliminado ya que mediante los análisis comparativos de las secuencias con las bases de datos disponibles (Greengenes, GeneBank y Ribosomal Database Project) así como mediante el análisis filogenético, se ha visto que algunas no pertenecían al gen codificante para el rRNA 16S de bacterias, sino que se han identificado como secuencias de cloroplastos, procedentes tanto de algas, como de protozoos (género *Euglena*) (Figura 26). En los casos en los que la comparación con la base de datos del RDP y del Greengenes no ofrecía el mismo resultado, de forma que la secuencia era clasificada como cianobacteria o cloroplasto con una baja similitud, el análisis filogenético ha permitido discernir finalmente la afiliación de dicha secuencia.

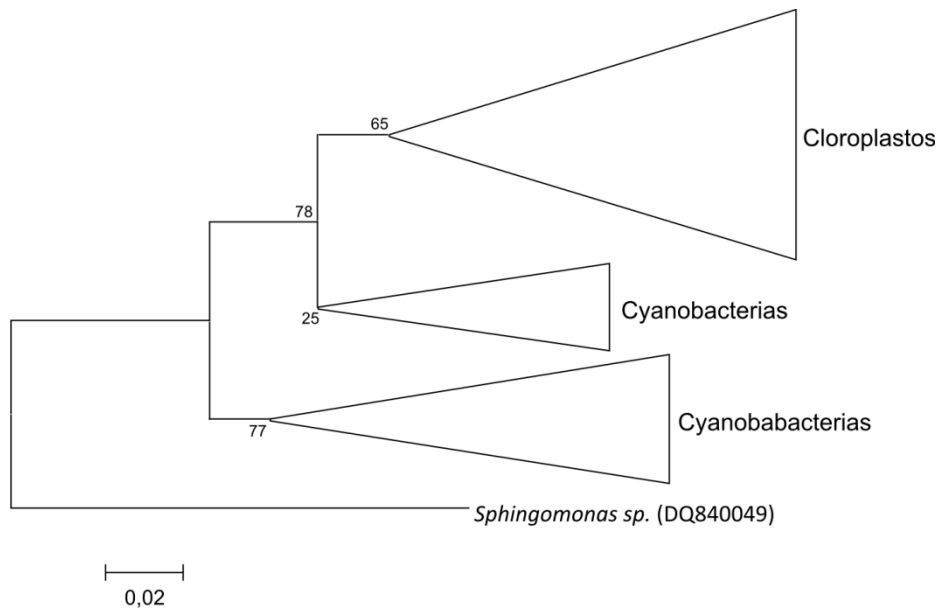


Figura 26. Árbol filogenético de las secuencias identificadas como cloroplastos y cianobacterias procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. El tamaño de los triángulos es proporcional al número de taxones comprendidos en la rama. La raíz del árbol se ha situado en *Sphingomonas sp.* incluida como outgroup.

Por otro lado, se ha preferido “perder” secuencias y ganar en fiabilidad de las mismas. Mediante el análisis comparativo de cada una de las secuencias estudiadas con la base de datos GenBank y utilizando el algoritmo BLASTN se han eliminado de los análisis posteriores las secuencias identificadas o sospechosas de ser quimeras, siendo las quimeras productos de PCR incompletos que pueden hibridar como oligonucleótidos (primers) en secuencias heterólogas (Acinas, 2007), formando productos de PCR recombinantes. La siguiente figura (Figura 27) muestra como ejemplo el resultado de la búsqueda con el algoritmo BLASTN de una de las secuencias identificada como quimera.

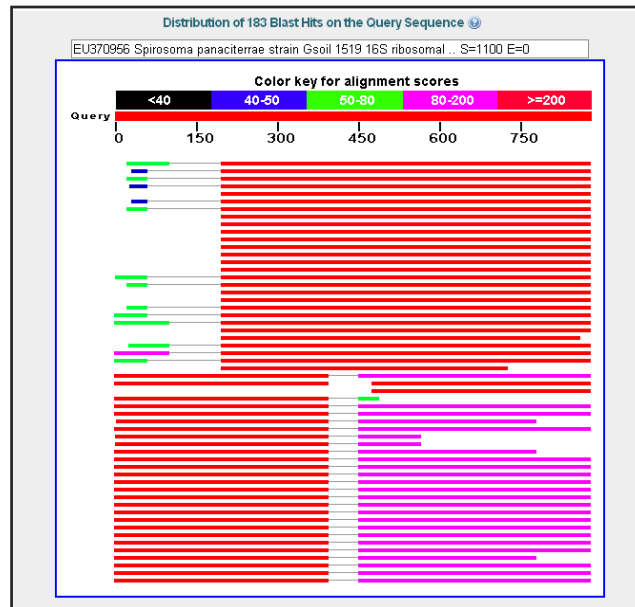


Figura 27. Ejemplo de secuencia identificada como quimera o recombinante. Secuencia obtenida del análisis de la comunidad de bacterias del sustrato procedente del tratamiento con arlita, flujo subsuperficial y sin vegetación de la planta piloto a pequeña escala (MASC307F). La imagen muestra una captura de pantalla de la búsqueda BLASTN.

### 3.1. Composición de las comunidades de bacterias

De acuerdo a lo desarrollado en el capítulo de Material y Métodos, la composición de las comunidades de bacterias de los microecosistemas se ha estudiado mediante tres metodologías: 1.- Clasificación de las secuencias mediante la herramienta “Classifier” del Ribosomal Database Project (RDP). 2.- Clasificación mediante la herramienta “Classify a batch of sequences against multiple taxonomies” de la aplicación Greengenes, nomenclatura taxonómica NCBI. 3.- Clasificación filogenética propia.

Los resultados a nivel de filo, obtenidos mediante estas tres metodologías, se muestran en las siguientes figuras (Figuras 28, 29, 30, 31 y 32) para todos los ambientes estudiados, tanto de la planta piloto a pequeña escala como de la planta piloto a escala real. La categoría “Otros filos” agrupa a todas las secuencias sin clasificar en un filo, esta categoría “Otros filos” con la clasificación realizada a partir del análisis filogenético puede desglosarse a su vez en diferentes categorías, no ocurre así con las clasificaciones realizadas mediante comparación con las bases de datos, ya que éstas engloban en una misma agrupación todas las secuencias sin otra afiliación de acuerdo con los umbrales de similitud establecidos.

Las tres metodologías muestran como en todos los ambientes la comunidad de bacterias está dominada, en cuanto a abundancia, por bacterias del filo Proteobacteria (con la excepción de los tratamientos control con flujo superficial de la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial, en los que el filo Cyanobacteria es dominante). Este resultado coincide por lo señalado en la revisión de Truu *et al.* (2009), en la que se indica, que las comunidades de bacterias, en diferentes tipos de humedales artificiales, están dominadas en cuanto a abundancia por individuos afiliados al filo Proteobacteria. Como segundo filo con un mayor número de bacterias, Truu *et al.*

(2009) señalan el filo Bacteroidetes, seguido por los filios Actinobacteria y Firmicutes. En esta ocasión, los resultados del presente trabajo, indican que en los ambientes del sistema a escala real para el tratamiento de agua residual urbana, el segundo filo con un mayor número de bacterias es el filo Bacteroidetes. Sin embargo, en el sistema a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial no se identifica un segundo grupo dominante después del filo Proteobacteria.

La construcción de un árbol filogenético con todas las secuencias estudiadas así como las obtenidas en las bases de datos ha permitido identificar las bacterias presentes en los distintos microecosistemas estudiados. El análisis pormenorizado de cada uno de estos filios ha permitido estudiar la composición de la comunidad de bacterias de cada ambiente, en muchas ocasiones incluso a nivel de familia y/o género.

A diferencia de las otras metodologías utilizadas en este trabajo para el estudio de la composición de la comunidad de bacterias de un ambiente, el análisis filogenético permite identificar la afiliación de cada taxón aunque se desconozca el nombre del grupo en el que se incluye. De esta forma, puede desarrollarse un análisis más preciso de la comunidad al diferenciar taxones diferentes, evitándose agrupar estas secuencias, cuya afiliación de acuerdo con las bases de datos, y particularmente con la base de datos Greengenes, sólo llega a establecerse a un nivel relativamente alto (filio-clase), en diferentes grupos establecidos en base a sus distancias genéticas.

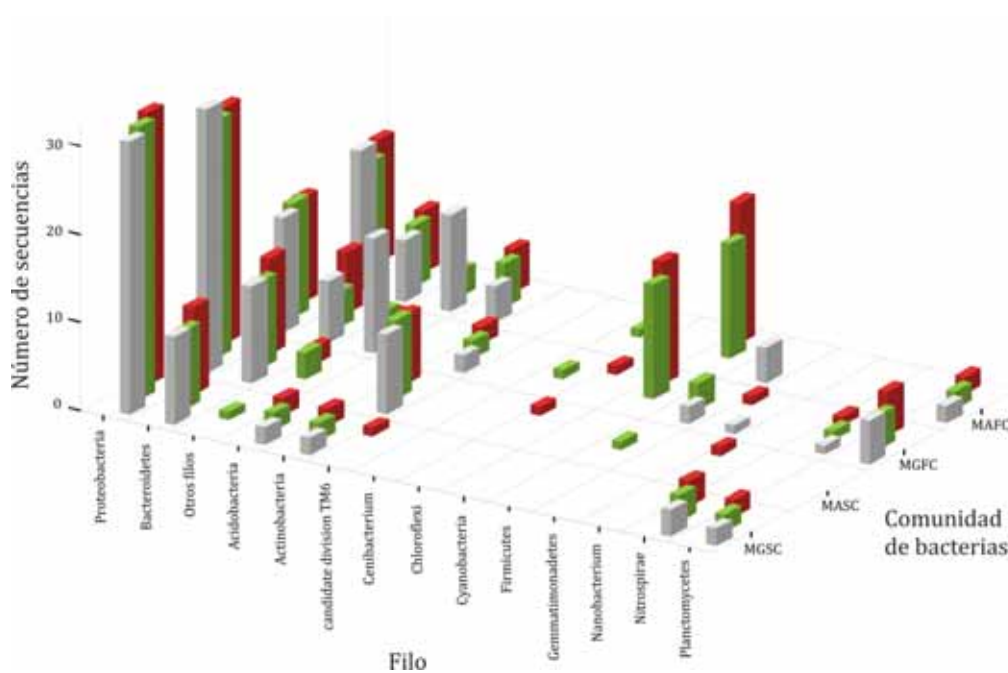


Figura 28. Número de secuencias de las comunidades de bacterias presentes en el sustrato de los tratamientos control sin vegetación de la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial y filo en el que se clasifican de acuerdo con las bases de datos RDP (gris), GreenGenes (verde) y la clasificación filogenética realizada utilizando secuencias del GenBank como referencia (rojo).

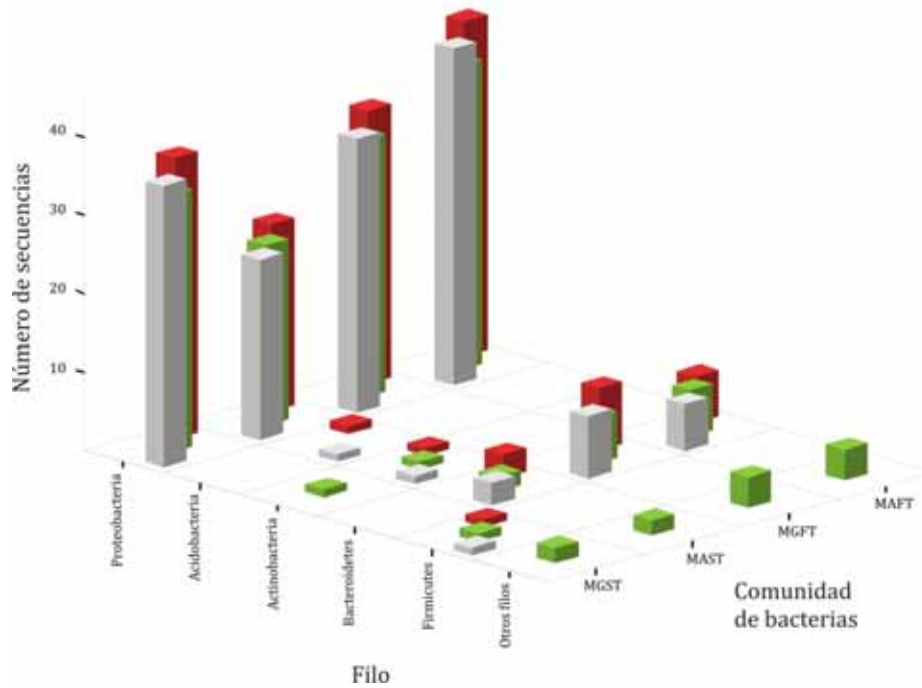


Figura 29. Número de secuencias de las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de *Typha latifolia* en los tratamientos plantados con esta especie vegetal en la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial y filo en el que se clasifican de acuerdo con las bases de datos RDP (gris), GreenGenes (verde) y clasificación filogenética (en rojo).

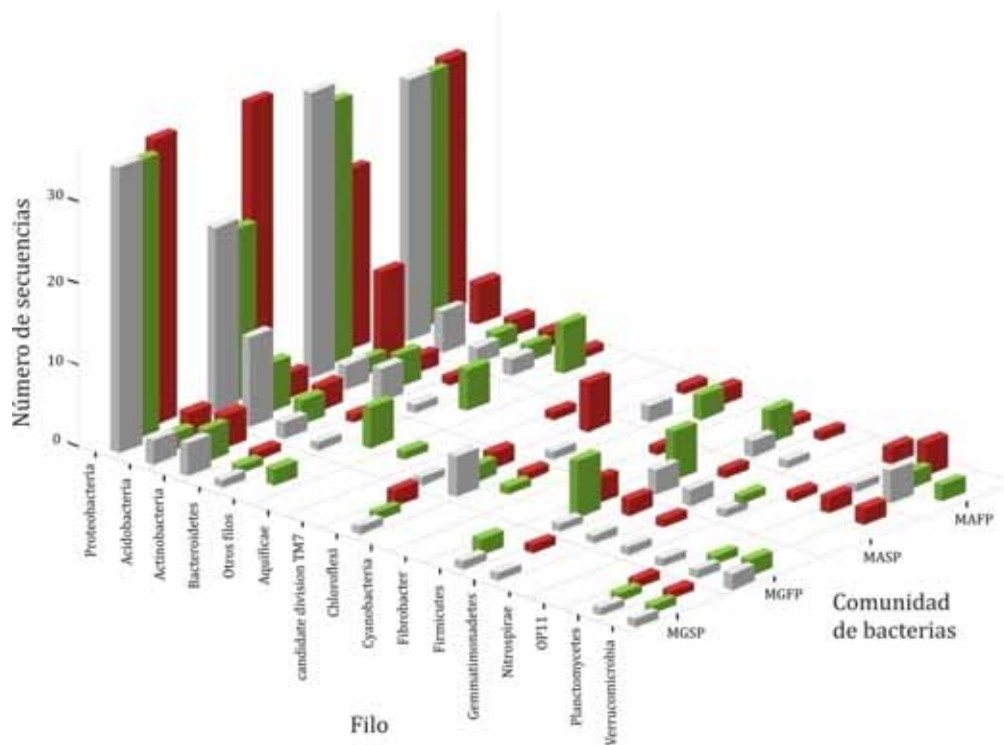


Figura 30. Número de secuencias de las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de *Phragmites australis* en la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial y filo en el que se clasifican de acuerdo con las bases de datos RDP (gris), GreenGenes (verde) y clasificación filogenética (rojo).



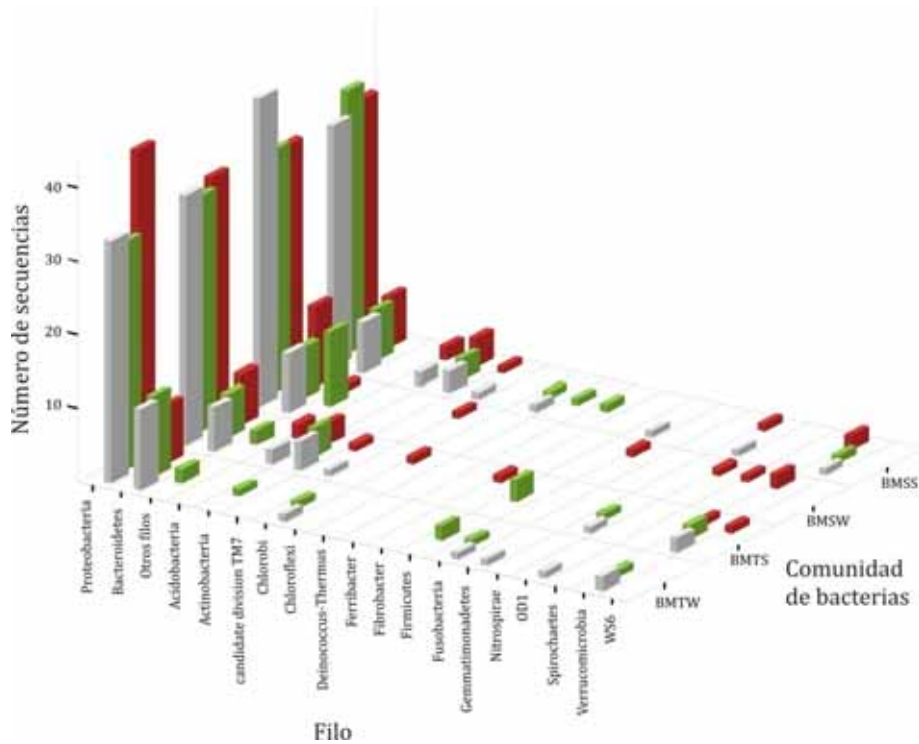


Figura 31. Número de secuencias de las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de *Typha latifolia* (BMTS y BMTW) y *Salix atrocinerea* (BMSS y BMSW) de la planta piloto para el tratamiento de agua residual urbana y filo en el que se clasifican de acuerdo con las bases de datos RDP (gris), GreenGenes (verde) y clasificación filogenética (rojo).

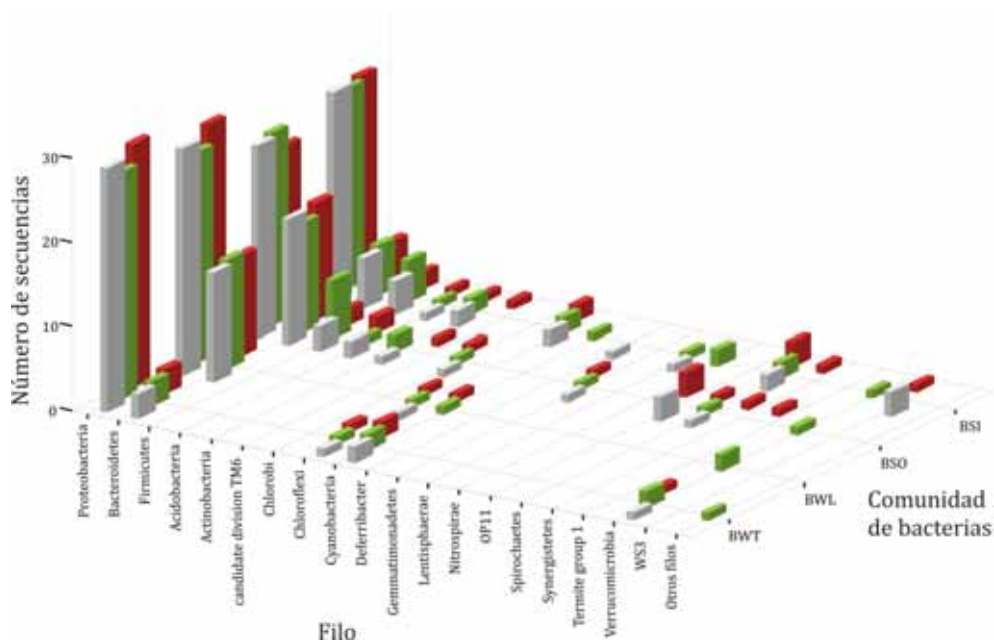


Figura 32. Número de secuencias de las comunidades de bacterias del sedimento de la laguna de micrófitos (BSI y BSO) y comunidades de bacterias en el agua de la laguna de micrófitos (BWL) y del humedal plantado con *Typha latifolia* (BWT) de la planta piloto para el tratamiento de agua residual urbana y filo en el que se clasifican de acuerdo con las bases de datos RDP (gris), GreenGenes (verde) y clasificación filogenética (rojo).

A partir de los datos obtenidos con las tres metodologías de clasificación (análisis comparativo con las bases de datos Greengenes y RDP y clasificación elaborada a partir del análisis filogenético de las secuencias) se ha calculado la riqueza en filios y en órdenes de cada comunidad de bacterias. Los resultados muestran que entre las tres metodologías seguidas existen algunas discrepancias, más acusadas a nivel de orden (Figura 33).

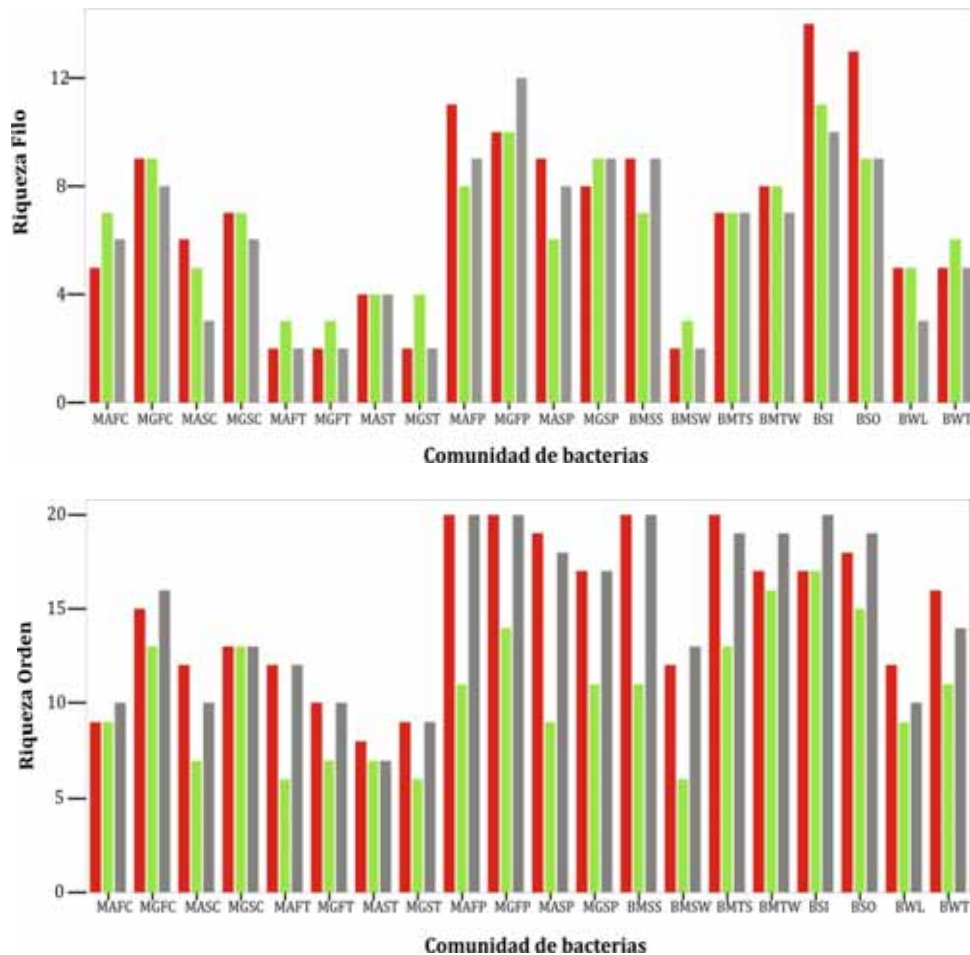


Figura 33. Riqueza definida a nivel de filo de las comunidades de bacterias estudiadas de acuerdo con los resultados obtenidos mediante en análisis comparativo con las bases de datos RDP (gris), y GreenGenes (verde) y la clasificación filogenética realizada (rojo).

A nivel de filo, la clasificación obtenida a partir del análisis comparativo de las secuencias con la base de datos RDP ha ofrecido en general valores de riqueza inferiores que las clasificaciones obtenidas mediante el análisis comparativo con la base de datos Greengenes y la construcción de árboles filogenéticos, con una única excepción en el caso de la comunidad de bacterias del tratamiento con grava, flujo superficial y plantado con *Phragmites australis* de la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial (MGFP) para el cual la riqueza más alta a nivel de filo se muestra al utilizar los datos aportados por la base de datos RDP. A este nivel de filo, las diferencias más acusadas se han identificado para las comunidades de bacterias asociadas al sedimento de la laguna de micrófitos en el MJEA® (BSI y BSO), para las que la clasificación filogenética elaborada ha mostrado los valores más altos de riqueza, debido a que esta clasificación ha permitido discriminar en diferentes grupos las secuencias sin identificar (6 secuencias en BSI y 3 secuencias en BSO),

mientras que las bases de datos RDP y Greengenes agrupan estas secuencias juntas en el grupo de no clasificados.

Cuando el análisis de riqueza se ha realiza a nivel de orden, los valores de riqueza más altos han sido en general los calculados a partir de los datos obtenidos con la metodología de clasificación mediante análisis comparativo con la base de datos RDP junto con los obtenidos a partir de la metodología de clasificación filogenética, mientras que la clasificación mediante análisis comparativo con la base de datos Greengenes, ha presentado los menores valores de riqueza para todas las comunidades de bacterias estudiadas, probablemente debido a que esta base de datos agrupa todas las secuencias que no puede clasificar en un único grupo dentro de cada clase.

### 3.1.1. Descripción de los taxones identificados en las comunidades de bacterias estudiadas

Se presentan a continuación todos los árboles filogenéticos construidos con el total de secuencias analizadas y las secuencias más similares descargadas de la base de datos GreenGenes. La iconografía utilizada para indicar a que comunidad de bacterias pertenece cada una de las secuencias se muestra en la siguiente (Figura 34).

#### Planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial

■ MAFC	■ MAFT	■ MAFP
■ MASC	■ MAST	■ MASP
■ MGFC	■ MGFT	■ MGFP
■ MGSC	■ MGST	■ MGSP

#### Planta piloto a escala real para el tratamiento de agua residual urbana

▲ BWL	▲ BMTS
▲ BWT	▲ BMSS
▲ BSI	▲ BMTW
▲ BSO	▲ BMSW

Figura 34. Iconografía utilizada en la elaboración de los árboles filogenéticos. Las secuencias correspondientes a las comunidades de bacterias de la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial se resaltan con un cuadrado, las procedentes de la planta piloto a escala real para el tratamiento de agua residual urbana con un triángulo. Consultar Tabla 6 y Figura 6 para más información.

## Filo Proteobacteria

El filo Proteobacteria alberga la mayor parte de las bacterias identificadas (más del 40% de los géneros aislados y descritos). Este filo de bacterias gram negativas se subdivide en cinco clases: Alfa, Beta, Gamma, Delta y Epsilon (Figura 35). Se caracteriza por una elevada diversidad metabólica, que va desde la fotoautotrofia y la quimiolitotrofia hasta la fotoheterotrofia y la heterotrofia estricta. Así mismo, se incluyen bacterias estrictamente aerobias, estrictamente anaerobias, aerobias facultativas y microaerobias (Kersters *et al.*, 2006).

La importancia ecológica de este filo es muy destacada ya que dentro del mismo se incluyen varios grupos de bacterias que desarrollan un papel fundamental en los ciclos del carbón, del nitrógeno y del azufre.

En todos los ambientes estudiados (sistema piloto para el tratamiento de agua residual industrial y sistema piloto para el tratamiento de agua residual urbana) el filo Proteobacteria domina en abundancia la comunidad de bacterias.

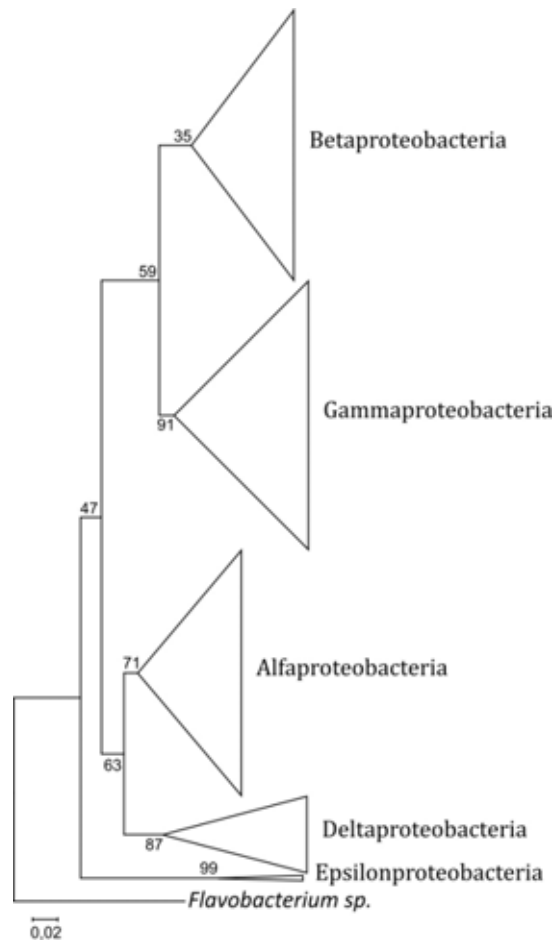


Figura 35. Árbol filogenético esquemático (comprimido) de las secuencias identificadas como proteobacterias procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. El tamaño de los triángulos es proporcional al número de taxones comprendidos en la rama. La raíz del árbol se ha situado en *Flavobacterium sp.* incluida como outgroup.

### Clase Alfaproteobacteria

Alfaproteobacteria, al igual que todo el filo Proteobacteria, se caracteriza por su alta diversidad metabólica. De acuerdo con los resultados de este trabajo, bacterias afiliadas a la clase Alfaproteobacteria dominan en cuanto a su abundancia las comunidades de bacterias de los tratamientos con *Phragmites australis* y sustrato de arlita, de la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial (MAFP y MASP).

El análisis filogenético indica que las secuencias estudiadas se agrupan en siete órdenes diferentes (Figura 36). Entre estos órdenes, se encuentra Rhizobiales, dentro del que se incluyen bacterias quimiolitótrofas nitrificantes como *Nitrobacter*, capaz de oxidar el nitrito a nitrato por lo que desempeña un papel fundamental en el ciclo del nitrógeno en los humedales artificiales, habiéndose identificado esta bacteria en tratamientos de la planta piloto para la depuración de agua residual industrial (Figuras 36 y 37). En este mismo orden y principalmente en la misma instalación, se han identificado bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, y *Mesorhizobium* capaces de fijar nitrógeno atmosférico en condiciones de asociación mutualista con plantas.

Se han identificado también bacterias fotoheterótrofas como las bacterias rojas no del azufre, géneros *Rhodospirillum*, orden Rhodospirillales, y *Rhodobacter* del orden Rhodobacterales; así como bacterias quimiorganótrofas, por ejemplo familia Caulobacteraceae, orden Caulobacterales (Figuras 36 y 38) y familia Sphingomohadaceae, orden Sphingomonadales (Figuras 36 y 40), con una amplia representación en los distintos ambientes estudiados, particularmente del sistema de tratamiento para agua residual industrial.

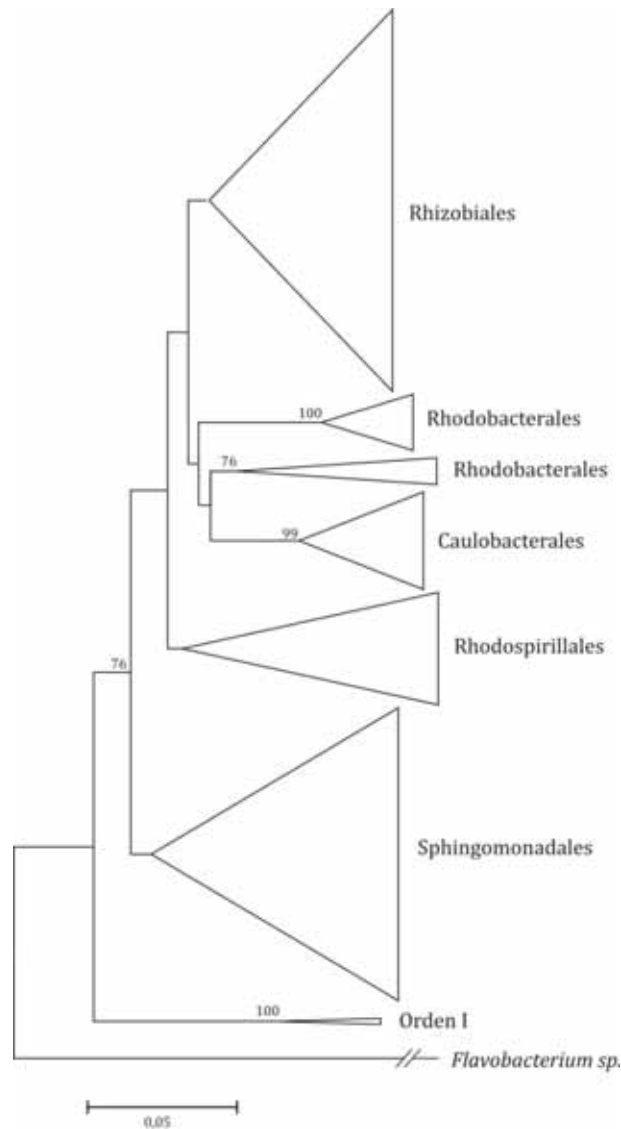


Figura 36. Árbol filogenético esquemático (comprimido) de las secuencias afiliadas a la clase Alphaproteobacteria procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. El tamaño de los triángulos es proporcional al número de taxones comprendidos en la rama. La raíz del árbol se ha situado en *Flavobacterium sp.* que funciona como outgroup.

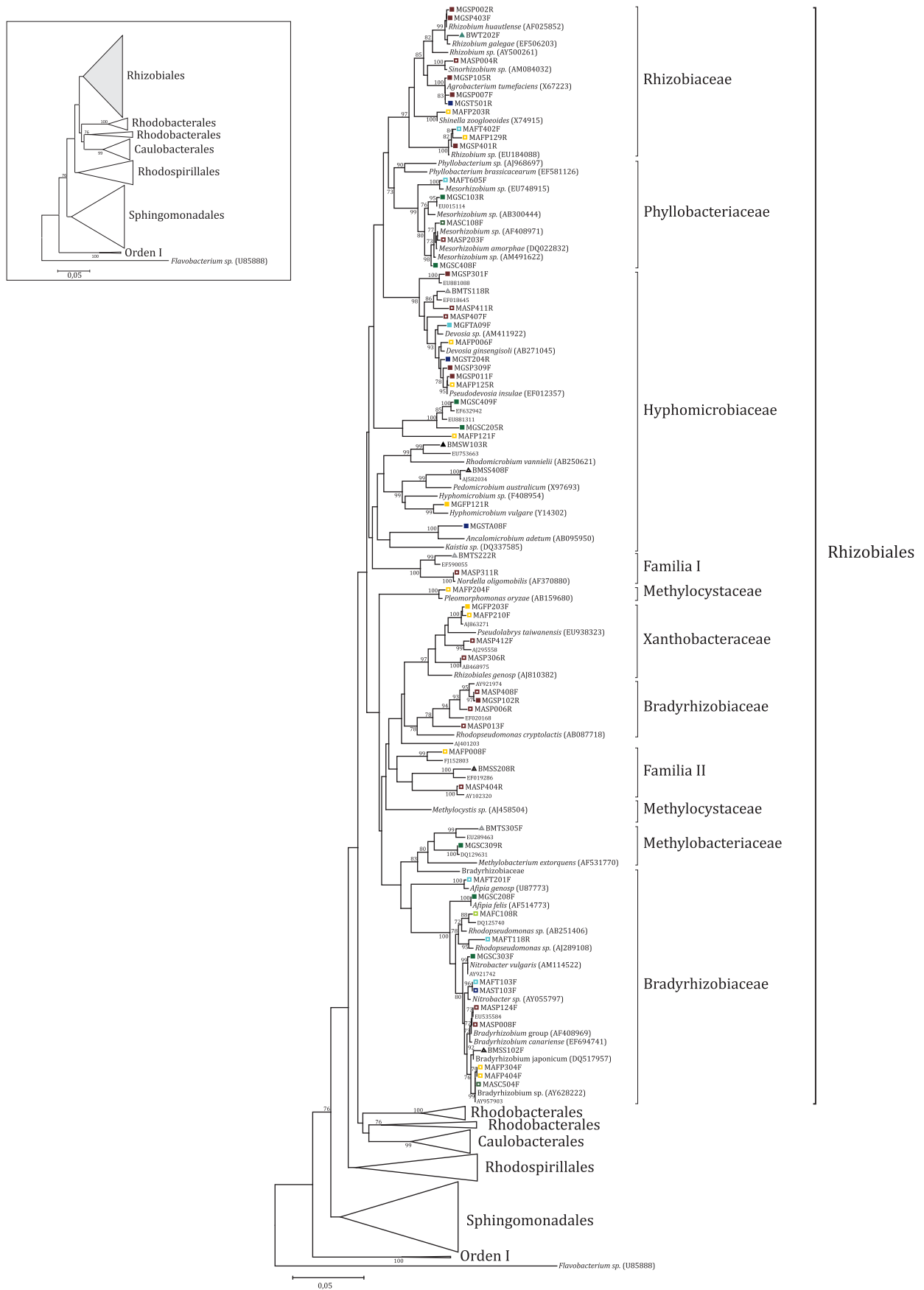


Figura 37. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Alphaproteobacteria, orden Rhizobiales, procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas, así como las secuencias de bacterias más similares obtenidas del GenBank. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. Los triángulos muestran otros órdenes de la clase Alphaproteobacteria. Su tamaño es proporcional al número de taxones comprendidos en cada orden. La raíz del árbol se ha situado en *Flavobacterium sp.* incluida como outgroup.

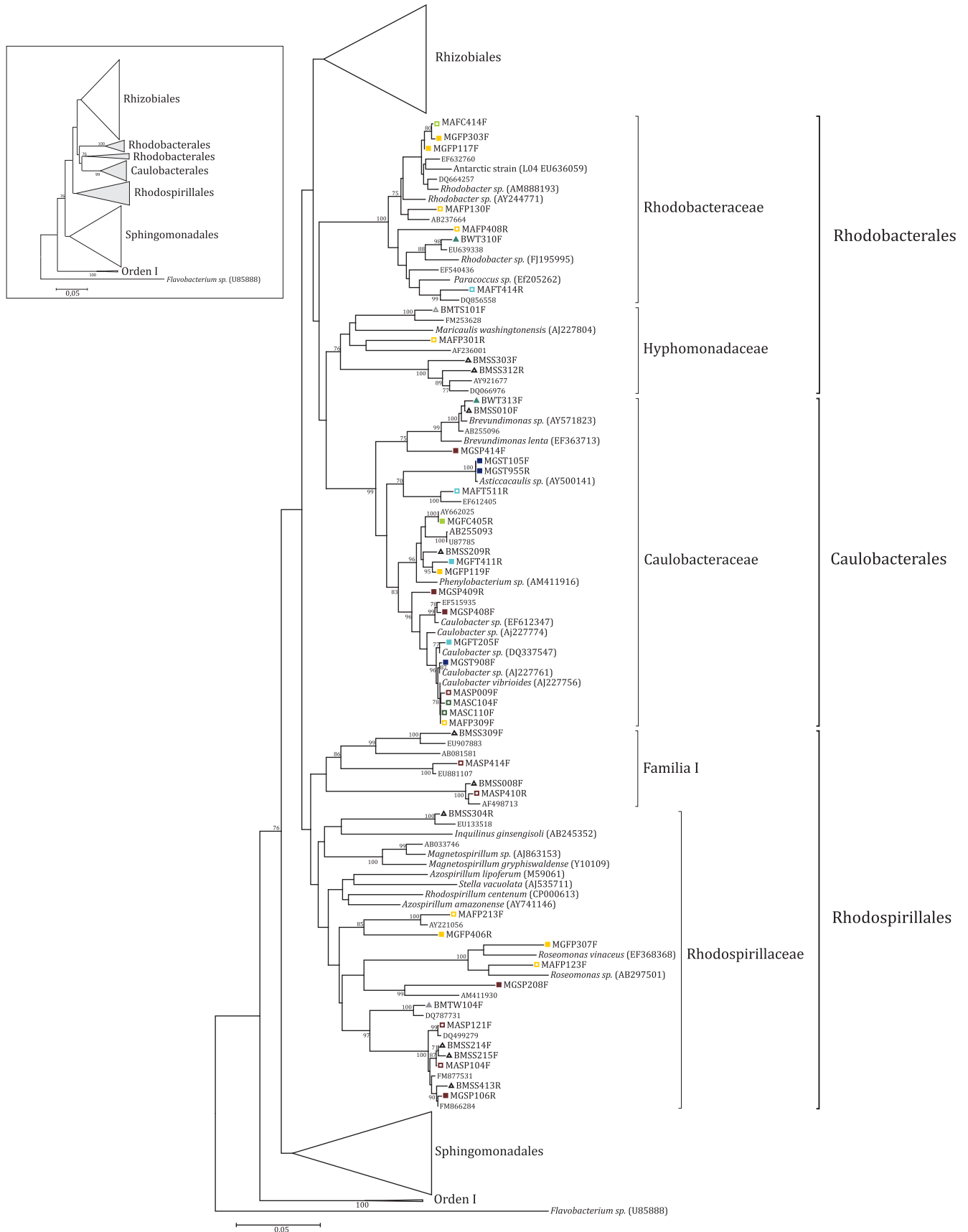


Figura 38. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Alphaproteobacteria, órdenes Rhodobacterales, Caulobacterales y Rhodospirillales, procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas, así como las secuencias de bacterias más similares obtenidas del GenBank. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. Los triángulos muestran otros órdenes de la clase Alphaproteobacteria. Su tamaño es proporcional al número de taxones comprendidos en cada orden. La raíz del árbol se ha situado en *Flavobacterium sp.* incluida como outgroup.



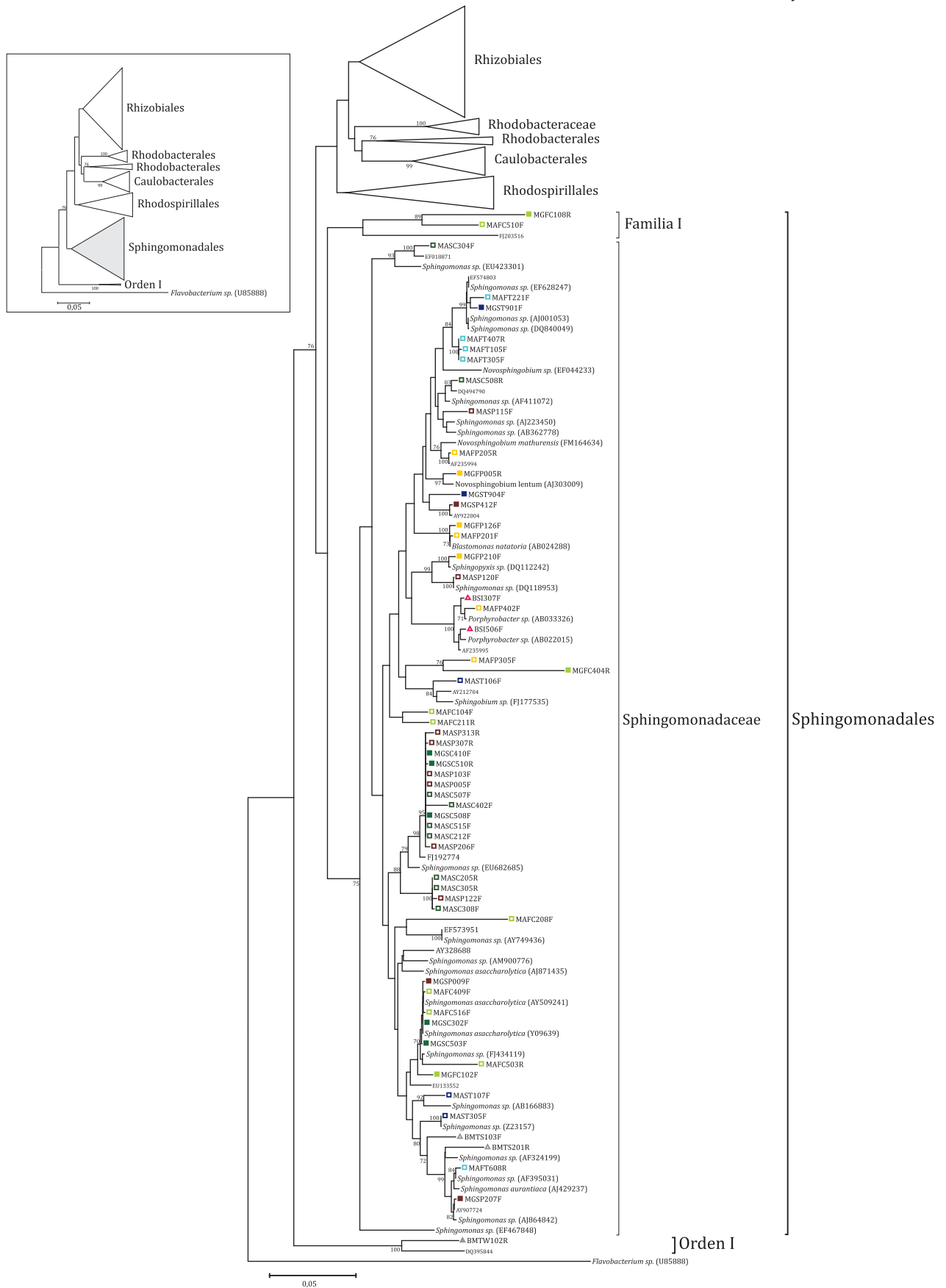


Figura 39. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Alphaproteobacteria, órdenes Sphingomonadales y Orden I, procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas, así como las secuencias de bacterias más similares obtenidas del GenBank. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. Los triángulos muestran otros órdenes de la clase Alphaproteobacteria. Su tamaño es proporcional al número de taxones comprendidos en cada orden. La raíz del árbol se ha situado en *Flavobacterium* sp. incluida como outgroup.

## Clase Betaproteobacteria

Las Betaproteobacterias representan un grupo claramente monofilético dentro de otro linaje más grande compuesto por las Gamma y las Betaproteobacterias (Figura 35) (Kerstens *et al.*, 2006). La reconstrucción del árbol filogenético de esta clase (Figura 40) muestra un gran número de órdenes incluidos en la misma (12). Burkholderiales y la familia Burkholderiaceae constituyen, de acuerdo con estos resultados, un grupo polifilético (Figuras 40, 41 y 42).

Entre otros grupos, se han identificado de esta clase, bacterias rojas no del azufre *Rhodofera*, de la familia Comamonadaceae, orden Burkholderiales, en las comunidades de bacterias del agua de la laguna de micrófitos y del humedal plantado con *Typha latifolia* (BWL y BWT) (Figuras 40 y 42); bacterias aerobias quimiolitotróficas oxidantes del amonio, del linaje de las Nitrosomonas, género *Nitrospira* en el tratamiento con grava de sustrato, flujo subsuperficial y sin vegetación de la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial (MGSC) (Figuras 40 y 43); bacterias metilótrofas como *Methylophilus*, familia Methylophilaceae en la comunidad de bacterias asociadas a la rizosfera de *Typha latifolia* en el tratamiento con grava como sustrato y flujo subsuperficial (MGST) (Figuras 40 y 44); y bacterias oxidantes de sulfuro de hidrógeno con formación de depósitos extracelulares de azufre en la comunidad de bacterias asociadas al sedimento de la laguna de micrófitos (BSI y BSO) (género *Thiobacillus*, familia Hydrogenophilaceae, orden Hydrogenophiales) (Figuras 40 y 44).

El orden Rhodocyclales se encuentra también ampliamente representado, de forma que varias secuencias estudiadas se han identificado como bacterias afiliadas a este grupo, procedentes de las comunidades de bacterias tanto de la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial como de la planta para el tratamiento de agua residual urbana (Figuras 40 y 43).

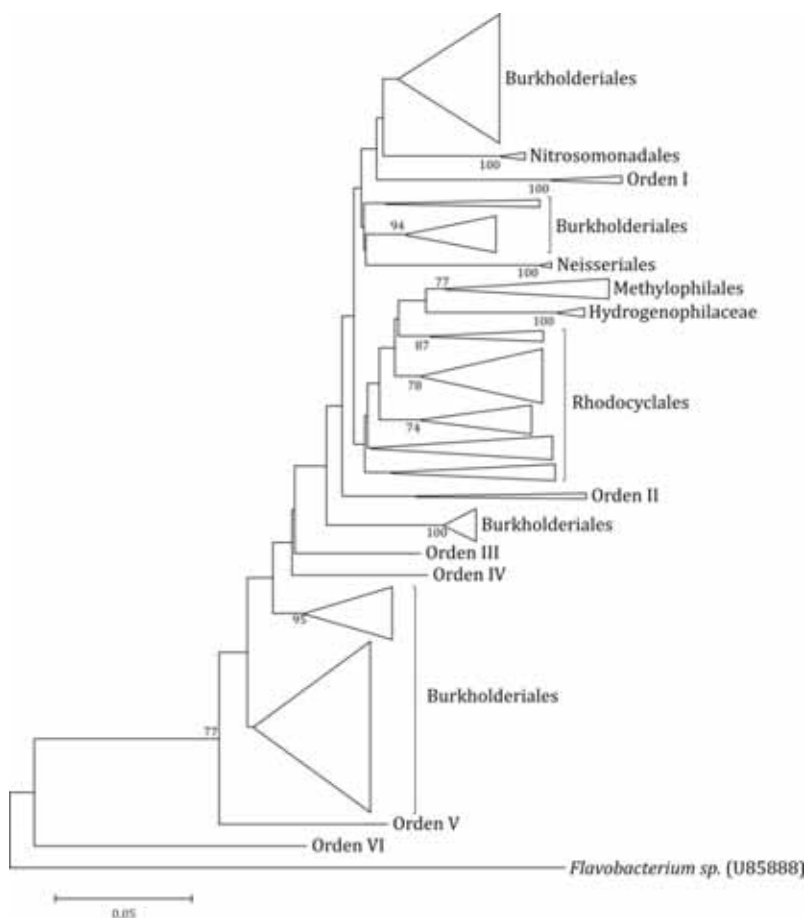


Figura 40. Árbol filogenético esquemático (comprimido) de las secuencias afiliadas a la clase Betaproteobacteria. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap superiores al 70% se indican en los nodos. El tamaño de los triángulos es proporcional al número de taxones comprendidos en la rama. La raíz del árbol se ha situado en *Flavobacterium sp.* (U85888) incluida como outgroup.

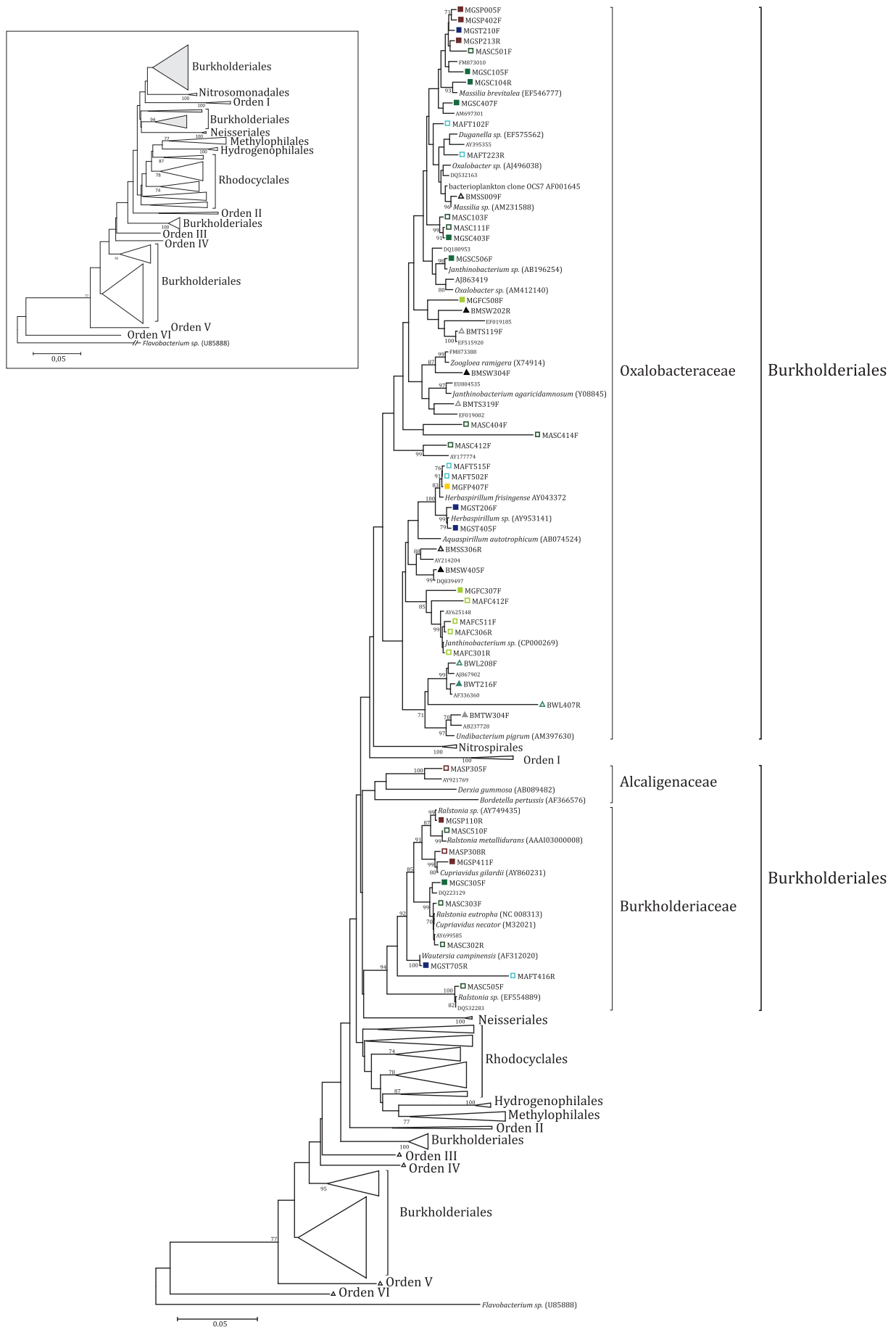


Figura 41. Árbol filogenético de secuencias afiliadas a la clase Betaproteobacteria, orden Burkholderiales, procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas, así como las secuencias de bacterias más similares obtenidas del GenBank. Los triángulos muestran otros órdenes de la clase Betaproteobacteria. Su tamaño es proporcional al número de taxones comprendidos en cada orden. La raíz del árbol se ha situado en *Flavobacterium sp.* incluida como outgroup.

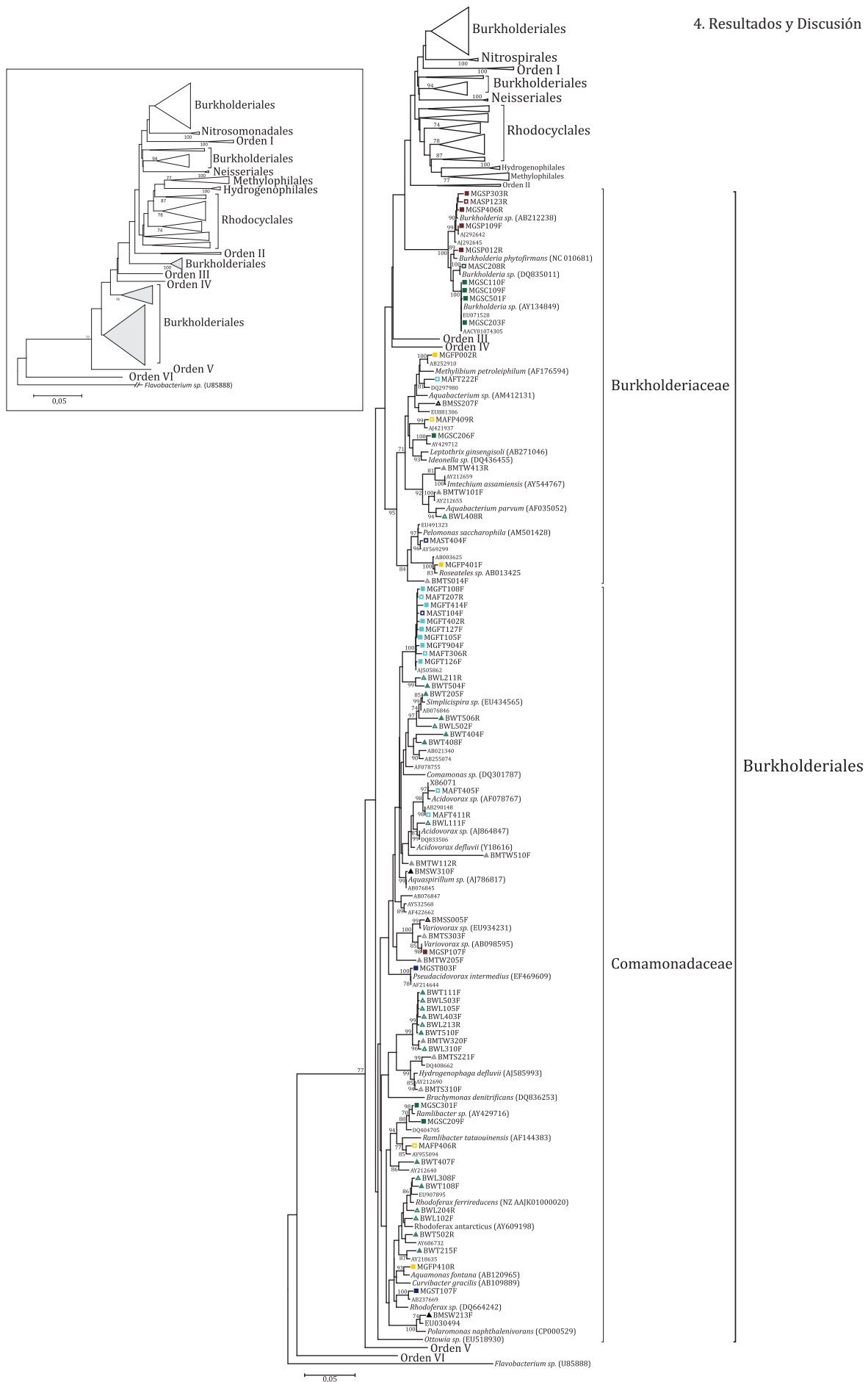


Figura 42. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al orden Burkholderiales, procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas, así como las secuencias de bacterias más similares obtenidas del GenBank. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap superiores al 70% se indican en los nodos. La raíz del árbol se ha situado en *Flavobacterium sp.* incluida como outgroup.

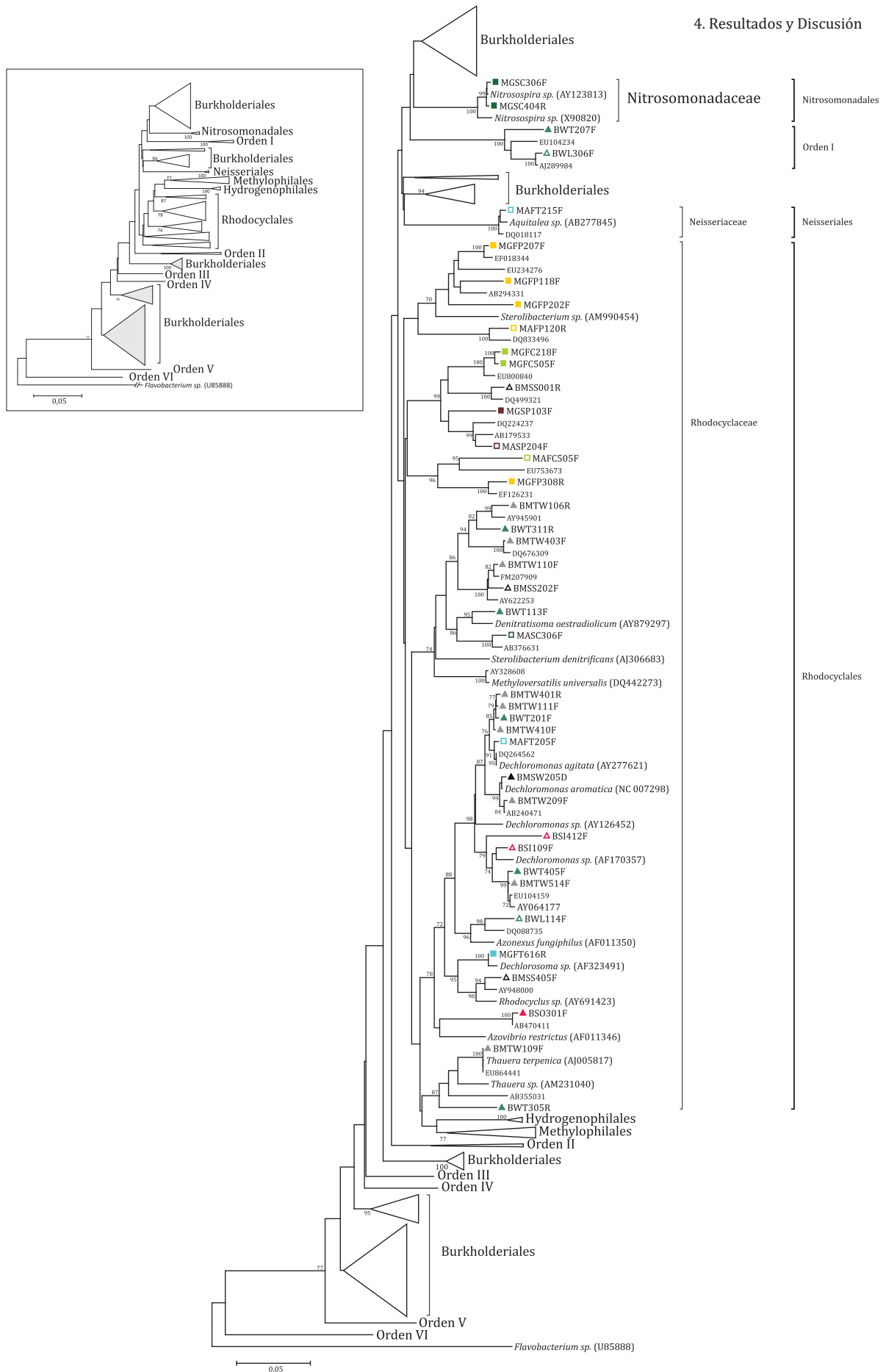


Figura 43. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Betaproteobacteria, órdenes Nitrosomonadales, Neisseriales, Rhodocyclales y Orden I, procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas, así como las secuencias de bacterias más similares obtenidas del GenBank. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap superiores al 70% se indican en los nodos. La raíz del árbol se ha situado en *Flavobacterium sp.* incluida como outgroup.

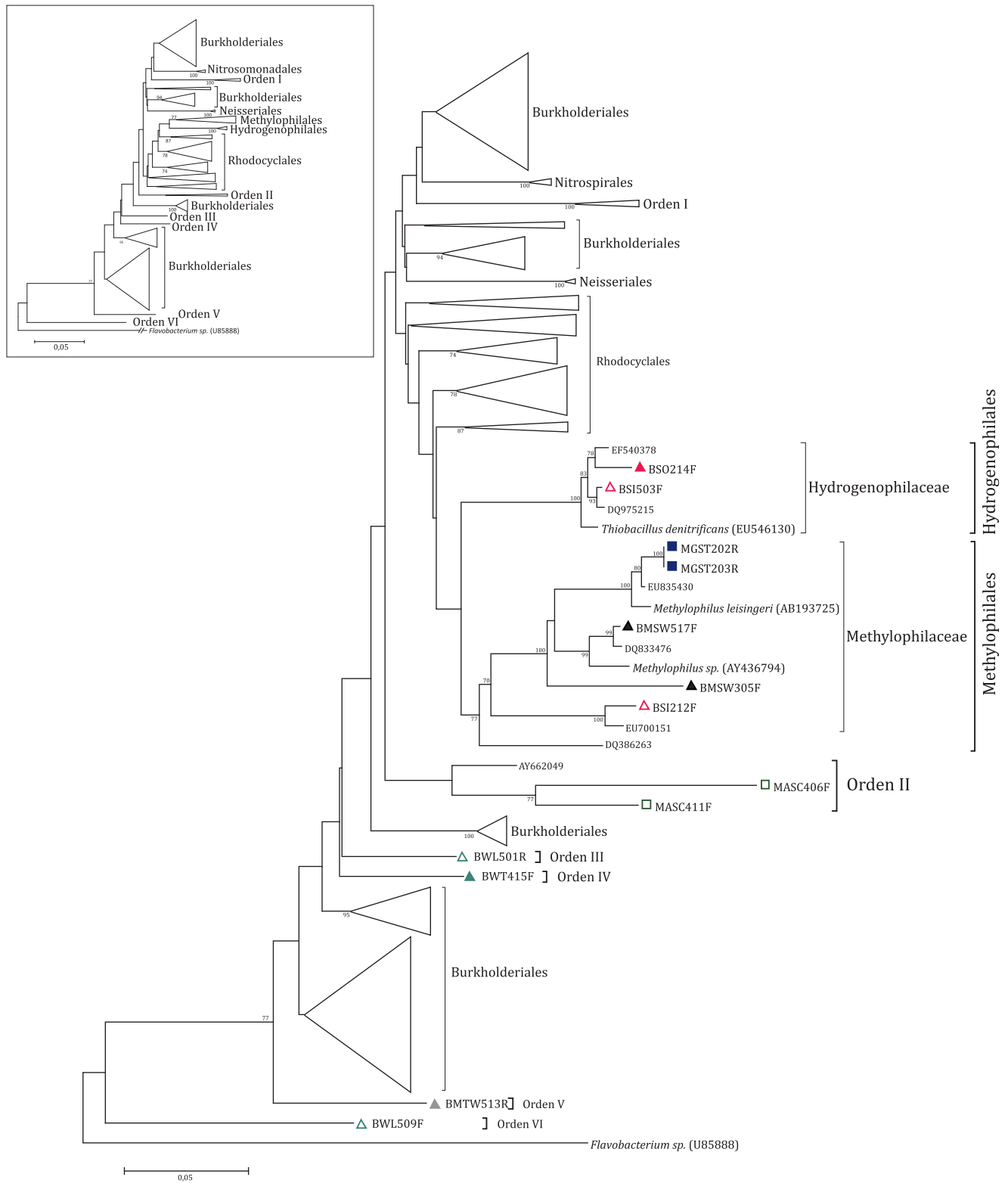


Figura 44. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Betaproteobacteria, órdenes Hydrogenophilales, Methylophilales y otros órdenes sin identificar, procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas, así como las secuencias de bacterias más similares obtenidas del GenBank. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. Los triángulos muestran otros órdenes de la clase Betaproteobacteria. Su tamaño es proporcional al número de taxones comprendidos en cada orden. La raíz del árbol se ha situado en *Flavobacterium sp.* incluida como outgroup.

## Clase Gammaproteobacteria

Gammaproteobacteria constituye la clase que más géneros y especies agrupa dentro del filo Proteobacteria (Kerstens *et al.*, 2006).

Dentro de esta clase se han identificado individuos quimiorganótrofos afiliados a las familias Enterobacteriaceae, orden Enterobacteriales, en la que se incluyen principalmente bacterias anaerobias facultativas, implicadas en procesos fermentativos de la materia orgánica (Figuras 45 y 46); Pseudomonadaceae, del orden Pseudomonadales (Figuras 45 y 47), familia de bacterias aerobias muy heterogéneas ya que emplean una gran variedad de compuestos orgánicos para obtener energía y como fuente de carbono, desempeñando un papel fundamental en los procesos de depuración del agua residual (Kerstens *et al.*, 2006); y familia Legionellaceae (Figuras 45 y 48), encontrándose la presencia de bacterias de estas familias tanto en la planta piloto a pequeña escala como en la planta a escala real.

En la laguna de micrófitos de la instalación para el tratamiento de agua residual urbana (BWL) se han identificado bacterias rojas del azufre, que son bacterias fotoautótrofas que utilizan como donador de electrones sulfuro de hidrógeno, polisulfuros, o azufre molecular (Núñez-Cardona, 2003) de la familia Chromatiaceae, orden Chromatiales (Figuras 45 y 48).

En el orden Thiotrichales, se han encontrado bacterias desnitrificantes de la familia Sinobacteraceae (*Steroidobacter denitrificans*) (Figuras 45 y 48), así como de la familia Thiotrichaceae con bacterias quimiolitótrofas oxidantes de sulfuro, representada en las comunidades de bacterias del agua de la laguna de micrófitos del sistema a escala real (BWL), con el género *Beggiatoa* (Figuras 45 y 48).

Finalmente se destaca, dentro del orden Pseudomonadales, la familia Moraxellaceae, de nuevo mayoritariamente presentes en la comunidad de bacterias de la laguna de micrófitos (BWL) (Figuras 45 y 47).

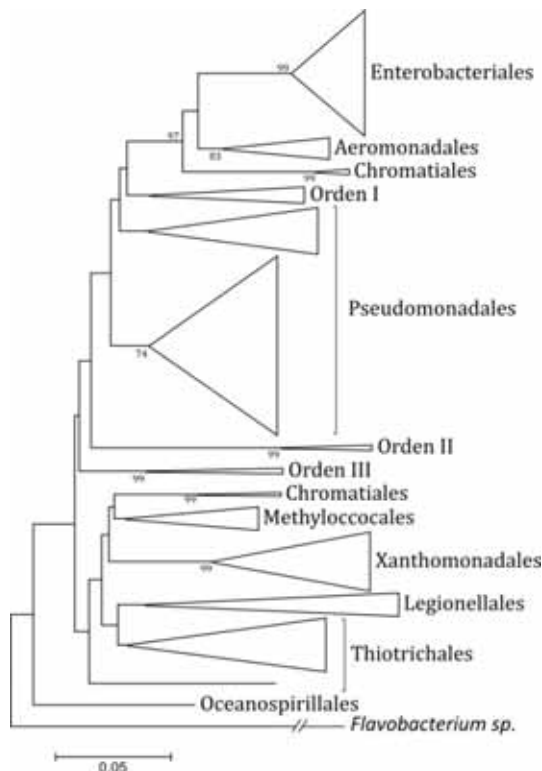


Figura 45. Árbol filogenético esquemático (comprimido) de las secuencias afiliadas a la clase Gammaproteobacteria procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. El tamaño de los triángulos es proporcional al número de taxones comprendidos en la rama. La raíz del árbol se ha situado en *Flavobacterium sp.* que funciona como outgroup.

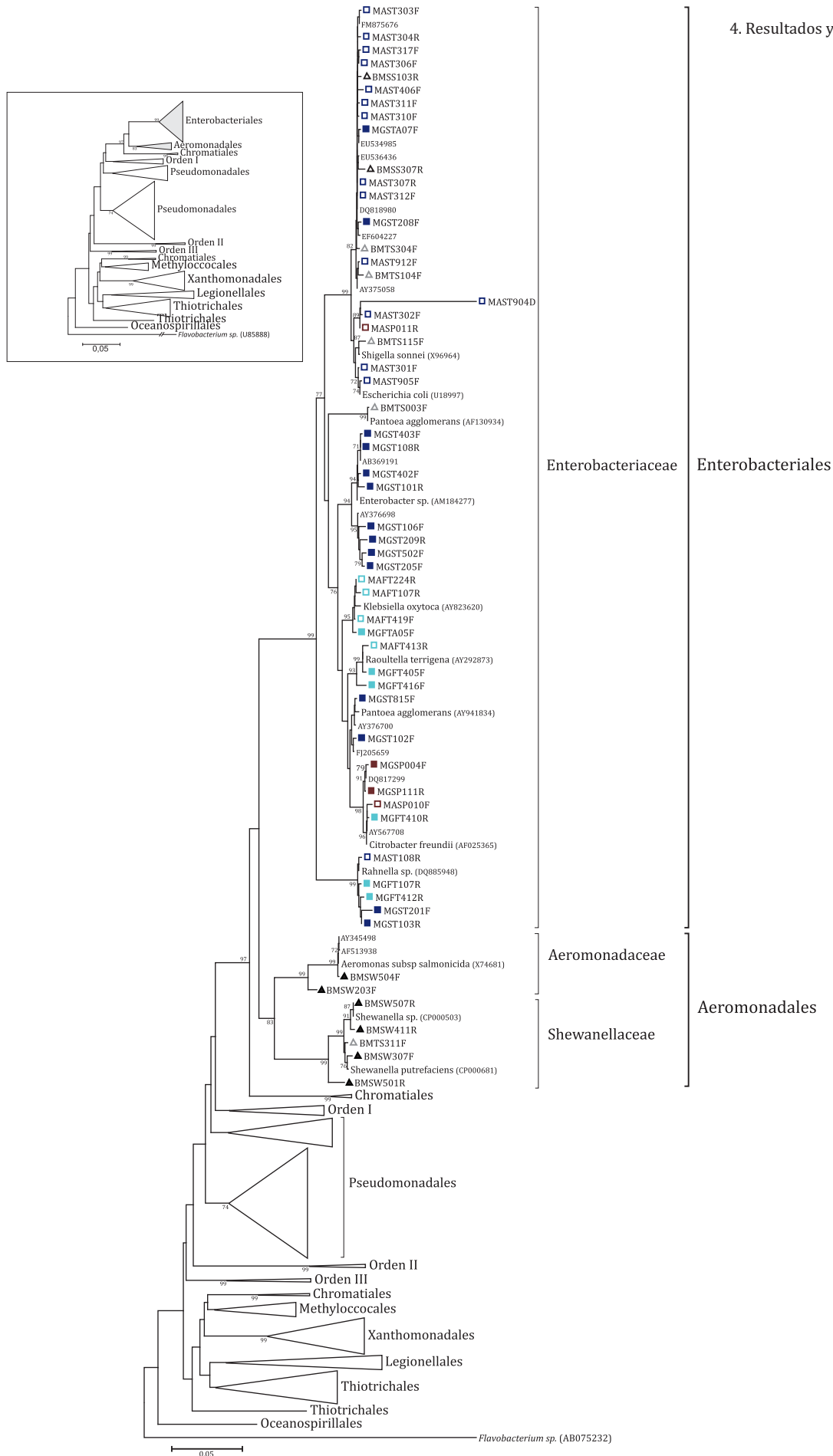


Figura 46. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Gammaproteobacteria, órdenes Enterobacteriales y Aeromonadales, procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas, así como las secuencias de bacterias más similares obtenidas del GenBank. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. La raíz del árbol se ha situado en *Flavobacterium sp.* incluida como outgroup.



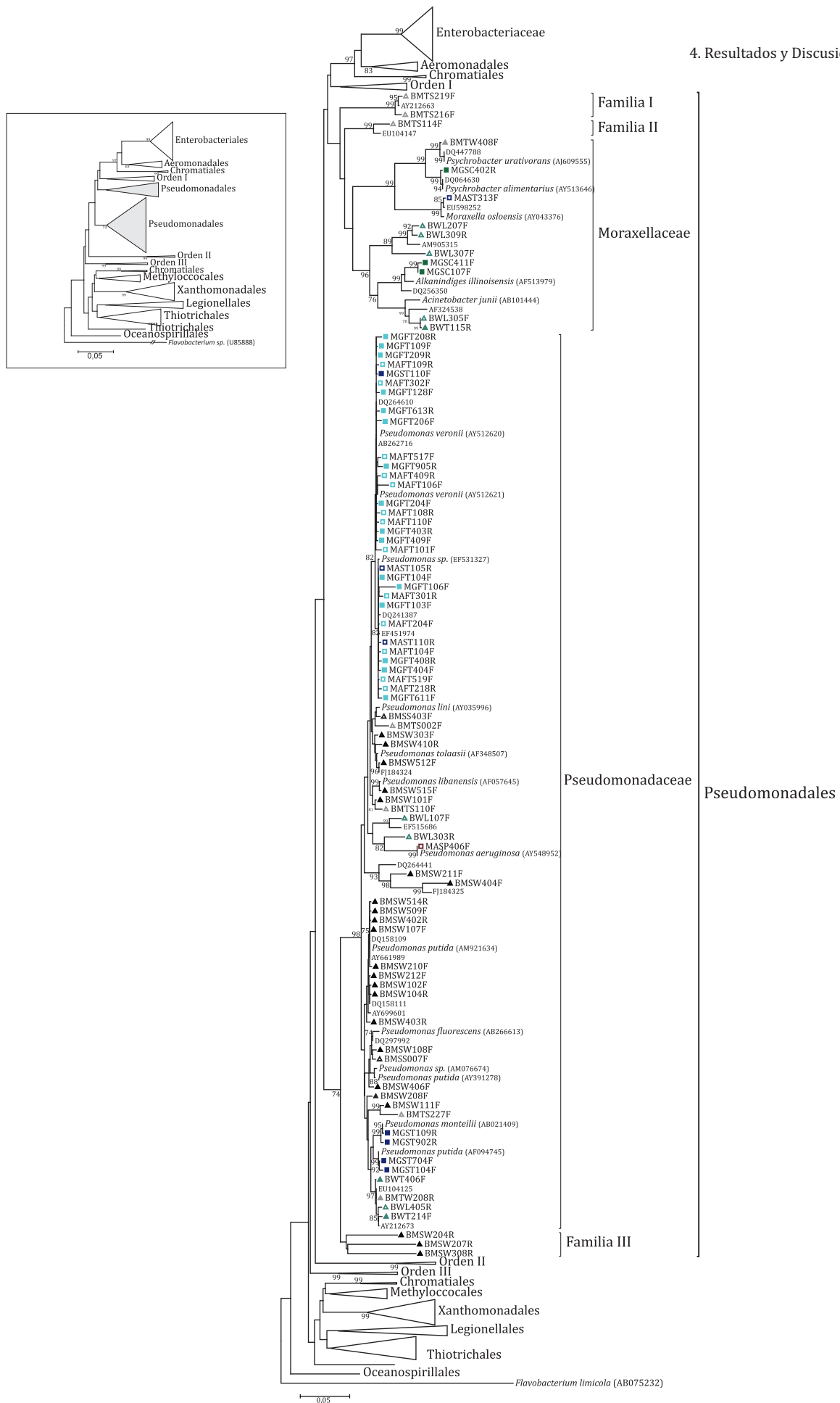


Figura 47. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Gammaproteobacteria, orden Pseudomonadales. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap superiores al 70% se indican en los nodos. Los triángulos muestran otros órdenes de la clase Gammaproteobacteria. La raíz del árbol se ha situado en *Flavobacterium sp.* incluida como outgroup. 130

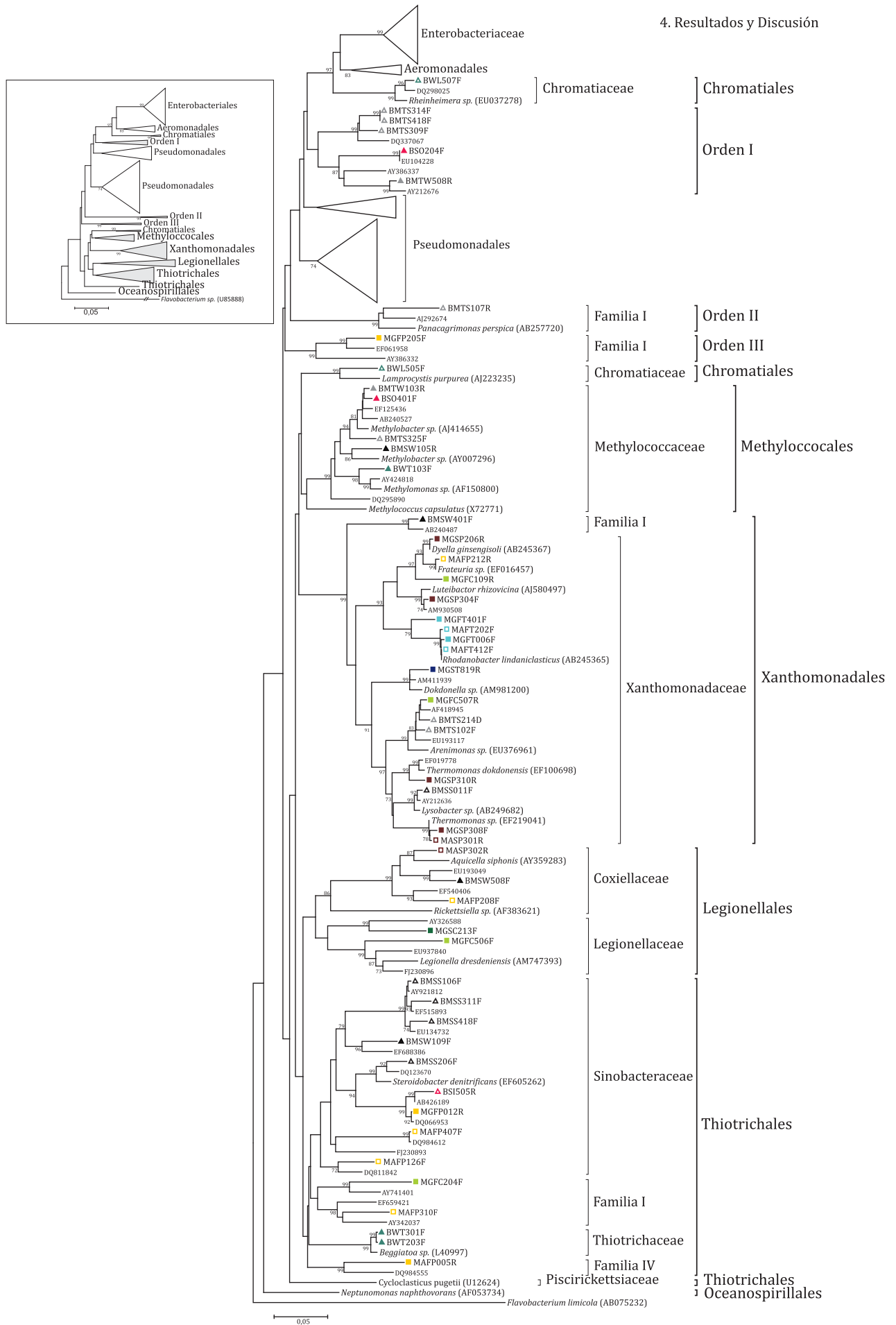


Figura 48. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Gammaproteobacteria, órdenes Methylococcales, Xanthomonadales, Legionellales, Thiotrichales y otros órdenes sin identificar. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. La raíz del árbol se ha situado en *Flavobacterium sp.* incluida como outgroup.

### Clase Deltaproteobacteria y Clase Epsilonproteobacteria

Dentro de la Clase Deltaproteobacteria, el orden dentro del cual se ha identificado un mayor número de secuencias ha sido Syntrophobacterales, en el que se incluyen bacterias (*Syntrophus*) que realizan una fermentación de benzoato a acetato, dióxido de carbono e hidrógeno de forma sintrófica con arqueobacterias metanogénicas (Kersters *et al.*, 2006).

Además, se han identificado afiliaciones (en su mayoría secuencias procedentes de las muestras de sedimento de la laguna de micrófitos del MJE<sup>A</sup>) a grupos de bacterias anaerobias reductoras de sulfato y de azufre, con un importante papel en el ciclo del azufre (Desulfobacterales, Desulfuromonadales, Desulfovibrionales (Figuras 49 y 50).

La Clase Epsilonproteobacteria se encuentra escasamente representada en las distintas comunidades de bacterias analizadas, de forma que únicamente está presente en el sistema a escala real para el tratamiento de agua residual urbana, en la rizosfera de *Typha latifolia*, en el muestreo realizado en invierno (Figuras 49 y 50).

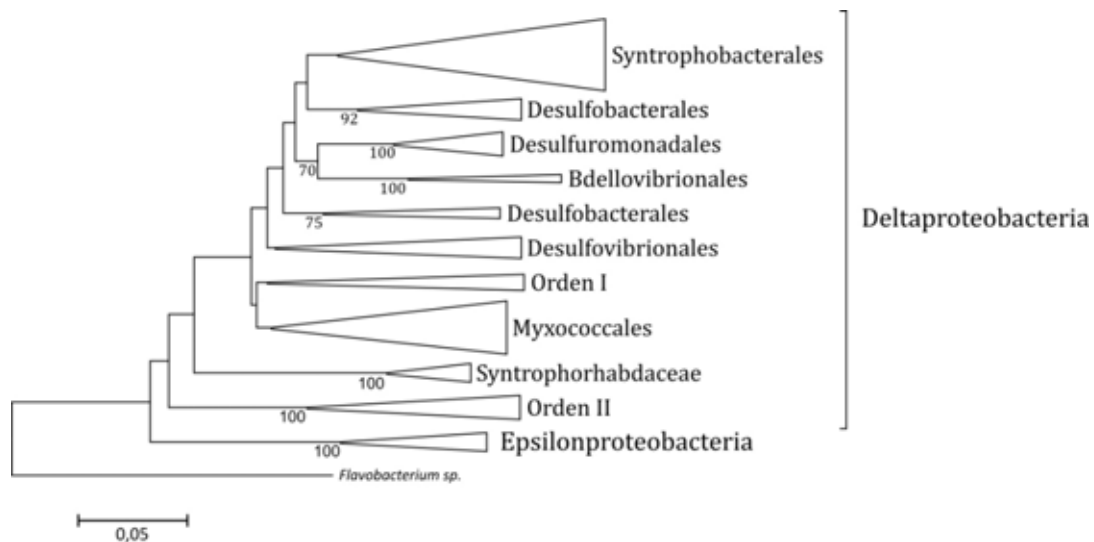


Figura 49. Árbol filogenético esquemático (comprimido) de las secuencias afiliadas a las clases Deltaproteobacteria y Epsilonproteobacteria procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. El tamaño de los triángulos es proporcional al número de taxones comprendidos en la rama. La raíz del árbol se ha situado en *Flavobacterium sp.* incluida como outgroup.

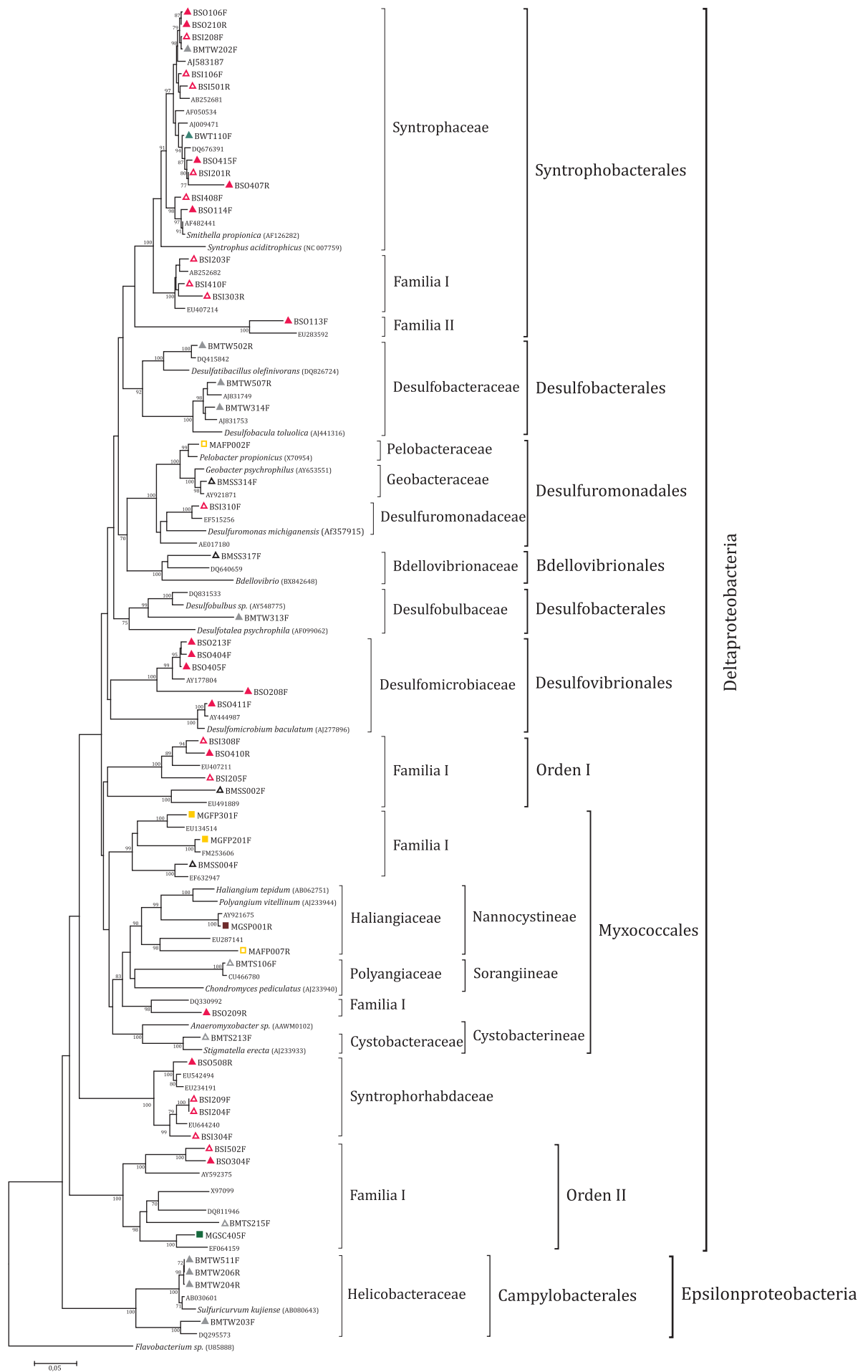


Figura 50. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a las clases Delta y Epsilonproteobacteria, procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas, así como las secuencias de bacterias más similares obtenidas del GenBank. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. La raíz del árbol se ha situado en *Flavobacterium sp.* incluida como outgroup.

## Filo Bacteroidetes

El filo Bacteroidetes constituye generalmente, uno de los grupos más importantes de bacterias heterótrofas en las distintas comunidades de bacterias (Kirchman, 2002). Individuos afiliados al filo Bacteroidetes, distribuidos entre las tres clases que configuran el filo, están presentes en todas las comunidades de bacterias estudiadas, tanto de la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial, como de la planta piloto a escala real para el tratamiento de agua residual urbana (Figura 51).

Dentro de la clase Flavobacteria, en la que se agrupan organismos mayoritariamente aerobios y en general identificados como degradadores de polímeros, se han identificado bacterias del género *Flavobacterium*, y en menor medida bacterias de los Géneros *Chryseobacterium* y *Brumimicrobium*, género este último, de la familia Cryomorphaceae, descrita recientemente en habitats polares (Bernadet y Nakagawa, 2006; Bowman *et al.*, 2003) (Figura 52).

Bacterias afiliadas a la clase Bacteroidia, bacterias fermentadoras, anaerobias estrictas, se han identificado en el sistema a escala real para la depuración de agua residual urbana, y particularmente en los sedimentos de la laguna de micrófitos. Sólo se ha identificado una bacteria para la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual urbana, incluida en este grupo (Figura 53).

La clase Sphingobacteria representa en el conjunto de los ambientes estudiados el grupo con una mayor abundancia. Se trata de organismos aerobios, microaerófilos, o aerobios facultativos, capaces de degradar polisacáridos complejos. Dentro de esta clase, las familias mejor representadas han sido Flexibacteraceae y Chitinophagaceae (Figura 54).

Los estudios confieren una relevancia ambiental cada vez más notable a las bacterias de este filo, ya que parecen desempeñar un papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos gracias a que sus diversas enzimas les permiten degradar una gran variedad de sustratos orgánicos complejos (Kirchman, 2002; Johansen y Binnerup, 2002).

## Filo Chlorobi

La relación entre el Filo Bacteroidetes con el género *Chlorobium* y otras bacterias verdes del azufre se ha puesto de manifiesto mediante análisis de rRNA 16S (Paster *et al.*, 1994; Overmann, 2006) y de proteínas (Gupta, 2000; Overmann, 2006) aunque debido a otras diferencias entre ambos grupos no se ha establecido una agrupación entre ambos (Bernadet y Nakagawa, 2006) (Figura 51).

Este filo está integrado de forma mayoritaria por organismos no cultivados, de forma que únicamente seis géneros del mismo corresponden a organismos cultivados. Se trata de un filo escasamente representado en el sistema de tratamiento de agua residual urbana, y sin ninguna representación en la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial.

El filo comprende bacterias fotosintéticas obligadas y anoxigénicas, en general autótrofas, aunque son capaces de crecer fotoheterótróficamente. Al igual que las proteobacterias fotosintéticas (bacterias rojas del azufre de la clase Alfacproteobacteria, y bacterias rojas no del azufre de la clase Gammaproteobacteria), utilizan sulfuro de hidrógeno como fuente de electrones (Roselló y Antón, 2009), por lo que son frecuentes en zonas húmedas de poca profundidad, con abundante materia

orgánica, y sulfuro de hidrógeno generado por las bacterias anaerobias de los sedimentos (generalmente Bacteroidetes). Debido a que requieren una intensidad de luz muy baja, ocupan lugares donde otros organismos fotosintéticos no pueden crecer (Roselló y Antón, 2009).

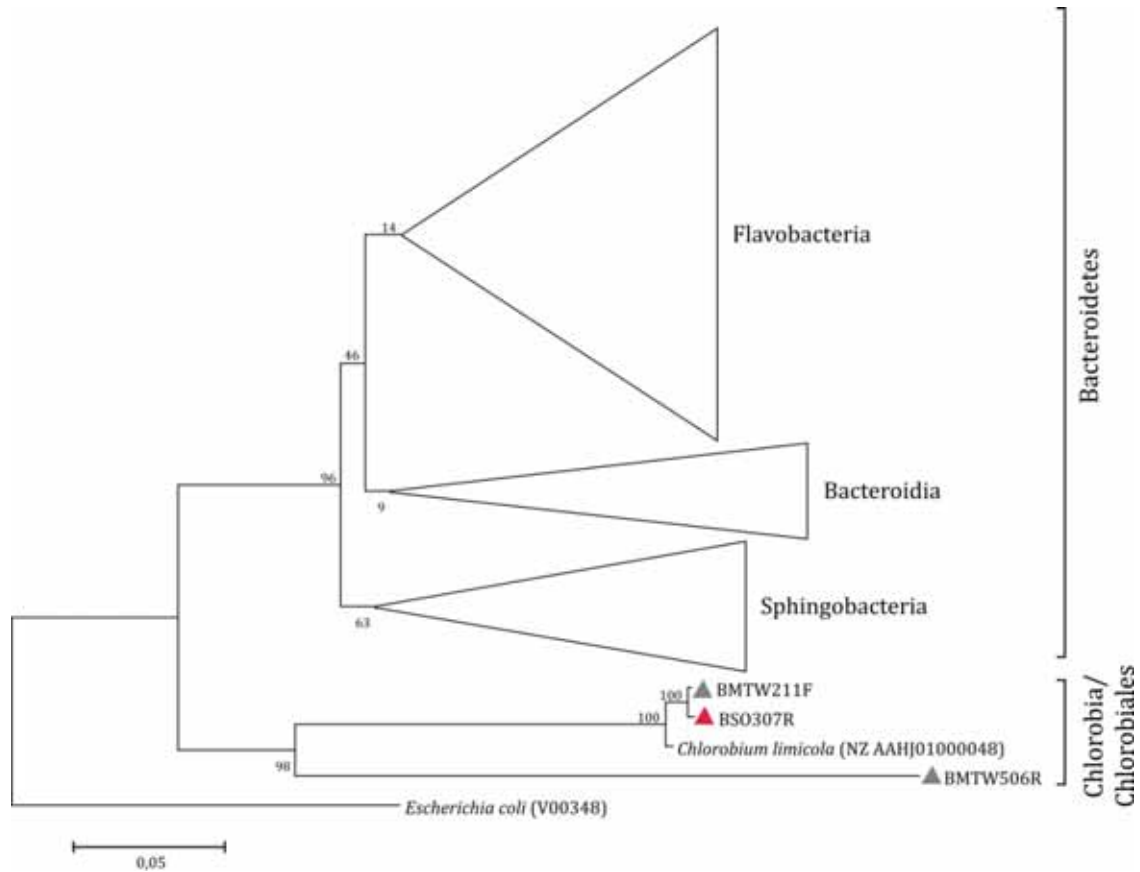


Figura 51. Árbol filogenético esquemático de las secuencias afiliadas al filo Bacteroidetes y árbol expandido del filo Chlorobi, procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap superiores al 70% se indican en los nodos. La raíz se ha situado en *Escherichia coli* incluida como outgroup.

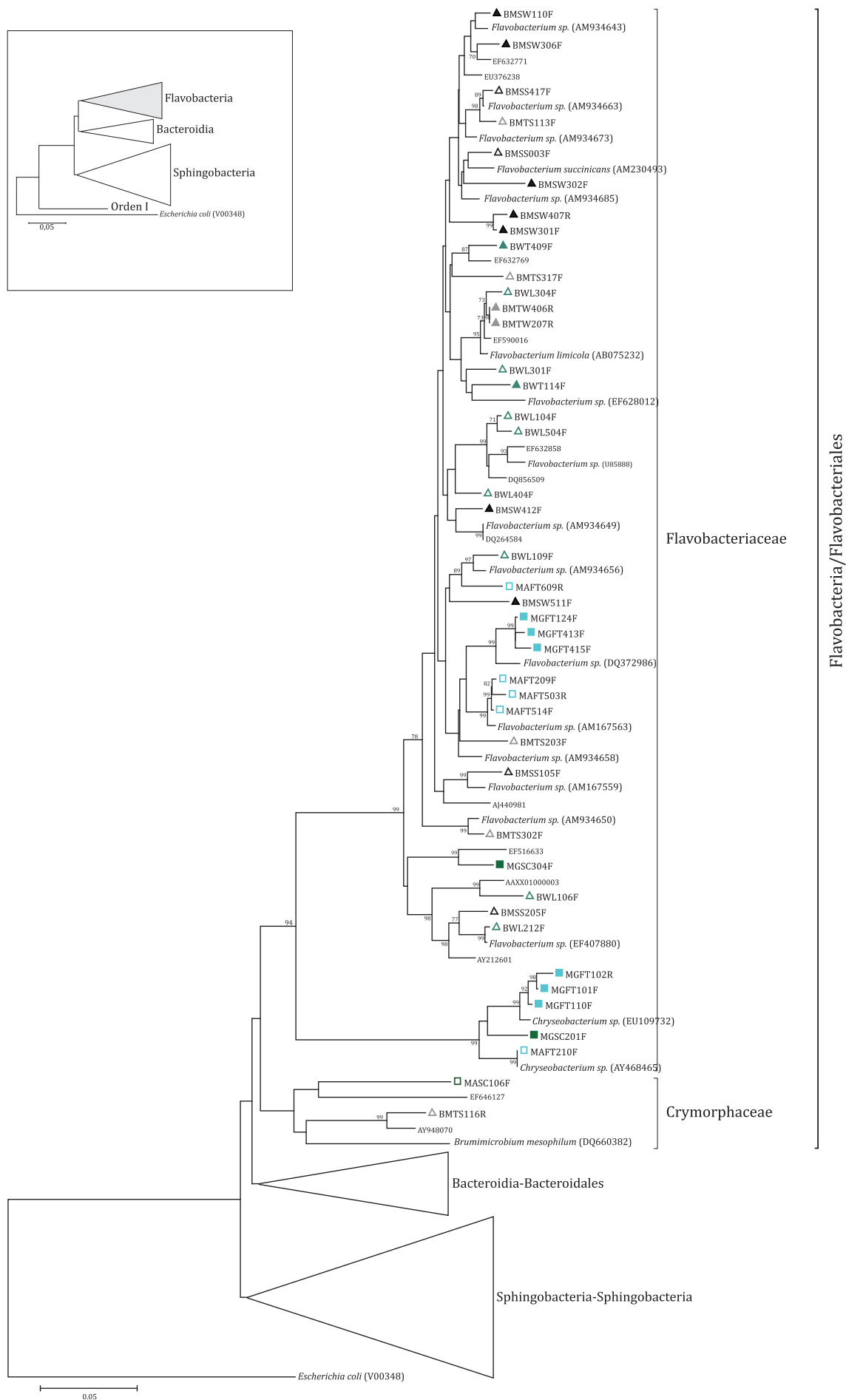


Figura 52. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Flavobacteria, procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas, así como las secuencias de bacterias más similares obtenidas del GenBank. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap superiores al 70% se indican en los nodos. Los triángulos muestran las clases Bacteroidia y Sphingobacteria del filo Bacteroidetes. La raíz del árbol se ha situado en *Escherichia coli* incluida como outgroup.

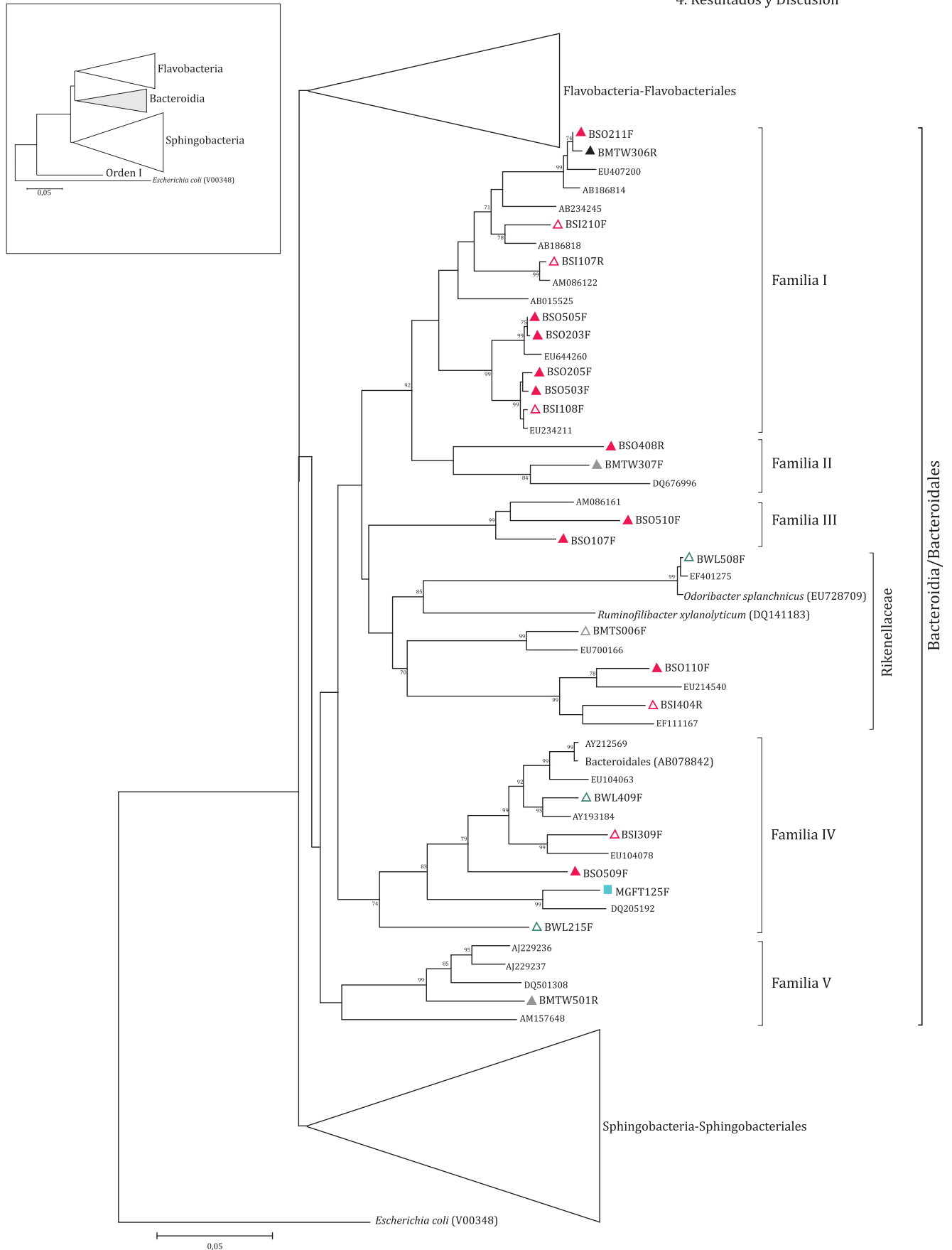


Figura 53. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Bacteroidia, procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas, así como las secuencias de bacterias más similares obtenidas del GenBank. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. Los triángulos muestran las clases Flavobacteria y Sphingobacteria del filo Bacteroidetes. Su tamaño es proporcional al número de taxones comprendidos en cada orden. La raíz del árbol se ha situado en *Escherichia coli* incluida como outgroup.



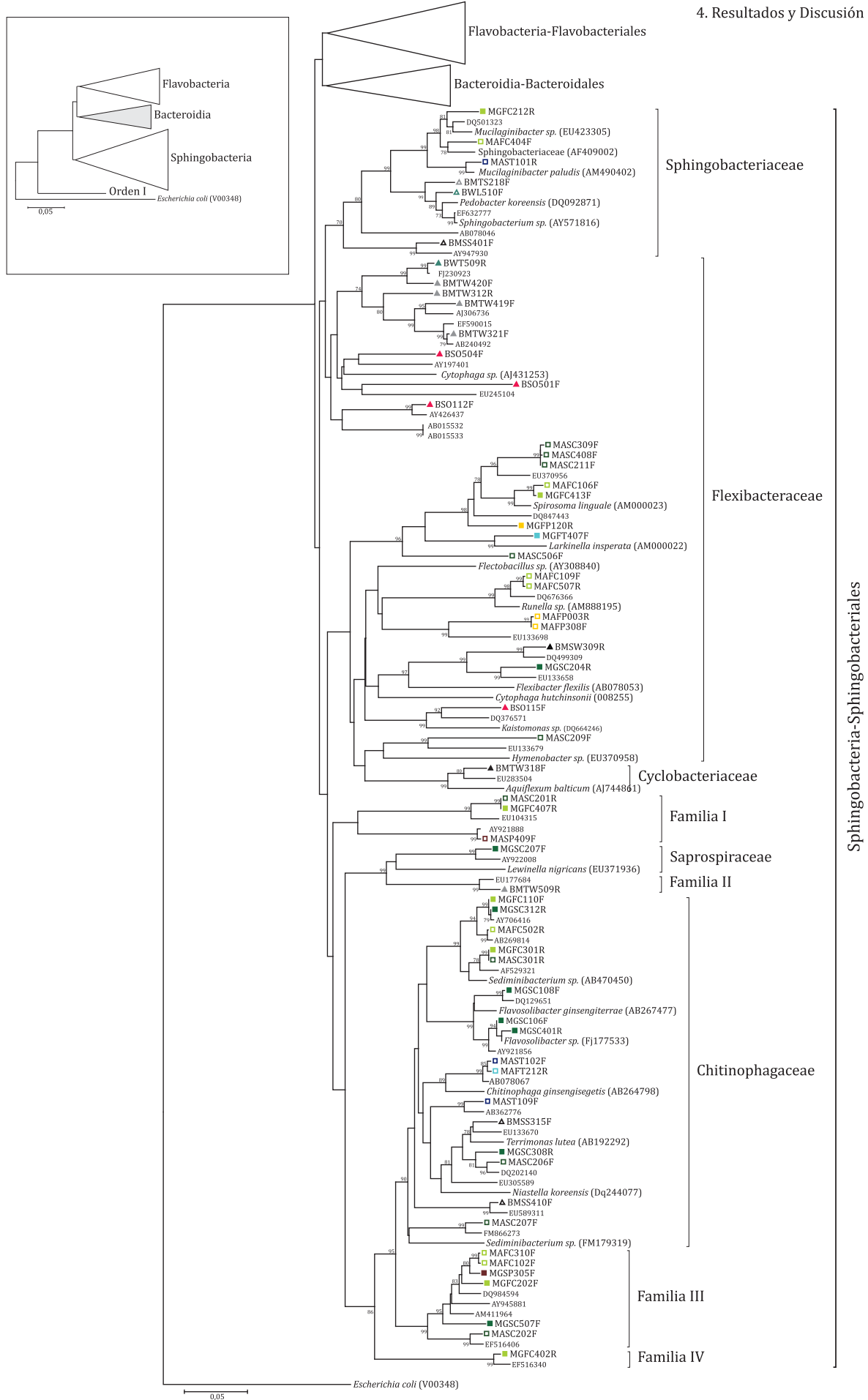


Figura 54. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a la clase Sphingobacteria. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap superiores al 70% se indican en los nodos. La raíz del árbol se ha situado en *Escherichia coli* incluida como outgroup.

### **Filo Acidobacteria**

El filo Acidobacteria constituye una división creada recientemente (Kuske *et al.*, 1997). Bacterias de este filo han sido descritas en hábitats muy diferentes mediante técnicas moleculares basadas en el empleo del gen rRNA 16S. Su diversidad filogenética así como su ubicuidad y abundancia, especialmente en suelos, sugieren que las bacterias de este grupo desempeñan un papel fundamental en los ecosistemas terrestres que queda reflejada en su gran versatilidad metabólica (Quaser *et al.*, 2003). Sin embargo, la información actual sobre este grupo tanto en relación a su fisiología y metabolismo como a aspectos genéticos es todavía muy escasa. Así, la mayor parte de las acidobacterias están representadas únicamente por muestras ambientales de secuencias de rRNA 16S siendo muy pocas las bacterias que presentan un nombre válido publicado (no llegan a diez).

Las tres clases descritas para este filo (Acidobacteria, Holophagae, Solibacteres) cuentan con representantes entre las bacterias identificadas para las comunidades de bacterias de la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial. Sin embargo, no se trata de un filo con una presencia notable en las comunidades de bacterias de la planta para el tratamiento de agua residual urbana, ya que se han identificado pocas secuencias incluidas en el filo, y ninguna en la clase Solibacteres (Figura 55 y 56).

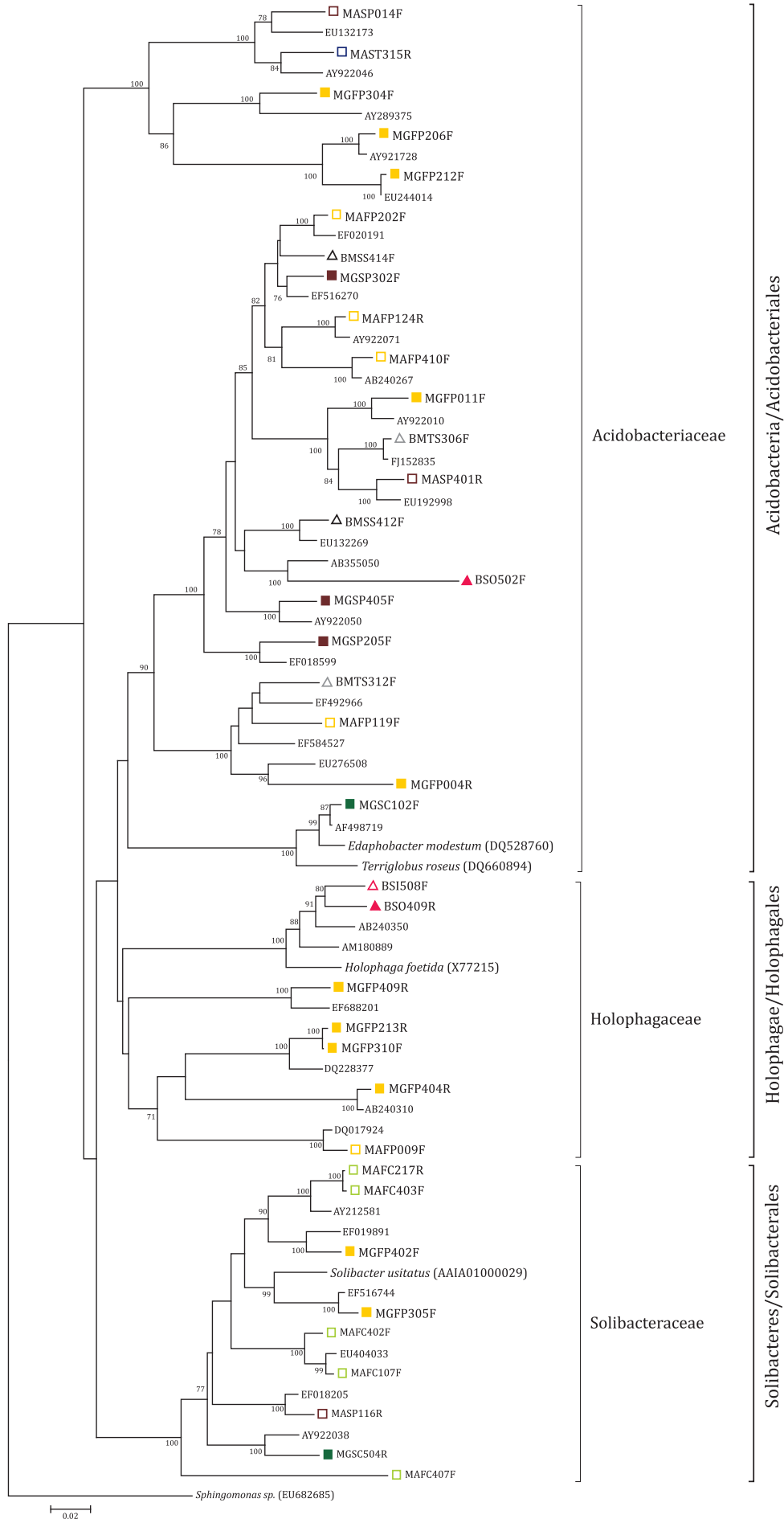


Figura 55. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al filo Acidobacteria. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. La raíz del árbol se ha situado en *Spingomonas sp.* incluida como outgroup.

## Filo Fibrobacteres

Este filo cuenta con un único género descrito válidamente (*Fibrobacter*), el cual no ha sido nunca detectado fuera del tracto digestivo de herbívoros, aunque estudios recientes mediante técnicas moleculares han demostrado la presencia de organismos relacionados con *Fibrobacter* en otros ambientes (McDonald *et al.*, 2008 y 2009) como los trabajos con el gen rRNA 16S mediante los que se ha observado la presencia de bacterias incluidas en la división Acidobacteria-Fibrobacter en suelos (Saul *et al.*, 2005) y en lagunas (Wise *et al.*, 1997).

Fibrobacteres se encuentra representado en las comunidades de bacterias estudiadas únicamente por dos secuencias, una de la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial y una segunda en la otra instalación depuradora, sin estar ambas secuencias afiliadas al género *Fibrobacter*, por lo que quedan identificadas dentro del filo Fibrobacteres (Figura 56).

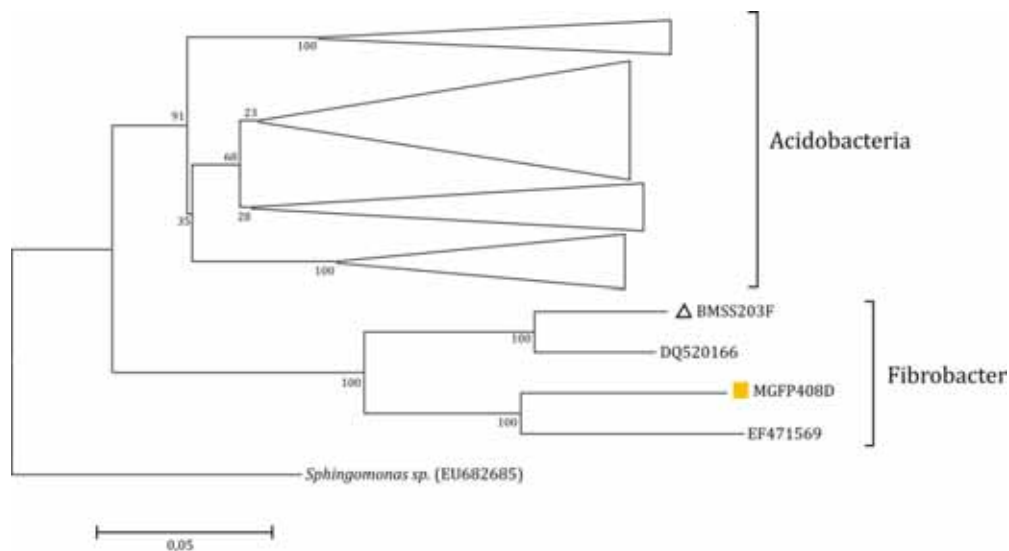


Figura 56. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a filo Fibrobacteres, procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. Los triángulos muestran las clases del filo Acidobacteria. El tamaño de los triángulos es proporcional al número de taxones comprendidos en la rama. La raíz del árbol se ha situado en *Sphingomonas sp.* incluida como outgroup.

## Filo Actinobacteria

Junto con el filo Firmicutes, este filo engloba todas las bacterias gram positivas, diferenciándose de los Firmicutes por ser gram positivas de alto contenido en GC.

Los organismos del filo Actinobacteria se consideraba tradicionalmente que estaban fundamentalmente presentes en los suelos, siendo rara su presencia en ecosistemas acuáticos (Madigan *et al.*, 1997). Sin embargo, estudios recientes muestran una gran abundancia de Actinobacterias en ecosistemas acuáticos, y concretamente en lagunas y humedales (Glockner *et al.*, 2000; Hahn, 2006). Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que las Actinobacterias son el quinto filo en abundancia en el conjunto de los distintos ambientes analizados (Figura 57).

Los organismos de este filo desempeñan un importante papel en la degradación de materia orgánica, como celulosa y quitina y por tanto, en el ciclo del carbono.

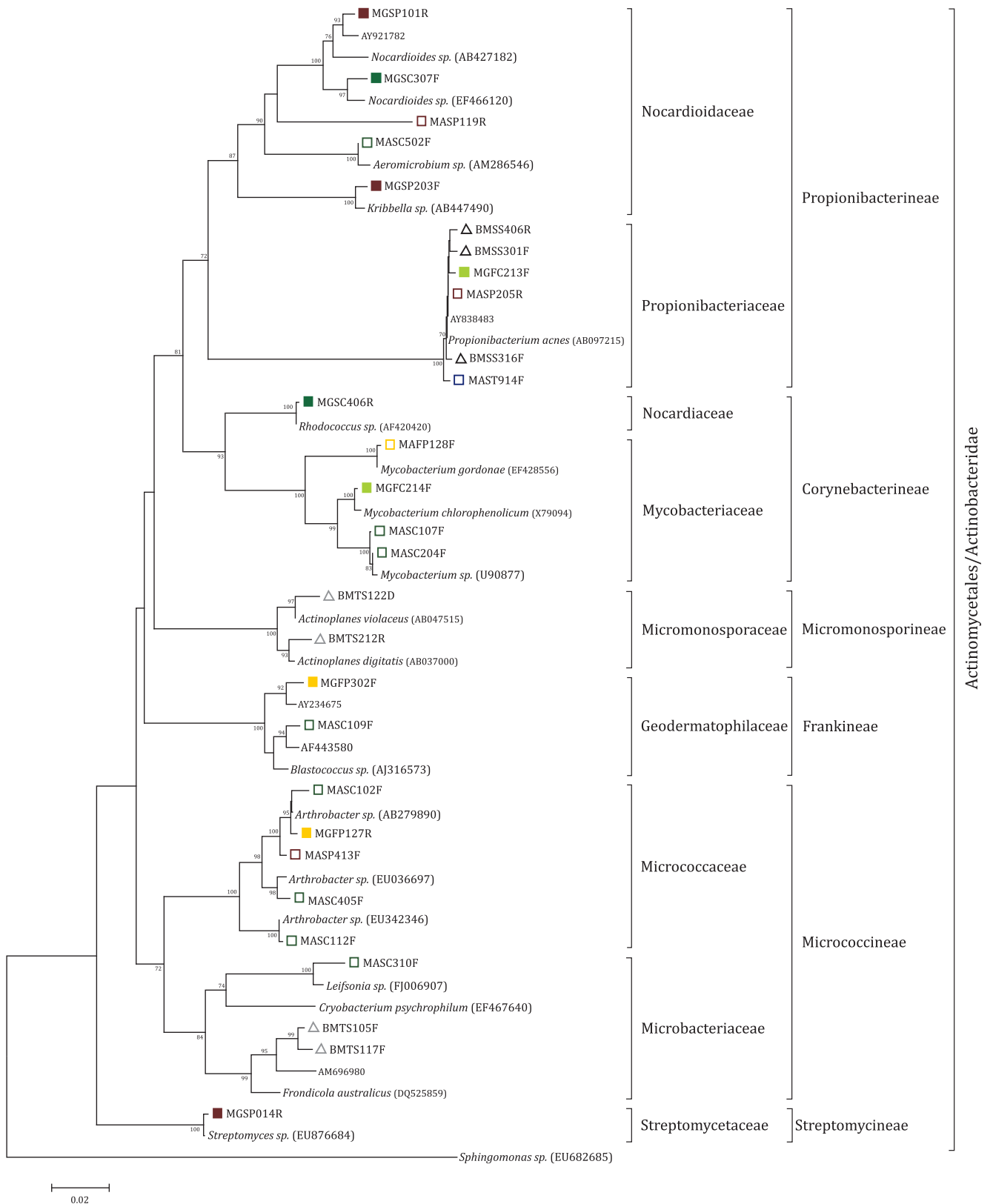


Figura 57. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al filo Actinobacteria, procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas, así como las secuencias de bacterias más similares obtenidas del GenBank. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. La raíz del árbol se ha situado en *Sphingomonas sp.* incluida como outgroup.

## Filo Firmicutes

Los Firmicutes son bacterias gram positivas de bajo contenido en CG, característica que las diferencia de las bacterias de filo Actinobacteria. Se trata de un grupo muy diverso, ubicuos y especialmente relevantes en suelos y ambientes anaerobios (Roselló y Antón, 2009).

Este filo se divide en tres clases, Bacilli, Clostridia y Mollicutes, si bien en este trabajo se han identificado bacterias únicamente afiliadas a las clases Bacilli, con organismos aerobios o aerobios facultativos, presentes en el sistema de tratamiento a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial, y Clostridia, que engloba bacterias anaerobias, encontradas fundamentalmente en los sedimentos de la laguna de micrótinos del sistema a escala real para el tratamiento de agua residual urbana (Figura 58).

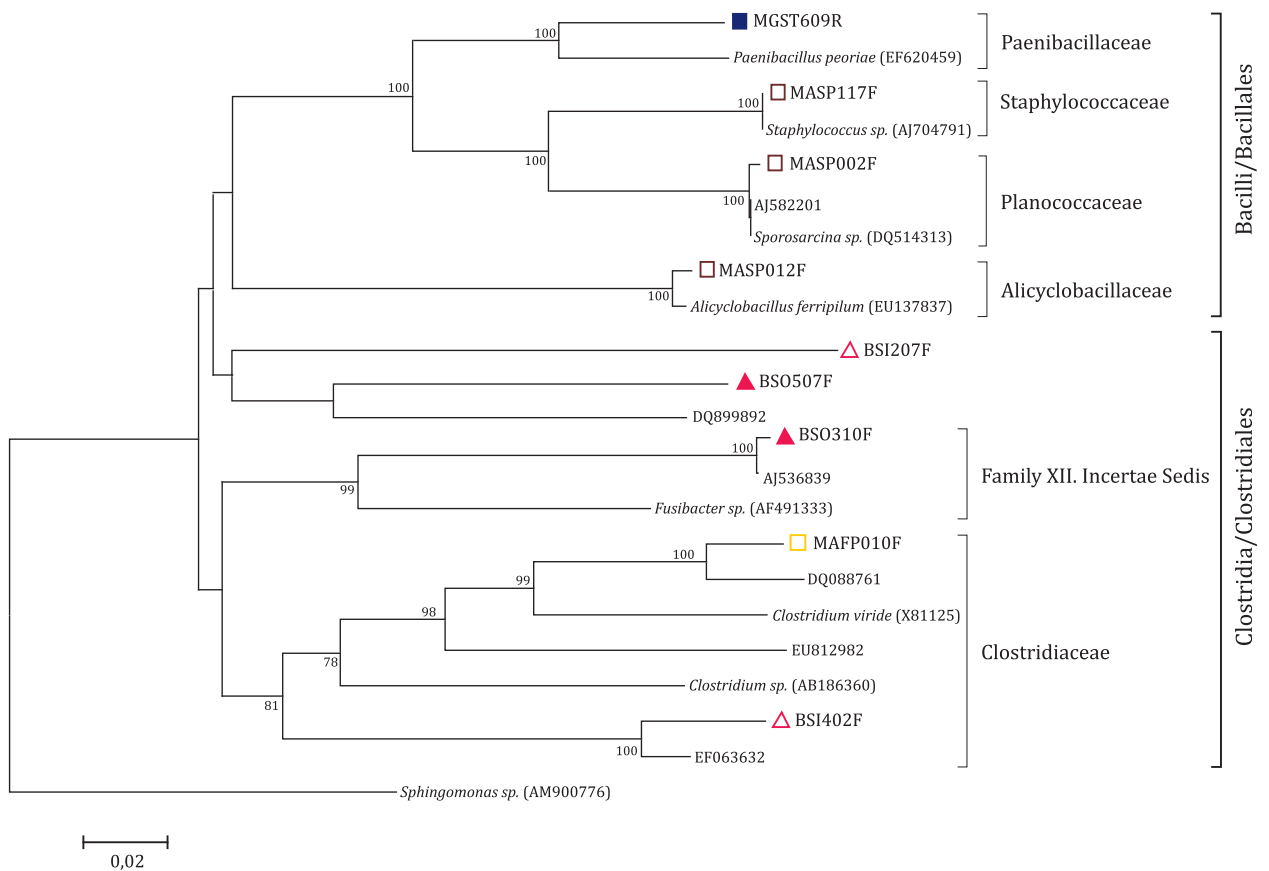


Figura 58. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al filo Firmicutes, procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas, así como las secuencias de bacterias más similares obtenidas del GenBank. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. La raíz del árbol se ha situado en *Sphingomonas sp.* incluida como outgroup.

## Filo Cyanobacterias

Filo muy homogéneo metabólicamente, está formado por organismos fotosintéticos oxigénicos obligados y autótrofos. Ocupan ambientes muy diversos, fundamentalmente aguas dulces o saladas, pero también están presentes en suelos, e incluso en ambientes extremos como desiertos.

En este trabajo se han encontrado bacterias afiliadas al filo Cyanobacteria principalmente en el tratamiento sin vegetación, con arlita o grava como sustrato, y flujo superficial (MAFC y MGFC), en la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial, de forma que la comunidad de bacterias de ambos tratamientos está dominada en cuanto a abundancia por bacterias de este filo, y siendo además éstas muy semejantes entre sí (Figura 59).

A este filo se atribuye el origen del organismo que por endosimbiosis dio lugar a los cloroplastos (Roselló y Antón, 2009). En este trabajo, una fracción de los clones obtenidos en los diferentes ambientes analizados, se ha identificado como portadores de cloroplastos (ver Figura 26).

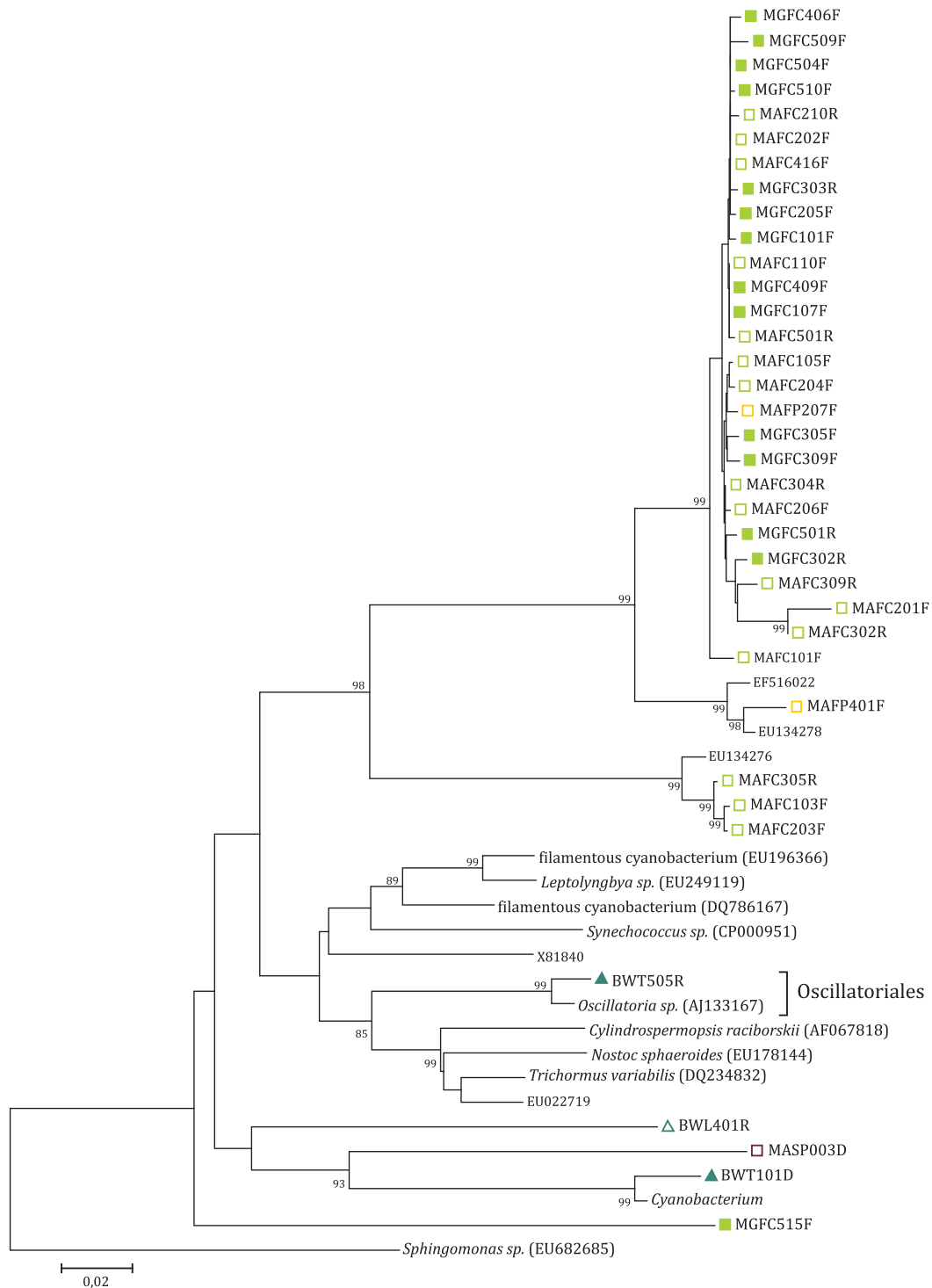


Figura 59. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al filo Cyanobacteria. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. La raíz se ha situado en *Sphingomonas sp.* incluida como outgroup.

### **Filo Chloroflexi**

Afiliadas al filo Chloroflexi se han identificado en este estudio bacterias de las clases Dehalococcoidetes y Chloroflexi, así como un tercer grupo de bacterias de este filo sin clasificar.

La clase Dehalococcoidetes, con un único género Dehalococcoides, agrupa organismos especializados en un nicho fisiológico particular; la detoxificación de compuestos, como compuestos orgánicos clorados, difíciles de degradar por otras vías. De forma, que algunas cepas de Dehalococcoides parecen estar particularmente adaptadas a la degradación completa de tetracloroetileno (PCE), tetracloroetano (TCE), cis-dicloroetileno (cis-DCE) y cloruro de vinilo a etileno (Lu et al., 2006). La mayor parte de los Dehalococcoides identificados en este trabajo, se han encontrado en los tratamientos con *Phragmites australis* de la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial (MAFP, MGFP, MASP, MGSP) y de manera minoritaria distribuidos en los distintos ambientes del sistema a escala real para el tratamiento de agua residual urbana (Figura 60).

Bacterias fotótrofas de la clase Chloroflexi, orden Chloroflexales, se han identificado en el agua de la laguna de micrófitos (BWL) así como en la rizosfera de *Salix atrocinerea* (BMSS), si bien se trata de una pequeña representación. Este grupo de bacterias, tradicionalmente conocidas como bacterias verdes no del azufre, agrupa individuos filamentosos anoxigénicos y fotótrofos (Hanada y Pierson, 2006).

### **Filo Planctomycetes**

Se trata de un filo de amplia distribución tanto en ambientes acuáticos como en suelos. Algunos estudios relacionan la presencia de planctomycetes con ambientes eutrofizados y contaminados, así como una mayor abundancia de los mismos con altos valores de pH (6,8-9,4), alta conductividad, y temperaturas más cálidas (Ward et al., 2006).

Se conoce todavía poco del papel que estas bacterias desempeñan en los ciclos ambientales. La fisiología y metabolismo de los planctomycetes es poco conocido, de forma que todos los planctomycetes para los que se ha conseguido obtener un cultivo puro, son quimioheterótrofos, tanto aerobios estrictos como anaerobios facultativos, aunque se conoce que hay representantes quimioorganótrofos que realizan una oxidación anaerobia del amonio, proceso de gran relevancia ecológica y conocido como Anammox (Ward et al., 2006).

En este trabajo se han identificado bacterias afiliadas al filo Planctomycetes en el sistema de tratamiento a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial, y concretamente en tratamientos con *Phragmites australis* (MAFP, MGFP, MGSP) y tratamientos control (MAFC, MGFC, MGSC). Destaca la presencia de dos bacterias (MGFP125F y MGFP403R) identificadas como posibles anammox ya que mediante la búsqueda en el GenBank de secuencias más similares con el algoritmo BLASTN, las secuencias encontradas han correspondido a secuencias de organismos anammox sin cultivar (Figura 61).



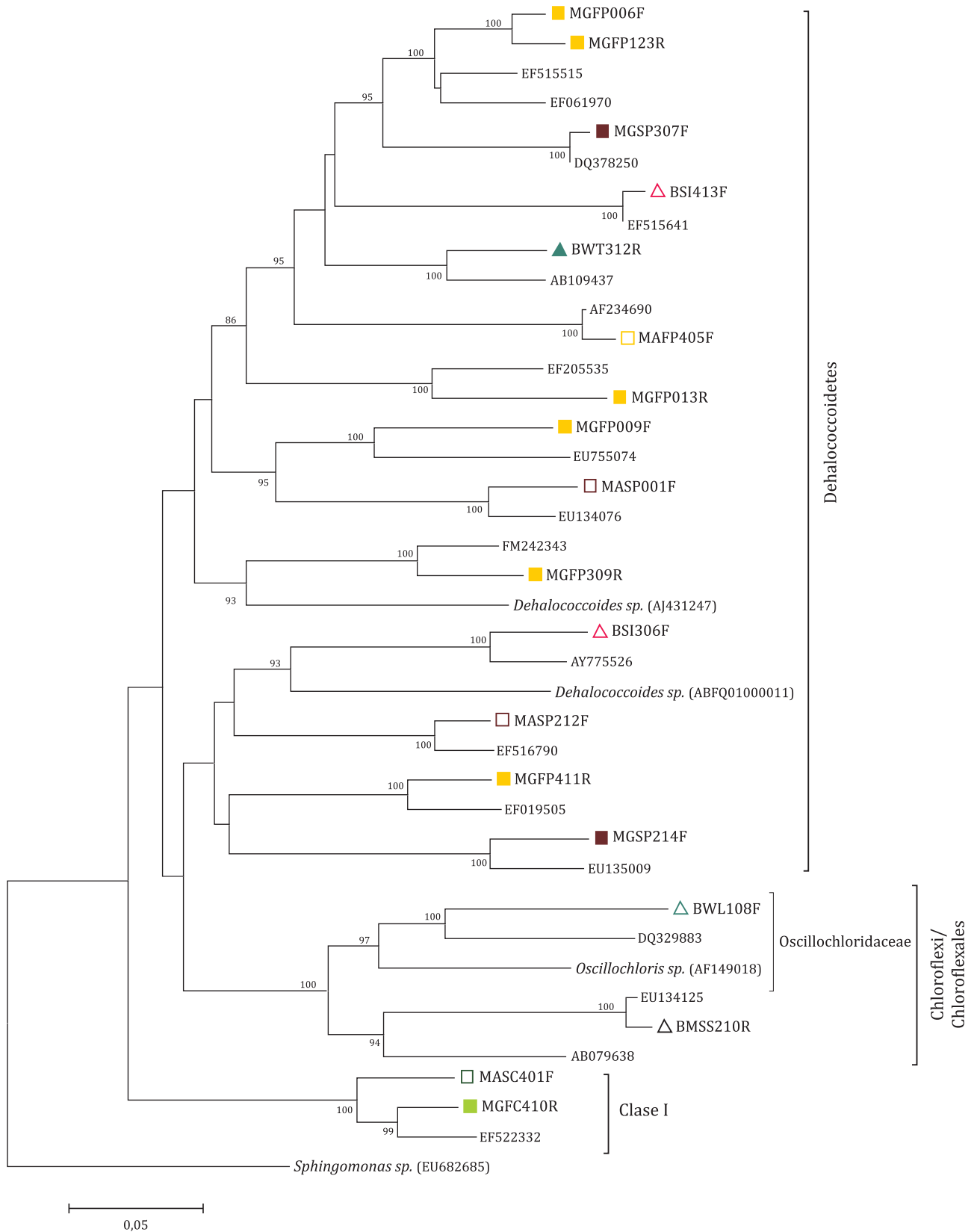


Figura 60. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al filo Chloroflexi procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas, así como las secuencias de bacterias más similares obtenidas del GenBank. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. La raíz del árbol se ha situado en *Sphingomonas sp.* incluida como outgroup.

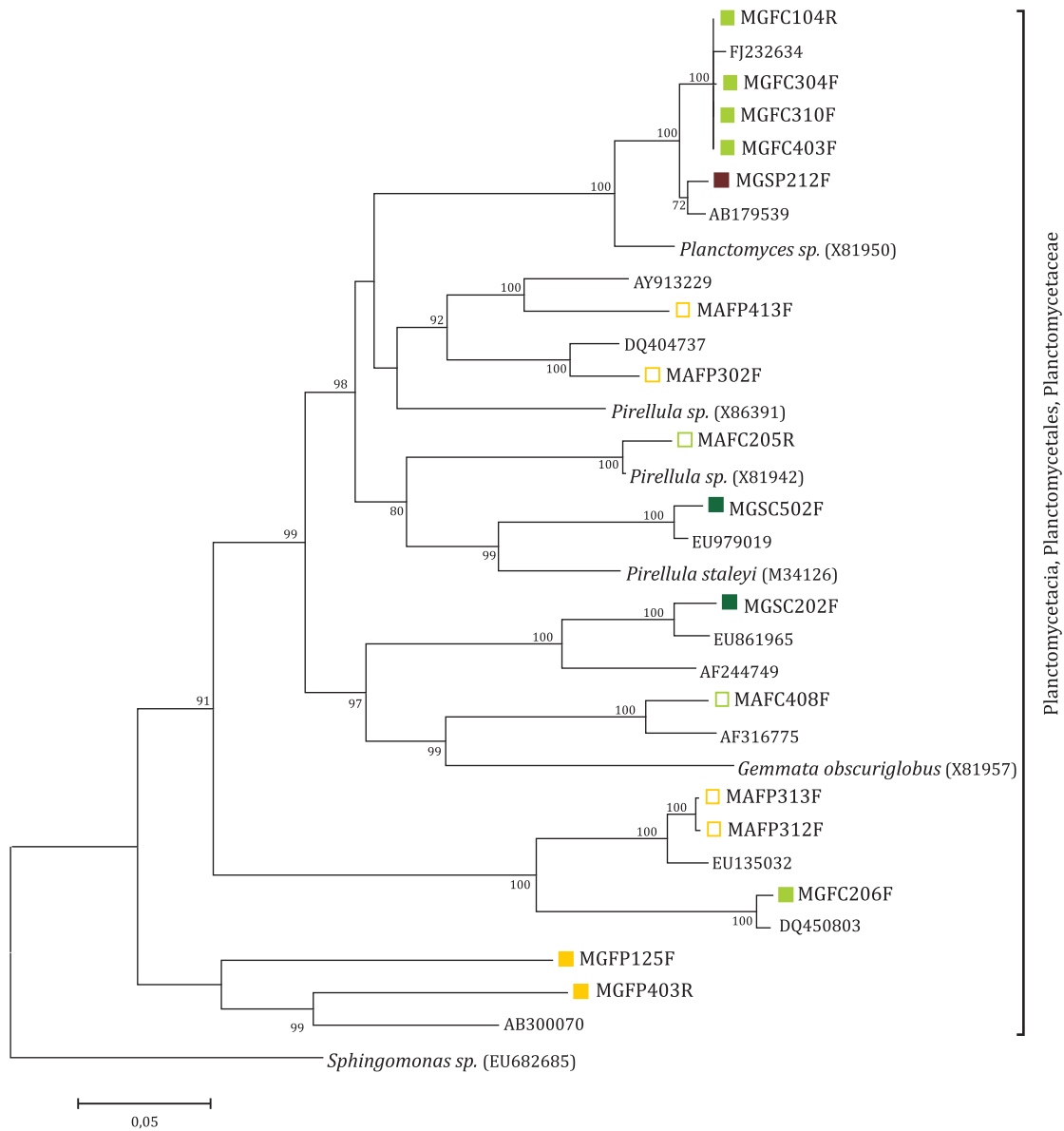


Figura 61. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al filo Planctomycetes procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas, así como las secuencias de bacterias más similares obtenidas del GenBank. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. La raíz del árbol se ha situado en *Spingomonas sp.* incluida como outgroup.

## Filo Verrucomicrobia

Verrucomicrobia es un filo de reciente creación (Garrity y Holt, 2001), que engloba varias especies ambientales, así como un pequeño número de especies cultivadas agrupadas en cuatro géneros distintos, y del que se tiene un escaso conocimiento, limitado a las pocas especies cultivables que han sido caracterizadas (Schlesner et al., 2006).

Las técnicas moleculares están permitiendo ampliar el conocimiento de este filo, de forma que en cuanto a su ecología, parece que su distribución es ubicuista, estando presentes en un amplio rango de ecosistemas acuáticos y terrestres, siendo en muchas ocasiones ambientes eutróficos o incluso fuertemente contaminados (Schlesner et al., 2006). Dentro de este filo hay bacterias estrictamente aerobias, anaerobias facultativas, y estrictamente anaerobias.

Un pequeño número de bacterias del filo Verrucomicrobia se ha identificado en este estudio en las dos plantas de tratamiento de depuración de agua residual. En la instalación piloto para la depuración de agua residual industrial, sólo se han encontrado en tratamientos con *Phragmites australis* (MGFP y MGSP), mientras que en el sistema para la depuración de agua residual urbana están presentes principalmente formando parte de las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de *Typha latifolia* (BMTS y BMTW) (Figura 62).

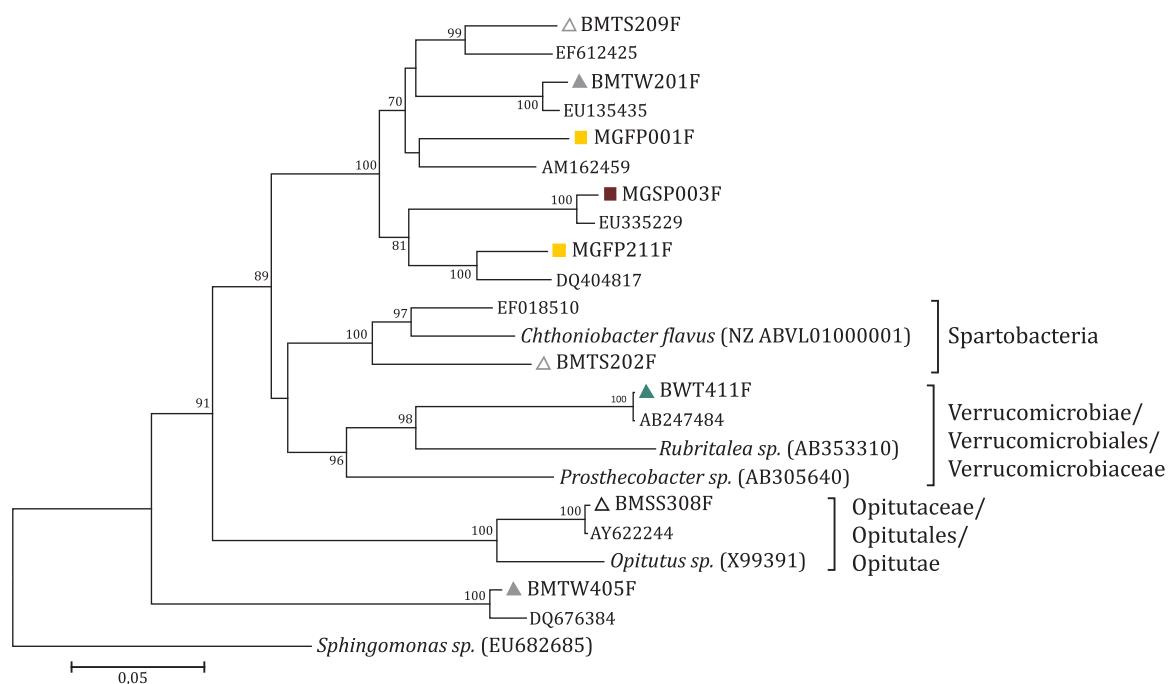


Figura 62. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al filo Verrucomicrobia, procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas, así como las secuencias de bacterias más similares obtenidas del GenBank. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. La raíz del árbol se ha situado en *Sphingomonas* sp. incluida como outgroup.

## Filo Nitrospirae

Este filo de bacterias está formado por individuos de una única familia (Nitrospiraceae) así como otras bacterias sin clasificar (muestras ambientales).

Bacterias del filo Nitrospirae, familia Nitrospiraceae, han sido identificadas formando parte de las comunidades de bacterias de los tratamientos sin vegetación (MGFC y MGSC) y en el tratamiento con *Phragmites australis* (MASP) de la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial, así como en la comunidad de bacterias asociada a la rizosfera de *Typha latifolia* en la planta para el tratamiento de agua residual urbana (BMTS) (Figura 63).

Se trata de bacterias nitrificantes que llevan a cabo la oxidación de nitrito a nitrato, por lo que desempeñan un papel muy importante en la eliminación de nitrógeno en aguas residuales.

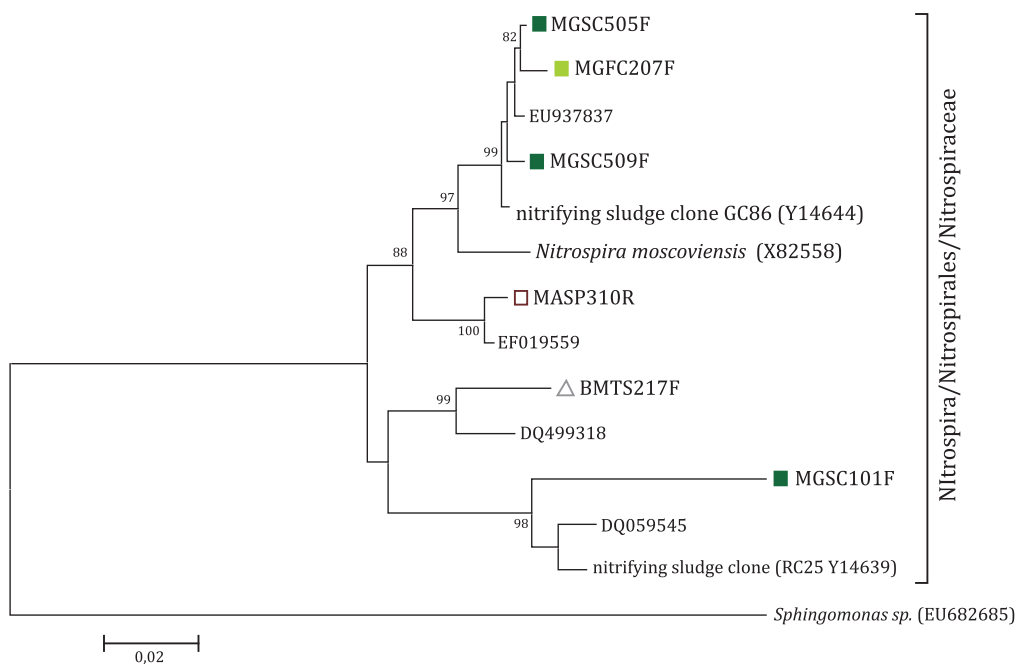


Figura 63. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al filo Nitrospirae, procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas, así como las secuencias de bacterias más similares obtenidas del GenBank. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. La raíz del árbol se ha situado en *Sphingomonas* sp. incluida como outgroup.

## Filo Gemmatimonadetes

Filo de reciente creación ya que fue en el año 2003 cuando Zhang et al. (2003) describieron la bacteria *Gemmatimonas aurantiaca*, y con ella el filo Gemmatimonadetes, previamente propuesto por Hugenholtz et al. (2001) en base a secuencias sin identificar. La bacteria aerobia *Gemmatimonas aurantiaca* fue aislada en el fango de un reactor biológico aerobio-anaerobio para la eliminación de fósforo.

Se han identificado bacterias de este filo en las comunidades de la planta para el tratamiento de agua residual industrial, así como un único individuo en la comunidad de bacterias presente en el sedimento de la laguna de micrófitos (BSO) del sistema para el tratamiento de agua residual urbana (Figura 64).

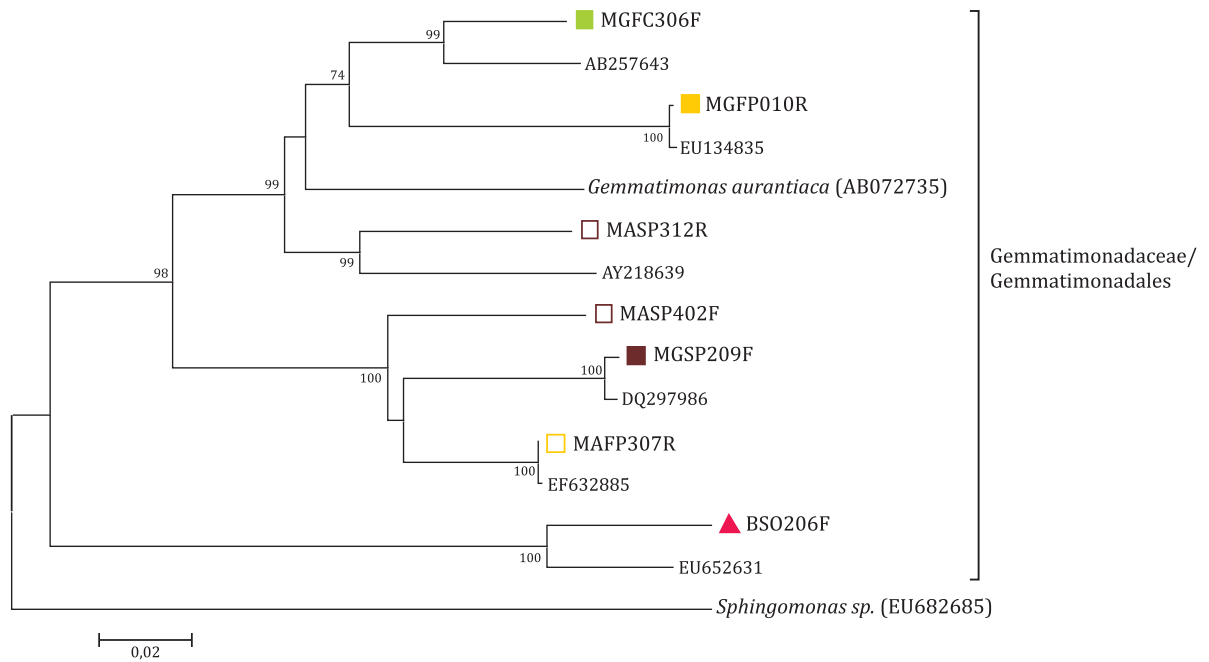


Figura 64. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al filo Gemmatimonadetes, procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas, así como las secuencias de bacterias más similares obtenidas del GenBank. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. La raíz del árbol se ha situado en *Sphingomonas sp.* incluida como outgroup.

### Filo Synergistetes

Grupo de bacterias anaerobias ampliamente distribuido en diferentes ambientes, si bien su presencia en las comunidades de bacterias es generalmente muy minoritaria. El filo presenta una alta diversidad fisiológica y bioquímica, siendo capaces todos los individuos cultivados de degradar aminoácidos (Vartoukian et al., 2007). Su presencia en el tracto digestivo del hombre es frecuente y generalmente asociada a la aparición de diferentes enfermedades como la enfermedad periodontal.

Dos bacterias de este filo se han identificado en las comunidades presentes en el sedimento de la laguna de micrófitos (BSI y BSO) de la planta piloto para el tratamiento de agua residual urbana (Figura 65).

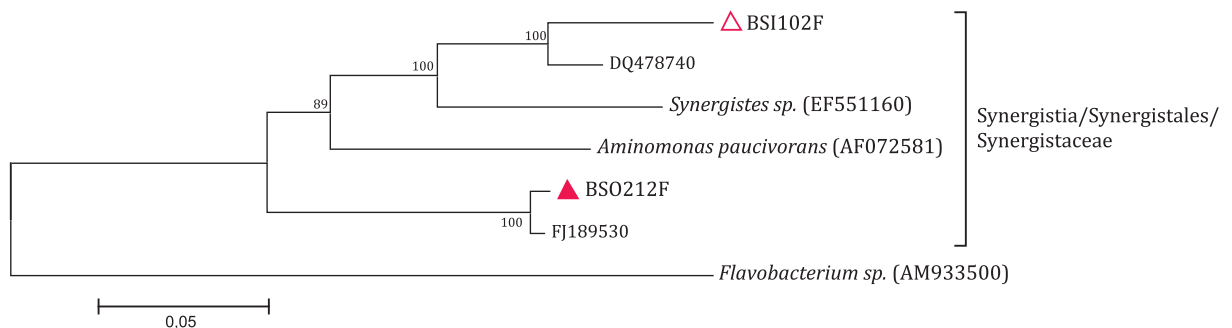


Figura 65. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al filo Synergistetes, procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas, así como las secuencias de bacterias más similares obtenidas del GenBank. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. La raíz del árbol se ha situado en *Flavobacterium sp.* incluida como outgroup.

## Filo Spirochaetes

Spirochaetes constituye un filo muy homogéneo desde el punto de vista morfológico y de estructura celular. Incluye bacterias de vida libre en sedimentos y ambientes acuáticos como comensales y parásitos de animales (Roselló y Antón, 2009).

En este estudio se han identificado Spirochaetes del género *Spirochaeta* principalmente en los sedimentos de la laguna de micrófitos del sistema de tratamiento de agua residual urbana (BSI y BSO) (Figura 64). Este género incluye bacterias anaerobias y anaerobias facultativas presentes en ecosistemas acuáticos (Leschine *et al.*, 2006).

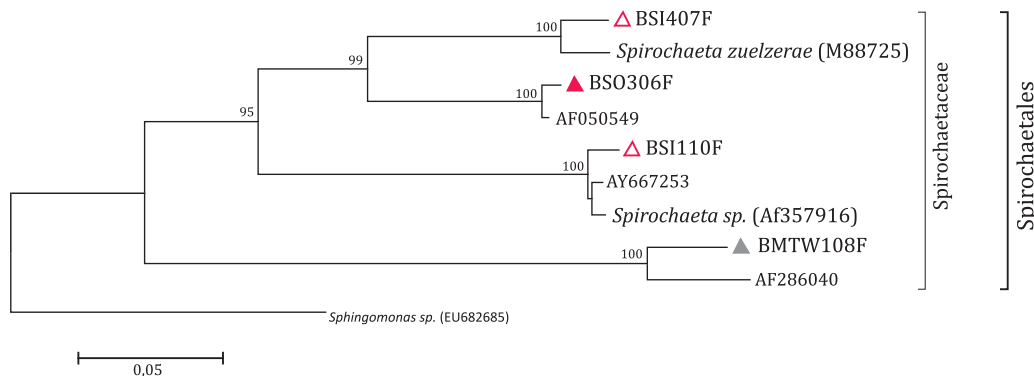


Figura 66. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas al filo Spirochaetes, procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas, así como las secuencias de bacterias más similares obtenidas del GenBank. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. La raíz del árbol se ha situado en *Spingomonas sp.* incluida como outgroup.

## Otros filios y bacterias sin clasificar

La aplicación de las técnicas moleculares, y en concreto la secuenciación del gen rRNA 16S, al estudio de las comunidades de bacterias procedentes de muestras de todo tipo de ambientes, han permitido identificar gran cantidad de nuevas bacterias pertenecientes a grupos filogenéticos no descritos (Harris *et al.*, 2004). Estas divisiones o clados, para los que no hay ningún representante cultivado, se denominan generalmente como “candidate divisions” para indicar así el escaso conocimiento que se tiene de las mismas (Lane, 1994).

En este trabajo se han clasificado bacterias afiliadas a distintas divisiones sin ningún representante cultivado (Candidate division TM6, Candidate division TM7, OP11, OD1, WS3, WS6, Termite group 1), la mayor parte de las cuales proceden de las comunidades de bacterias presentes en los sedimentos de la laguna de micrófitos del sistema para el tratamiento de agua residual urbana (BSI y BSO) (Figura 65).

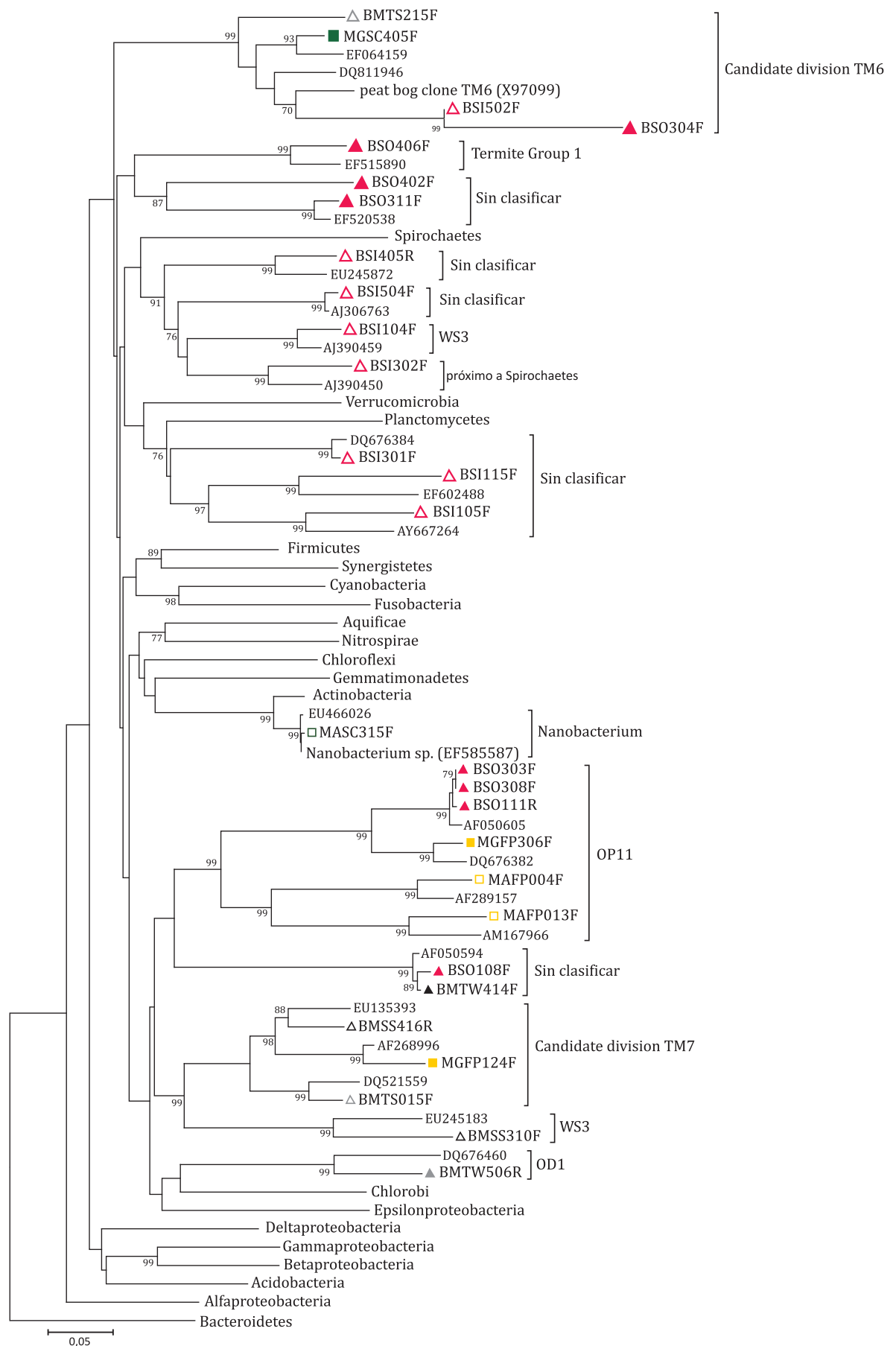


Figura 67. Árbol filogenético de las secuencias afiliadas a filos sin individuos cultivados así como secuencias sin afiliación definida, procedentes de las comunidades de bacterias estudiadas, así como las secuencias de bacterias más similares obtenidas del GenBank. Se ha incorporado una secuencia de cada uno de los filos identificados en este trabajo. El árbol se ha construido de acuerdo con el algoritmo Neighbour-Joining. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) superiores al 70% se indican en los nodos. La raíz del árbol se ha situado arbitrariamente en el filo Bacteroidetes.

### 3.1.2. Composición de las comunidades de bacterias en la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial

Se ha realizado un análisis de correspondencias que ha permitido elaborar un mapa perceptual de las categorías de las variables analizadas (tratamientos de la planta piloto y abundancia de cada taxón) en un espacio de dos dimensiones. Los dos primeros ejes permiten explicar casi la mitad de la varianza (46,8%), mientras que el resto de ejes recogen porcentajes relativamente bajos, por ello gráficamente se muestra sólo el biplot con los dos primeros ejes (Figura 68 y Tabla 42). Los resultados permiten identificar dos gradientes, uno que separa las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de *Typha latifolia*, y un segundo gradiente que diferencia las comunidades asociadas a la rizosfera de *Phragmites australis*. Este segundo eje diferencia también, aunque de forma menos intensa, las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de *Phragmites australis* así como las de los tratamientos control en función del tipo de flujo hidráulico. La mayor o menor distancia entre los puntos del gráfico refleja relaciones de dependencia y semejanza más o menos fuertes entre las categorías, de manera que las comunidades asociadas a la rizosfera de *Typha latifolia* son más semejantes entre sí que las comunidades de los tratamientos control y las asociadas a la rizosfera de *Phragmites australis*, ya que en cada uno de estos dos conjuntos de tratamientos las comunidades presentan una mayor relación de dependencia en función del tipo de flujo hidráulico.

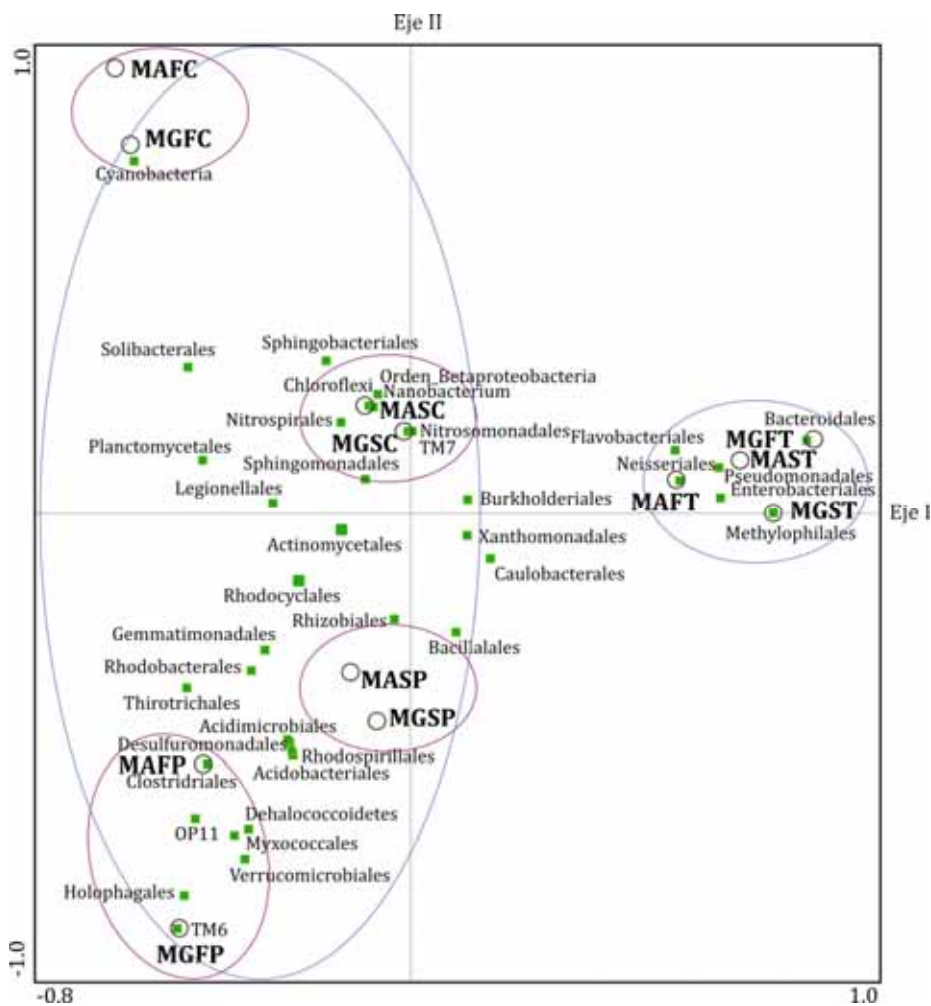


Figura 68. Biplot del análisis de correspondencias realizado para las comunidades de bacterias de la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial, indicadas con un círculo, y los distintos taxones (órdenes) separados por el eje I con línea azul, las separadas por el eje II con línea morada.



Tabla 42. Resultados obtenidos en el análisis de correspondencias realizado para las comunidades de bacterias presentes en la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial y los taxones, a nivel de orden, identificados. Se presenta la varianza explicada por todos los ejes o dimensiones.

Eje	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
Varianza explicada (%)	27,2	19,6	12,7	11,2	8,3	6,0	5,41	3,5	2,7	2,2	1,3

### Tratamientos control, sin vegetación

Las cyanobacterias, organismos fotosintéticos oxigénicos obligados y autótrofos, han sido el filo dominante en abundancia en la comunidad de bacterias asociadas al sustrato de los tratamientos control con flujo superficial (MAFC y MGFC). En los tratamientos con flujo subsuperficial (MASC y MGSC) la comunidad ha estado dominada por bacterias con metabolismos diversos del orden Burkholderiales (Betaproteobacterias) y del orden Sphingobacteriales (Bacteroidetes), estas últimas también frecuentes en los tratamientos con flujo superficial (Tabla 43 y Figura 68).

Tabla 43. Número de secuencias obtenidas y su afiliación a nivel de filo, clase y orden, en las comunidades de bacterias presentes en los tratamientos control (sin vegetación). Consultar Tabla 6 para más información.

Filo	Clase	Orden	MAFC	MGFC	MASC	MGSC
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	-	-	-	1
	Solibacteres	Solibacterales	5	-	-	1
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	-	2	8	2
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	-	-	1	2
	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	7	7	10	8
Candidate division TM6			-	-	-	1
Chlorflexi	Clase I		-	-	1	-
	Clase II		-	1	-	-
Cyanobacteria			16	14	-	-
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	-	1	-	-
Nanobacterium			-	-	1	-
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	-	1	-	3
Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	2	5	-	2
Proteobacteria	Alfaproteobacteria	Caulobacterales	-	1	2	-
		Rhizobiales	1	-	2	7
		Rhodobacterales	1	-	-	-
		Sphingomonadales	7	3	9	5
		Betaproteobacteria	Burkholderiales	4	2	11
		Nitrosomonadales	-	-	-	2
		Orden II	-	-	2	-
		Rhodocyclales	1	2	1	-
	Gammaproteobacteria	Legionellales	-	1	-	1
		Pseudomonadales	-	-	-	3
		Thiotrichales	-	1	-	-
		Xanthomonadales	-	2	-	-
	Sin clasificar			-	1	2

### Tratamientos plantados con *Typha latifolia*

En los cuatro tratamientos, la comunidad de bacterias asociada a la rizosfera de *Typha latifolia* está dominada en cuanto a abundancia por la clase Gammaproteobacteria. Dentro de esta clase se diferencian los tratamientos con flujo superficial (MAFT y MGFT), con un mayor número de bacterias afiliadas al orden Pseudomonadales con bacterias de metabolismo heterogéneo, de los tratamientos con flujo subsuperficial (MAST y MGST), en los que el número más alto de bacterias se encuentra en el orden Enterobacteriales (Tabla 44 y Figura 68).

Tabla 44. Número de secuencias obtenidas y su afiliación a nivel de filo, clase y orden, en las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de *Typha latifolia* en los tratamientos de la planta piloto a pequeña escala. Consultar Tabla 6 para más información.

Filo	Clase	Orden	MAFT	MGFT	MAST	MGST	
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	-	-	1	-	
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	-	-	1	-	
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	-	1	-	-	
	Flavobacteria	Flavobacteriales	5	6	-	-	
	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	1	1	3	-	
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	-	-	-	1	
Proteobacteria	Alfaproteobacteria	Caulobacterales	1	2	-	3	
		Rhizobiales	5	1	1	3	
		Rhodobacterales	1	-	-	-	
		Sphingomonadales	5	-	3	2	
		Betaproteobacteria	Burkholderiales	10	7	2	6
		Methylophilales	-	-	-	2	
		Neisseriales	1	-	-	-	
		Rhodocyclales	1	1	-	-	
		Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	4	6	15	14
	Pseudomonadales		13	16	3	5	
	Xanthomonadales		2	2	-	1	

### Tratamientos plantados con *Phragmites australis*

En los tratamientos con sustrato de arlita (MAFP y MASP), la comunidad de bacterias asociada a la rizosfera de *Phragmites australis* está dominada en cuanto a abundancia, por bacterias de la clase Alfaproteobacteria, orden Rhizobiales. En el tratamiento con sustrato de grava y flujo superficial (MGFP), ha sido de nuevo el filo Proteobacteria, el más abundante, si bien a nivel de clase y orden, no se identifica ningún taxón dominante. Mientras que en la comunidad de bacterias en el tratamiento con sustrato de grava y flujo subsuperficial (MGSP) los ordenes Rhizobiales y Burkholderiales, de las clases Alfa y Betaproteobacteria respectivamente, han sido los más abundantes (Tabla 45 y Figura 68).

Tabla 45. Número de secuencias obtenidas y su afiliación a nivel de filo, clase y orden, en las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de *Phragmites australis* en los tratamientos de la planta piloto a pequeña escala. Consultar Tabla 6 para más información.

Filo	Clase	Orden	MAFP	MGFP	MASP	MGSP
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	4	5	2	3
	Holophagae	Holphagales	1	4	-	-
	Solibacteres	Solibacterales	-	2	1	-
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	1	2	3	3
		Acidimicrobiales	1	-	-	1
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	2	1	1	1
Candidate division TM7			-	1	-	-
Chlorflexi	Dehalococcoidetes		1	6	2	2
Cyanobacteria			2	-	1	-
Fibrobacter			-	1	-	-
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	-	-	3	-
	Clostridia	Clostridiales	1	-	-	-
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	1	1	2	1
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	-	-	1	-
OP11			2	1	-	
Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	4	2	-	1
Proteobacteria	Alfaproteobacteria	Caulobacterales	1	1	1	3
		Rhizobiales	10	2	13	9
		Rhodobacterales	3	2	-	-
		Rhodospirillales	2	2	4	2
		Sphingomonadales	4	3	8	3
	Betaproteobacteria	Burkholderiales	2	4	3	10
		Rhodocyclales	1	4	1	1
		Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	-	-	2
	Legionellales		1	-	1	-
	Pseudomonadales		-	-	1	-
	Thiotrichales		4	1	-	-
	Xanthomonadales		1	-	1	4
	Deltaproteobacteria	Orden I	-	1	-	-
		Myxococcales	1	2	-	1
		Desulfuromonadales	1	-	-	-
Verrucomicrobia			-	2	-	1

### 3.1.3. Composición de las comunidades de bacterias en la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual urbana

El análisis de correspondencias realizado se muestra de forma gráfica en el siguiente biplot (Figura 69). Los dos primeros ejes (eje I y eje II) han explicado un porcentaje de la varianza de 31% y 17,3% respectivamente, lo que supone que entre ambos ejes se recoge casi la mitad de la varianza de los datos. El tercer eje explica un porcentaje de varianza casi igual al segundo eje (16,9%) (Tabla 46).

El resultado permite identificar un gradiente principal marcado por el eje I que separa las comunidades de bacterias del sedimento de la laguna de micrófitos, bacterias principalmente anaerobias, del resto de comunidades. El segundo eje diferencia las comunidades de bacterias del agua, las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de la vegetación en invierno y estas mismas comunidades en verano.

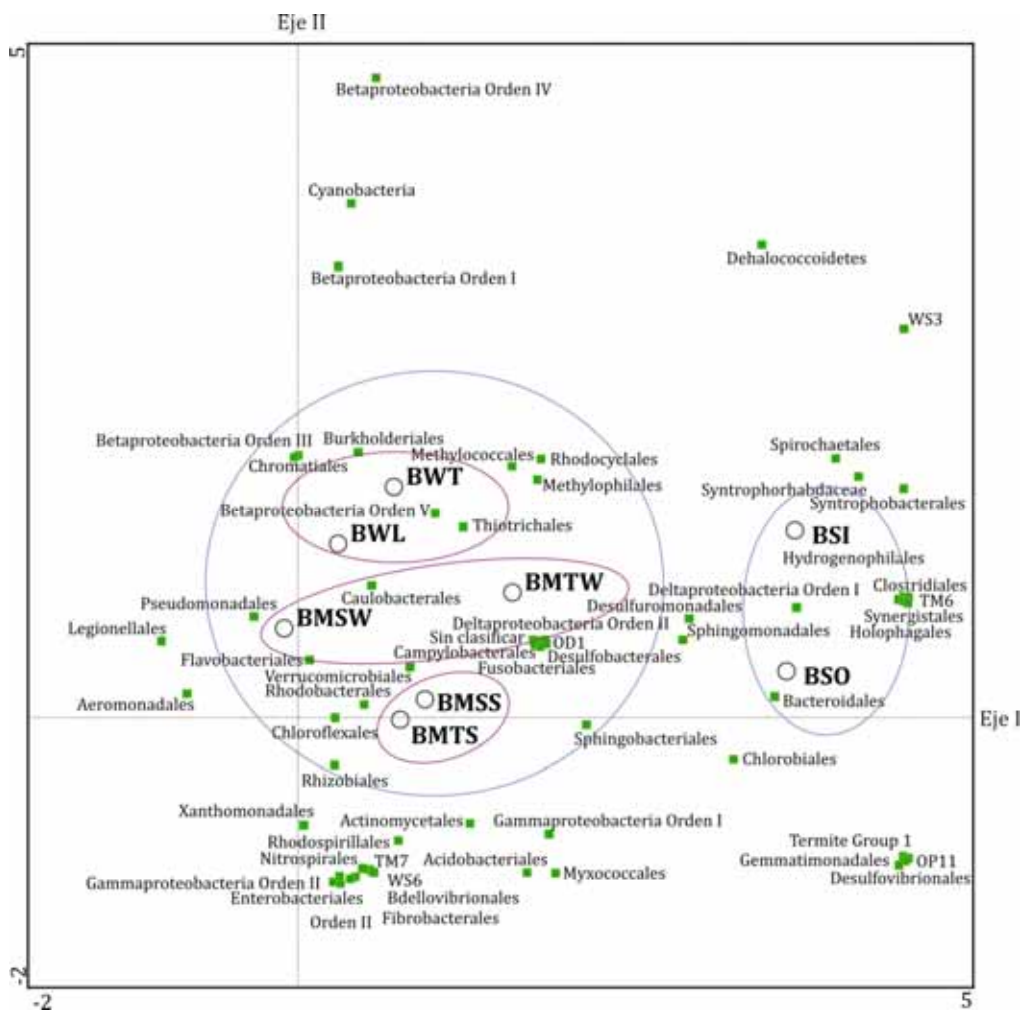


Figura 69. Biplot con los ejes I y II del análisis de correspondencias. Se indican con un círculo las distintas comunidades de bacterias estudiadas y con un cuadrado verde los taxones a nivel de orden identificados. Se han señalado las agrupaciones separadas por el eje I con línea azul, las separadas por el eje II con línea morada.

Tabla 46. Resultados obtenidos en el análisis de correspondencias realizado para las comunidades de bacterias presentes en la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial y los taxones, a nivel de orden, identificados. Se presenta la varianza explicada por todos los ejes o dimensiones.

Eje	I	II	III	IV	V	VI	VII
Varianza explicada (%)	31,0	17,3	16,9	11,1	9,9	8,6	5,2

#### Comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de *Typha latifolia* y *Salix atrocinerea*

Estas comunidades de bacterias están dominadas, en cuanto a abundancia, por bacterias afiliadas al filo Proteobacteria. Dentro de este filo, bacterias de la clase Alfabroteobacteria, orden Rhodospirillales, han dominado la comunidad asociada a la rizosfera de *Salix* en el muestreo realizado a finales de verano (BMSS), mientras que a finales de invierno esta comunidad (BMSW) ha presentado una clara dominancia de bacterias afiliadas a la clase Gammaproteobacteria, orden Pseudomonadales. En el caso de la rizosfera de *atrocinerea Typha latifolia*, las comunidades asociadas a la misma, han estado dominadas en verano (BMTS) por bacterias de la clase Gammaproteobacteria, orden Pseudomonadales, y de la clase Betaproteobacteria, orden Burkholderiales, mientras que a finales del invierno (BMTW), el taxón más abundante ha sido Betaproteobacteria, con los ordenes Rhodocyclales en primer lugar, y Burkholderiales en segundo lugar (Tabla 47 y Figura 69).

Tabla 47. Número de secuencias obtenidas y su afiliación en las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de *Typha latifolia* a finales de verano y de invierno (BMTS y BMTW) y a la rizosfera de *Salix atrocinerea* a finales de verano y de invierno (BMSS y BMSW).

Filo	Clase	Orden	BMTS	BMTW	BMSS	BMSW	
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	2	-	2	-	
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	4	-	3	-	
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	1	3	-	-	
	Flavobacteria	Flavobacteriales	5	2	4	7	
	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	1	6	3	1	
Candidate division TM7			1	-	1	-	
Chlorobi	Chlorobia	Chlorobiales	-	1	-	-	
Chlorflexi	Chloroflexi	Chloroflexales	-	-	1	-	
Fibrobacter			-	-	1	-	
Fusobacteria	Fusobacteria	Fusobacteriales	-	1	-	-	
Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	1	-	-	-	
OD1			-	1	-	-	
Proteobacteria	Alfaproteobacteria	Caulobacterales	-	-	2	-	
		Rhizobiales	3	-	3	1	
		Rhodobacterales	1	-	2	-	
		Rhodospirillales	-	1	6	-	
		Sphingomonadales	2	-	-	-	
		Orden I	-	1	-	-	
	Betaproteobacteria	Burkholderiales	6	7	4	5	
		Methylophilales	-	-	-	2	
		Rhodocyclales	-	9	3	1	
		Orden V	-	1	-	-	
		Gammaproteobacteria	Aeromonadales	1	-	-	6
			Enterobacteriales	4	-	2	-
	Legionellales		-	-	-	1	
	Methylococcales		1	1	-	1	
	Pseudomonadales		6	2	2	23	
	Thiotrichales		-	-	4	1	
	Xanthomonadales		2	-	1	1	
	Orden I		3	1	-	-	
	Orden II		1	-	-	-	
	Deltaproteobacteria		Bdellovibrionales	-	-	1	-
		Desulfobacterales	-	4	-	-	
		Desulfuromonadales	-	-	1	-	
		Myxococcales	2		1	-	
		Syntrophobacteriales	-	1	-	-	
		Orden I	-	-	1	-	
		Orden II	1	-	-	-	
		Epsilonproteobacteria	Campylobacteriales	-	4	-	-
Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales	-	1	-	-	
Verrucomicrobia	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiales	2	2	1	-	
WS6			-	-	1	-	
Sin clasificar			-	1	-	-	

## Comunidades de bacterias en el sedimento de la laguna de micrófitos

A nivel de clase, Deltaproteobacteria (filo Proteobacteria) ha sido el taxón con mayor número de bacterias afiliadas en ambas comunidades. Sin embargo, a nivel de orden, la comunidad de bacterias presente en el sedimento de la laguna de micrófitos en la zona de salida de agua residual de la misma (BSO) ha estado dominada por bacterias del orden Bacteroidales, clase Bacteroidia. En la zona de entrada de agua residual a la laguna, la comunidad de bacterias (BSI) ha presentado una mayor abundancia de bacterias del orden Syntrophobacterales, clase Deltaproteobacteria (Tabla 48 y Figura 69).

Tabla 48. Número de secuencias obtenidas y su afiliación a nivel de filo, clase y orden, en las comunidades de bacterias en el sedimento de la laguna de micrófitos en la zona de entrada de agua residual (BSI) y en la zona de salida (BSO).

Filo	Clase	Orden	BSI	BSO	
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	-	1	
	Holophagae	Holophagales	1	1	
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	1	-	
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	5	10	
	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	-	4	
Candidate division TM6			1	1	
Chlorobi	Chlorobia	Chlorobiales	-	1	
Chlorflexi	Dehalococcoidetes		2	-	
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	2	2	
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	-	1	
OP11			-	3	
Proteobacteria	Alfaproteobacteria	Sphingomonadales	2	-	
		Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	1	1
			Methylophilales	1	-
			Rhodocyclales	2	1
	Gammaproteobacteria		Methylococcales	-	1
			Thiotrichales	1	-
			Orden I	-	1
	Deltaproteobacteria		Desulfovibrionales	-	5
			Desulfuromonadales	1	-
			Myxococcales	-	1
			Syntrophobacterales	9	6
			Syntrophorhabdaceae	5	3
		Orden I	2	1	
Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales	3	1	
Synergistetes	Synergistia	Synergistales	1	1	
Termite group 1			-	1	
WS3			1	-	
Sin clasificar			6	3	

### Comunidades de bacterias presentes en el agua de la laguna de micrófitos y el humedal plantado con *Typha latifolia*

En estos dos ambientes, agua de la laguna de micrófitos y agua del humedal plantado con *Typha latifolia* (BWL y BWT) la comunidad de bacterias ha estado dominada por bacterias afiliadas al filo Proteobacteria, clase Betaproteobacteria, orden Burkholderiales (Tabla 49 y Figura 69).

Tabla 49. Número de secuencias obtenidas y su afiliación a nivel de filo, clase y orden, en las comunidades de bacterias en el agua de la laguna de micrófitos (BWL) y en el agua del humedal artificial plantado con *Typha latifolia*.

Filo	Clase	Orden	BWL	BWT
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	3	-
	Flavobacteria	Flavobacteriales	8	2
	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	1	1
Chlorflexi	Chloroflexi	Chloroflexales	1	-
	Dehalococcoidetes		-	1
Cyanobacteria			1	2
Proteobacteria	Alfaproteobacteria	Caulobacterales	-	1
		Rhizobiales	-	1
	Betaproteobacteria	Rhodobacterales	-	1
		Burkholderiales	14	12
		Rhodocyclales	1	5
		Orden I	1	1
		Orden III	1	-
		Orden IV	-	1
		Orden V	1	-
	Gammaproteobacteria	Chromatiales	2	-
		Methylococcales	-	1
		Pseudomonadales	7	3
		Thiotrichales	-	2
	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	-	1
Verrucomicrobia		Verrucomicrobiales	1	1

### 3.2. Riqueza y diversidad de las comunidades de bacterias

El estudio de la riqueza y diversidad de las comunidades de bacterias estudiadas se ha desarrollado a partir de la definición de unas unidades taxonómicas operativas (OTUs) establecidos en base a cinco distancias filogenéticas (0,01; 0,05; 0,10; 0,20 y 0,40). En este trabajo se ha considerado que el estudio de la diversidad y riqueza de las comunidades de bacterias se define de forma más precisa al utilizar esta aproximación filogenética que si se desarrollara el cálculo de la diversidad y riqueza en base a la clasificación taxonómica.

Una vez definidos los OTUs, se han realizado curvas de acumulación y curvas de rarefacción para evaluar la calidad del muestreo realizado, es decir, para conocer si el esfuerzo de muestreo (50 clones de cada comunidad) permite estimar de forma precisa la riqueza y diversidad de una comunidad o si ese número de clones ha resultado insuficiente.

Las curvas de acumulación muestran el número de OTUs observados (definidos) en función del esfuerzo de muestreo realizado, mientras que las de rarefacción reflejan el número de OTUs



estadísticamente esperado en función del esfuerzo de muestreo realizado (Figura 70). Los resultados indican que con distancias genéticas pequeñas (0,01 0,05 y 0,10) según aumenta el esfuerzo de muestreo se incrementa el número de OTUs (tanto observados como esperados) sin que las curvas alcancen una asíntota horizontal, es decir, existe un sesgo en el muestreo. Este hecho resulta frecuente en los estudios de comunidades muy diversas y complejas como las comunidades de bacterias en humedales (Hughes *et al.*, 2001). Sin embargo, cuando se han considerado distancias genéticas mayores para definir los OTUs (0,20 y 0,40), las curvas tienden a alcanzar una asíntota horizontal, lo que indica que aunque se incrementara el número de secuencias estudiadas, no se incrementaría el número de OTUs, por lo que considerando estas distancias genéticas la comunidad de bacterias estaría correctamente muestreada.

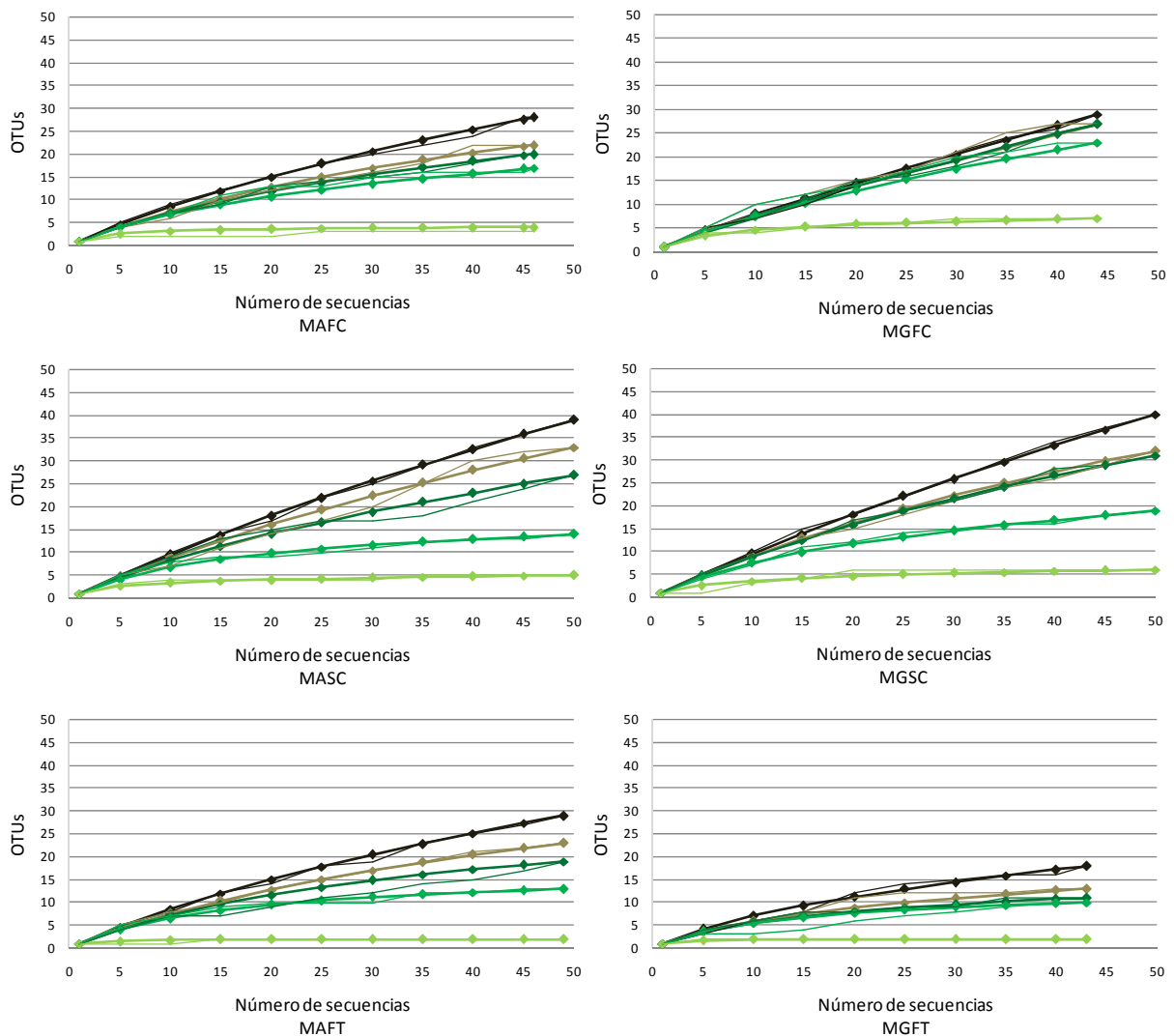


Figura 70. Curvas de acumulación (línea gruesa con marcadores) y curvas de rarefacción (línea fina sin marcadores). Para más información consultar Tabla 6. Continúa en la página siguiente.

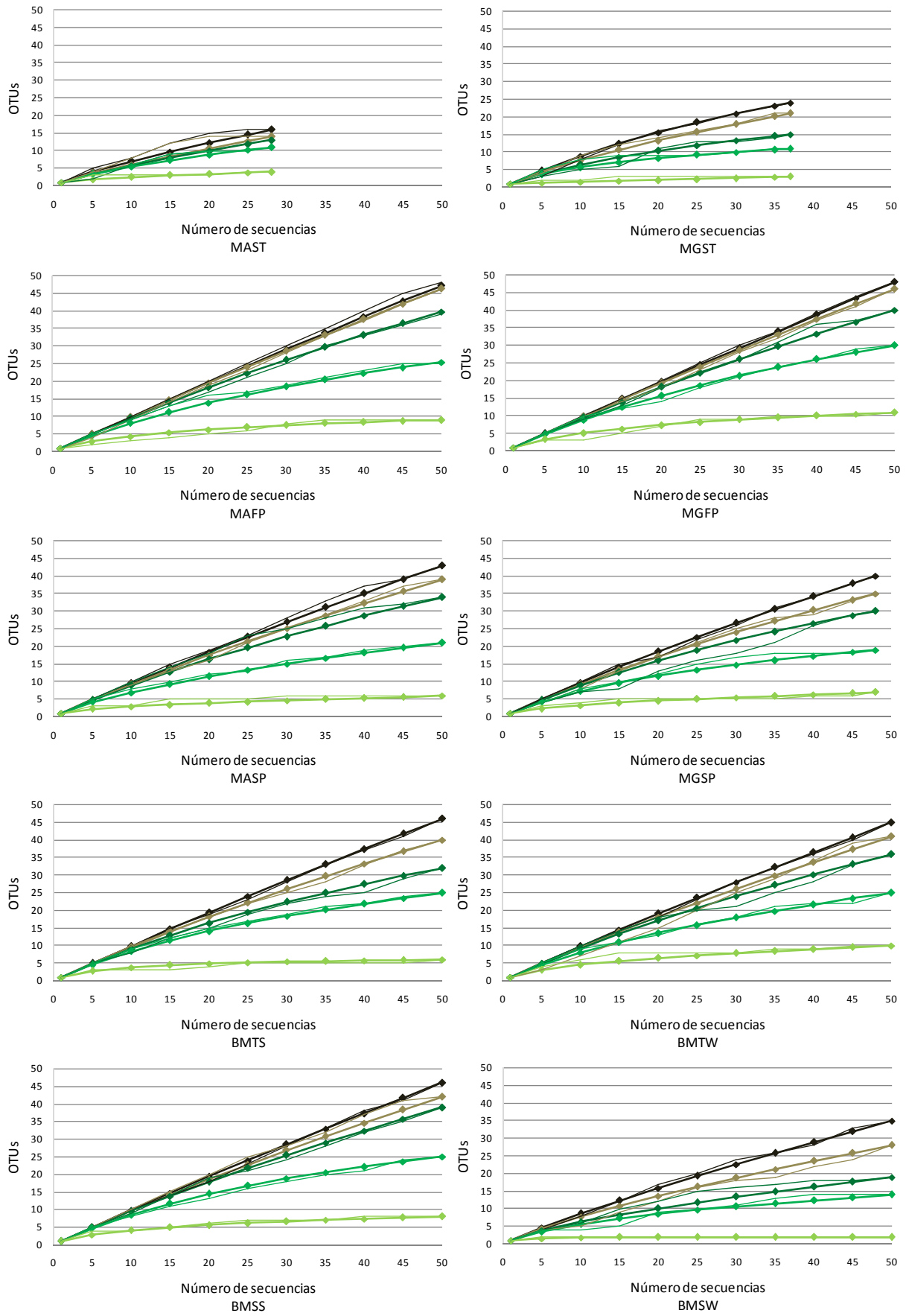


Figura 70. Curvas de acumulación (línea gruesa con marcadores) y curvas de rarefacción (línea fina sin marcadores). Para más información consultar Tabla 6 y Figura 6. Continúa en la página siguiente.

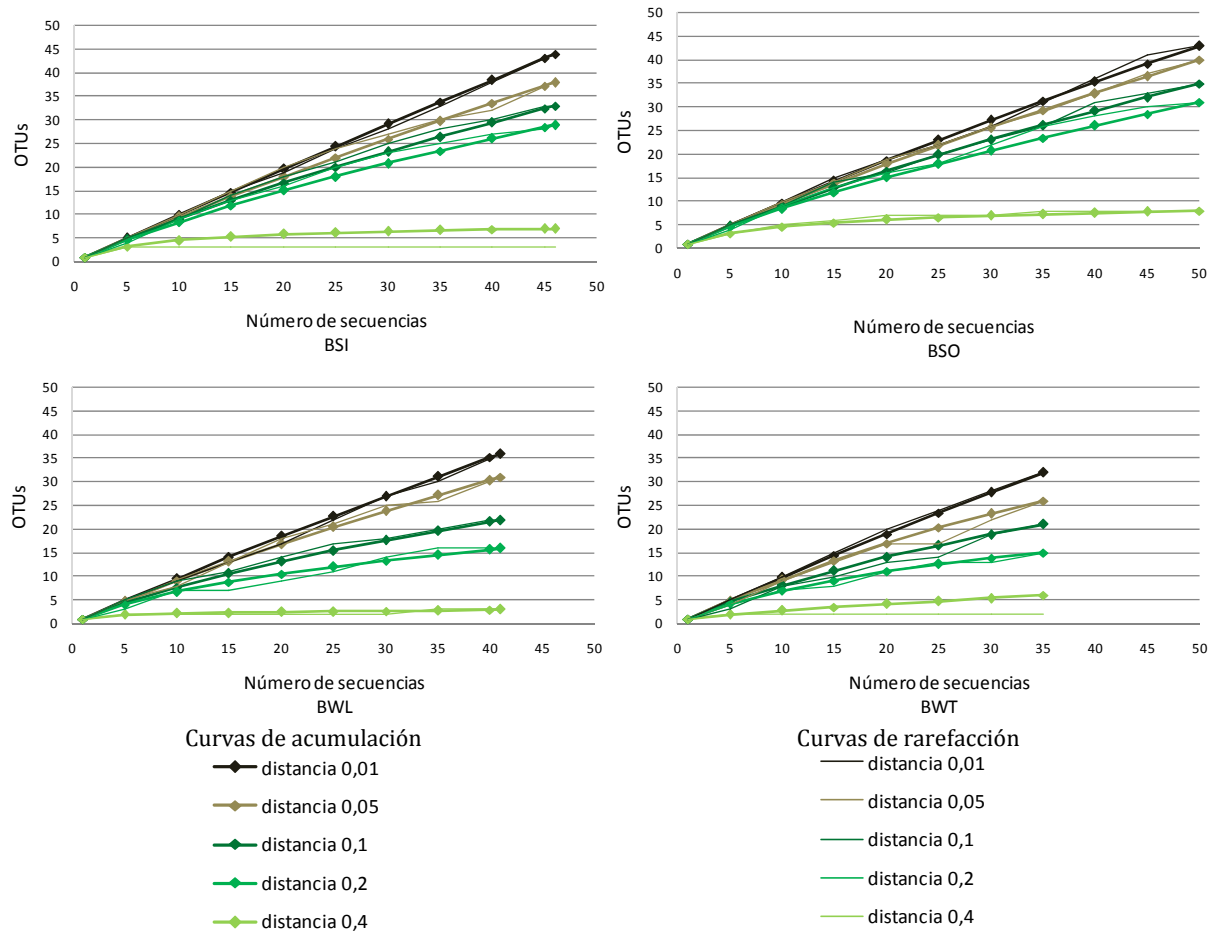


Figura 70. Curvas de acumulación (línea gruesa con marcadores) y curvas de rarefacción (línea fina sin marcadores) que muestran como aumenta el número de OTUs observados o esperados según se incrementa el esfuerzo de muestreo. Cada gráfica muestra estas curvas para comunidad de bacterias estudiada, y considerando cinco distancias genéticas en la definición de los OTUs. Para más información consultar Tabla 6 y Figura 6.

Para estudiar la diversidad de las comunidades de bacterias se ha recurrido al empleo de diferentes estimadores (Tabla 50 y 51). Aunque las curvas de acumulación y rarefacción a bajas distancias genéticas han indicado que el esfuerzo de muestreo realizado no ha sido suficiente para detectar toda la riqueza en las distintas comunidades, es posible comparar la diversidad entre estas comunidades mediante el empleo de estimadores, ya que el esfuerzo de muestreo (con algunas excepciones) y la metodología seguida, ha sido la misma para todas ellas.

Los resultados obtenidos indican que en la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial, las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de *Phragmites australis* han presentado valores significativamente más altos de diversidad estructural así como de riqueza específica que los tratamientos control y los tratamientos con *Typha latifolia* ( $p < 0,05$ ; U de Mann-Whitney). Entre los cuatro tratamientos con *Phragmites australis*, han destacado los dos con flujo subsuperficial (MAFP y MGFP) ya que han alcanzado los valores más altos de diversidad y riqueza a cualquier distancia filogenética, por ejemplo considerando una distancia filogenética de 0,01 en la definición de los OTUs, el índice de Shannon-Wiener ha sido de 3,86 en los dos tratamientos, y la riqueza estimada mediante Chao1 de 307,75 y 393,00 respectivamente. Por el contrario, las comunidades de bacterias menos diversas y con menor riqueza han resultado ser

aquellas asociadas a la rizosfera de *Typha latifolia* (MAFT, MGFT, MAST y MGST), mientras que los tratamientos control (MAFC, MGFC, MASC Y MGSC) se han situado en una posición intermedia entre ambos grupos, si bien las diferencias entre los tratamientos control y los tratamientos con *Typha latifolia* no han sido estadísticamente significativas para todas las distancias filogenéticas analizadas ( $p < 0,05$ ; U de Mann-Whitney), (Tabla 50).

Junto al efecto de la presencia o ausencia de vegetación, así como de la especie vegetal seleccionada, se ha estudiado el efecto de los otros dos factores considerados en el diseño de los distintos tratamientos (sustrato y tipo de flujo). Estos dos factores (sustrato: A, arlita o G, grava silíceas, tipo de flujo hidráulico: F, superficial y S, subsuperficial) no se han mostrado como variables que permitan establecer diferencias entre las comunidades de bacterias en cuanto a su diversidad estructura y riqueza específica (U de Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ).

Tabla 50. Número de OTUs observados (OTUs obs), índice de dominancia de Simpson (D), índice de diversidad de Shanon-Wiener (H') y riqueza estimada (Chao 1) para las comunidades de bacterias estudiadas en la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial. Los resultados se muestran considerando para la definición de los OTUs las distancias filogenéticas de 0,01; 0,05; 0,10; 0,20 y 0,40.

Distancia	Riqueza-Diversidad	MAFC	MGFC	MASC	MGSC	MAFT	MGFT	MAST	MGST	MAFP	MGFP	MASP	MGSP
0,01	OTUs obs	28	29	39	40	29	18	16	24	48,00	48,00	43,00	40,00
	D	0,05	0,08	0,01	0,01	0,04	0,09	0,13	0,03	0,0016	0,0016	0,01	0,01
	H'	3,07	2,95	3,58	3,60	3,13	2,50	2,34	3,05	3,86	3,86	3,67	3,62
	Chao 1	52,43	191,50	116,50	128,00	67,00	36,33	55,00	37,13	307,75	393,00	228,25	152,20
0,05	OTUs obs	22	27	33	32	23	13	14	21	46,00	46,00	39,00	35,00
	D	0,09	0,09	0,03	0,02	0,08	0,17	0,21	0,08	0,0033	0,0033	0,02	0,02
	H'	2,70	2,84	3,30	3,31	2,75	2,07	2,04	2,69	3,80	3,80	3,52	3,42
	Chao 1	30,25	111,33	79,00	58,25	34,14	18,00	32,33	42,00	237,20	218,20	144,60	129,50
0,10	OTUs obs	20	27	27	31	19	11	13	15	39,00	40,00	34,00	30,00
	D	0,10	0,09	0,05	0,03	0,09	0,18	0,25	0,16	0,01	0,01	0,03	0,03
	H'	2,59	2,84	3,00	3,25	2,58	1,95	1,91	2,21	3,59	3,61	3,34	3,25
	Chao 1	29,17	111,33	69,75	61,00	26,20	13,00	28,00	19,67	103,00	110,86	71,50	51,38
0,20	OTUs obs	17	23	15	19	13	10	11	11	25,00	30,00	21,00	19,00
	D	0,11	0,10	0,10	0,07	0,11	0,18	0,25	0,18	0,06	0,03	0,11	0,09
	H'	2,43	2,60	2,36	2,66	2,28	1,90	1,80	1,96	2,91	3,22	2,55	2,58
	Chao 1	29,00	47,00	17,33	34,00	16,00	11,50	18,00	16,00	43,50	47,00	36,60	34,00
0,40	OTUs obs	3	7	5	6	2	2	4	3	9,00	11,00	6,00	7,00
	D	0,35	0,22	0,36	0,40	0,78	0,69	0,68	0,89	0,38	0,22	0,52	0,52
	H'	1,13	1,62	1,18	1,19	0,37	0,48	0,64	0,25	1,40	1,83	0,94	1,03
	Chao 1	4,00	8,00	5,00	6,00	2,00	2,00	5,00	4,00	9,00	12,50	7,50	13,00
Tamaño de muestra (número de secuencias)		46	40	50	50	49	43	28	37	50	50	50	48

En la planta piloto a escala real para el tratamiento de agua residual urbana las comunidades de bacterias han resultado ser más homogéneas en cuanto a la estimación de su diversidad y riqueza específica (Tabla 51), de forma que no se han identificado diferencias significativas en estos parámetros entre las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de la vegetación, las comunidades del sedimento y las comunidades en el agua residual ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis).

En el caso de las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de *Typha latifolia* y *Salix atrocinerea* no se han encontrado diferencias significativas ni en su diversidad ni en su riqueza específica con independencia de la distancia filogenética considerada ( $p < 0,05$ , U de Mann-Whitney). Tampoco el efecto de la estacionalidad se ha mostrado como un factor que permita identificar diferencias significativas en los valores de diversidad y riqueza específica en las comunidades asociadas a la rizosfera de las plantas en verano o en invierno ( $p < 0,05$ , U de Mann-Whitney), si bien en el caso de *Salix atrocinerea* la comunidad presente en verano (BMSS) ha sido una de las más diversas y con mayor riqueza de todas las analizadas, mientras que la muestreada en invierno (BMSW) ha sido la de menor riqueza y diversidad.

En las comunidades de bacterias asociadas al sedimento en la laguna de micrófitos situadas en la zona de entrada de agua residual (BSI) y en la zona de salida (BSO), los valores de diversidad de ambas comunidades son muy similares (por ejemplo, considerando una distancia filogenética de 0,05 para definir los OTUs la diversidad estimada de la comunidad BSI ha sido de 3,53 y la de BSO de 3,58), por lo que no parece existir un efecto de las características físico-químicas del agua residual que sí varía entre la zona de entrada y de salida (ver Tabla 21) con los parámetros de diversidad definidos para las comunidades de bacterias presentes en el sedimento de la laguna.

Finalmente, las comunidades de bacterias muestreadas en el agua residual de la laguna de micrófitos (BWL) y en el agua del humedal plantado con *Typha latifolia* (BWT) han presentado valores de diversidad y riqueza generalmente más bajos que las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de plantas (con la excepción antes mencionada de la comunidad BMSW) así como en relación a las comunidades presentes en el sedimento.

En general, todas las comunidades de bacterias analizadas han mostrado altos valores de diversidad, característicos de hábitats complejos como los estudiados. Únicamente cuando los OTUs se han definido con una distancia genética muy alta (0,40), la diversidad y riqueza estimada de las comunidades ha disminuido drásticamente, de forma que esta distancia se considera demasiado grande para comprender las agrupaciones incluso a nivel de filo.

Los dos sistemas piloto estudiados han recibido agua residual con características muy diferenciadas, por un lado agua con altas concentraciones en disolución de arsénico y zinc y muy escasa carga de materia orgánica en los tratamientos de la planta piloto para la depuración de agua residual industrial, y por otro lado, agua residual urbana con una carga media en materia orgánica y nutrientes, y bajas concentraciones de metales pesados en disolución (ver Tablas 12, 13 y 21). La comparación entre las comunidades de bacterias de estos dos sistemas para el tratamiento de agua residual ha indicado que no existen diferencias estadísticamente significativas en la diversidad (índice de Shannon-Wiener) ni en la riqueza (estimador Chao1), con independencia de la distancia filogenética escogida para definir los OTUs ( $p < 0,05$ , prueba U de Mann-Whitney). Aunque no se hayan identificado diferencias significativas, si se observa en términos generales, que las comunidades de bacterias presentes en el sistema a escala real para el tratamiento de agua residual urbana se han mostrado como comunidades más diversas y con mayor riqueza específica que las comunidades de bacterias de la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial. Este resultado es coherente con lo indicado anteriormente, ya que el sistema a escala real constituye un ecosistema ya maduro tras varios años de funcionamiento en el que los microambientes son más complejos que en el sistema piloto a pequeña escala.

Tabla 51. Número de OTUs observados (OTUs obs), índice de dominancia de Simpson (D), índice de diversidad de Shanon-Wiener (H') y riqueza estimada (Chao 1) para las comunidades de bacterias estudiadas en la planta piloto a escala real para el tratamiento de agua residual urbana. Los resultados se muestran considerando para la definición de los OTUS las distancias filogenéticas de 0,01; 0,05; 0,10; 0,20 y 0,40.

Distancia	Riqueza-Diversidad	BMTS	BMTW	BMSS	BMSW	BSI	BSO	BWL	BWT
0,01	OTUs obs	46,00	45,00	46,00	35,00	44,00	43,00	36,00	32,00
	D	0,0033	0,0057	0,0041	0,04	0,0019	0,0019	0,01	0,01
	H'	3,80	3,75	3,79	3,26	3,77	3,70	3,51	3,44
	Chao 1	218,2	475,5	347,00	180,00	331,00	218,75	212,00	133,50
0,05	OTUs obs	40,00	41,00	42,00	28,00	38,00	40,00	31,00	26,00
	D	0,0098	0,0131	0,01	0,08	0,01	0,01	0,02	0,02
	H'	3,61	3,60	3,66	2,89	3,53	3,58	3,29	3,18
	Chao 1	110,86	198,50	264,00	85,75	318,50	337,50	139,33	45,13
0,10	OTUs obs	32,00	36,00	39,00	19,00	33,00	35,00	22,00	21,00
	D	0,02	0,02	0,01	0,16	0,02	0,02	0,06	0,05
	H'	3,33	3,44	3,57	2,30	3,33	3,36	2,77	2,82
	Chao 1	62	111,6	163,00	38,50	150,00	238,00	82,00	36,17
0,20	OTUs obs	25,00	25,00	25,00	14,00	29,00	31,00	16,00	15,00
	D	0,04	0,05	0,04	0,19	0,04	0,04	0,11	0,11
	H'	2,99	2,92	3,03	2,03	3,11	3,15	2,38	2,38
	Chao 1	51,25	49	36,14	42,00	75,20	181,00	28,00	18,50
0,40	OTUs obs	6,00	10,00	8,00	2,00	3,00	8,00	3,00	2,00
	D	0,39	0,27	0,36	0,73	0,26	0,26	0,52	0,64
	H'	1,25	1,64	1,38	0,44	1,57	1,63	0,73	0,80
	Chao 1	6	15	10,00	2,00	7,00	8,50	3,00	12,00
Tamaño de muestra (número de secuencias)		50	50	50	50	46	50	41	35

### 3.3. Análisis comparativo de las comunidades de bacterias.

Una vez estudiada cada comunidad de bacterias en cuanto a su composición y su diversidad alfa, se han realizado distintos análisis comparativos para ver si existen diferencias entre estas comunidades utilizando la información filogenética de las mismas. Para ello, se ha empleado el software UniFrac (Lozupone *et al.*, 2005) que utiliza como información de partida el árbol filogenético (con distancias) construido con el programa MEGA versión 4 (Tamura *et al.*, 2007) con todas las secuencias estudiadas procedentes de las distintas comunidades de bacterias.

Los resultados del análisis por parejas de las comunidades de bacterias analizadas muestran que dichas comunidades no son significativamente diferentes entre sí (Unifrac Significance con corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples,  $p < 0,1$ ; y P test,  $p < 0,1$ ).

Sin embargo, al analizar cada comunidad individualmente, de forma que el resto de comunidades, (tanto de la planta piloto a pequeña escala como de la planta a escala real) se consideran en conjunto como una misma comunidad, los resultados indican que las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de *Phragmites australis*, en los tratamientos de la planta piloto a pequeña escala con flujo superficial, con independencia del sustrato empleado (MAFP y MGFP), sí son significativamente distintas al resto de comunidades ( $p < 0,01$ ). En el caso de la planta piloto a escala real para el tratamiento de agua residual urbana, la comunidad de bacterias asociada a la rizosfera de *Typha latifolia* y muestreada a finales del invierno (BMTW) es significativamente distinta al resto de comunidades ( $p < 0,01$ ), así como las comunidades de bacterias presentes en el sedimento de la laguna de micrófitos (BSI y BSO) ( $p < 0,01$ ) (Tablas 52 y 53).

Tabla 52. Resultados del análisis comparativo de cada comunidad con el resto de comunidades estudiadas. La tabla muestra el valor del estadístico Weighted UniFrac para cada comunidad de bacterias de los distintos tratamientos de la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial.

Comunidad de bacterias	p	Comunidad de bacterias	p	Comunidad de bacterias	p
MAFC	0,86	MAFT	1,0	MAFP	<0,01
MGFC	0,65	MGFT	1,0	MGFP	<0,01
MASC	0,67	MAST	0,97	MASP	0,54
MGSC	0,77	MGST	1,0	MGSP	0,87

Tabla 53. Resultados del análisis comparativo de cada comunidad con el resto de comunidades estudiadas. La tabla muestra el valor del estadístico Weighted UniFrac para cada comunidad de bacterias de los distintos tratamientos de la planta piloto para el tratamiento de agua residual urbana.

Comunidad de bacterias	p	Comunidad de bacterias	p
BMTS	0,04	BWL	0,28
BMTW	<0,01	BWT	0,84
BMSS	0,02	BSI	<0,01
BMSW	0,91	BSO	<0,01

La siguiente figura muestra la agrupación o cluster de las distintas comunidades de bacterias estudiadas (Figura 71). Las comunidades asociadas al sedimento de la laguna de micrófitos (BSI y BSO) se separan de forma clara del resto (valor de confianza del nodo de más de 99,9%, técnica Jaknife de remuestreo). Estas dos comunidades están dominadas por bacterias heterótrofas



anaerobias estrictas del orden Bacteroidales, así como por bacterias anaerobias reductoras de sulfato y de azufre de los ordenes Desulfobacterales, Desulfuromonadales y Desulfovibriales.

Las comunidades asociadas a la rizosfera de *Phragmites australis* de la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial (MAFP, MGFP, MASP y MGSP) se encuentran igualmente agrupadas en un cluster independiente aunque de baja significación (valor de confianza inferior a 50%). Estas comunidades se caracterizan por altos valores de diversidad (índice de Shannon-Wiener) y una mayor abundancia de bacterias quimioheterótrofas aerobias implicadas en los procesos de degradación aerobia de la materia orgánica, como bacterias del orden Rhizobiales y el orden Burkholderiales.

Se ha identificado un tercer cluster que agrupa con un alto valor de confianza (>99,9%) los tratamientos de la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial que funcionan sin vegetación y flujo superficial (MAFC y MGFC). La comunidad de bacterias asociada al sustrato en estos dos tratamientos tiene a las cianobacterias como taxón más abundante.

El resto de comunidades se asocian en otro gran cluster, de baja significación (valor de confianza inferior a 50%, técnica Jackknife de remuestreo), dentro del cual se diferencian varios subgrupos. Por una parte, con un nivel de significación de entre 70 y 90%, las comunidades de los tratamientos control y flujo subsuperficial de la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial (MASC y MGSC), dominadas por individuos de los órdenes Burkholderiales, Sphingomonadales y Sphingobacterales.

Por otro lado, se agrupan las comunidades asociadas a la rizosfera de *Typha latifolia* en los tratamientos plantados con esta especie en la planta piloto a pequeña escala junto con la comunidad de bacterias asociada a la rizosfera de *Salix atrocinerea* muestreada en invierno (BMSW). Todas estas comunidades presentan bajos valores de diversidad y riqueza específica (ver Tablas 50 y 51). Se diferencian dos subgrupos con un alto nivel de significación (entre 90 y 99,9%), uno formado por las comunidades dominadas por bacterias del filo Gammaproteobacteria, orden Pseudomonadales (BMSW, MAFT y MGFT) y otro dominado por bacterias del orden Enterobacterales (MAST y MGST).

Otro grupo lo configuran las comunidades asociadas a la rizosfera de *Typha latifolia* y *Salix atrocinerea* muestreadas a finales de verano en la planta piloto a escala real para el tratamiento de agua residual urbana (BMTS y BMSS) que son comunidades muy diversas (ver Tabla 51) en las que predominan bacterias del filo Proteobacteria.

Finalmente, las comunidades presentes en el agua de la laguna de micrófitos y del humedal plantado con *Typha latifolia* (BWL y BWT) dominadas por bacterias aerobias quimioheterótrofas del orden Burkholderiales, se agrupan formando un cluster con valor de confianza de entre 70 y 90%, al que se une la comunidad de bacterias asociada a la rizosfera de *Typha latifolia* muestreada a finales de invierno en la planta piloto a escala real para el tratamiento de agua residual urbana, aunque con una baja significación (valor de confianza inferior a 50%).

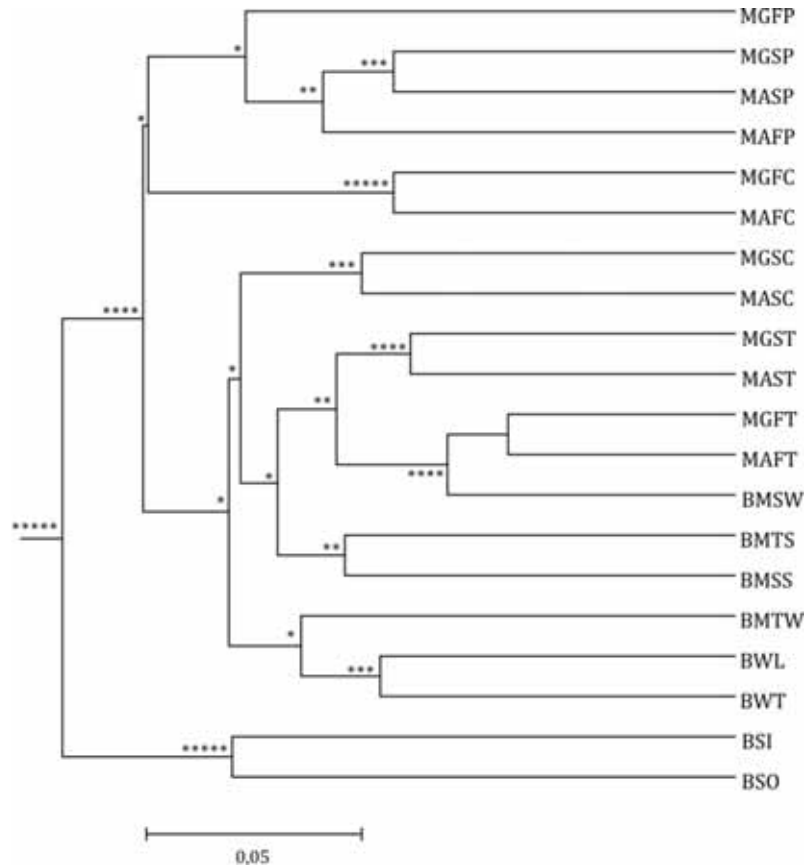


Figura 71. Análisis cluster jerárquico (UPGMA) de las comunidades de bacterias estudiadas. Se indica en los nodos el valor de confianza obtenido mediante la técnica Jaknife de remuestreo. \* <50%, \*\*50-70%, \*\*\* 70-90%, \*\*\*\*90-99,9%, \*\*\*\*\* >99,9%.

Finalmente, se ha realizado un Análisis de Componentes Principales (ACP) con el objetivo de estudiar los factores que explican la variabilidad entre las distintas comunidades de bacterias. Este análisis se ha realizado utilizando la información filogenética de las comunidades estudiadas. Los resultados indican que el porcentaje de variabilidad entre comunidades explicado por los ejes principales I, II y III (componentes principales) es relativamente bajo, y la interpretación de la variabilidad de las comunidades en base a determinados gradientes o factores se muestra con baja intensidad (Tabla 54 y Figura 72).

Tabla 54. Resultados del Análisis de Componentes Principales (ACP). Se presenta el porcentaje de la variabilidad explicado por los seis primeros ejes o dimensiones.

Eje	I	II	III	IV	V	VI
Varianza explicada (%)	10,67	10,25	7,64	6,44	5,67	5,41

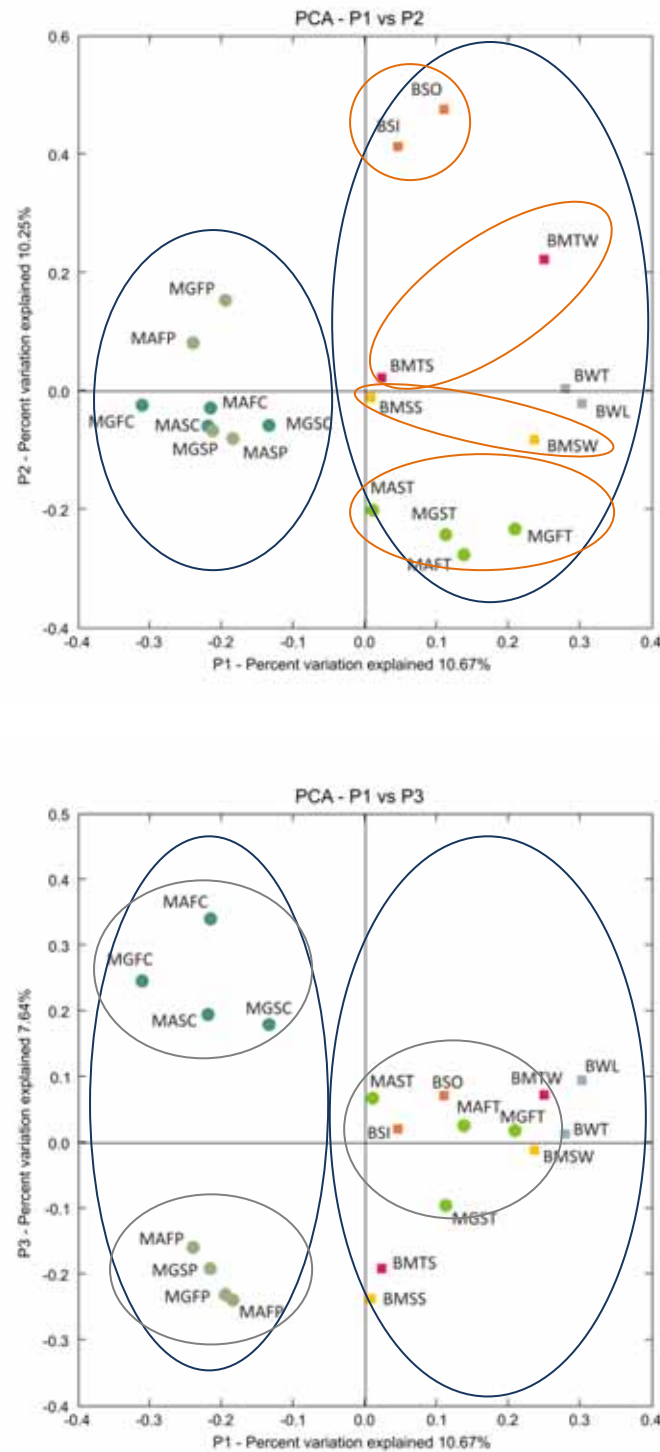


Figura 72. Diagramas biplot con los ejes I y II, y I y III del Análisis de Componentes Principales (ACP). Estos tres ejes se han seleccionado como componentes principales.

El eje I ha permitido diferenciar dos grandes grupos, las comunidades de la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial (excepto los tratamientos con *Typha latifolia*) y las comunidades de la planta piloto para el tratamiento de agua residual urbana.

Las comunidades de los tratamientos con *Typha latifolia* de la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial se separan de las comunidades de la planta piloto para el tratamiento de

agua residual urbana a lo largo del gradiente establecido por el eje II. Este segundo eje ha permitido diferenciar también el conjunto de comunidades de la planta piloto para el tratamiento de agua residual urbana, de forma que separa claramente el grupo formado por las comunidades asociadas al sedimento de la laguna de micrófitos.

Las comunidades asociadas a la rizosfera de *Typha latifolia* y *Salix atrocinerea* en la planta para el tratamiento de agua residual urbana se distribuyen según la estacionalidad (eje I y eje III) y la especie de macrófito (eje II).

El tercer eje seleccionado (eje III) ha permitido diferenciar las comunidades de los tratamientos de la planta piloto para agua residual industrial en función de la especie vegetal utilizada o la ausencia de vegetación.

Estos resultados sugieren que en la planta piloto a pequeña escala para el tratamiento de agua residual industrial la especie vegetal seleccionada en el diseño del humedal puede tener un efecto en la composición de la comunidad de bacterias asociada a su rizosfera, tal y como indican los resultados obtenidos en el análisis de correspondencias realizado, en las estimaciones de diversidad y riqueza de las comunidades y finalmente en el análisis de componentes principales. Estas diferencias se han puesto de manifiesto de forma más intensa entre las comunidades asociadas a la comunidad de *Phragmites australis*, las cuales se diferencian de las asociadas a la rizosfera de *Typha latifolia* y las de los tratamientos control. Mientras que entre las comunidades asociadas a la rizosfera de *Typha latifolia* y las de los tratamientos control las diferencias no han sido claras en todos los análisis.

En esta misma planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial, otra de las variables estudiadas ha sido el tipo de sustrato empleado (arrita o grava silíceo). Esta variable no se ha mostrado como un factor relevante en la composición y estructura de las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de la vegetación o al sustrato en los tratamientos control. Este resultado difiere de lo propuesto por Vacca *et al.* (2005), ya que estos autores identifican diferencias significativas en la composición de comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera de *Phragmites australis* en función de tipo de sustrato empleado. Finalmente, el diseño del humedal artificial, con flujo hidráulico superficial o subsuperficial, tampoco ha resultado ser un factor determinante en los parámetros de diversidad y riqueza específica de las comunidades de bacterias estudiadas en la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial, si bien la composición de estas comunidades si presenta diferencias en cuanto a la presencia de bacterias aerobias o anaerobias.

En cuanto a la planta piloto a escala real para el tratamiento de agua residual urbana, las comunidades de bacterias estudiadas han presentado diferencias en función del ambiente en el que se han muestreado (agua, sedimento o rizosfera de *Typha latifolia* y *Salix atrocinerea*), siendo estas diferencias más acusadas en las comunidades de bacterias asociadas al sedimento de la laguna de micrófitos, dominadas por bacterias anaerobias. En el caso de las comunidades asociadas a la rizosfera de especies vegetales, no se han identificado diferencias significativas en la composición, diversidad y riqueza entre las comunidades asociadas a *Typha latifolia* y *Salix atrocinerea*, aunque sí que los análisis de correspondencias y análisis de componentes principales realizados si sugieren un cierto grado de diferencia entre ambas, si bien en este caso, hay que considerar que estas comunidades reciben un agua residual de distintas características.

Por tanto, los resultados obtenidos en las dos plantas piloto indican que la especie vegetal seleccionada tiene influencia en la comunidad de bacterias pero no condiciona de manera importante la diversidad y composición de la misma, resultado igualmente sugerido por otros autores (Ahn *et al.*, 2007; DeJournett *et al.*, 2007; Gorra *et al.*, 2007; Tietz *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007). En cuanto a las diferencias obtenidas entre las comunidades de bacterias asociadas a la

rizosfera de especies vegetales en la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial y las de la planta piloto para el tratamiento de agua residual urbana, los análisis realizados han permitido establecer una agrupación diferenciada entre las comunidades procedentes de estas dos plantas de tratamiento, si bien estas diferencias quedan matizadas por las comunidades asociadas a la rizosfera de *Typha latifolia* en la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial, que no se agrupan claramente en todos los análisis con las comunidades de dicha planta piloto. Estos resultados se encuentran en la misma línea que los obtenidos por Sleytr *et al.* (2009) en humedales artificiales. Estos autores no identifican diferencias claras en el estudio realizado con técnicas “*fingerprinting*” entre las comunidades de bacterias presentes en dos sistemas expuestos a diferentes condiciones climáticas, plantados con distintas especies vegetales y que reciben agua residual de distinta composición.

# BIBLIOGRAFÍA RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Acinas S.G., 2007. Diversidad y estructura de una comunidad microbiana. *Actualidad SEM* 44, 24-29.
- Ahn C., Gillevet P.M., Sikaroodi M., 2007. Molecular characterization of microbial communities in treatment microcosm wetlands as influenced by macrophytes and phosphorus loading. *Ecological Indicators* 7, 852-863.
- Ansola G., González J.M., Cortijo R. y de Luis E., 2003. Experimental and full-scale pilot plant constructed wetlands for municipal wastewaters treatment. *Ecological Engineering* 21, 43-52.
- Arceivala S.J. y Asoleka S.R., 2006. *Wastewater Treatment for Pollution Control and Reuse*. Tata McGraw-Hill, 518 pp.
- August E.E., Mcknight D.M., Hrncir D.C. y Garhart K.S., 2002. Seasonal variability of metals transport through a wetland impacted by mine drainage in the rocky mountains. *Environmental Science and Technology* 36, 3779-3786.
- Batty L.C., Baker A.J. y Wheeler B.D., 2002. Aluminium and phosphate uptake by *Phragmites australis*: the role of Fe, Mn and Al root plaques. *Annals of Botany* 89, 443-449.
- Bernadet J.-F. y Nakagawa Y., 2006. An introduction to the Family Flavobacteriaceae. En: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K-H y Stackebrandt (editors), *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria*. Tercera edición, Springer Science+Business Media, Inc., 7, 815-842.
- Bowman J.P., Mancuso C., Nichols P.D. y Gibson A.E., 2003. *Algoriphagus ratkowskyi* gen. nov., sp. nov., *Brumimicrobium glaciale* gen. nov., sp. nov., *Cryomorpha ignava* gen. nov., sp. nov. and *Crocinitomix catalasitica* gen. nov., sp. nov., novel flavobacteria isolated from various polar habitats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1343-1355.
- Brisson J. y Chazarenc F., 2009. Maximizing pollutant removal in constructed wetlands: Should we pay more attention to macrophyte species selection?. *Science of the Total Environment* 407, 3923-39030.
- Cheng S., Grosse, W. Karrenbrock, F. y Thoennessen M., 2002. Efficiency of constructed wetlands in decontamination of water polluted by heavy metals. *Ecological Engineering* 18, 317-325.
- DeJournett T.D., Arnold W.A. y LaPara T.M., 2007. The characterization and quantification of methanotrophic bacterial populations in constructed wetland sediments using PCR targeting 16S rRNA gene fragments. *Applied Soil Ecology* 35, 648-659.
- Faulwetter J.L., Gagnon V., Sundberg C., Chazarenc F., Burr M.D., Brisson J., Camper A.K. y Stein O.R., 2009. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: a review. *Ecological Engineering* 35, 987-1004.

- Fraser L.F. y Keddy P., 1997. The role of experimental microcosms in ecological research. *Trends Ecol Evol* 12, 478-81.
- Garrity G.M. y Holt J.G., 2001. The road map to the manual. En: Boone D.R., Castenholz, R.W. y Garrity, G.M. (editores), *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. 2nd edition. Volume I. Springer-Verlag, New York, USA, 119 pp.
- Gazea B., Adam K., Kontopoulos A., 1996. A review of passive systems for the treatment of acid mine drainage. *Mineral Engineering* 9, 23-42.
- Gersberg R.M., Lyon S.R., Elkins B.V., Goldman C.R., 1984. The removal of heavy metals by artificial wetlands. En: *Proc. Conf. Future of Water Use*. AWWA Research Foundation, Denver, CO, 639-648.
- Glöckner F.O., Zaichikov E., Belkova N., Denissova L., Pernthaler J., Pernthaler A. y Amann R., 2000. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5053-5065.
- Gorra R., Coci M., Ambrosoli R. y Laanbroek H.J., 2007. Effects of substratum on the diversity and stability of ammoniaoxidizing communities in a constructed wetland used for wastewater treatment. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1442-1452.
- Goulet R.R. y Pick F.E., 2001. Changes in dissolved and total Fe and Mn in a young constructed wetland: Implications for retention performance. *Ecological Engineering* 17, 373-384.
- Gries C. y Garbe D., 1989. Biomass, and nitrogen, phosphorous and heavy metal content of *Phragmites australis* during the third growing season in a root zone waste water treatment. *Archiv fur Hydrobiologie*, 117, 97-105.
- Gschlößl T. y Stuibler H., 2000. Reed bed systems: Design, performance and maintainability. *Water Science and Technology*, 41, 73-76.
- Gupta R.S., 2000. The phylogeny of Proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 367-402.
- Hahn M.W., 2006. The microbial diversity of inland waters. *Current opinion in Biotechnology*, 17, 256-261.
- Hallberg K.B. y Johnson D.B., 2005. Microbiology of a wetland ecosystem constructed to remediate mine drainage from a heavy metal mine. *The Science of the Total Environment* 338, 53-66.
- Hanada S. y Pierson B.K., 2006. The family Chloroflexaceae. En: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K-H y Stackebrandt (editores), *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria*. Tercera edición, Springer Science+Business Media, Inc., 7, 815-842.
- Harris J.K., Scott T.K. y Pace N.R., 2004. New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11. *Applied and environmental microbiology*, 70, 845-849.
- Hugenholtz P., Tyson G.W., Webb R.I., Wagner A.M. y Blackall L.L., 2001. Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain Bacteria with no known pure-culture representatives. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 411-419.

- Hughes J.B., Hellmann J.J., Ricketts T.H. y Bohannon, B.J.M., 2001. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and environmental microbiology* 67, 4399- 4406.
- Iasur-Kruh L., Hadar Y., Milstein D., Gasith A. y Minz D., 2009. Microbial Population and Activity in Wetland Microcosms Constructed for Improving Treated Municipal Wastewater. *Environmental Microbiology*, DOI 10.1007/s00248-009-9611-z.
- Johansen J.E. y Binnerup S.J., 2002. Contribution of Cytophaga-like bacteria to the potential turnover of carbon, nitrogen, and phosphorous by bacteria in the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare L.*). *Microbial Ecology* 43, 298-306.
- Kadlec R.H. y Knight R.L., 1996. *Treatment wetlands*. Boca Raton, FL: CRC, 893 pp.
- Karspicak M.M., Whiteaker L.R., Artiola J.F. y Foster K.E., 2001. Nutrient and heavy metal uptake and storage in constructed wetland systems in Arizona. *Water Science and Technology*, 44, 455-462.
- Kerstens K., Lisdiyanti P., Komagata K. y Swings, J., 2006. The family Acetobacteraceae: the genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. En: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K-H y Stackebrandt (editores), *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria*. Tercera edición, Springer Science+Business Media, Inc.
- Kirchman D.L., 2002. The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol* 39, 91-100.
- Knox A.S., Paller M.H., Nelson E.A., Specht W.L., Halverson N.V. y Gladden J.B., 2006. Metal distribution and stability in constructed wetland sediment. *Journal of Environmental Quality*, 35, 1948-1959.
- Kröpfelová L., Vymazal J., Svehla J. y Stíchová J., 2009. Removal of trace elements in three horizontal sub-surface flow constructed wetlands in the Czech Republic. *Environmental Pollution* 157, 1186-1194.
- Kuske C.R., Barns S.M. y Busch J.D., 1997. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3614-3621.
- Lane D.J., 1994. 16S/23S rRNA sequencing. En: Stackebrandt E. y Goodfellow M. (editores), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, New York, 115-148 pp.
- Larsen E. y Greenway M., 2004. Quantification of biofilms in a subsurface flow wetland and their role in nutrient removal. *Water Science and Technology* 49, 115-122.
- Lesage E., 2006. *Behaviour of Heavy Metals in Constructed Treatment Wetlands*. PhD thesis. Faculty of Bioscience Engineering. Ghent University, Ghent, Belgium.
- Lesage E., Rousseau D.P.L., Meers E., Van de Moortel A.M.K., Du Laing G., Tack F.M.G., De Pauw N. y Verloo M.G., 2007. Accumulation of metals in the sediment and reed biomass of a combined constructed wetland treating domestic wastewater. *Water, air and soil pollution* 183, 253-264.
- Leschine S., Paster B.J. y Canale-Parola E., 2006. Free-Living saccharolytic Spirochaetes: the genus *Spirochaeta*. En: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K-H y Stackebrandt



- (editors), *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria*. Tercera edición, Springer Science+Business Media, Inc., 7, 195-210.
- Lozupone C. y Knight R., 2005. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8228-8235.
- Lu, X., J. T. Wilson, and D. H. Kampbell (2006), Relationship between geochemical parameters and the occurrence of Dehalococcoides DNA in contaminated aquifers, *Water Resources Research*, 42, W08427, doi:10.1029/2005WR004283.
- Madigan, M.T., Martinko J.M. y Parker J., 1997. *Brock biology of microorganisms*, octava edición, Prentice-Hall, Upper Saddle River, N.J, 731-732 pp.
- Maine M.A., Suñe N., Hadad H., Sánchez G., Bonetto C., 2006. Nutrient and metal removal in a constructed wetland for wastewater treatment from a metallurgic industry. *Ecological Engineering* 26, 341-347.
- Mays, P.A. y Edwards, G.S., 2001. Comparison of heavy metal accumulation in a natural wetland and constructed wetlands receiving acid mine drainage. *Ecological Engineering* 16, 487-500.
- McDonald J.E., Lockhart R.J., Cox M.J., Allison H.E. y McCarthy A.J., 2008. Detection of novel *Fibrobacter* populations in landfill sites and determination of their relative abundance via quantitative PCR. *Environmental Microbiology*, 10, 1310-1319.
- McDonald J.E., Menezes A.B., Allison H.E. y McCarthy A.J., 2009. Molecular Biological Detection and Quantification of Novel *Fibrobacter* Populations in Freshwater Lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 5148-5152.
- Mitsch W.J. y Gosselink J.G., 1993. *Wetlands*. 2ª Edición. Van Nostrand Reinhold, New York, NY, USA.
- Nelson E.A., Specht W.L. y Knox A.S., 2006. Metal removal from water discharges by a constructed treatment wetland. *Engineering in Life Sciences* 2006, 6, 26-30.
- Núñez-Cardona M.J., 2003. Aislamiento y caracterización pigmentaria de las bacterias rojas del azufre de la laguna de Tampamachoco, Veracruz. *Hidrobiológica* 13, 171-176.
- Obarska-Pempkowiak H. y Klimkowska K., 1999. Distribution of nutrients and heavy metals in a constructed wetland system. *Chemosphere*, 39, 303-312.
- O'Sullivan A.D., Murray D.A. yOtte M.L., 2004. Removal of sulfate, zinc, and lead from alkaline mine wastewater using pilot-scale surface-flow wetlands at Tara Mines, Ireland. *Mine Water and the Environment* 23, 58-65.
- Overmann J., 2006. The symbiosis between nonrelated bacteria in phototrophic consortia. En: Overmann J. (editor) *Molecular Basis of Symbiosis*. *Progress in Molecular Subcellular Biology*, Springer-Verlag, pp. 21-37.
- Paster B.J., Dewhirst F.E., Olsen I. y Fraser G.J., 1994. Phylogeny of *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* spp. and related bacteria. *J Bacteriol* 176, 725-732.
- Puigagut J., Villaseñor J., Salas J.J., Bécares E. y García J., 2007. Subsurface-flow constructed wetlands in Spain for the sanitation of small communities: A comparative study. *Ecological Engineering* 30, 312-319.

- Quaiser A., Ochsenreiter T., Lanz C., Schuster S.C., Treusch A.H., Eck J. y Schleper C., 2003. Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. *Molecular Microbiology* 50, 563–575.
- Rosselló-Móra, R., Antón, J., 2009. Procariotas: Arqueas y Bacterias. En: Vargas P. y Zardoya R. (editores), *El árbol de la vida*. Editorial Reverté. In press.
- Saul D.J., Aislabie J.M., Brown C.E., Harris L. y Foght J.M., 2005. Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. *Microbiology Ecology* 53, 141–155.
- Schlesner H., Jenkins C.J. y Staley T., 2006. The Phylum Verrucomicrobia: A Phylogenetically Heterogeneous Bacterial Group. En: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K-H y Stackebrandt (editores), *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria*, 7, Tercera edición, Springer Science+Business Media, Inc., 881-896 pp.
- Scholes L., Shutes R.B.E., Revitt D.M., Forshaw M., Purchase D., 1998. The treatment of metals in urban runoff by constructed wetlands. *The Science of the Total Environment* 214, 211-219.
- Sheoran A.S. y Sheoran V., 2006. Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wetlands: a critical review. *Minerals Engineering* 19, 105-116.
- Sleytr K., Tietz A., Langergraber G., Haberl R. y Sessitsch A., 2009. Diversity of abundant bacteria in subsurface vertical flow constructed wetlands. *Ecological Engineering* 35, 1021-1025.
- Sobolewski A., 1999. A review of processes responsible for metal removal in wetlands treating contaminated mine drainage, *International Journal of Phytoremediation* 1, 19-51.
- Stolz E. y Greger M., 2002. Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn four wetland plant species growing on submerged mine tailings. *Environmental and Experimental Botany* 47, 271-280.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. y Kumar S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599.
- Tietz A., Hornek R., Langergraber G., Kreuzinger N. y Haberl, R., 2007. Diversity of ammonia oxidising bacteria in a vertical flow constructed wetland. *Water Science and Technology* 56, 241–247.
- Truu M., Juhanson J. y Truu J., 2009. Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands. *Science of the total environment*, 407, 3958-3971.
- Vacca G., Wand H., Nikolausz M., Kusch M. y Kaestner M., 2005. Effect of plants and filter materials on bacteria removal in pilot-scale constructed wetlands. *Water Research* 39, 1361–1373.
- Vartoukiana S.R., Palmera R.M. y Wade W.G., 2007. The division “Synergistes”. *Anaerobe* 13, 99-106.
- Vymazal J. y Krása P., 2003. Distribution of Mn, Al, Cu and Zn in a constructed wetland receiving municipal sewage. *Water Science and Technology* 46, 299–305.
- Vymazal J., 2003. Distribution of iron, cadmium, nickel and lead in a constructed wetland receiving municipal sewage. En Vymazal J. (editor.), *Wetlands-Nutrients, metals and mass cycling* (pp. 341-363). Leiden, The Netherlands: Backhuys.
- Vymazal J., Svehla J., Kröpfelová L. y Chrastny V., 2005. Compartmentalization of metals and other elements in vegetation growing in three constructed wetlands treating municipal sewage in

- the Czech Republic. International Symposium on wetland pollutant dynamics and control, Ghent (Bélgica).
- Walker D.J. y Hurl S., 2002. The reduction of heavy metals in a stormwater wetland. *Ecological Engineering* 18, 407-414.
- Ward N., Staley J.T., Fuerst J.A., Giovannoni S., Schlesner H. y Stackebrandt E., 2006. The Order Planctomycetales, Including the Genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata* and *Isosphaera* and the Candidatus Genera *Brocadia*, *Kuenenia* and *Scalindua*. En: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K-H y Stackebrandt (editores), *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria*. Tercera edición, Springer Science+Business Media, Inc., 7, 757-793 pp.
- Weis J.S. y Weis P., 2004. Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. *Environment International* 30, 685-700.
- Wiessner A., Kusch P., Buddhawong S., Stottmeister U., Mattusch J., Kästner M., 2006. Effectiveness of Various Small-Scale Constructed Wetland Designs for the Removal of Iron and Zinc from Acid Mine Drainage under Field Conditions. *Engineering in Life Sciences* 6, 584-592.
- Wildeman T., Cevall J., Whiting K., Gusek J. y Scheuering J., 1994. Laboratory and pilot scale studies on the treatment of acid rock drainage at a closed gold-mining operation in California. En: *Proceedings of the International Land Reclamation and Mine Drainage Conference and III International Conference on Abatement of Acidic Drainage*, USBM Pub. SP 06A-94, 379-386 pp.
- Acidic Drainage, USBM Pub. SP 06A-94, pp. 379-386. Wise M.G., McArthur J.V. y Shimkets L.J., 1997. Bacterial diversity of a Carolina bay as determined by 16S rRNA gene analysis: confirmation of novel taxa. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1505-1514.
- Ye Z.H., Whiting S.N., Lin Z.Q., Lytle C.M., Qian J.H., Terry N., 2001. Removal and Distribution of Iron, Manganese, Cobalt, and Nickel within a Pennsylvania Constructed Wetland Treating Coal Combustion By-Product Leachate. *Journal of Environmental Quality* 30, 1464-1473.
- Zayed A., Zhy Y.L., Yu M., Terry N., 1999. Phytoaccumulation of trace elements by wetlands plants. III. Uptake and accumulation of ten trace elements by twelve plant species. *Journal of Environmental Quality* 28, 1448-1455.
- Zhang H., Sekiguchi Y., Hanada S., Hugenholtz P., Kim H., Kamagata Y. y Nakamura K., 2003. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1155-1163.
- Zhu N., An P., Krishnakumar B., Zhao L., Sun L., Mizuochi M. y Inamori, Y., 2007. Effect of plant harvest on methane emission from two constructed wetlands designed for the treatment of wastewater. *Journal of Environmental Management* 85, 936-943.



# CONCLUSIONES

1. La planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial permite eliminar zinc y arsénico en disolución. Los tratamientos más eficaces son aquellos plantados con *Phragmites australis*, mientras que los tratamientos menos eficaces son los plantados con *Typha latifolia*.
2. El flujo hidráulico es un factor clave en el diseño de un humedal artificial para la eliminación de zinc de agua. Los sistemas de flujo hidráulico superficial eliminan más zinc. La eliminación de arsénico es favorecida por la presencia de *Phragmites australis*.
3. El Mosaico Jerarquizado de Ecosistemas Artificiales (MJEA®) para el tratamiento de agua residual urbana de la localidad de Bustillo de Cea ha permitido dar cumplimiento a los requisitos establecidos por la legislación vigente en materia de aguas residuales durante el periodo comprendido entre los años 2006 y 2009.
4. La baja concentración de metales pesados en el agua residual urbana garantiza que su reutilización como agua para riego una vez depurada no conlleve ningún riesgo para la salud pública, pese a la baja eficacia del sistema en su eliminación.

5. El sedimento acumulado en las distintas etapas del MJEA®, particularmente la capa orgánica, permite retirar metales pesados del agua funcionando como un sumidero. A pesar de ello, las bajas concentraciones de metales permiten que los sedimentos pudieran ser utilizados directamente como abono en el sector agrario.
6. En los tejidos vegetales de las plantas utilizadas en el MJEA® se acumulan en mayor concentración el hierro, manganeso y boro. La poda y recogida de la biomasa aérea de *Typha latifolia*, labor realizada anualmente, no resulta un método eficaz para la eliminación de metales del sistema, ya que su concentración en esta especie es relativamente baja.
7. Todas las comunidades de bacterias estudiadas están dominadas por bacterias del filo Proteobacteria a excepción de las comunidades de los tratamientos control con flujo superficial de la planta piloto para el tratamiento de agua residual industrial, en los que el filo Cyanobacteria es el más abundante.
8. En la planta para el tratamiento de agua residual industrial la presencia de macrófitos y en menor medida el flujo hidráulico son los factores que más influyen en la composición de la comunidad de bacterias.
9. Las comunidades de bacterias del MJEA® difieren en su composición en función del ambiente en el que se han muestreado, siendo estas diferencias más acusadas en las comunidades de bacterias asociadas al sedimento de la laguna de micrófitos, dominadas por bacterias anaerobias.
10. Las curvas de acumulación y rarefacción muestran que si los OTUs se definen en función de distancias filogenéticas próximas a cero el esfuerzo de muestreo realizado es insuficiente para caracterizar de forma completa la riqueza y diversidad de las comunidades. Cuando las distancias filogenéticas consideradas son mayores el esfuerzo de muestreo realizado es suficiente.
11. Todas las comunidades de bacterias analizadas muestran altos valores de diversidad y riqueza, característicos de hábitats complejos como los estudiados. Estos valores son más altos en las comunidades de bacterias del sistema para el tratamiento de agua residual urbana, que constituye un sistema maduro y que además recibe un agua de contenido más complejo.
12. Los análisis estadísticos aplicados tanto a la composición como a las distancias filogenéticas entre secuencias permiten agrupar las comunidades en función de la planta piloto de la que proceden, la presencia de una determinada especie vegetal y del tipo de flujo hidráulico.