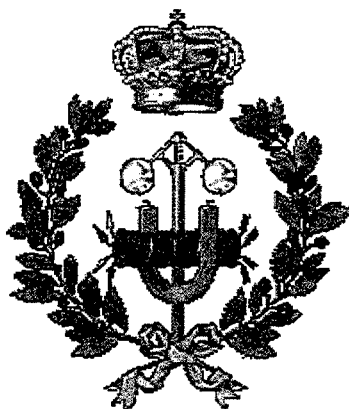


DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS INDUSTRIALES



TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE AGUA DE CIRCULACIÓN DE
UNA CENTRAL NUCLEAR MEDIANTE TÉCNICAS DE
MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**

Autor:

Director:

Ana M. García Ruiz
Licenciada en Biología

Diego A. Moreno Gómez
Doctor en Farmacia

Noviembre 2004

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Índice de Figuras y Tablas..... | 5 |
| 1. Introducción..... | 13 |
| 1.1. Antecedentes..... | 13 |
| 1.2. La Central Nuclear de Cofrentes..... | 16 |
| 1.2.1. Descripción del Ciclo Principal..... | 18 |
| 1.2.2. Sistema de Circulación de Agua..... | 20 |
| 1.2.3. Sistemas de Tratamiento de Agua y Gestión de Líquidos de la Central..... | 21 |
| 1.2.4. Seguridad Radiológica..... | 23 |
| 1.2.5. Métodos de Vigilancia..... | 30 |
| 1.3. Ecología Microbiana de Aguas Dulces..... | 32 |
| 1.4. Caracterización de las Comunidades Microbianas..... | 34 |
| 1.4.1. Importancia de los Microorganismos Viables Pero No Cultivables (VBNC, <i>Viable But Not Culturable</i>)..... | 35 |
| 1.4.2. Técnicas Moleculares para la Caracterización de Comunidades Microbianas..... | 37 |

| | |
|---|----|
| 1.4.2.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, <i>Polimerase Chain Reaction</i>)..... | 41 |
| 1.4.2.2. Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE, <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)..... | 47 |
| 2. Objetivos del Estudio..... | 51 |
| 3. Materiales y Métodos..... | 53 |
| 3.1. Toma de Muestras..... | 53 |
| 3.2. Análisis Físico-Químico del Agua..... | 59 |
| 3.3. Análisis Microscópico del Agua..... | 59 |
| 3.3.1. Microscopía Óptica..... | 59 |
| 3.3.2. Microscopía de Epifluorescencia..... | 60 |
| 3.4. Recuento de Microorganismos Cultivables..... | 63 |
| 3.5. Aislamiento de Microorganismos Cultivables..... | 63 |
| 3.6. Medios de Cultivo..... | 64 |
| 3.7. Extracción de ADN..... | 66 |
| 3.7.1. Extracción con <i>PrepMan™ Ultra</i> | 67 |
| 3.7.2. Extracción con Lisozima y Proteinasa K..... | 68 |
| 3.7.3. Extracción con Tratamiento Enzimático y <i>PrepMan™ Ultra</i> | 69 |
| 3.7.4. Extracción por Congelación-Descongelación..... | 70 |
| 3.7.5. Purificación del ADN por el Método del Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico..... | 70 |
| 3.8. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, <i>Polimerase Chain Reaction</i>)..... | 73 |
| 3.8.1. Muestras Cultivables..... | 75 |
| 3.8.2. Muestras Ambientales..... | 76 |
| 3.8.3. Protocolo de PCR para muestras cultivables (Muyzer y cols., 1993)..... | 80 |
| 3.8.4. Protocolo de PCR MW-001..... | 82 |
| 3.8.5. Protocolo de PCR MW-002..... | 82 |
| 3.8.6. Protocolo de PCR para cianobacterias (Nübel y cols., 1997)..... | 83 |
| 3.9. Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE, <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)..... | 84 |

| | |
|--|-----|
| 3.9.1. Puesta a Punto de las Condiciones de DGGE..... | 86 |
| 3.9.2. Muestras Cultivables..... | 87 |
| 3.9.3. Muestras Ambientales..... | 87 |
| 3.9.4. Preparación del Gel para DGGE..... | 88 |
| 3.9.5. Preparación de Soluciones de Poliacrilamida Desnaturalizantes..... | 89 |
| 3.9.6. Extracción del ADN de las Bandas del Gel de DGGE..... | 90 |
| 3.9.6.1. Método de Difusión en Agua (Jensen y cols., 1998; Miambi y cols., 2003)..... | 91 |
| 3.9.6.2. Método del Mercaptoetanol (Muyzer y cols., 1996)..... | 91 |
| 3.9.6.3. Método del Tampón de Elución (Rolleke y cols., 1996)..... | 92 |
| 3.10. Secuenciación del ADN..... | 92 |
| 3.10.1. Secuenciación con el Kit <i>Microseq 500TM</i> | 94 |
| 3.10.2. Secuenciación con <i>BigDye® Terminator v.1.1</i> | 98 |
| 3.10.3. Desarrollo de la Secuenciación del ADN..... | 101 |
| 3.11. Análisis Filogenéticos..... | 102 |
| 3.12. Técnicas de Clonaje..... | 104 |
| 3.12.1. Selección del Inserto: Fragmento de ADN de Interés..... | 107 |
| 3.12.2. Ligamiento..... | 107 |
| 3.12.3. Transformación..... | 110 |
| 3.12.4. Selección de Clones Transformados..... | 111 |
| 3.12.5. Verificación/Comprobación de los Clones Seleccionados..... | 111 |
| 3.12.6. Búsqueda de Insertos Diferentes..... | 113 |
| 3.12.7. Identificación de los Insertos Diferentes..... | 115 |
| 3.12.8. Preparación de Soluciones y Medios de Cultivo Utilizados en el Clonaje..... | 117 |
| 4. Resultados..... | 121 |
| 4.1. Características Físico-Químicas del Agua..... | 121 |
| 4.1.1. Agua de Aporte..... | 121 |
| 4.1.2. Agua de Vertido..... | 125 |
| 4.2. Análisis Microscópico del Agua..... | 130 |

| | |
|---|-----|
| 4.2.1. Microscopía de Epifluorescencia..... | 130 |
| 4.2.2. Microscopía Óptica..... | 133 |
| 4.3. Recuento de Microorganismos Cultivables..... | 136 |
| 4.4. Aislamiento e Identificación de Microorganismos Cultivables..... | 137 |
| 4.4.1. Agua de Aporte..... | 138 |
| 4.4.2. Punto N71..... | 143 |
| 4.4.3. Balsa Oeste..... | 147 |
| 4.4.4. Balsa Este..... | 160 |
| 4.4.5. Tanques de Hormigón..... | 170 |
| 4.4.6. Cultivo de Bacterias Reductoras de Sulfato..... | 173 |
| 4.5. Caracterización de las Muestras Ambientales..... | 176 |
| 4.5.1. DGGEs Ambientales por Muestreos..... | 176 |
| 4.5.2. DGGEs Ambientales por Puntos de Muestreo..... | 182 |
| 4.5.3. Identificación de las Bandas de DGGE..... | 188 |
| 5. Discusión..... | 191 |
| 5.1. Características Físico-Químicas del Agua..... | 191 |
| 5.2. Recuento de Microorganismos..... | 194 |
| 5.3. Identificación de Microorganismos..... | 199 |
| 5.3.1. Algas Filamentosas..... | 199 |
| 5.3.2. Bacterias..... | 201 |
| 5.4. Caracterización de Muestras Ambientales..... | 218 |
| 6. Conclusiones..... | 227 |
| 7. Líneas de Investigación Futuras..... | 231 |
| 8. Bibliografía..... | 233 |

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS:

| | |
|--|----|
| Figura 1. Esquema simplificado de la refrigeración de una Central Nuclear..... | 19 |
| Figura 2. Esquema de los tipos de circuitos de refrigeración..... | 21 |
| Figura 3. Esquema de los caminos seguidos por los vertidos radiactivos a las aguas superficiales..... | 25 |
| Figura 4. Esquema de la incidencia de la Central Nuclear de Cofrentes sobre el medio ambiente..... | 27 |
| Figura 5. Esquema de los cambios de temperatura durante un ciclo de PCR..... | 43 |
| Figura 6. Imagen de una DGGE: A, perpendicular; B, paralela..... | 49 |
| Figura 7. Sistema de tratamiento de agua y gestión de líquidos de la Central Nuclear de Cofrentes..... | 54 |
| Figura 8. Fotografías de la toma de muestras de agua del sistema de circulación de la Central Nuclear de Cofrentes. A: Toma de muestra de agua de la balsa de vertidos. B: Envase de plástico estéril utilizado para recoger las muestras. C: Dispositivo utilizado para recoger el agua de las balsas de vertido. D: Toma de muestra de agua de los tanques de hormigón a través del grifo exterior..... | 56 |

Índice de Figuras y Tablas

| | |
|---|-----|
| Figura 9. Esquema del rendimiento de una PCR..... | 74 |
| Figura 10. Rampa de temperatura de la PCR para muestras cultivables (Muyzer y cols., 1993)..... | 81 |
| Figura 11. Rampa de temperatura de la PCR MW-001..... | 82 |
| Figura 12. Rampa de temperatura de la PCR MW-002..... | 83 |
| Figura 13. Rampa de temperatura de la PCR para cianobacterias..... | 84 |
| Figura 14. Esquema del sistema de secuenciación por el método del dideoxi..... | 93 |
| Figura 15. Imagen de una secuencia obtenida por secuenciación automática..... | 94 |
| Figura 16. Rampa de temperaturas de la primera PCR de secuenciación con el kit <i>Microseq 500TM</i> | 96 |
| Figura 17. Rampa de temperaturas de la 2ª PCR de secuenciación con el kit <i>Microseq 500TM</i> | 97 |
| Figura 18. Rampa de temperaturas de la PCR de secuenciación con el kit <i>BigDye[®] Terminator v.1.1</i> | 100 |
| Figura 19. Secuencia de nucleótidos en formato <i>FASTA</i> | 103 |
| Figura 20. Alineamiento de las secuencias con el programa <i>ClustalX</i> | 104 |
| Figura 21. Esquema del protocolo de clonaje de un gen en una bacteria a través de un plásmido..... | 106 |
| Figura 22. Mapa del plásmido <i>pGEM[®]-T Easy Vector</i> | 108 |
| Figura 23. Rampa de temperaturas utilizada en la PCR para comprobación de la presencia del inserto..... | 113 |
| Figura 24. Concentración de fósforo total, nitratos, sólidos en suspensión y DQO del agua de aporte a la CNC..... | 123 |
| Figura 25. Conductividad del agua de aporte a la CNC..... | 124 |
| Figura 26. Concentración de sulfatos y cloruros del agua de aporte a la CNC..... | 124 |
| Figura 27. Concentración de fósforo total, nitratos, sólidos en suspensión y DQO del agua de vertidos de la CNC..... | 127 |
| Figura 28. Concentración de sulfatos y cloruros del agua de aporte a la CNC..... | 127 |
| Figura 29. Conductividad del agua de aporte a la CNC..... | 129 |
| Figura 30. Temperatura del agua a la entrada al condensador de la CNC..... | 129 |
| Figura 31. Recuento de microorganismos en los diferentes puntos del sistema de circulación de la CNC por Microscopía de Epifluorescencia con el fluorocromo DAPI..... | 131 |

| | |
|--|-----|
| Figura 32. Micrografías de epifluorescencia con el fluorocromo DAPI (x100 Inmersol) mostrando la morfología de diatomeas observadas en las balsas de almacenamiento temporal de vertidos..... | 132 |
| Figura 33. Recuento de diatomeas en diferentes puntos del sistema de circulación de la CNC por Microscopía de Epifluorescencia con el fluorocromo DAPI..... | 133 |
| Figura 34. Micrografía en contraste de fases de las diatomeas observada en el agua de las balsas de almacenamiento temporal de vertidos (x100 Inmersol)..... | 134 |
| Figura 35. Micrografía en campo oscuro de las algas observadas en las balsas de almacenamiento temporal de vertidos (x10 aumentos) A: <i>Oedogonium pringsheimii</i> , B: <i>Cladophora glomerata</i> | 135 |
| Figura 36. Micrografía en contraste de fases de las algas observadas en las balsas de almacenamiento temporal de vertidos A: i <i>Oedogonium pringsheimii</i> , ii <i>Cladophora glomerata</i> (x10 aumentos); B: Detalle de un oogonio de <i>O. pringsheimii</i> (x100 Inmersol); C: Detalle de un filamento de <i>O. pringsheimii</i> (x100 Inmersol); D: Detalle de un filamento de <i>C. glomerata</i> (x100 Inmersol).... | 135 |
| Figura 37. Recuento de microorganismos cultivables en los diferentes puntos de muestreo del sistema de circulación de la CNC..... | 136 |
| Figura 38. Geles de DGGE mostrando los patrones de bandas de algunos microorganismos aislados del agua de aporte a la CNC en los muestreos 4 MW (A) y 7MW (B)..... | 140 |
| Figura 39. Geles de DGGE mostrando los patrones de bandas de algunos microorganismos aislados en el punto de muestreo N71..... | 144 |
| Figura 40. Geles de DGGE mostrando los patrones de bandas de algunos microorganismos aislados en la Balsa Oeste en los muestreos 4 MW (A), 5 MW (B), 7MW (C) y 14 MW (D)..... | 151 |
| Figura 41. Geles de DGGE mostrando los patrones de bandas de algunos microorganismos aislados en la Balsa Oeste en los muestreos 10 MW y 13 MW..... | 152 |
| Figura 42. Geles de DGGE mostrando los patrones de bandas de algunos microorganismos aislados en la Balsa Este en los muestreos 6 MW (A), 7MW (B), 8MW y 9 MW (C y D)..... | 164 |
| Figura 43. Gel de DGGE mostrando los patrones de bandas de los microorganismos aislados en el tanque de hormigón N74-A005..... | 172 |
| Figura 44. DGGE ambiental de los puntos de muestreo analizados durante los muestreos 4 MW, 5 MW y 6 MW..... | 177 |

Índice de Figuras y Tablas

| | |
|--|-----|
| Figura 45. DGGEs ambientales de los puntos de muestreo analizados durante los muestreos 7 MW, 8 MW y 9 MW (A) y 10 MW, 11 MW, 12 MW y 13 MW (B)..... | 181 |
| Figura 46. DGGE ambiental del agua de aporte a la CNC en los muestreos 4 MW, 6 MW y 7 MW..... | 183 |
| Figura 47. DGGE ambiental del agua de los tanques de hormigón en los muestreos 5 MW, 6 MW y 14 MW..... | 184 |
| Figura 48. DGGE ambiental del agua de la Balsa Este en los muestreos 4 MW, 6 MW, 7 MW, 8 MW y 9 MW..... | 185 |
| Figura 49. DGGE ambiental del agua de la Balsa Oeste en los muestreos 4 MW, 5 MW y 7 MW (gel A) y 10 MW-13 MW (gel B)..... | 187 |
| Figura 50. Árbol filogenético de los diversos microorganismos aislados en el agua de aporte a la CNC..... | 208 |
| Figura 51. Árbol filogenético de los microorganismos aislados en el punto N71..... | 210 |
| Figura 52. Árbol filogenético de los microorganismos aislados en la Balsa Oeste..... | 211 |
| Figura 53. Árbol filogenético de los microorganismos aislados en la Balsa Este..... | 213 |
| Figura 54. Árbol filogenético de los microorganismos aislados en el tanque de hormigón N74-AA005..... | 214 |
| Figura 55. Árbol filogenético de los microorganismos aislados en <i>Postgate E</i> | 217 |

TABLAS:

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Fechas y puntos de muestreo de agua del sistema de circulación de la CNC..... | 58 |
| Tabla 2. Fluorocromos y filtros empleados para el recuento de microorganismos por Microscopía de Epifluorescencia..... | 62 |
| Tabla 3. Composición del medio Triptona de Soja (TSB, OXOID CM 129) pH = 7,3 ± 0,2; suplementado con agar..... | 64 |
| Tabla 4. Composición del medio Agar medio oligotrófico R2 (R2, MICROKIT DMT 215) pH = 7,2 ± 0,2..... | 65 |
| Tabla 5. Composición del medio Agar STC (Starch Casein) pH = 7,2 ± 0,2..... | 65 |
| Tabla 6. Composición del medio <i>Postgate B</i> , pH = 7,2 - 7,5..... | 66 |
| Tabla 7. Reactivos empleados en la reacción de PCR de muestras cultivables..... | 76 |

Evaluación microbiológica del sistema de agua de circulación de una central nuclear

| | | |
|-----------|---|-----|
| Tabla 8. | Pares de cebadores utilizados en la PCR anidada de muestras ambientales..... | 77 |
| Tabla 9. | Reactivos empleados en la 1ª PCR de muestras ambientales..... | 77 |
| Tabla 10. | Reactivos empleados en la 2ª PCR ó PCR anidada de muestras ambientales..... | 78 |
| Tabla 11. | Secuencia de los diferentes cebadores empleados en las reacciones de PCR..... | 78 |
| Tabla 12. | Reactivos empleados en la PCR de muestras ambientales para cianobacterias..... | 79 |
| Tabla 13. | Composición del tampón TBE..... | 80 |
| Tabla 14. | Composición del tampón TAE..... | 87 |
| Tabla 15. | Composición de la solución Acrilamida/Bisacrilamida (37,5:1) al 40%..... | 89 |
| Tabla 16. | Composición de la solución de poliacrilamida desnaturalizante al 0%..... | 90 |
| Tabla 17. | Composición de las soluciones desnaturalizantes para geles al 6%..... | 90 |
| Tabla 18. | Reactivos empleados en la 1ª PCR de secuenciación con el kit <i>Microseq 500™</i> | 95 |
| Tabla 19. | Reactivos empleados en la 2ª PCR de secuenciación con el kit <i>Microseq 500™</i> | 97 |
| Tabla 20. | Cantidad de ADN necesaria para la amplificación por PCR con el kit <i>BigDye® Terminator v.1.1</i> | 98 |
| Tabla 21. | Reactivos empleados en la PCR de secuenciación con el kit <i>BigDye® Terminator v.1.1</i> | 99 |
| Tabla 22. | Reactivos empleados en la PCR del control positivo de secuenciación con el kit <i>BigDye® Terminator v.1.1</i> | 99 |
| Tabla 23. | Reactivos empleados en el ligamiento del inserto en el plásmido <i>pGEM®-T</i> | 109 |
| Tabla 24. | Reactivos empleados en la reacción de PCR para comprobación de la presencia del inserto..... | 112 |
| Tabla 25. | Reactivos empleados en la reacción de PCR para búsqueda de insertos diferentes..... | 114 |
| Tabla 26. | Composición del Mg^{2+} 2M..... | 118 |
| Tabla 27. | Parámetros analizados en el agua de aporte y valores de referencia..... | 122 |
| Tabla 28. | Temperatura del agua del Embalse de Embarcaderos, cerca de la zona de captación de la CNC (°C)..... | 125 |
| Tabla 29. | Tabla 3 del Anexo al título IV del Reglamento del Dominio Público Hidráulico..... | 126 |

Índice de Figuras y Tablas

| | |
|---|-----|
| Tabla 30. Concentración de aluminio, cobre y zinc en las balsas de almacenamiento temporal de vertidos..... | 128 |
| Tabla 31. UFC aisladas en el agua de aporte a la CNC sobre los diferentes medios de cultivo utilizados en el estudio..... | 139 |
| Tabla 32. Microorganismos identificados en el agua de aporte en el muestreo 4 MW..... | 141 |
| Tabla 33. Microorganismos identificados en el agua de aporte en el muestreo 7 MW..... | 142 |
| Tabla 34. UFC aisladas en el agua del punto N71 sobre los diferentes medios de cultivo utilizados en el estudio..... | 143 |
| Tabla 35. Microorganismos identificados en el agua del punto de muestreo N71..... | 146 |
| Tabla 36. UFC aisladas en el agua de la Balsa Oeste sobre los diferentes medios de cultivo utilizados en el estudio..... | 148 |
| Tabla 37. Microorganismos identificados en el agua de la Balsa Oeste en el muestreo 5 MW..... | 153 |
| Tabla 38. Microorganismos identificados en el agua de la Balsa Oeste en el muestreo 7 MW..... | 154 |
| Tabla 39. Microorganismos identificados en el agua de la Balsa Oeste en el muestreo 10 MW..... | 155 |
| Tabla 40. Microorganismos identificados en el agua de la Balsa Oeste en el muestreo 13 MW..... | 156 |
| Tabla 41. Microorganismos identificados en el agua de la Balsa Oeste en el muestreo 14 MW..... | 158 |
| Tabla 42. Microorganismos identificados en el agua de la Balsa Oeste en el muestreo 4 MW..... | 159 |
| Tabla 43. UFC aisladas en el agua de la Balsa Este sobre los diferentes medios de cultivo utilizados en el estudio..... | 161 |
| Tabla 44. Microorganismos identificados en el agua de la Balsa Este en el muestreo 4 MW..... | 165 |
| Tabla 45. Microorganismos identificados en el agua de la Balsa Este en el muestreo 6 MW..... | 166 |
| Tabla 46. Microorganismos identificados en el agua de la Balsa Este en el muestreo 7 MW..... | 167 |
| Tabla 47. Microorganismos identificados en el agua de la Balsa Este en el muestreo 8 MW..... | 168 |

Evaluación microbiológica del sistema de agua de circulación de una central nuclear

| | |
|--|-----|
| Tabla 48. Microorganismos identificados en el agua de la Balsa Este en el muestreo 9 MW..... | 170 |
| Tabla 49. UFC aisladas en el agua del tanque de hormigón N74-A005 sobre los diferentes medios de cultivo utilizados en el estudio..... | 171 |
| Tabla 50. Microorganismos identificados en el agua del tanque de hormigón N74-A005..... | 173 |
| Tabla 51. Microorganismos del agua del sistema de circulación aislados en medio <i>Postgate E</i> | 175 |
| Tabla 52. Identificación de los clones obtenidos en el punto N71 del muestreo 14 MW..... | 189 |
| Tabla 53. Identificación de los clones obtenidos en la Balsa Oeste en el muestreo 14 MW..... | 189 |
| Tabla 54. Microorganismos aislados en el agua del sistema de circulación de la Central Nuclear de Cofrentes..... | 204 |
| Tabla 55. Porcentaje de microorganismos aislados en los diferentes puntos del sistema de circulación de la Central Nuclear de Cofrentes..... | 207 |

Índice de Figuras y Tablas

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

Las centrales nucleares requieren importantes volúmenes de agua para la refrigeración del condensador y otros circuitos y por ello se encuentran ubicadas en las proximidades de grandes extensiones de agua como mares, ríos, lagos y embalses. A grandes rasgos, en los sistemas de refrigeración el calor que se genera en los intercambiadores de calor es disipado mediante evaporación. Una vez ha desempeñado su función, el agua se devuelve a la fuente natural de la que fue tomada tras haber pasado una serie de análisis que posibilitan su vertido.

En los sistemas de refrigeración cerrados, como el de la Central Nuclear de Cofrentes (CNC), el agua es sometida a una serie de procesos de depuración antes de entrar a formar parte del sistema, pero éstos no implican su esterilidad por lo que parte de los microorganismos que componen la comunidad microbiana de la fuente natural de agua pasa al sistema de refrigeración. El incremento de temperatura que tiene lugar en el agua de los sistemas de refrigeración, así como el aumento en la concentración

de materia orgánica debido a los procesos de evaporación, convierten a estos sistemas en un lugar idóneo para el desarrollo de dichos microorganismos. Además, estos sistemas cerrados no lo están en su totalidad, sino que existen zonas abiertas donde se puede producir la incorporación de nuevos microorganismos desde el ambiente. Por otro lado, las pérdidas de agua que se producen como consecuencia de la evaporación deben ser compensadas, por lo que el sistema de refrigeración recibe periódicamente aportes de agua que proporcionan la entrada de nuevos microorganismos y la renovación de los nutrientes.

Adicionalmente, en todos los ambientes acuáticos los microorganismos (bacterias, algas, hongos, etc.) interactúan con las superficies, colonizándolas y dando lugar a la formación de biopelículas (Costerton y cols., 1995). Estos consorcios microbianos pueden originar fenómenos de bioensuciamiento y biocorrosión en los sistemas de refrigeración, donde existe gran cantidad de superficies sumergidas (Cloete y De Bruyn, 1995; Lutterbach y de Franca, 1996; Rao y Nair, 1998). Las consecuencias del bioensuciamiento son pérdidas de energía debido al incremento en el rozamiento del fluido y pérdidas de la eficiencia en la transferencia de calor (Zelver y cols., 1982), lo que en una central nuclear resulta de especial interés durante una emergencia o un accidente (Licina, 1988). Las biopelículas, que consisten en conjuntos de microorganismos embebidos en una matriz exopolimérica de origen microbiano que los mantiene unidos junto con otras sustancias del medio en que se encuentran (Charaklis y Marshall, 1990), favorecen la formación de nuevos microambientes para el crecimiento microbiano y proporcionan a las bacterias una serie de ventajas, como la resistencia a tratamientos de desinfección (Wingender y cols., 1999).

Por último, el agua del sistema de refrigeración se vierte a unas balsas de almacenamiento temporal de vertidos donde se mantiene unos días, a la espera de los

resultados de los análisis medioambientales, antes de ser liberada definitivamente a la fuente natural. Estas balsas pueden constituir nichos ideales para el desarrollo de numerosos microorganismos, pudiendo producirse en ellas auténticos afloramientos o “*blooms*” (European Comission, 2003). Estos afloramientos dependen de las condiciones ambientales y de la disponibilidad de recursos para el crecimiento de los microorganismos. Dada la capacidad de estas balsas, su vertido puede provocar alteraciones en el ecosistema al que se incorpora el agua, bien por un incremento en el tamaño de las poblaciones microbianas o por cambios en la composición de las mismas.

Aunque existen multitud de estudios sobre la calidad microbiológica de aguas naturales entre la documentación manejada, ninguno de ellos se ha efectuado en las proximidades de una central nuclear. La mayoría de los estudios llevados a cabo en relación con este tipo de instalaciones están dedicados al impacto radiológico de las centrales nucleares (Baeza y cols., 1991; Nedveckaite y cols., 2000; Baeza y cols., 2001; Howard y cols., 2004). En este sentido, se ha publicado un estudio sobre el impacto de la central nuclear de Ascó sobre el río Ebro (Sánchez-Cabeza y cols., 2000) en el que se concluye que no existe riesgo para la salud ni para el medio ambiente, pero no se analiza el impacto sobre la calidad microbiológica de las aguas. Yang y Yang (2001) han estudiado la ecología microbiana del suelo en los alrededores de una central nuclear de Taiwán, y aunque han observado variaciones en la población no las han podido asociar a los efectos de operación de la central.

Respecto a los sistemas de refrigeración, se han realizado estudios sobre el efecto de la temperatura de las aguas receptoras (Wu y cols., 2001; Chen y cols., 2003) y sobre la población de peces (Barnthouse, 2000; Perry y cols., 2002; Ehrler y cols., 2002) y crustáceos (Bamber y Seaby, 2004). El incremento de la temperatura de las aguas receptoras parece que influye en el desarrollo de microorganismos

oportunistas y termófilos (Solovykh y cols., 1998; Suzdaleva, 2001), afectando a la composición de la comunidad microbiana y contribuyendo a la contaminación del agua. En cuanto a la fauna acuática, los sistemas de refrigeración provocan un descenso en el número de larvas de ciertas especies por efecto de la temperatura sobre las aguas receptoras y como consecuencia del paso del agua por el circuito de refrigeración que causa la destrucción mecánica de las mismas. Además se han detectado en las aguas del río Ebro algunos ejemplares de peces mutantes, que han sido asociados a los vertidos radiactivos de la Central Nuclear de Santa María de Garoña.

Por todo ello, resulta de gran interés el análisis de los microorganismos que se desarrollan en los sistemas de refrigeración de las centrales nucleares y cómo varían las poblaciones del agua a lo largo de estos sistemas, desde su origen hasta su vertido.

1.2. LA CENTRAL NUCLEAR DE COFRENTES

La Central Nuclear de Cofrentes, propiedad de IBERDROLA S.A., es en la actualidad el centro de producción de energía eléctrica más importante de la Comunidad Valenciana y una de las centrales de mayor potencia de nuestro país.

La Central está situada en el término municipal de Cofrentes, a unos 110 kilómetros de Valencia capital, en la margen derecha del río Júcar, aguas arriba de su confluencia con el río Cabriel, (a unos 47 m por encima del nivel medio de las aguas del río Júcar, cota 372 m sobre el nivel del mar) en la cola del embalse de Embarcaderos, que sirve como fuente de refrigeración de la Central.

La elección del emplazamiento de la Central se efectuó siguiendo el proceso de selección basado en criterios coincidentes con los aplicables a otras instalaciones

productoras de energía, tales como la existencia de un medio refrigerante, la disponibilidad de terrenos, la proximidad a zonas de consumo, etc., a los que se añaden otros criterios específicos exigidos por la reglamentación nuclear. El estudio de dichos requisitos permitió la evaluación técnica de la idoneidad del emplazamiento elegido y la inclusión en el proyecto de las medidas adecuadas para que la operación de la Central tuviera el menor impacto posible.

El proyecto de la Central Nuclear de Cofrentes se inició en Marzo de 1973, al contratarse con General Electric, Co. el suministro del reactor, del turbogenerador y la primera carga de combustible. En las mismas fechas, se contrataron los trabajos de ingeniería, permitiendo que a lo largo de los años 1973, 1974 y 1975 se realizara la ingeniería básica, adquisición del equipo principal y obtención de la Autorización de Construcción que fue concedida el 6 de Septiembre de 1975, comenzándose a partir de ese momento la explanación de los terrenos y las obras de cimentación donde habrían de construirse los edificios de la Central.

La obra civil y montaje de equipos se desarrolló entre 1975 y finales de 1982, fecha en la que se aprobó por parte de los organismos competentes el Programa de Pruebas Nucleares que se prolongaría entre 1983 y 1984.

La primera carga de combustible tuvo lugar el día 6 de Agosto de 1984 como paso previo y necesario a la definitiva conexión de la Central a la red eléctrica nacional que tuvo lugar el día 14 de Octubre de ese mismo año.

Desde entonces, la Central Nuclear de Cofrentes ha venido funcionando con normalidad, contribuyendo con una producción media anual de 7.800 millones de Kw·h⁻¹ al mercado eléctrico, donde llega a alcanzar cuotas de participación del 70% en la Comunidad Valencia y del 4% para el conjunto del país.

Prácticamente todas las edificaciones de la Central quedan dentro del área de exclusión. Esta área es de 750 metros de radio tomando como punto central el eje del reactor. En ella se diferencian tres zonas:

- Zona de edificios principales, que incluye el edificio de turbinas, el auxiliar, el del reactor y el del combustible.
- Zona de edificios menores, que comprende el edificio de calderas auxiliares, el de calentadores, el de tratamientos de desechos radiactivos, el de grupos diesel, el de servicios, el eléctrico, las oficinas, los talleres y los almacenes.
- Zona de servicios de refrigeración y gestión de líquidos, constituida por las torres de refrigeración, el edificio de tratamiento de agua, el estanque de agua de servicios esenciales, las balsas de vertido y el parque de intemperie.

1.2.1. DESCRIPCIÓN DEL CICLO PRINCIPAL

La Central Nuclear de Cofrentes está equipada con un reactor de agua en ebullición del tipo BWR-6 (BWR, *Boiling Water Reactor*) que emplea dióxido de uranio (UO_2) enriquecido al 2,6% aproximadamente en isótopo U-235 como combustible. Dispone de una potencia térmica de 3.015 MWt lo que permite obtener una potencia eléctrica nominal de 1.025,4 MWe.

El principio del funcionamiento de una central nuclear, al igual que una central térmica, se basa en la transformación de la energía calorífica de un combustible en energía mecánica y ésta en energía eléctrica. En el caso de las centrales nucleares el calor lo produce la fisión del uranio en el reactor nuclear. Este combustible se presenta en forma de pastillas cilíndricas apiladas en unos tubos o vainas de aleación metálica

de zircaloy, las cuales, a su vez, se agrupan en haces denominados "elementos combustibles". El calor producido en el reactor nuclear calienta un fluido, normalmente agua, para producir vapor, que se expande en una turbina que acciona un generador eléctrico para producir la electricidad. El vapor de agua que sale de la turbina pasa a estado líquido en el condensador, retornando, mediante el concurso de las bombas de condensado y de agua de alimentación, al generador de vapor para reiniciar el ciclo (**Figura 1**).

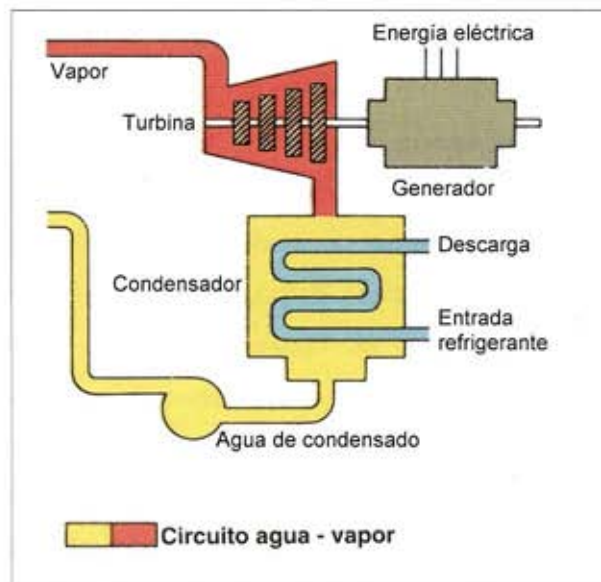


Figura 1. Esquema simplificado de la refrigeración de una Central Nuclear.
(<http://217.127.34.207/VIGILANCIA.HTM>)

La regulación del calor que se produce en la fisión nuclear se lleva a cabo con elementos que modifican el flujo neutrónico, y que son denominados barras de control, pues se trata de barras constituidas por materiales metálicos absorbentes de

neutrones (principalmente componentes de boro y cadmio) que se introducen en el núcleo del reactor. Estas barras son deslizantes y cuanto más introducidas están en el núcleo más neutrones absorben, con lo que disminuye el número de fisiones. Por el contrario, al extraer las barras, el número de fisiones aumenta, pudiendo así controlar la potencia del reactor.

1.2.2. SISTEMA DE CIRCULACIÓN DE AGUA

Mediante un caudal de agua aportado por un tercer circuito "sistema de circulación", se realiza la refrigeración del condensador. El sistema de refrigeración toma agua de una fuente natural (río, embalse, lago, mar) y la usa para condensar el vapor de agua una vez que éste ha movido la turbina, de forma similar a las de cualquier otra central térmica de carbón, fuel-oil, gas o de ciclo combinado. Después, el agua del circuito de refrigeración exterior se devuelve al río, el embalse o el mar, a una temperatura superior a la que se tomó. Esta agua no está en contacto directo con el combustible nuclear, por lo que no contiene elementos radiactivos. Existen fundamentalmente dos tipos de sistemas de refrigeración: en circuito abierto o en circuito cerrado con torres de refrigeración (**Figura 2**). En el primer caso, el agua se devuelve completamente a la fuente de donde se ha tomado, mientras que con el circuito cerrado sólo una parte del agua tomada de la fuente natural es devuelta a la misma, de forma que el incremento de la temperatura del agua devuelta es bastante menor.

En la Central Nuclear de Cofrentes la refrigeración es en circuito cerrado mediante dos torres de tiro natural, de 130 m de altura y 90 m de diámetro en la base. El agua procedente de la refrigeración de los condensadores de la turbina principal es enviada a la parte superior de las torres por tubería cerrada, donde se enfría al caer

pulverizada en contracorriente con el aire ascendente. El agua sale del fondo o balsa de las torres por un canal descubierta hasta la casa de bombas de circulación, del tipo intemperie, donde 4 bombas de hélice, de eje vertical y 2.800 HP de potencia unitaria, impulsan un caudal de refrigeración de $28 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ hasta los condensadores, cerrando el circuito. Al SO de las torres de refrigeración hay 5 balsas (2 de 130.000 m^3 y 3 de 5.500 m^3 de capacidad) destinadas a recoger los vertidos líquidos de la Central antes de su análisis y descarga controlada al río.

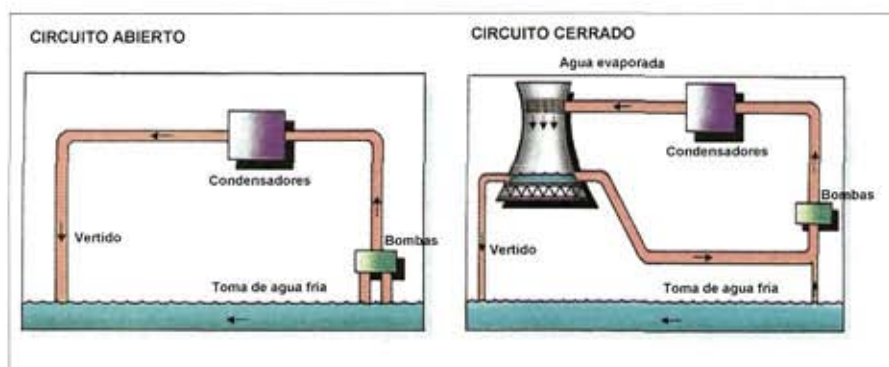


Figura 2. Esquema de los tipos de circuitos de refrigeración.
(<http://217.127.34.207/VIGILANCIA.HTM>)

1.2.3. SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE AGUA Y GESTIÓN DE LÍQUIDOS DE LA CENTRAL

Toda el agua necesaria para el funcionamiento de la Central Nuclear de Cofrentes se toma del embalse de Embarcaderos a través de una estación de bombeo situada a unos 5 km al NO de los edificios principales de la Central. Dispone de tres bombas del 50% de capacidad cada una, que elevan hasta $1.100 \text{ L} \cdot \text{s}^{-1}$ hasta la primera

planta de tratamiento de agua, donde se procede a una decantación y filtrado, eliminando la materia en suspensión procedente del río. Esta planta consta de dos decantadores circulares del tipo de recirculación de fangos, del 50% de capacidad unitaria, que utilizan alúmina como coagulante, procediéndose a una filtración posterior a través de cuatro filtros de gravedad del tipo “Mono-Pack” con una capacidad de $900 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ cada uno. Los fangos resultantes, entre 20 y $60 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ dependiendo de las impurezas del agua del río, se envían a una planta de tratamiento de fangos donde son espesados y secados con la ayuda de un polielectrolito, para finalmente ser evacuados para su almacenamiento. La mayor parte del agua filtrada se utiliza directamente para suplir las pérdidas del sistema en circulación en las torres de tiro natural, evaporándose $660 \text{ L} \cdot \text{s}^{-1}$ con una purga en continuo de unos $330 \text{ L} \cdot \text{s}^{-1}$ hacia dos balsas de control de vertidos (130.000 m^3) para su posterior devolución al río. La purga se ajusta en función de la salinidad del agua y la evaporación para mantener la concentración deseada (2 a 3 concentraciones).

El agua destinada a los demás sistemas se somete a una serie de tratamientos posteriores más complejos, en función de los requerimientos químicos del sistema. El agua empleada en el ciclo principal requiere el ablandamiento en dos reactivadores del 100% que utilizan cal, sulfato de alúmina como coagulante e hipoclorito sódico como desinfectante. Después es filtrada en dos filtros de arena a presión del 100% y por último es desmineralizada en dos cadenas de resinas de intercambio iónico, donde se obtiene un agua aceptable para reposición al ciclo principal, con una capacidad de producción de 450 m^3 al día funcionando 15 horas. El sistema de agua de servicio de la Central, se utiliza para refrigerar la mayoría de los componentes que no son de seguridad. Dispone de 3 torres de tiro mecánico, que reponen las pérdidas con agua procedente de la fase de ablandamiento, anteriormente mencionada, sometida a una suavización adicional en cambiadores de zeolitas. El sistema de agua de servicio

esencial, se utiliza para refrigerar los sistemas de seguridad durante accidente o pérdida de los sistemas normales de extracción de calor del reactor. Consta de un estanque de reserva de 79.000 m³, que enfría las tuberías de retorno de agua caliente mediante aspersores. La reposición de agua por evaporación natural se hace con agua desmineralizada para evitar el aumento de concentración de sales. Además el estanque dispone de un sistema de cloración para eliminar materia orgánica. Todos los efluentes de los sistemas de tratamiento de agua se envían a una balsa de neutralización donde se normaliza el pH entre 6,5 y 8 antes de su vertido definitivo. Por otro lado, los drenajes líquidos de equipos y los derrames de los edificios de la Central son recogidos por el sistema de residuos radiactivos, donde son tratados en dos cadenas dependiendo de su conductividad. Tras ser filtrados y desmineralizados, se reintegran al ciclo, y los residuos sólidos procedentes del tratamiento son eliminados en bidones de 200 L de capacidad compactados con cemento. Los líquidos que contienen detergentes o de difícil recuperación son evaporados, recogién dose y embidonándose igualmente los residuos sólidos.

1.2.4. SEGURIDAD RADIOLÓGICA

Para garantizar que no se vierte de la Central ningún líquido incontroladamente, se dispone de un sistema de recogida de vertidos para su verificación antes del vertido definitivo. Los posibles efluentes se clasifican en dos categorías, no radiactivos y potencialmente radiactivos. Los no radiactivos proceden básicamente de la purga de las torres de tiro natural y se descargan alternativamente a dos balsas independientes (de 130.000 m³) donde se almacenan durante cuatro días, mientras se realizan los análisis pertinentes antes de su vertido final. Los residuos potencialmente radiactivos se almacenan en tres balsas de 5.500 m³ cada una, donde también son analizados, para verterlos a través de las balsas de vertidos no radiactivos.

El control y supervisión de las características de los vertidos antes de proceder a su liberación al río, se realizan con el fin de mantener la calidad del agua dentro de los límites fijados por la Autorización Administrativa correspondiente y tras una serie de análisis químicos y radioquímicos previos en los que la Central certifica la “potabilidad radiológica” acorde con los requisitos exigidos por la Confederación Hidrográfica del Júcar, especificados en el “Reglamento de Vertidos de la Central Nuclear Cofrentes”, validado por el Consejo de Seguridad Nuclear. Este proceso se ve facilitado por el hecho de disponer de dos balsas de vertidos y un único punto de emisión. Por otra parte, el agua que se utiliza tiene que poseer unas características físico-químicas adecuadas para el buen funcionamiento de los equipos de la Central, por lo que la tomada del Embalse de Embarcaderos necesita ser previamente tratada. A este efecto se han analizado muestras del agua del río desde el año 1976, lo que permite establecer y controlar fielmente la incidencia química de la Central en el Júcar.

La comparación de los análisis de agua se realiza mensualmente por la Confederación Hidrográfica del Júcar. Para ello, toma muestras aguas arriba y aguas abajo de la Central, siendo la condición del vertido de “potabilidad” en el análisis radioquímico y de un incremento de sales inferior al 10%. También la Universidad Politécnica de Valencia realiza supervisiones trimestrales de los análisis de los vertidos de las balsas.

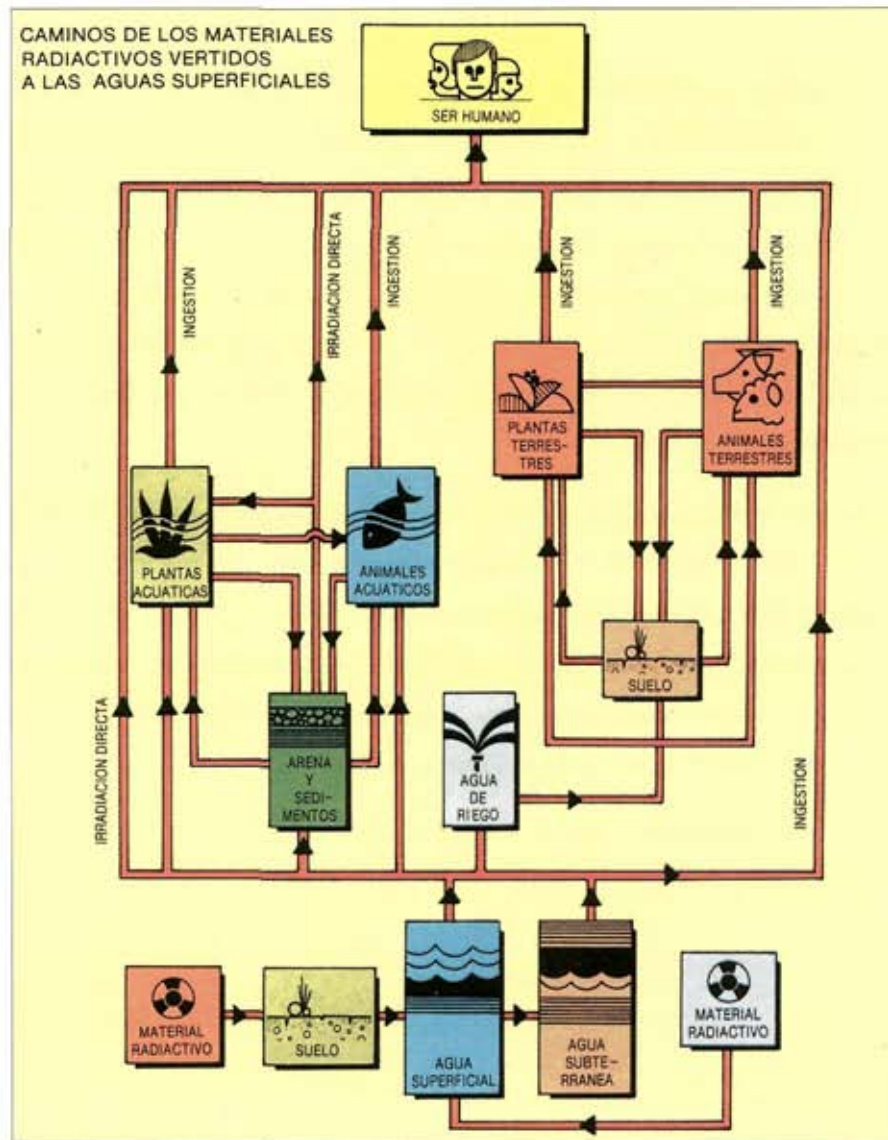


Figura 3. Esquema de los caminos seguidos por los vertidos radiactivos a las aguas superficiales. (IBERDROLA, 1994)

Buscando desde el principio la mínima alteración del cauce del río Júcar y del embalse de Embarcaderos, se proyectó la estructura de toma de agua aprovechando la existencia de una central hidráulica y se eligió la descarga de tipo superficial para los efluentes líquidos. De esta manera, puede decirse que las obras de la Central no han afectado en absoluto al cauce del río. Por otra parte, todo el bloque de edificios de la Central está impermeabilizado, por lo que no pueden producirse filtraciones desde el interior de los mismos. De estas consideraciones se deduce que son mínimos los efectos de carácter hidrológico.

El tipo de refrigeración utilizado aísla sensiblemente la Central del medio, por lo que los efectos térmicos y biológicos de ella sobre el río son prácticamente inapreciables. En lo referente a la contaminación radiactiva por los vertidos líquidos, el modelo analítico que se utiliza para calcular la dosis (cantidad recibida) a personas, por todos los posibles caminos de los materiales radiactivos vertidos a las aguas superficiales se basa el esquema de la **Figura 3**.

La incidencia de la Central Nuclear de Cofrentes sobre el medio ambiente se manifiesta en la **Figura 4**.

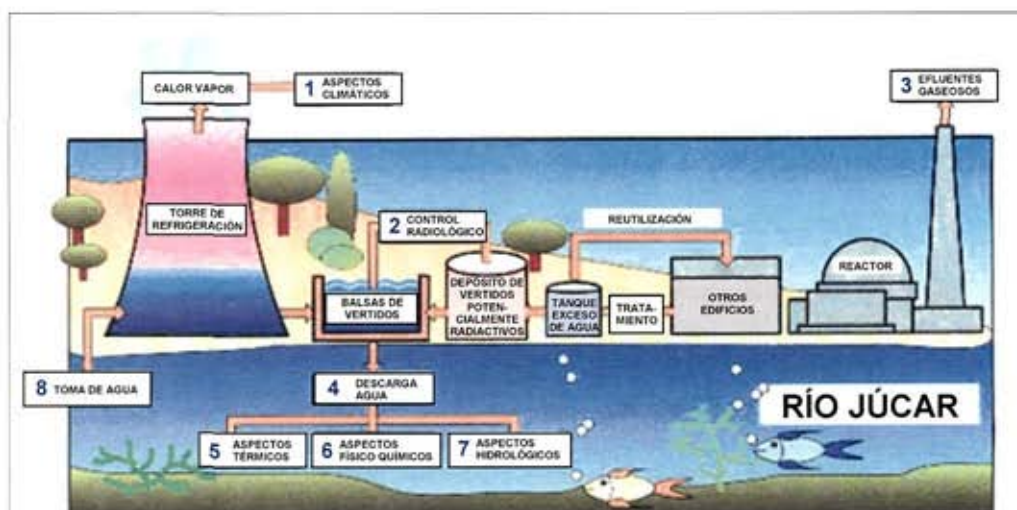


Figura 4. Esquema de la incidencia de la Central Nuclear de Cofrentes sobre el medio ambiente. (<http://217.127.34.207/VIGILANCIA.HTM>)

La Central Nuclear de Cofrentes ha implantado un Sistema de Gestión Medioambiental (SIGEMA) asegurando así la protección al medio ambiente como consecuencia de las actividades realizadas para la producción de la energía eléctrica. El SIGEMA, implantado conforme a la norma UNE 77-801-94/EN-ISO 14001 y certificado por la Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR) desde el 11 de Diciembre de 1996, implica un total cumplimiento de la legislación, el registro de todos los efectos relacionados con el medio ambiente, y una mejora continua en la calidad medioambiental.

El SIGEMA es la parte del sistema general de gestión que define la política medioambiental y que incluye la estructura organizativa, las responsabilidades, las prácticas, los procedimientos, los procesos y los recursos para llevar a cabo dicha

política, dentro del objetivo general de CALIDAD TOTAL, estando todo el personal de la Central Nuclear de Cofrentes involucrado en la gestión medioambiental.

Los principios del SIGEMA son:

- Valorar los aspectos medioambientales y reducirlos al mínimo posible.
- Utilizar las materias primas y la energía de forma racional.
- Integrar la cultura de protección y respeto al medioambiente en todas las actividades de diseño, operación y mantenimiento.
- Gestionar todos los residuos siguiendo los criterios de minimización en origen, reutilización, reciclaje y, cuando éste no sea posible, eliminación de los mismos seleccionando la alternativa que cause el menor impacto ambiental.
- Considerar la componente medioambiental en la adquisición de materiales y en la contratación de servicios.
- Garantizar el compromiso y la responsabilidad a las partes interesadas mediante el cumplimiento de la norma UNE-EN-ISO 14001: "SISTEMAS DE GESTIÓN MEDIO-AMBIENTAL".
- Formar e informar al personal de la Central, aprovechando las experiencias externas e internas y estimulando las actitudes para crear un clima favorable a los temas medioambientales.

De acuerdo con este sistema, la Central Nuclear de Cofrentes analiza sus actividades de tal modo que se identifiquen, prevengan y reduzcan todos los aspectos medioambientales al mínimo posible. En este sentido, se ha comprometido a:

- Continuar cumpliendo con la legislación aplicable en materia de protección medioambiental y, en los casos en que sea posible, ser más rigurosos en la definición de los criterios de aceptación.
- Proteger el medioambiente natural en el entorno de la Central Nuclear de Cofrentes.
- Reducir los aspectos medioambientales de las actividades al mínimo posible, implantando una mejora continua de la gestión medioambiental en todos los ámbitos de la Central.
- Prevenir la contaminación del emplazamiento y del entorno adoptando las salvaguardias técnico-administrativas adecuadas.
- Estimular una conciencia medioambiental y fomentar los conocimientos en esta área a todo el personal de la Central Nuclear de Cofrentes.
- Establecer y mantener procesos de comunicación con las partes interesadas en asuntos relativos a la gestión medioambiental, especialmente con la comunidad local.
- Mantener a disposición pública el Informe Anual Medioambiental incluyendo los objetivos medioambientales adoptados.
- Definir y controlar los objetivos y el programa de gestión medioambiental.

En definitiva, la Central Nuclear de Cofrentes se compromete a generar energía eléctrica de manera respetuosa con el medio ambiente y hacer un uso racional de los recursos naturales con el fin de contribuir a un desarrollo sostenible.

1.2.5. MÉTODOS DE VIGILANCIA

Para evaluar la incidencia radiológica que la Central pudiera producir en el medio ambiente, y a través de él, en las personas, se dispone de medios adecuados que se utilizan según métodos establecidos, que se concretan en el Programa de Vigilancia Radiológica Ambiental (P.V.R.A.) de la Central Nuclear de Cofrentes.

La necesidad de establecer un P.V.R.A. para instalaciones nucleares viene impuesta por la legislación vigente, de forma que deben ser determinadas y evaluadas las dosis equivalentes a la población potencialmente afectada por los efluentes radiactivos liberados al medio ambiente, según los caminos de exposición. Para ello, se realiza de forma sistemática, antes y durante la operación de la Central, la recogida de las muestras más representativas de la zona: aire, agua, sedimentos, suelo, cultivos, peces, leche, carnes, etc., dentro de un radio de 30 km alrededor de la Central, los cuales son analizados para identificar los isótopos presentes en las muestras y su actividad. Los puntos de muestreo, tipos de muestra, frecuencia de recogida, medidas y análisis a realizar, fueron previamente definidos, después del correspondiente estudio de la flora, fauna, producción agrícola y ganadera, y de la ubicación de las poblaciones del entorno de la Central.

Los valores obtenidos antes de la entrada en funcionamiento de la Central (programa pre-operacional) permiten determinar la radiación de fondo natural existente en la zona de influencia de la Central y sirven de referencia para comprobar si la operación de la misma produce algún impacto apreciable en las condiciones radiológicas de la zona.

Las garantías sobre la calidad de las medidas son múltiples: la vigilancia se realiza siguiendo procedimientos de muestreo y medida definidos, los equipos de medida son calibrados periódicamente y una parte de las muestras (alrededor de un

10%) se envía a un laboratorio externo para contraste de los valores medidos según queda definido en el propio Programa. Por otra parte, las inspecciones y evaluaciones del Consejo de Seguridad Nuclear supervisan la calidad de dichas medidas al verificar el cumplimiento del Programa y los Procedimientos que previamente han tenido que ser aceptados, independientemente de que recoja muestras y las analice al igual que la Generalitat Valenciana.

Además del sistema de vigilancia citado, la Central posee, de acuerdo con los distintos organismos competentes y la normativa en vigor, instrumentación de medida instalada en los puntos de vertido, tanto líquidos como gaseosos, y cuenta con laboratorios debidamente equipados que permiten la identificación y cuantificación de los elementos y sustancias a controlar. Respecto a las emisiones, la Central dispone, como una medida adicional de control, de un procedimiento informático de cálculo para determinar la influencia radiológica de dichos efluentes, basándose en las medidas obtenidas con los equipos citados anteriormente y los datos procedentes de las dos estaciones meteorológicas instaladas en su entorno.

En dichas estaciones han sido erigidas sendas torres de 50 y 100 metros de altura (torres primaria y secundaria, respectivamente), dotadas del correspondiente sistema de adquisición y tratamientos de datos que permiten en todo momento disponer de las variables meteorológicas necesarias para una continua evaluación de la dispersión de los efluentes gaseosos en la atmósfera.

En lo referente a la vigilancia de los vertidos líquidos, en la Central han sido construidas dos balsas para el almacenamiento y retención de los mismos, que aseguran, por medio de los análisis correspondientes, la calidad del agua antes de su descarga al río.

1.3. ECOLOGÍA MICROBIANA DE AGUAS DULCES

El agua ofrece un medio único favorable para el desarrollo de muchos tipos de microorganismos que no se encuentran en otros hábitats. Entre ellos destacan las algas fotosintéticas, como las diatomeas, que pueden ser una fuente importante de carbono orgánico para los microorganismos quimioorganótrofos, y los protozoos, que se alimentan de otros microorganismos, aumentando la recirculación de los nutrientes. También aparecen bacterias fotosintéticas, como las cianobacterias, bacterias heterótrofas y hongos microscópicos y filamentosos. Entre los géneros bacterianos más característicos se encuentran *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Cytophaga* y *Leptothrix* (Atlas y Bartha, 2002). Estos géneros incluyen bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, con y sin pigmentos, móviles e inmóviles, bacilos y cocos, formas pedunculadas y sin pedúnculos. Las cianobacterias más frecuentes incluyen *Anabaena* y *Microcystis* y entre las algas cabe mencionar a *Navicula* o *Diatoma* (diatomeas) y *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Cladophora* (Atlas y Bartha, 2002; Schwarz y cols., 2004) La composición de los ecosistemas acuáticos depende de variables químicas como la concentración de nutrientes orgánicos e inorgánicos, especialmente fósforo y nitrógeno, la disponibilidad de oxígeno, el pH y la temperatura, entre otros.

Los lagos y los ríos crean ambientes microbianos muy diferentes de los sistemas oceánicos. Así en los lagos, la mezcla y el intercambio de las aguas pueden estar muy limitados creándose gradientes verticales en distancias más cortas. Los lagos pueden dividirse en oligotróficos o pobres en nutrientes y eutróficos o ricos en nutrientes. Los lagos pobres en nutrientes permanecen aeróbicos a lo largo del año y los cambios estacionales de temperatura no producen una estratificación clara. Por el contrario, los lagos eutróficos tienen sedimentos en el fondo ricos en materia orgánica

y se hallan estratificados. En ellos, la capa superior o *epilimnion* (caliente) es aeróbica, mientras que la capa más profunda o *hipolimnion* (fría) es a menudo anaeróbica. Ambas capas se encuentran separadas por una zona de disminución rápida de la temperatura conocida como *termoclina*. En la primavera y el otoño, el agua superficial y la profunda se intercambian como resultado de las diferencias de temperatura y de gravedad específica. Después de que se produzca esta mezcla, las bacterias móviles y las algas migran en la columna de agua para encontrar su ambiente más adecuado. Cuando se añaden cantidades suficientes de nutrientes al agua, se produce la eutrofización, que estimula el crecimiento de algas y cianobacterias. Como el nitrógeno y el fósforo limitan frecuentemente el crecimiento microbiano en los hábitats de agua dulce, la adición de compuestos que contienen estos elementos afecta notablemente a la composición de los sistemas acuáticos (Jones, 2001).

Los ríos presentan una situación diferente ya que existe un movimiento horizontal de las aguas que minimiza la estratificación vertical. Además la mayor parte de la biomasa microbiana funcional se encuentra adherida a las superficies (Prescott y cols., 1999). Dependiendo del tamaño del río, la fuente de nutrientes varía de forma que puede proceder directamente del río (microorganismos fotosintéticos) o del exterior (sedimentos arrastrados por la lluvia, materia orgánica que cae directamente al agua, etc.). En la mayoría de los casos la cantidad de materia orgánica presente en los ríos no supera la capacidad oxidativa del sistema de manera que se mantienen productivos, pero si se incorpora demasiada materia orgánica el agua puede volverse anaeróbica. Esto sucede en zonas urbanas e industrializadas donde el vertido de las aguas residuales tratadas de forma inadecuada produce la contaminación de los ríos, afectando de forma significativa a la composición de la comunidad microbiana de los mismos.

1.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS

La identificación de especies y el recuento de microorganismos son críticos en el estudio de las comunidades microbianas. Las técnicas tradicionales empleadas para tal fin incluyen el cultivo en medios generales y selectivos, pruebas bioquímicas y tinción con diferentes productos para observar posteriormente las muestras en el microscopio.

Las técnicas de microscopía y de cultivo tienen una utilidad limitada, ya que los microorganismos pueden tener una morfología tan similar que no permite su diferenciación microscópica y los medios de cultivo fallan en imitar las condiciones requeridas para el crecimiento de los microorganismos en su ambiente natural. Por ello, la microbiología tradicional puede infravalorar la biodiversidad de microorganismos en muestras ambientales y proporcionar descripciones poco realistas de la estructura de la comunidad microbiana.

Estos inconvenientes han puesto de manifiesto la necesidad de aplicar nuevas técnicas más precisas y rápidas para la identificación y cuantificación de los microorganismos.

El desarrollo de técnicas moleculares ha aumentado la capacidad de detectar e identificar bacterias en muestras ambientales (Pace y cols., 1986), poniendo de manifiesto que sólo una pequeña fracción de las bacterias que existen en la naturaleza ha sido aislada e identificada (Ward y cols., 1990; Torsvik y cols., 1998).

1.4.1. IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS VIABLES PERO NO CULTIVABLES (VBNC, *VIABLE BUT NOT CULTURABLE*)

Los estudios sobre supervivencia bacteriana en ambientes naturales indican que algunos microorganismos pierden la capacidad de ser cultivados en medios apropiados bajo ciertas condiciones y que aun así exhiben signos de actividad metabólica y por tanto viabilidad (McDougald y cols., 1998), lo cual se ha definido como estado “viable pero no cultivable” (VBNC, *Viable But Not Culturable*). Este estado parece ser parte del ciclo celular y por tanto una respuesta programada a condiciones ambientales desfavorables (Oliver, 1993). Las células que entran en este estado VBNC sufren una serie de cambios que les permite permanecer en el medio durante periodos de tiempo prolongados (Barcina y cols., 1997; McDougald y cols., 1998). Entre estos cambios está la reducción del tamaño y la adquisición de formas redondeadas o cocoides. Aunque la integridad de la membrana celular se mantiene, parece ser que hay variaciones en la composición de ácidos grasos de la membrana y de aminoácidos de la pared celular. El citoplasma se condensa y se produce una reducción de la concentración de ADN y de ARN. La actividad metabólica de las bacterias en este estado es también menor y disminuye la tasa de multiplicación celular.

En los ambientes acuáticos sucede lo mismo y la supervivencia de los microorganismos se ve afectada por una serie de factores ambientales bióticos y abióticos, a los que responden adoptando un estado latente, que también se conoce como “viable pero no cultivable” (Barcina y cols., 1997). Entre los factores bióticos se encuentra la predación por protozoos, fagos y bacterias líticas como *Bdellovibrio*, que pueden eliminar las bacterias que componen las comunidades naturales. El consumo de bacterias por los protozoos es uno de los principales factores que controlan la densidad bacteriana en los sistemas acuáticos (Barcina y cols., 1991; Iriberry y cols.,

1994). Además se ha visto que la susceptibilidad de las especies acuáticas al consumo por los protozoos es variable (González y cols., 1990) y que uno de los factores determinantes de esta sensibilidad puede ser atribuida a la mayor dificultad en la digestión de las paredes celulares de las bacterias Gram-positivas (Nilsson, 1987). La presencia o no de plásmidos es otro factor que puede afectar a la composición de las comunidades acuáticas (Awong y cols., 1990), aunque hay algunos autores que no han encontrado diferencias (Chao y Feng, 1990). Podría decirse que sólo en aquellos casos en que los plásmidos confieren alguna propiedad de resistencia frente a los factores ambientales que comprometen la viabilidad, su presencia podría aumentar la cantidad de las especies portadoras (Barcina y cols., 1992). Los factores abióticos que más afectan a la supervivencia de los microorganismos en los ambientes acuáticos son la escasez de nutrientes, la temperatura y la luz. La escasez de nutrientes se convierte en un factor limitante sólo para aquellas especies copiotróficas (Morita, 1992). En cuanto al efecto de la temperatura, los resultados se contradicen y mientras que algunos autores han encontrado que el descenso de la temperatura disminuye la viabilidad (Oliver y cols., 1995), otros han detectado un incremento (Barcina y cols., 1986). El efecto negativo de la luz sobre el cultivo de los microorganismos en ambientes acuáticos se ha documentado sobre todo para las enterobacterias (Arana y cols., 1992). La entrada en un estado VBNC de las bacterias por efecto de la luz se debe a la producción de formas reactivas del oxígeno, principalmente peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo.

Aunque hay algunos estudios que avalan la reversibilidad del estado “no cultivable” existe cierto escepticismo en aceptar este proceso. La adición de nutrientes (Roszak y cols., 1984), la transferencia a medio de cultivo fresco (Evdokimova y cols., 1994), el aumento de la temperatura (Nilsson y cols., 1991), y el *shock* térmico (Ravel y cols., 1995) son algunas formas de recuperar el estado no cultivable *in vitro*. Pero

algunos autores opinan que esta reversibilidad solo es posible si el estado VBNC ha sido durante un periodo de tiempo corto y otros defienden que esta reversibilidad no representa más que el crecimiento de unas pocas células presentes en el medio de cultivo (Weichart y cols., 1992). En este sentido, se ha demostrado que el sobrenadante de células no cultivables (Weichart y cols., 1992) puede inducir este estado en células en desarrollo y, por otro lado, que las células en desarrollo pueden producir señales necesarias para la recuperación del estado VBNC (Votyakova y cols., 1994).

1.4.2. TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE COMUNIDADES MICROBIANAS

Las estrategias para determinar la diversidad de las comunidades microbianas se basan en la utilización de técnicas moleculares, independientes del cultivo de los microorganismos para su análisis, las cuales pueden dividirse en tres grandes categorías: (1) las que generan información fenotípica mediante el análisis de lípidos y otros marcadores microbiológicos, (2) las que proporcionan datos genotípicos mediante el análisis de ácidos nucleicos y (3) las que miden la asimilación de sustratos marcados mediante su incorporación en biomarcadores de la comunidad microbiana y establecen relaciones mecánicas entre los datos fenotípicos y los procesos naturales (Parekh y Bardgett, 2002).

Ciertos compuestos celulares como los metil-ésteres de ácidos grasos (FAMES, *Fatty Acid Methyl Esters*) y los fosfolípidos (PLFAs, *Phospholipid Fatty Acids*) se utilizan con frecuencia para el análisis de la composición de comunidades microbianas. Estas técnicas se basan en que los microorganismos contienen gran cantidad de tipos distintos de ácidos grasos entre sus estructuras lipídicas y en que

algunos de estos ácidos grasos están presentes en ciertos grupos filogenéticos y no en otros. Por ello, proporcionan información de los grupos taxonómicos presentes en muestras mixtas. Aunque el análisis de FAMES se ha utilizado para estudiar poblaciones microbianas *in situ* (Cavigelli y cols., 1995), la mayoría de los investigadores optan por el análisis de PLFAs, que permiten valorar de forma más rápida y fidedigna la biomasa microbiana y la composición de muestras ambientales. De hecho, a finales de los 90 se produjo una explosión del uso de esta técnica en el estudio de las comunidades microbianas del suelo (Yeates y cols., 1997; Yeates y cols., 1999; Wardle y cols., 1999) y de sedimentos marinos (Rajendran y Nagamoto, 1999). El análisis de PLFAs tiene la ventaja de que se refiere exclusivamente a la parte “viva” de la microflora, ya que los fosfolípidos no son material de reserva y cuando las células mueren son utilizados y metabolizados por otros organismos, desapareciendo del medio (White y cols., 1979). Sin embargo, los PLFAs se encuentran en diferentes concentraciones en los microorganismos y por ello no pueden utilizarse para medir especies o géneros específicos dentro de una comunidad microbiana (Ratledge y Wilkinson, 1988), sino sólo para establecer cambios en la abundancia relativa de ciertos grupos taxonómicos. Además, los PLFAs pueden verse modificados en función de las condiciones ambientales como alteraciones del pH y la temperatura, o de su estado de crecimiento (Federle, 1986).

Gracias al desarrollo de técnicas basadas en el marcaje de células con isótopos radiactivos o fluorescentes y biomarcadores es posible el establecimiento de relaciones entre determinados procesos ecológicos con grupos de microorganismos específicos. Entre estas técnicas de ecología microbiana cabe mencionar la hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH, *Fluorescence in situ Hybridization*) combinada con la autorradiografía y el seguimiento de sustratos marcados (Ouverney y Fuhrman, 1999; Lee y cols., 1999), la detección de bacterias mediante sondas dirigidas al rRNA

(Stoffels y cols., 1999), o la detección de PLFAs marcados con isótopos radiactivos o fluorescentes (Roslev y cols., 1998). En la técnica de FISH combinada con la autorradiografía los microorganismos se ponen en contacto con un sustrato marcado y se transfieren a una placa autorradiográfica. Posteriormente, se hibridan con sondas fluorescentes dirigidas al rRNA de grupos o especies determinadas y finalmente se tiñen con un agente que permita detectar todas las células de la población, como el DAPI (Lee y cols., 1999). Las células que capturan el sustrato marcado radiactivamente se pueden detectar observando los granos de plata en la película autorradiográfica y las que pertenecen a los grupos o especies para las que se han empleado sondas específicas mediante la excitación adecuada. De esta forma se puede analizar *in vivo* la captura de sustratos por organismos identificados filogenéticamente bajo distintas condiciones ambientales, aunque los resultados no sean cuantitativos.

Las técnicas de biología molecular basadas en el análisis de la heterogeneidad de las secuencias del ADN y ARN han permitido revisar la taxonomía microbiana y ampliar el conocimiento de las relaciones entre organismos. El desarrollo de estas técnicas ha sido posible gracias a la capacidad de extraer y purificar el material genético de los organismos en diferentes ambientes. Se han empleado genes indicativos de la presencia y diversidad de un determinado grupo fisiológico (a través de genes funcionales), y genes indicativos de la relación filogenética de los microorganismos detectados con otros organismos (mediante el uso de genes universales y conservados). Entre los genes más utilizados se encuentran los del ARN de la subunidad pequeña del ribosoma, el 16S rRNA para microorganismos procariotas y 18S rRNA para eucariotas. Esto se debe, en gran parte, a que se ha aceptado el uso de un sistema filogenético basado en la secuencia del rRNA, donde el grado de semejanza entre secuencias ribosómicas proporcionan una estimación de las relaciones filogenéticas o evolutivas (Woese, 1987). El gen 16S rRNA y, su homólogo, el 18S

rRNA, son moléculas suficientemente grandes como para proporcionar un número significativo de nucleótidos que permita la comparación entre secuencias y, sin embargo, lo suficientemente pequeñas como para ser analizadas convencionalmente. Son consideradas excelentes “cronómetros moleculares”, debido a que están presentes en todos los microorganismos; contienen regiones conservadas, útiles para establecer relaciones filogenéticas lejanas; regiones variables, para evaluar relaciones próximas y distinguir entre secuencias de distintas especies o cepas; y no son susceptibles de cambios de secuencia rápidos por selección, dada su función central en la expresión génica. La base de datos de secuencias del ARN ribosómico se inició a partir de cepas bien caracterizadas de cultivos de colección (Larsen y cols., 1993) y en la actualidad representa un sistema dinámico y en continuo crecimiento. La base de datos incluye secuencias de microorganismos procedentes de cultivo así como secuencias de genes clonados a partir de material genético extraído de diferentes muestras ambientales (Pace y cols., 1986).

Entre las técnicas basadas en el análisis de secuencias cabe destacar el FISH y el análisis mediante enzimas de restricción. El FISH permite la identificación de células microbianas dentro de una muestra ambiental (DeLong y cols., 1989). La muestra se fija sobre un soporte adecuado, se permeabilizan las membranas celulares y se pone en contacto con una solución de hibridación en la que está inmersa la sonda marcada con un fluorocromo. Las condiciones de esta hibridación vienen dadas por la temperatura y la concentración de formamida de la solución. La forma de detectar la sonda fluorescente puede ser desde microscopía de epifluorescencia (DeLong y cols., 1999), a microscopía láser confocal (Wagner y cols., 1994) o citometría de flujo (Amann y cols., 1990; Fuchs y cols., 2000). El FISH se ha utilizado con éxito para la identificación filogenética de microorganismos en el plankton, sedimentos y suelos (Snaird y cols., 1997; Christensen y cols., 1999; Araya y cols., 2003). Además se ha

utilizado para estimar la actividad fisiológica en biopelículas (Poulsen y cols., 1993) y es particularmente útil para la localización espacial de microorganismos en gradientes ambientales (Schramm y cols., 1996) o asociaciones simbióticas (Polz y cols., 1994). A pesar de su amplia utilización, presenta una serie de factores limitantes como la accesibilidad de la diana dentro de la célula, la especificidad de la sonda o la sensibilidad de los sistemas de detección, por lo que resulta problemática para muestras ambientales complejas (Head y cols., 1998).

El análisis mediante enzimas de restricción se basa en que las enzimas reconocen secuencias específicas (de restricción) y cortan el ADN en dichas zonas. El ADN procedente de muestras ambientales genéticamente distintas dará lugar a fragmentos de restricción de diferente tamaño y en distinta cantidad y por tanto con un patrón diferente al ser analizado mediante electroforesis (Sadowsky, 1994). Estos patrones permiten detectar diferencias entre muestras, pero a veces resultan difíciles de interpretar. El análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) es un método derivado, en el que se usan sondas específicas de determinados fragmentos de restricción (Grattard y cols., 1993). En este caso se pueden detectar pequeñas diferencias en el ADN de la comunidad bacteriana.

1.4.2.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR, *POLIMERASE CHAIN REACTION*)

El desarrollo de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Reacción en Cadena de la Polimerasa) ha revolucionado los estudios de ecología microbiana permitiendo la aplicación de nuevos métodos para el análisis de la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas (Mullis, 1990). La PCR permite amplificar un fragmento de

ADN de interés, es decir, obtener *in vitro* un gran número de copias de dicho fragmento. Está catalizada por la enzima Taq Polimerasa, que es estable a temperaturas elevadas (hasta 98 °C), aislada de la bacteria *Thermophilus aquaticus* (Saiki y cols., 1988). En la PCR, la doble hélice de ADN se desnaturaliza y se pone en contacto con unos pequeños oligonucleótidos llamados *primers* o cebadores, que son secuencia de nucleótidos complementarias a los extremos del fragmento de ADN que se pretende amplificar. Estos cebadores son extendidos por la polimerasa que usa como molde el ADN de cadena sencilla para crear una hebra de ADN complementaria. Cada uno de estos tres pasos (desnaturalización, hibridación y extensión) se define por un periodo de tiempo y una temperatura determinados y en su conjunto se denomina ciclo. La repetición sucesiva de estos ciclos permite el incremento exponencial del número de copias del fragmento de ADN de interés. En la **Figura 5** se muestra un esquema de los cambios de temperatura que tienen lugar durante un ciclo de PCR.

La desnaturalización se realiza a 95 °C y la separación conseguida permite que cada hebra sirva como molde o *template* para la síntesis de una nueva molécula de ADN. El tiempo de desnaturalización depende de la longitud del fragmento que se pretende amplificar, y generalmente dura entre 30 segundos y un minuto. Debido a que al comienzo de la amplificación es necesario desnaturalizar todo el ADN de la muestra, inicialmente se realiza una incubación de 5 minutos a 95 °C.

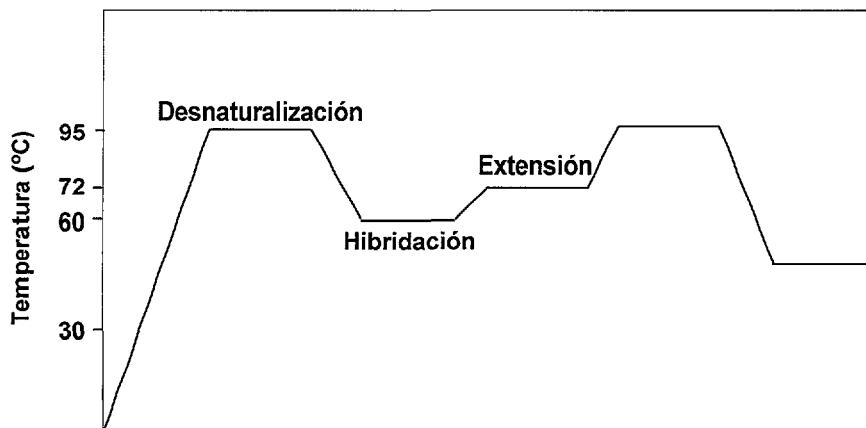


Figura 5. Esquema de los cambios de temperatura durante un ciclo de PCR.

Tras la desnaturalización, se produce la hibridación entre el ADN molde y los cebadores. Esta etapa se basa en el principio de renaturalización de Doty y cols. (1960), y ocurre al llevar la reacción a 45-60 °C. Dado que los cebadores están en mayor proporción que el ADN molde, se favorece la hibridación entre el molde y el cebador sobre la hibridación molde:molde.

La extensión ocurre a 72 °C, que es la temperatura de máxima eficiencia de la enzima, y su duración depende de la distancia de los cebadores entre sí. En general, se ha calculado que la polimerasa es capaz de incorporar 60 nucleótidos por segundo a 70 °C (Innis y cols., 1988), por lo que un minuto es suficiente para incorporar alrededor de 1000 pares de bases (pb). Como se utilizan dos cebadores, uno para cada hebra, y estos quedan a una distancia de entrecruzamiento durante la síntesis de ADN, el segmento definido será amplificado en forma exponencial. Esto significa que en cada ciclo se producirá un número de copias equivalente al exponente del número de hebras de ADN molde. Así por ejemplo, si al inicio de la amplificación sólo hay una

molécula de ADN de doble hebra (2 moldes) después de 30 ciclos de amplificación se generarán 230 copias de ADN (1.097.736.000 copias).

Esta técnica es especialmente valiosa y prácticamente insustituible teniendo en cuenta su alta especificidad, fácil automatización y alta capacidad para amplificar cantidades muy pequeñas de muestra de ADN.

Desde mediados de los años 80, la mayoría de los estudios de ecología microbiana basados en la PCR se han centrado en el análisis del gen 16S rRNA, pero se pueden utilizar también genes que codifican para enzimas implicadas en procesos ecológicos importantes para establecer la posición filogenética de los organismos que participan en tales procesos.

Cuando se usa esta técnica para el estudio de comunidades microbianas hay que tener en cuenta una serie de factores que pueden afectar a los resultados que se obtienen. En primer lugar, el ADN de los microorganismos puede estar presente en una muestra a pesar de que estos ya no se encuentren vivos o activos, dando lugar a falsos positivos (Trevors y Van Elsas, 1995). Además el método de extracción del material genético puede no ser adecuado para obtener el ADN de ciertos tipos celulares o de esporas (Wilson, 1997). No todas las especies son igualmente sensibles a los agentes químicos utilizados para la lisis celular debido a la organización de su pared celular, fundamentalmente. Por ello cuando se trata de muestras ambientales donde es muy difícil extraer el material genético de todas las especies presentes con la misma eficiencia, se puede estar introduciendo cierta selectividad. Otro problema importante es el de contaminación de las muestras. Dado que para la amplificación por PCR es necesario muy poca cantidad de ADN, si no se tienen precauciones durante la manipulación de las muestras se pueden introducir secuencias exógenas. La generación de quimeras por co-amplificación de genes homólogos también debe ser considerada, ya que puede dar lugar a una interpretación incorrecta de la diversidad

bacteriana presente en una muestra o incluso a la descripción de especies inexistentes (Wang y Wang, 1996). El análisis de las poblaciones bacterianas basado en la amplificación de fragmentos del 16S rRNA asume que la amplificación de secuencias homólogas aunque no idénticas tiene lugar con la misma eficiencia. Sin embargo, está demostrado que ciertas secuencias se amplifican de forma preferente y otras no amplifican (Reysenbach y cols., 1992). Por otro lado, Hansen y cols. (1998), demostraron que el genoma de ciertas especies contiene secuencias fuera de la zona de amplificación que inhiben los primeros pasos de la PCR. Estas sustancias inhibitorias pueden encontrarse también formando parte de la muestra en sí, como es el caso de los ácidos húmicos en muestras de suelo (LaMontagne y cols., 2002). Por último, las propias condiciones de la PCR como el número de ciclos (Stewart y cols., 1999), la concentración de ADN de partida (Chandler y cols., 1997) o la elección de los *primers* (Dieffenbach y cols., 1993), también pueden afectar a los resultados obtenidos en el estudio de las muestras ambientales.

El conjunto de productos de PCR que se generan cuando se amplifica el material genético de una comunidad microbiana debe ser posteriormente analizado. Para ello existen diferentes métodos según cuáles sean los objetivos experimentales. Así, si lo que interesa es detectar miembros específicos de un género o especie bacteriana dentro de la población se pueden usar sondas que hibriden con una región interna del fragmento amplificado que sean específicas del grupo de interés. Con esta técnica, por dar un ejemplo, se han detectado bacterias oxidantes del amonio del género *Nitrobacter* en muestras de suelo (Degrange y Bardin, 1995) y enterobacterias fecales en aguas residuales (Chen y cols., 2004).

Otras técnicas que proporcionan información rápida sobre la diversidad microbiana y composición de muestras ambientales y que permiten además establecer comparaciones espaciales y temporales entre varias muestras son el análisis de RFLP

de fragmentos de ADN previamente amplificados por PCR (Porteous y cols., 1994), el análisis de polimorfismos de conformaciones monocatenarias (SSCP, *Single-Strand Conformation Polymorphism*) (Lee y cols., 1996) y la electroforesis en gel de gradiente de temperatura o desnaturizante (TGGE o DGGE, *Temperature o Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (Muyzer y cols., 1993; Eichner y cols., 1999).

El análisis de RFLP también se conoce como ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) cuando se refiere a fragmentos amplificados del gen 16S rRNA. La aplicación de este método al estudio de variaciones en la comunidad microbiana se ha utilizado por Smit y cols. (1997), en suelos contaminados con cobre y por Gich y cols. (2000), en aguas residuales industriales y urbanas. Existen modificaciones a esta técnica conocidas como Flu-RFLP (*Fluorescent*) o T-RFLP (*Terminal*) (Scheinert y cols., 1996). El T-RFLP se basa en la digestión con endonucleasas de restricción de fragmentos de ADN amplificados con uno o dos cebadores marcados con fluorocromos distintos. Después, los fragmentos fluorescentes se separan en una electroforesis capilar o en gel para comparar los patrones obtenidos. Varios autores han aplicado esta técnica al estudio de las poblaciones bacterianas en hábitats naturales (Liu y cols., 1997; Osborn y cols., 2000) y discuten su utilidad en el análisis semicuantitativo de la proporción relativa de los genotipos dominantes en las comunidades microbianas.

El análisis de polimorfismos de conformaciones monocatenarias (SSCP) se basa en que las modificaciones en la secuencia del ADN provocan cambios en la conformación de las moléculas de ADN de cadena sencilla dando lugar a diferencias en la movilidad electroforética en un gel de poliacrilamida (Orita y cols., 1989). La PCR-SSCP permite detectar hasta el 90% de las mutaciones en una sola base en fragmentos de 200 pb. Por ello este método es especialmente útil en el estudio de

comunidades bacterianas en diversos ecosistemas (Widjoatmodjo y cols., 1995; Lee y cols., 1996). Así, Zumstein y cols. (2000), adaptaron la PCR-SSCP a un secuenciador automático para estudiar la evolución de las comunidades de bacterias y arqueobacterias durante un periodo de dos años en un biorreactor anaerobio.

1.4.2.2. ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE (DGGE, DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS)

La electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) o de temperatura (TGGE) es quizá el método más utilizado para analizar los fragmentos de ADN amplificados por PCR procedentes de muestras ambientales y estudiar la diversidad estructural de las comunidades microbianas. Ambas técnicas separan fragmentos de ADN de la misma longitud pero con distinta secuencia de nucleótidos según su temperatura de fusión (T_m , *melting temperature*). Durante la electroforesis los fragmentos de ADN permanecen en su estructura de doble hélice hasta que se alcanzan las condiciones que producen la desnaturalización del dominio de desnaturalización con menor temperatura de fusión. Esta desnaturalización parcial produce la apertura de la molécula de ADN lo que disminuye su movilidad electroforética en el gel. En la DGGE los fragmentos de ADN amplificados por PCR se separan en un gel de electroforesis paralelo con un gradiente desnaturalizante creciente (de arriba hacia abajo) formado por urea y formamida a 60 °C. La TGGE se basa en un gradiente creciente de temperatura en presencia de una concentración de urea y formamida constante. Las características de fusión de los fragmentos de ADN que se van a someter al análisis por DGGE o TGGE se deben determinar previamente para optimizar las condiciones del gradiente y la duración de la electroforesis y que los fragmentos queden bien separados en el gel. Estas características se pueden determinar experimentalmente mediante geles perpendiculares, en los que el gradiente

desnaturalizante o de temperatura es perpendicular a la dirección de la electroforesis, es decir, de derecha a izquierda (Muyzer y Smalla, 1998), aunque existen también programas informáticos que permiten su cálculo teórico (Lerman y cols., 1984) como el WinMelt o MacMelt para PC o Macintosh, respectivamente.

La electroforesis de las muestras de ADN en un gel con gradiente perpendicular produce su migración en forma de una curva sigmoidea, donde las moléculas de doble hélice se encuentran en la zona del gel con menor gradiente (izquierda), las de cadena sencilla en la zona de mayor gradiente (derecha) y las moléculas con distinto grado de desnaturalización en la zona intermedia del gel (**Figura 6**). Además de la temperatura de fusión de las moléculas de ADN, la electroforesis con gradiente perpendicular permite determinar también el gradiente desnaturalizante óptimo para el análisis multibanda en una DGGE paralela. La DGGE paralela es la que se utiliza con mayor frecuencia, ya que permite el análisis de varias muestras diferentes de forma simultánea en un mismo gel. La resolución óptima se consigue cuando las moléculas de ADN no se desnaturalizan por completo, lo cual se consigue añadiendo una pequeña secuencia de 30-40 nucleótidos de G+C en uno de los cebadores utilizados en la PCR.

Los patrones de bandas generados en la DGGE se pueden visualizar mediante tinción con bromuro de etidio. La tinción con plata es bastante más sensible (Felske y cols., 1996), pero los geles teñidos de esta forma no se pueden utilizar para realizar experimentos de hibridación posteriores, y además la plata tiñe los fragmentos de ADN de cadena sencilla. El *SYBER green I* es otra alternativa de tinción (Muyzer y cols., 1997), que no genera fondo y que permite detectar fragmentos de ADN a muy bajas concentraciones.

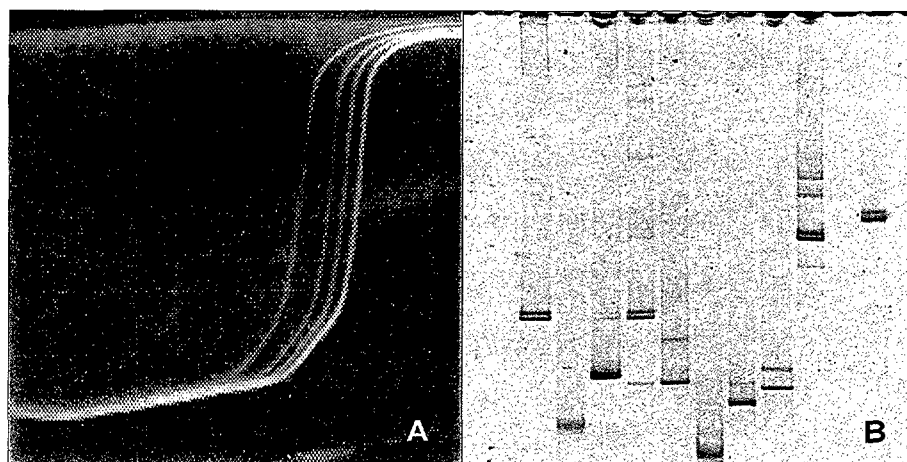


Figura 6. Imagen de una DGGE: A, perpendicular; B, paralela.

La DGGE se empleó por primera vez al estudio de la biodiversidad de las comunidades bacterianas por Muyzer y cols. (1993). Examinaron tapetes microbianos marinos y biopelículas procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales y demostraron que los fragmentos de ADN ribosómicos generados por amplificación del material genético de la comunidad microbiana podían ser separados utilizando este método. Posteriormente, los patrones de DGGE se transfirieron a membranas de nailon y se hibridaron con sondas específicas de bacterias sulfatorreductoras (Amann y cols., 1992) y se identificaron los miembros de la comunidad microbiana mediante secuenciación del ADN extraído de las bandas del gel (Muyzer y De Waal, 1994). Desde ese momento la DGGE se ha utilizado con éxito para caracterizar la estructura de las poblaciones microbianas en diferentes muestras ambientales y estudiar la dinámica de las mismas como consecuencia de perturbaciones ambientales (Ferris y cols., 1997). En este sentido, se ha estudiado la diversidad genética de poblaciones

microbianas en biorreactores experimentales (LaPara y cols., 2002; Stamper y cols., 2003), en aguas (Ovreas y cols., 1997; Bernard y cols., 2001; Bano y Hollibaugh, 2002), fangos activos (Tanaka y cols., 2003), suelos (Kozdroj y Van Elsas, 2001), obras de arte (Rolleke y cols., 1998; Gutner y cols., 2000), biopelículas (Santegoeds y cols., 1998), alimentos (Ercolini, 2004), muestras clínicas (Mc Bain y cols., 2003), etc.

La PCR-DGGE es muy utilizada en ecología microbiana porque proporciona un patrón de bandas de la comunidad microbiana de una muestra ambiental después de la extracción directa del ADN de la misma de manera rápida. De forma esquemática, se extrae el ADN de la muestra ambiental para obtener una mezcla que contiene el ADN de todas las especies bacterianas presentes. Este ADN se usa como molde en una PCR para amplificar un fragmento concreto de una región variable de ADN de interés taxonómico. Así se obtiene una mezcla de fragmentos de ADN representativos de todas las especies presentes en la muestra ambiental. Todos estos fragmentos tienen el mismo tamaño, aunque diferente secuencia de nucleótidos por lo que quedarán separados en una DGGE originando un patrón de bandas característico de la muestra ambiental, donde cada banda representa una especie microbiana. Las bandas del gel pueden ser posteriormente identificadas mediante purificación de las mismas y secuenciación.

2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Dada la carencia de estudios sobre la calidad microbiológica del agua de los sistemas de refrigeración y más concretamente en el ámbito de las centrales nucleares y al posible impacto que el vertido de volúmenes tan grandes de agua puede causar sobre las fuentes naturales que abastecen a este tipo de instalaciones, en el presente proyecto se pretenden abordar los siguientes objetivos:

Identificar las poblaciones microbianas que se desarrollan en el sistema de circulación de agua de la Central Nuclear de Cofrentes, desde su origen el río Júcar hasta su regreso al mismo.

Analizar las variaciones cualitativas y cuantitativas de la población bacteriana a lo largo del sistema de refrigeración, así como las modificaciones que ocurren con el paso del tiempo.

Objetivos del Estudio

Analizar la influencia del sistema de circulación de agua en la calidad microbiológica de las aguas naturales utilizadas para la refrigeración.

Poner a punto de técnicas moleculares que permitan la caracterización microbiana del sistema.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. TOMA DE MUESTRAS

La **Figura 7** esquematiza el sistema de circulación de agua de la Central Nuclear de Cofrentes y en ella se indican los puntos de muestreo seleccionados, así como el nombre dado a cada uno de ellos.

El agua de aporte al sistema de circulación de la Central, proviene del embalse de Embarcaderos. Existe una tubería metálica que permite realizar la toma de muestras de agua directamente. Este punto se denomina nº 1.

Tras las torres de refrigeración, existe un goteo de ácido sulfúrico (96%-98%) cuyo fin es disminuir el pH del agua. En este punto, denominado N71, se aplican también hipoclorito sódico como desinfectante y Depositrol BL5314 (fosfonatos) como antiincrustante para el tratamiento del agua y se ha considerado el nº 2.

Los tanques de hormigón (N74-AA003, N74-AA004 y N74-AA005) de sección circular, recogen los vertidos potencialmente radiactivos de la Central. Son

Las balsas de almacenamiento temporal de vertidos (N74-AA001 y N74-AA002) son de igual forma y tamaño. Se trata de artesas de planta cuadrangular (ángulos redondeados) con la base inferior de 94,8 m de lado, la superior de 136 m y la altura de 10,5 m. Su capacidad útil es de 115.000 m³. Las balsas acumulan el agua de rechazo de las torres de refrigeración (unos 800 m³·h⁻¹) y de otras instalaciones de la central (20 m³·h⁻¹) y una vez llenas descargan al río. El funcionamiento de las balsas es alternativo, es decir, que cuando una balsa llega al límite de su capacidad, la otra está vacía y cuando la primera comienza a vaciarse la segunda inicia su llenado. Son los puntos de muestreo n° 3, cuando están vacíos, y n° 5 cuando están llenos. En un primer momento se pensó tomar muestras de agua a distintas alturas, pero la dificultad de tal práctica llevó a la eliminación del punto de muestreo que sería considerado n° 4.

Las muestras de agua se recogieron en envases de plástico de 2 L de capacidad (APOSAN) esterilizados en un autoclave "Autester" (SELECTA) a 1 atmósfera de presión, 121 °C, durante 20 minutos. En las zonas de accesibilidad reducida, como las balsas de almacenamiento temporal de vertidos y los tanques de hormigón, la toma de muestras se realizó con ayuda de personal de la propia central nuclear y empleando un dispositivo adecuado para garantizar la seguridad (**Figura 8**). Así, para recoger el agua de las balsas se utilizó una garrafa adosada a un patín con pesas y sujeto con una cuerda. Para tomar las muestras de agua de los tanques de hormigón existe un grifo exterior, pero cuando los tanques no están suficientemente llenos no es posible recoger el agua a través del grifo y es necesario acceder a los tanques desde la parte superior de los mismos y lanzar una garrafa atada a una cuerda, de forma similar a como se hace en las balsas.



Figura 8. Fotografías de la toma de muestras de agua del sistema de circulación de la Central Nuclear de Cofrentes. A: Toma de muestra de agua de la balsa de vertidos. B: Envase de plástico estéril utilizado para recoger las muestras. C: Dispositivo utilizado para recoger el agua de las balsas de vertido. D: Toma de muestra de agua de los tanques de hormigón a través del grifo exterior.

El agua, una vez recogida, fue trasladada al Laboratorio de Biodeterioro del Departamento de Ingeniería y Ciencia de los Materiales de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de la Universidad Politécnica de Madrid, en una nevera portátil y allí se mantuvo a 4 °C hasta que fue procesada para su análisis microbiológico, normalmente dentro de las 24-48 h siguientes a la toma de la muestra.

Una parte del agua recogida se utilizó para hacer el recuento de los microorganismos totales mediante tinción con fluorocromos y observación a microscopio de epifluorescencia (véase Apartado 3.3.2). Otra parte fue utilizada para inocular diferentes medios de cultivo y analizar así los microorganismos cultivables (véase Apartado 3.5). El material genético de los mismos fue amplificado por PCR y, mediante DGGE, se seleccionaron los microorganismos diferentes para ser identificados por secuenciación del ADN. Por último, otra parte del agua se utilizó para extraer el material genético del total de la población y caracterizar mediante PCR-DGGE las muestras de agua.

En total se realizaron 14 muestreos de agua en diferentes puntos del sistema y coincidiendo con diferentes estaciones del año (véase **Tabla 1**).

La nomenclatura empleada para la identificación de los muestreos fue un número indicando el orden del muestreo, seguido de un punto y otro número indicando el punto del sistema de circulación en el que se realizó la toma de muestra de agua, seguido de las letras MW, que son una abreviatura del acrónimo del Proyecto que constituye este estudio (MICROWATER). Así, por ejemplo, 7.1 MW indica que se trata del muestreo 7 en el punto de muestreo nº 1 (agua de aporte a la CNC).

Tabla 1. Fechas y puntos de muestreo de agua del sistema de circulación de la CNC.

| Fecha del muestreo | Puntos muestreados |
|---------------------------|---|
| 30 Enero 2002 | 1.1 MW: Agua de aporte a la CNC. |
| 20 Febrero 2002 | 2.1 MW: Agua de aporte a la CNC. |
| 25 Abril 2002 | 3 MW: Muestra de Algas de las Balsas de vertido. |
| 05 Septiembre 2002 | 4.1 MW: Agua de aporte a la CNC. 4.3 MW: Agua del N74-AA001 (Balsa OESTE), que estaba fuera de servicio. 4.5 MW: Agua del N74-AA002 (Balsa ESTE), que estaba llena. |
| 26 Noviembre 2002 | 5.5 MW: Agua del N74-AA001, que estaba llena. 5.6 MW: Agua del N74-AA005, que estaba en servicio. |
| 19 Febrero 2003 | 6.1 MW: Agua de aporte a la CNC. 6.2 MW: Agua del N71. 6.5 MW: Agua del N74-AA002, que estaba llena. 6.6 MW: Agua del N74-AA004, que estaba en servicio. |
| 07 Mayo 2003 | 7.1 MW: Agua de aporte a la CNC. 7.5 MW: Agua del N74-AA001, que estaba llena. 7.3 MW: Agua del fondo del N74-AA002, que estaba fuera de servicio. |
| 03 Junio 2003 | 8.3 MW: Agua del N74-AA002, que estaba fuera de servicio. |
| 04 Junio 2003 | 9.3 MW: Agua del N74-AA002, que estaba fuera de servicio. |
| 11 Agosto 2003 | 10.5 MW: Agua del N74-AA001, que estaba llena (1,90 m). |
| 12 Agosto 2003 | 11.5 MW: Agua del N74-AA001, que estaba llena (4,50 m). |
| 13 Agosto 2003 | 12.5 MW: Agua del N74-AA001, que estaba llena (6,90 m). |
| 14 Agosto 2003 | 13.5 MW: Agua del N74-AA001, que estaba llena (8,66 m). |
| 22 Octubre 2003 | 14.1 MW: Agua de aporte a la CNC. 14.2 MW: Agua del N71. 14.5 MW: Agua del N74-AA001, que estaba llena. 14.6 MW: Agua del N74-AA003, que estaba en servicio. |

3.2. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL AGUA

La caracterización físico-química del agua del sistema de circulación de la Central Nuclear de Cofrentes, se realizó en los Laboratorios de Química que Iberdrola, S.A. posee dentro de la propia central, siguiendo los procedimientos establecidos en AWWA-APHA-WEF (1998).

Por un lado, se determinan las características del agua de aporte a la Central para aplicar los tratamientos necesarios para el buen funcionamiento de los equipos. En esta agua se cuantifica el fósforo total, los nitratos, los sólidos en suspensión, la DQO (Demanda Química de Oxígeno), los cloruros y los sulfatos. También se determina la conductividad, el pH, la turbidez, la dureza total y la alcalinidad del agua.

En las balsas de almacenamiento temporal de vertidos se realizan análisis del agua antes de proceder a su liberación al río para garantizar que se mantiene la calidad dentro de los límites fijados. Además, se efectúan análisis de una muestra compuesta de las balsas vertidas una vez al mes. En estos análisis se determinan el pH, la temperatura y la conductividad del agua. También se cuantifican la DQO, la concentración de cloruros, sulfatos, nitratos y fósforo total, y como análisis radioquímicos se analiza la actividad alfa total, beta total y el isotópico gamma.

3.3. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DEL AGUA

3.3.1. MICROSCOPIA ÓPTICA

Para tener una idea del contenido del agua del sistema de agua de circulación de la CNC se efectuó la observación de las muestras de agua en fresco mediante Microscopía Óptica. Se utilizó un microscopio Axioskop 2 (Zeiss, Alemania) en modo de contraste de fases, campo claro y campo oscuro. Las muestras se observaron a diferentes aumentos (x10, x40, x100 y con el objetivo de inmersión).

3.3.2. MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA

Las moléculas fluorescentes absorben la luz de una determinada longitud de onda y emiten luz de otra longitud de onda menos negativa y más larga. Si un compuesto de este tipo es iluminado a su longitud de onda absorbente y visualizado a través de un filtro que sólo permita pasar la longitud de onda de la luz emitida, el compuesto aparece brillante sobre un fondo oscuro. En este principio se basa la Microscopía de Epifluorescencia. El microscopio utilizado es similar al microscopio convencional a excepción de que la luz incidente, que procede de una fuente halógena muy potente, atraviesa un primer filtro que selecciona la longitud de onda capaz de excitar a la molécula fluorescente o fluorocromo, antes de incidir sobre la muestra. La luz emitida por la muestra (reflejada y fluorescente) atraviesa un segundo filtro que selecciona la longitud de onda de emisión del fluorocromo. La intensidad y el color de la luz es una propiedad característica del fluorocromo utilizado.

Existen cientos de fluorocromos, cada uno de ellos con diferentes rangos de excitación y emisión. Pueden usarse directamente, aprovechando la propiedad que tienen algunos de ellos de unirse a determinadas moléculas u orgánulos celulares, como los colorantes de ácidos nucleicos, o conjugados a otras moléculas, como los anticuerpos, que son capaces de unirse de modo específico a estructuras concretas de la célula.

La Microscopía de Epifluorescencia es una técnica muy utilizada para el estudio de microorganismos en muestras ambientales (Kuwaie y Hosokawa, 1999), puesto que no requiere realizar cultivos en el laboratorio. Dependiendo del fluorocromo, permite la cuantificación rápida de todos los microorganismos presentes en una muestra, de diferenciar entre los que están vivos y muertos, e incluso detectar

aquellos que aun estando vivos, se encuentran inactivos desde el punto de vista metabólico.

Para el recuento de los microorganismos presentes en el agua de los diferentes puntos del sistema de circulación de la Central se empleó una técnica rápida conocida como DEFT (*Direct Epifluorescence Filter Technique*) (Pettipher y cols., 1980; Tresse y cols., 2003) que consiste en filtrar los microorganismos para retenerlos en una membrana apropiada antes de contarlos.

Se hicieron varias diluciones del agua del sistema de circulación de la CNC con agua desionizada estéril y se filtraron diferentes volúmenes de las mismas por filtros negros de 0,2 μm de diámetro de poro (ISOPORE™, GTBP02500, MILLIPORE) para optimizar la forma de hacer los recuentos. Los filtros se hidrataron primero con agua desionizada estéril y después se filtró 1 mL de la muestra de agua. A continuación, se hizo pasar otra vez agua desionizada estéril para mejorar la retención de los microorganismos de la muestra a cuantificar.

Posteriormente, los filtros se tiñeron utilizando diferentes fluorocromos. Para diferenciar entre células vivas y muertas, se utilizó el Kit L-7012 (*Live/Dead BacLight™ Bacterial Viability Kit, Molecular Probes Inc, Eugene, Oregon*). El kit está compuesto por dos fluorocromos que se unen a ácidos nucleicos: SYTO 9 (componente A del kit) y yoduro de propidio (componente B del kit). El SYTO 9 penetra a través de las membranas celulares tiñendo todas las células de verde, mientras que el yoduro de propidio, sólo penetra en las células con la membrana celular dañada y la combinación de ambos fluorocromos produce fluorescencia en rojo. La tinción se realizó en placas de Petri estériles de 35 mm de diámetro, añadiendo de forma simultánea los dos fluorocromos en proporción 1:1 a las concentraciones finales de 3,41 μM de SYTO 9 y 6,01 μM de yoduro de propidio en un volumen de agua desionizada estéril suficiente para cubrir los filtros

(aproximadamente 1 mL). Éstos se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación los filtros se lavaron con agua desionizada estéril y se dejaron secar al aire y en oscuridad.

Para el recuento de microorganismos totales se utilizó el fluorocromo DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, Molecular Probes Inc, Eugene, Oregon*), que tiñe ADN y emite fluorescencia en azul. En este caso, se colocaron los filtros en placas de Petri de 35 mm de diámetro y se cubrieron con 1 mL de solución del fluorocromo a una concentración de 500 µg/mL en agua desionizada estéril. Se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad y una vez teñidos se lavaron con agua desionizada estéril y se dejaron secar al aire y en oscuridad.

Una vez secos, los filtros se montaron con el componente C del kit L-7012 (*mounting oil* $n_{25}=1,517\pm 0,003$) entre un porta y un cubreobjetos y se observaron en un microscopio de epifluorescencia Axioskop 2 (Zeiss, Alemania). Para hacer los recuentos, se empleó el objetivo de x100 aumentos con aceite de inmersión (Inmersol® 518N, $n_e = 1,518$ a 23 °C).

Los filtros de luz epifluorescente utilizados en cada caso se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Fluorocromos y filtros de luz utilizados para el recuento de microorganismos por Microscopía de Epifluorescencia.

| Fluorocromo | Filtro | Especificaciones |
|--|--------------|----------------------------|
| SYTO 9 y Yoduro de Propidio | Zeiss 487709 | BP-450-490, FT-510, LP-515 |
| <i>4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride</i> (DAPI) | Zeiss 487701 | BP-365, FT-395, LP-397 |

3.4. RECUENTO DE MICROORGANISMOS CULTIVABLES

Para el recuento de los microorganismos cultivables del agua de la central, se realizaron diluciones seriadas de las muestras (10^{-1} – 10^{-7}) en solución salina estéril (9 g NaCl por litro de agua estéril). Se tomaron 100 μ L de cada dilución y se inocularon por duplicado en placas de Petri de TSA (Agar Triptona de Soja, véase composición en Apartado 3.6), extendiendo homogéneamente el agua con ayuda de un asa de Drigalsky. Las placas se incubaron a 30 °C, y el recuento de Unidades Formadoras de Colonia (UFC, *Unit Forming Colony*) se realizó transcurridas 48 y 72 horas.

Estas diluciones también se inocularon sobre placas de agar STC y R2A para ver la influencia del medio de cultivo en la cantidad de microorganismos cultivables.

3.5. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CULTIVABLES

Se filtraron diferentes volúmenes de agua del sistema de circulación de la CNC a través de filtros de 0,45 μ m y 0,22 μ m de diámetro de poro (MFTMHAWP04700 y GSWP04700, MILLIPORE). Los filtros se colocaron sobre placas de Petri de agar TSA, STC y R2 (véase composición en Apartado 3.6) para aislar el mayor número de microorganismos cultivables y se incubaron a 30 °C hasta que crecieron los microorganismos. Las UFC observadas sobre los filtros fueron aisladas y purificadas mediante resiembra en placas de agar del mismo medio de cultivo que el de partida.

A partir del muestreo 5 MW, las diluciones seriadas que se hicieron para el recuento de microorganismos cultivables, se utilizaron también para inocular placas de agar STC y R2A y aislar las UFC que crecieron para su identificación.

Para analizar la presencia de bacterias reductoras de sulfato (SRB, *Sulphate-Reducing Bacteria*) en el agua del sistema de circulación de la Central, se filtraron 20 mL de agua de los diferentes puntos de muestreo por filtros de 0,22 μm de diámetro de poro (GSWP02500, MILLIPORE). Los filtros se colocaron en medio líquido *Postgate B* (Postgate, 1984) (véase composición en Apartado 3.6) y se incubaron a 30°C.

3.6. MEDIOS DE CULTIVO

La composición de los diferentes medios de cultivo utilizados se muestra en las **Tablas 3, 4, 5 y 6**.

Tabla 3. Composición del medio Triptona de Soja (TSB, OXOID CM 129) pH = 7,3 \pm 0,2; suplementado con agar.

| Reactivo | Concentración |
|--|------------------------|
| Digerido pancreático de caseína | 17,0 g·L ⁻¹ |
| Digerido papaínico de semilla de soja | 3,0 g·L ⁻¹ |
| Cloruro sódico (NaCl) | 5,0 g·L ⁻¹ |
| Fosfato potásico dibásico (K ₂ HPO ₄) | 2,5 g·L ⁻¹ |
| Glucosa | 2,5 g·L ⁻¹ |
| Agar (UPS) Purísimo, PANREAC | 15,0 g·L ⁻¹ |
| Agua desionizada | 1000 mL |

Tabla 4. Composición del medio Agar medio oligotrófico R2 (R2, MICROKIT DMT 215) pH = 7,2 ± 0,2.

| Reactivo | Concentración |
|---|------------------------|
| Extracto de levadura | 0,50 g·L ⁻¹ |
| Extracto de carne | 0,50 g·L ⁻¹ |
| Casaminoácidos | 0,50 g·L ⁻¹ |
| Dextrosa | 0,50 g·L ⁻¹ |
| Almidón soluble | 0,50 g·L ⁻¹ |
| Fosfato dipotásico anhidro (K ₂ HPO ₄) | 0,30 g·L ⁻¹ |
| Sulfato de magnesio (MgSO ₄) | 0,05 g·L ⁻¹ |
| Piruvato de sodio | 0,30 g·L ⁻¹ |
| Agar-agar | 15,0 g·L ⁻¹ |
| Agua desionizada | 1000 mL |

Tabla 5. Composición del medio Agar STC (*Starch Casein*) pH = 7,2 ± 0,2.

| Reactivo | Concentración |
|--|------------------------|
| Almidón de patata soluble, PANREAC | 10,0 g·L ⁻¹ |
| Casaminoácidos, DIFCO LABORATORIES | 1,0 g·L ⁻¹ |
| Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄), PANREAC | 0,5 g·L ⁻¹ |
| Agar (UPS) purísimo, PANREAC | 15,0 g·L ⁻¹ |
| Agua desionizada | 1000 mL |

Tabla 6. Composición del medio *Postgate B*, pH = 7,2 - 7,5.

| Reactivo | Concentración |
|---|-----------------------|
| Extracto de levadura, OXOID | 1,0 g·L ⁻¹ |
| Lactato sódico al 50%, MERCK | 3,5 g·L ⁻¹ |
| Sulfato de magnesio (MgSO ₄ ·7H ₂ O), PANREAC | 2,0 g·L ⁻¹ |
| Sulfato de calcio (CaSO ₄), PANREAC | 1,0 g·L ⁻¹ |
| Cloruro de amonio (NH ₄ Cl), PANREAC | 1,0 g·L ⁻¹ |
| Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄), PANREAC | 0,5 g·L ⁻¹ |
| Ácido ascórbico L (+), PANREAC | 0,1 g·L ⁻¹ |
| Ácido tioglicólico al 80%, PANREAC | 0,1 g·L ⁻¹ |
| Sulfato de hierro (FeSO ₄ ·7H ₂ O), PANREAC | 0,5 g·L ⁻¹ |
| Agua desionizada | 1000 mL |

Desairear durante 15 minutos con N₂ (99,99%), AIR LIQUIDE

Una vez preparados, los medios de cultivo se esterilizaron en un autoclave “Autester” (SELECTA) a 1 atmósfera de presión, 121 °C, durante 20 minutos. Tras ello, se atemperaron en un baño a 50 °C y se dispensaron en placas de Petri de 90 mm de diámetro en condiciones estériles en una cabina de flujo laminar (TELSTAR AV100).

El medio líquido se dispensó en botes universales de 20 mL, y después se esterilizó de la misma forma que los medios con agar.

3.7. EXTRACCIÓN DE ADN

Se utilizaron varios métodos de extracción de ADN de las muestras de agua para optimizar el rendimiento, dependiendo de si eran muestras cultivables o ambientales.

De los microorganismos cultivados, se procedió a la extracción del material genético a partir de las UFC aisladas sobre el agar o del *pellet* obtenido de cultivo en medio líquido.

Para la extracción del ADN de las muestras ambientales, se utilizaron dos sistemas. Uno se basó en la concentración de las muestras de agua mediante centrifugación a 4000 rpm en una ultracentrífuga refrigerada (*Megafuge 1.0 R*, HERAEUS). El otro, consistió en filtrar 100 mL de agua por filtros de 0,22 μm de diámetro de poro (GSWP 02500, MILLIPORE) y utilizar dichos filtros para extraer el ADN.

3.7.1. EXTRACCIÓN CON PREPMANTM ULTRA (APPLIED BIOSYSTEMS)

Se utilizó para la extracción del ADN de bacterias Gram-negativas y de las muestras ambientales, siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante:

- Resuspender una colonia aislada, un *pellet* bacteriano o un filtro en 1 mL de agua desionizada estéril en un *Eppendorf* de 1,5 mL.
- Centrifugar a 13.000 rpm (*Biofuge Fresco*, HERAEUS) durante 3 minutos y eliminar el sobrenadante con micropipeta estéril.
- Añadir 200 μL de *PrepManTM ULTRA (Applied Biosystems)* e incubar 30 minutos en baño a 56 °C.
- Hacer un “vortex” de 10 segundos.
- Incubar 8 minutos en baño a 100 °C.
- Centrifugar 2 minutos a 13.000 rpm.
- Recoger el sobrenadante en un *Eppendorf* de 1,5 mL limpio.

3.7.2. EXTRACCIÓN CON LISOZIMA Y PROTEINASA K

Se utilizó para la extracción del ADN de bacterias Gram-positivas y muestras ambientales.

- Resuspender una colonia aislada, un *pellet* bacteriano o un filtro en 1 mL de agua desionizada estéril en un *Eppendorf* de 1,5 mL.
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 3 minutos y eliminar el sobrenadante con micropipeta estéril.
- Añadir 245 μL de TE (10 mM Tris-HCl, pH = 8, 1 mM EDTA) y 5 μL de lisozima a una concentración de $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (*Muramidase, from hen egg white, Boehringer Mannheim, Alemania*).
- Incubar 45 minutos en baño a 56°C .
- Añadir 205 μL de TE, 5 μL DiTioTreitol (DTT) 1M, 10 μL EDTA 0,5 M ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$, Amresco[®]), 25 μL SDS al 10% (*Sodium Dodecyl Sulfate, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$, Amresco[®]*) y 5 μL Proteínasa K (*Proteinase K Solution, Boehringer Mannheim, Alemania*) a una concentración de $17,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.
- Incubar a 30°C durante toda la noche.
- Precipitar el ADN con acetato sódico (véase “Purificación de ADN por el método de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico”, más adelante).

3.7.3. EXTRACCIÓN CON TRATAMIENTO ENZIMÁTICO Y *PREPMAN*TM *ULTRA*

Este método es una combinación de los dos anteriores y se utilizó para la extracción de ADN de bacterias Gram-positivas y muestras ambientales. El protocolo fue facilitado por *Applied Biosystems*:

- Resuspender una colonia aislada, un *pellet* bacteriano o un filtro en 1 mL de agua desionizada estéril en un *Eppendorf* de 1,5 mL.
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 3 minutos y eliminar el sobrenadante con micropipeta estéril.
- Añadir 245 μL de TE (10 mM Tris-HCl, pH = 8, 1 mM EDTA) y 5 μL de lisozima a una concentración de $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (*Muramidase, from hen egg white, Boehringer Mannheim, Alemania*).
- Incubar 45 minutos en baño a 56°C .
- Añadir 205 μL de TE, 5 μL DiTioTreitol (DTT) 1M, 10 μL EDTA 0,5 M ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$, Amresco[®]), 25 μL SDS al 10% (*Sodium Dodecyl Sulfate, C₁₂H₂₅NaO₄S, Amresco[®]*) y 5 μL Proteínasa K (*Proteinase K Solution, Boehringer Mannheim, Alemania*) a una concentración de $17,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.
- Incubar a 37°C durante 1 hora.
- Añadir 200 μL de *PrepMan*TM *ULTRA* (*Applied Biosystems*) e incubar 30 minutos en baño a 56°C .
- Hacer un “vortex” de 10 segundos.
- Incubar 8 minutos en baño a 100°C .
- Centrifugar 2 minutos a 13.000 rpm.

- Recoger el sobrenadante en un *Eppendorf* de 1,5 mL limpio.

3.7.4. EXTRACCIÓN POR CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN

Este procedimiento se utilizó para bacterias Gram-negativas, Gram-positivas y muestras ambientales.

- Resuspender una colonia aislada, un *pellet* bacteriano o un filtro en 500 μ L de agua desionizada estéril en un *Eppendorf* de 1,5 mL.
- Introducir la muestra en un congelador a -20 °C y dejar que se congele (aproximadamente 45 minutos).
- Descongelar la muestra en un baño a 60 °C.
- Hacer un “vortex” de 10 segundos.
- Volver a introducir la muestra en el congelador y repetir el ciclo de congelación-descongelación 3 veces.
- Tras la última descongelación, centrifugar la muestra a 3.000 rpm durante 10 minutos.
- Recoger el sobrenadante en un *Eppendorf* de 1,5 mL limpio.

3.7.5. PURIFICACIÓN DEL ADN POR EL MÉTODO DEL FENOL: CLOROFORMO: ALCOHOL ISOAMÍLICO

Tras la extracción del ADN conviene, en muchos casos, realizar su purificación para eliminar sustancias contaminantes como restos celulares y proteínas, que disminuyen la calidad del ADN e interfieren en el desarrollo de la PCR y

secuenciación. Con la precipitación, se consigue además incrementar la cantidad de ADN extraída. El protocolo de purificación fue el siguiente:

- Añadir a la muestra a purificar 1 volumen de fenol (preequilibrado con Tris-HCl 0,1M, pH = 8): cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1).
- Agitar invirtiendo varias veces el *Eppendorf* y centrifugar a 13.000 rpm durante 1 minuto.
- Recoger el sobrenadante en un *Eppendorf* limpio y repetir el proceso 2 veces.
- Recoger el sobrenadante en un *Eppendorf* limpio y añadir 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1).
- Agitar invirtiendo varias veces el *Eppendorf* y centrifugar a 13.000 rpm durante 1 minuto.
- Recoger la fase acuosa (fase superior) en un *Eppendorf* limpio y descartar la fase orgánica (fase inferior).
- Precipitar el ADN de la fase acuosa añadiendo 1:10 volúmenes de acetato sódico 3 M (para conseguir una concentración final de 0,3 M).
- Agitar invirtiendo varias veces el *Eppendorf* y añadir 0,6 volúmenes de isopropanol.
- Agitar invirtiendo varias veces el *Eppendorf* y centrifugar a 13.000 rpm durante 10 minutos.
- Eliminar el sobrenadante.
- Lavar el *pellet* con 200 μ L de etanol 70% frío (-20 °C).
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos.

- Eliminar el sobrenadante y secar el *pellet* al aire o en estufa a 30 °C.
- Resuspender el *pellet* de ADN en agua desionizada estéril.

La precipitación del ADN también puede hacerse con etanol y cloruro de magnesio según el siguiente protocolo, proporcionado por *Applied Biosystems*:

- Añadir 3,5 volúmenes de MgCl_2 0,5 mM en etanol 70%.
- Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 20 minutos.
- Descartar el sobrenadante.
- Añadir 200 μL de etanol 70% frío (-20 °C).
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos.
- Eliminar bien el sobrenadante.
- Secar el *pellet* de ADN al aire o en estufa a 30 °C.
- Resuspender el ADN en agua desionizada estéril.

Una vez extraído el ADN, se midió su concentración y pureza en un biofotómetro (*BioPhotometer 6131, Eppendorf AG, Hamburg, Alemania*). La concentración del ADN viene expresada en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y la pureza de la muestra puede deducirse a partir de la absorbancia a 230, 260 y 320 nm, así como de la relación A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{320} . El cociente A_{260}/A_{280} informa sobre la contaminación de proteínas de la muestra, y se considera que el ADN tiene calidad suficiente para realizar una PCR si este valor se encuentra entre 1,5 y 1,9. Con muestras puras el valor de A_{320} debería ser cero.

En función de la concentración del ADN de la muestra, ésta se diluyó con agua desionizada estéril para ser utilizada posteriormente como molde o *template* en la reacción de PCR.

Posteriormente, el ADN extraído de las diferentes muestras, cultivables o ambientales, se guardó en el congelador a -20 °C hasta su utilización.

3.8. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR, *POLIMERASE CHAIN REACTION*)

La PCR o Reacción en Cadena de la Polimerasa es una técnica que permite amplificar un fragmento de ADN de interés, es decir, obtener *in vitro* un gran número de copias de dicho fragmento, independientemente de su origen (virus, bacterias, plantas, animales o humanos). Para ello, son necesarios unos *primers* o cebadores (secuencias de unos 20 nucleótidos complementarias a los extremos del fragmento de ADN que se pretende amplificar), deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP) y una enzima con actividad polimerasa que sintetice una nueva hebra de ADN a partir de estos *primers* y usando como molde el ADN de interés o *template*.

El fundamento de la PCR consiste básicamente en la repetición cíclica de tres pasos sucesivos denominados: desnaturalización, *annealing* o hibridación y extensión.

El primer paso o desnaturalización consiste en la separación de las dos cadenas que forman la molécula de ADN que se quiere amplificar, para lo cual se calienta el ADN a temperaturas próximas a la ebullición (92-96 °C). De esta manera se consigue que el ADN quede en forma de hebra sencilla, que es como la enzima ADN polimerasa puede utilizarlo de molde para la síntesis de una nueva cadena de ADN complementaria.

Durante el *annealing* o hibridación se produce la unión de los *primers* a su secuencia complementaria en el ADN molde para lo que se hace descender la temperatura entre 45 y 72 °C, dependiendo de la composición de bases del *primer*. Estos *primers* o cebadores permiten la formación de una doble cadena necesaria para que la enzima ADN polimerasa comience a sintetizar ADN.

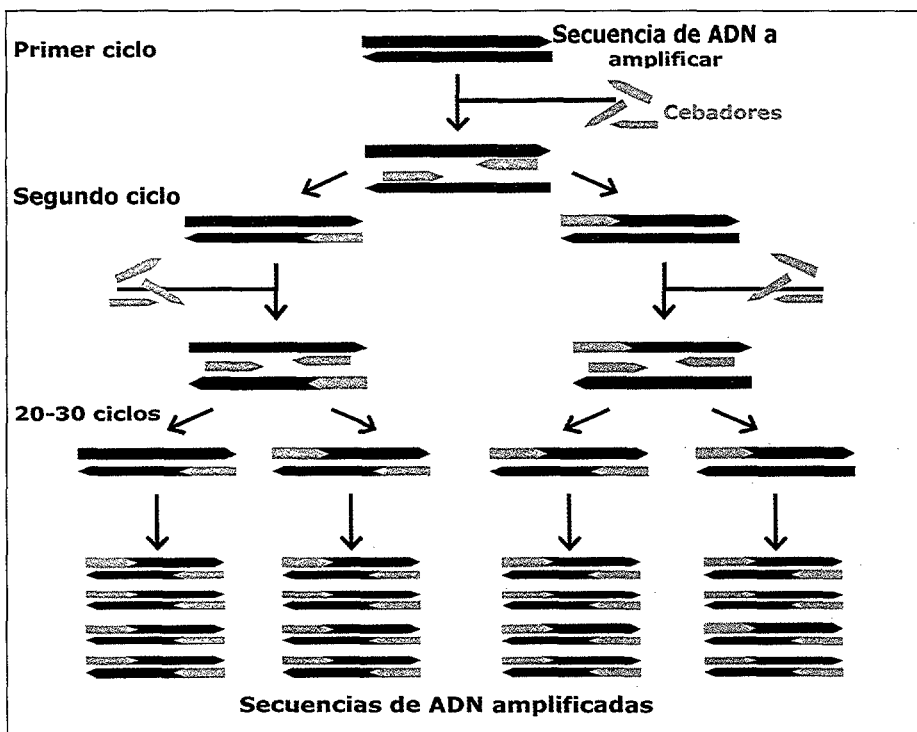


Figura 9. Esquema del rendimiento de una PCR.

La polimerasa, usando el ADN en forma de cadena sencilla como molde, puede empezar a incorporar dNTPs en el extremo 3' del cebador y sintetizar una nueva cadena de ADN. Esta última etapa es la denominada extensión y suele usarse una

temperatura en torno a los 72 °C que es adecuada para el funcionamiento de la enzima y evita la hibridación inespecífica de los cebadores. Los *primers* deben construirse en la dirección adecuada, con el extremo 3' dirigido hacia la zona del ADN donde se quiere que empiece a sintetizar la polimerasa.

Cada uno de estos tres pasos se define por un periodo de tiempo determinado y en su conjunto se denominan ciclo. La repetición sucesiva de estos ciclos permite obtener gran número de copias del fragmento de ADN de interés (**Figura 9**).

Normalmente se realizan 30-40 ciclos, con lo que se obtienen 2^{30} (mil millones) ó 2^{40} (1 billón) copias del fragmento deseado, si partimos de una sola molécula de ADN.

Existen multitud de protocolos de PCR aplicables en función de cuales sean los objetivos experimentales.

3.8.1. MUESTRAS CULTIVABLES

Para la identificación de los microorganismos cultivables, el primer paso fue la amplificación de un fragmento discreto del gen que codifica para la subunidad 16S del ribosoma bacteriano (16S rDNA). Se utilizaron los cebadores 5 F-GC y 531 R (véase su secuencia en la **Tabla 11**), universales para el dominio *Bacteria*, que permiten la amplificación de un fragmento de unas 500 pares de bases del gen. El protocolo de PCR utilizado fue el descrito por Muyzer y cols., (1993), que se detalla más adelante, y la concentración de reactivos se muestra en la **Tabla 7**:

Tabla 7. Reactivos empleados en la reacción de PCR de muestras cultivables.

| | Concentración inicial | Concentración final | Volumen |
|---------------------------|-----------------------|---|--------------|
| PCR Master ^(*) | 2X | (1,5 mM MgCl ₂ ; 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; 0,2 mM dNTPs; 1,25 U Taq DNA polimerasa) | 12,5 µL |
| Cebador 5 F-GC | 25 µM | 1 µM | 1 µL |
| Cebador 531 R | 25 µM | 1 µM | 1 µL |
| MgCl ₂ | 12,5 mM | 0,4 mM | 0,8 µL |
| H ₂ O | — | — | 4,7 µL |
| ADN molde | — | Entre 10 y 30 µg·mL ⁻¹ | 5 µL |
| Volumen total | | | 25 µL |

^(*) PCR Master (Roche Diagnostic)

F = "Forward" o Sentido; R = "Reverse" o Antisentido

3.8.2. MUESTRAS AMBIENTALES

En el caso de las muestras ambientales, se utilizaron diferentes pares de cebadores y un protocolo denominado PCR anidada o *Nested-PCR*. En éste, tras la primera PCR se realiza una segunda, usando cebadores situados en zonas más internas que el primer par de cebadores. Existe un proceso intermedio, denominado *Seminested-PCR* en el que solo se emplea uno de los cebadores internos. Los cebadores internos se denominan también anidados. La clave de este método es que el producto de la primera PCR es un *template* ideal para la segunda PCR consiguiéndose mayor eficiencia en la amplificación por la mayor especificidad proporcionada por el uso de dos pares de *primers*, el mayor número de ciclos y la renovación de los reactivos.

Los cebadores utilizados se muestran en la **Tabla 8** y la secuencia de cada uno de ellos en la **Tabla 11**.

Tabla 8. Pares de Cebadores utilizados en la PCR anidada de muestras ambientales.

| 1ª PCR | 2ª PCR |
|-----------------|-------------------|
| 005 F // 907 R | 005 F-GC // 531 R |
| 005 F // 907 R | 385 F-GC // 531 R |
| 341 F // 1540 R | 385 F-GC // 531 R |
| 341 F // 907 R | 341 F-GC // 531 R |

En la primera PCR el protocolo seguido se denomina MW-001 y en la segunda MW-002, basados en los estudios de Gutner y cols., (2000) detallados más adelante. La concentración de reactivos utilizada en cada caso se muestra en las **Tablas 9 y 10**:

Tabla 9. Reactivos empleados en la 1ª PCR de muestras ambientales.

| | Concentración inicial | Concentración final | Volumen |
|-------------------------|------------------------------|---|----------------|
| PCR Master | 2X | (1,5 mM MgCl ₂ ; 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; 0,2 mM dNTPs; 1,25 U Taq DNA polimerasa) | 25 µL |
| Cebador F | 25 µM | 1µM | 2 µL |
| Cebador R | 25 µM | 1µM | 2 µL |
| MgCl₂ | 12,5 mM | 0,4 mM | 1,6 µL |
| H₂O | — | — | 9,4 µL |
| ADN molde | — | Entre 10 y 30 µg·mL ⁻¹ | 10 µL |
| Volumen total | | | 50 µL |

En la 2ª PCR, se utilizó como *template* el producto obtenido en la 1ª PCR.

Tabla 10. Reactivos empleados en la 2ª PCR ó PCR anidada de muestras ambientales.

| | Concentración inicial | Concentración final | Volumen |
|-------------------------|-----------------------|---|---------|
| PCR Master | 2X | (1,5 mM MgCl ₂ ; 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; 0,2 mM dNTPs; 1,25 U Taq DNA polimerasa) | 50 µL |
| Cebador F-GC | 25 µM | 1 µM | 4 µL |
| Cebador R | 25 µM | 1 µM | 4 µL |
| MgCl₂ | 12,5 mM | 0,4 mM | 3,2 µL |
| H₂O | — | — | 18,8 µL |
| ADN molde | — | Entre 10 y 30 µg·mL ⁻¹ | 20 µL |
| Volumen total | | | 100 µL |

Para las muestras ambientales se hicieron dos PCR anidadas de cada muestra con el fin de obtener mayor concentración de ADN amplificado, para ser utilizado posteriormente en la DGGE.

Tabla 11. Secuencia de los diferentes cebadores empleados en las reacciones de PCR, sintetizados por *Roche Diagnostic*.

| Cebador | Secuencia nucleótidos 3' → 5' |
|----------------------|---------------------------------------|
| 005 F | TGGAGATTTGATCCTGGCTCAG |
| 341 F | CCTACGGGAGGCAGCAG |
| 385 F | CGGCGTCGCTGCGTCAGG |
| 531 R | TACCGCGGCTGCTGGCAC |
| 907 R | CCGTCAATTCCTTTGAGTTT |
| 1540 R | AAGGAGGTGATCCARCCGCA |
| CYA 359 F | GGGGAATYTTCCGCAATGGG |
| CYA 781 R (a) | GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT |
| CYA 781 R (b) | GACTACAGGGTATCTAATCCCTTT |
| Cola GC | CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG |

Las muestras ambientales también fueron sometidas a una reacción de PCR con cebadores específicos del grupo *Cyanobacteria*, para comprobar la presencia de tales microorganismos en el agua del sistema de circulación de la central. Se utilizó el protocolo de PCR descrito por Nübel y cols., (1997), y la concentración de reactivos que se muestra en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Reactivos empleados en la PCR de muestras ambientales para cianobacterias.

| | Concentración inicial | Concentración final | Volumen |
|----------------------|-----------------------|---|---------|
| PCR Master | 2X | 1X (1,5 mM MgCl ₂ ; 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; 0,2 mM dNTPs; 1,25 U Taq DNA polimerasa) | 12,5 µL |
| CYA 359 F-GC | 12,5 µM | 0,5 µM | 1 µL |
| CYA 781 R (a) | 12,5 µM | 0,5 µM | 1 µL |
| CYA 781 R (b) | 12,5 µM | 0,5 µM | 1 µL |
| MgCl ₂ | 12,5 mM | 0,4 mM | 0,8 µL |
| H ₂ O | — | — | 3,7 µL |
| ADN molde | — | Entre 10 y 30 µg·mL ⁻¹ | 5 µL |
| Volumen total | | | 25 µL |

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin Elmer).

Terminada la PCR, se comprobó la amplificación del ADN mediante electroforesis en un gel de agarosa (Agarosa tipo I estándar, PANREAC) al 1% en tampón TBE 1X (Tris Borato EDTA, véase composición en **Tabla 13**), conteniendo 4 µL de solución de bromuro de etidio (BIO-RAD) a una concentración de 10 mg·mL⁻¹

en 100 mL de la solución de agarosa. La electroforesis se desarrolló en una cubeta de electroforesis (BIO-RAD) con TBE 1X, a 90 V durante 20 minutos, cargando 4,5 μ L de producto de PCR y 1,5 μ L de *Gel Loading Dye* 6X (BIO-RAD). El gel se observó en un analizador de imágenes *Gel Doc 2000* (BIO-RAD) empleando el software de adquisición de imágenes de BIO-RAD (*Quantity One V 4.4.0*).

Tabla 13. Composición del tampón TBE.

| Tampón Tris Borato EDTA (TBE) | | | |
|-------------------------------|---------|---------------------------|---------|
| Concentración Stock: 10 X | | Concentración de uso: 1 X | |
| Tris base | 108 g | | |
| Ácido bórico | 55 g | Tris Borato | 0,09 M |
| 0,5M EDTA (pH 8,0) | 40 mL | EDTA | 0,002 M |
| Agua desionizada estéril | 1000 mL | | |

3.8.3. PROTOCOLO DE PCR PARA MUESTRAS CULTIVABLES (MUYZER Y COLS., 1993)

Este protocolo de PCR es del tipo de los denominados “*touchdown*”, y fue concebido para simplificar el proceso de determinación de la temperatura de hibridación óptima y proporcionar unas condiciones de PCR menos restrictivas, permitiendo la unión del cebador a secuencias que no son 100% homólogas, por lo que añade especificidad y aumenta la eficiencia. En este tipo de PCR, la hibridación comienza aproximadamente 15 °C por encima de la temperatura de fusión (T_m) calculada para la secuencia de ADN y en los ciclos posteriores la temperatura es reducida gradualmente hasta que alcanza unos 5 °C por debajo de la T_m .

La rampa de temperatura de este protocolo se representa en la **Figura 10**. En primer lugar, la muestra se incubó a 94 °C durante 5 minutos para activar la polimerasa. Después se realizaron 20 ciclos en los que la desnaturalización fue de 1 minuto a 94 °C, la hibridación de 1 minuto, comenzando a 65 °C y descendiendo 0,5 °C en cada ciclo, hasta alcanzar los 55 °C en el ciclo número 20, y la extensión fue de 3 minutos a 72 °C. A continuación, se realizaron otros 10 ciclos en los que la desnaturalización fue a 94 °C durante 1 minuto, la hibridación a 55 °C durante 1 minuto, y la extensión a 72 °C durante 3 minutos. Tras el último ciclo se realizó una extensión a 72 °C durante 7 minutos y después la temperatura se hizo descender a 4 °C para el mantenimiento del ADN amplificado.

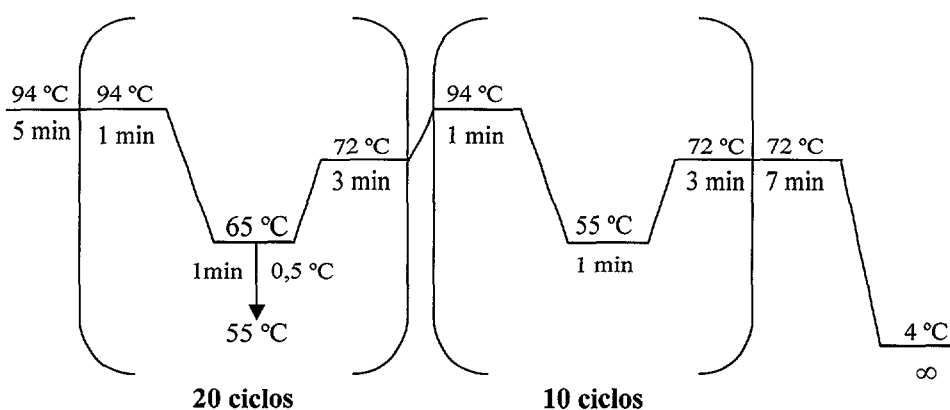


Figura 10. Rampa de temperatura de la PCR para muestras cultivables (Muyzer y cols., 1993).

3.8.4. PROTOCOLO DE PCR MW-001

Se siguió el protocolo descrito en la **Figura 11**.

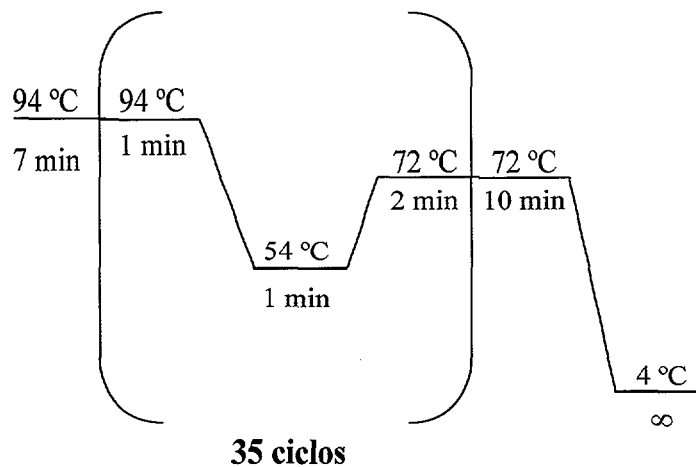


Figura 11. Rampa de temperatura de la PCR MW-001.

3.8.5. PROTOCOLO DE PCR MW-002

Este protocolo es exactamente igual al anterior (MW-001) con la excepción de que aquí, la temperatura de hibridación fue de 64 °C (**Figura 12**).

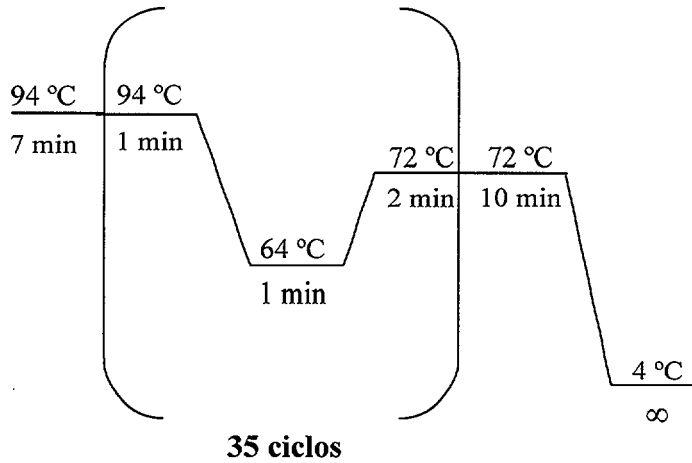


Figura 12. Rampa de temperatura de la PCR MW-002.

3.8.6. PROTOCOLO DE PCR PARA CIANOBACTERIAS (NÜBEL Y COLS., 1997)

La rampa de temperatura de este protocolo se muestra en la **Figura 13**. En primer lugar la muestra a amplificar se incubó a 94 °C durante 5 minutos para activar la polimerasa. Después se efectuaron 35 ciclos de la siguiente manera: la desnaturalización consistió en incubar la muestra a 94 °C durante 1 minuto, la hibridación a 60 °C 1 minuto y la extensión a 72 °C 1 minuto. Después del último ciclo se realizó una extensión de las muestras a 72 °C durante 9 minutos y para finalizar, la temperatura descendió a 4 °C para mantener el ADN amplificado.

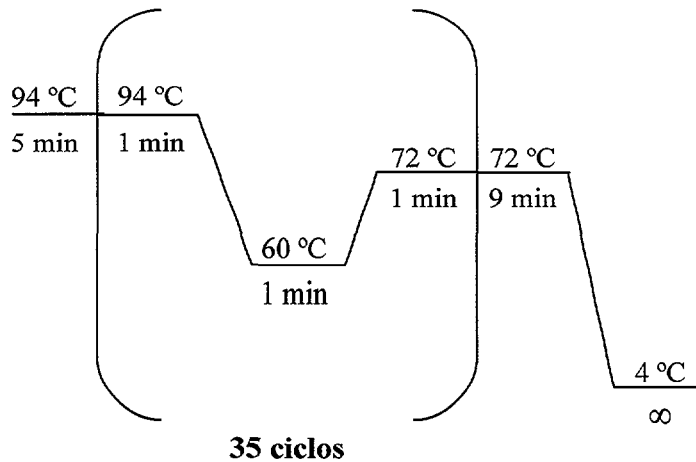


Figura 13. Rampa de temperatura de la PCR para cianobacterias.

3.9. ELECTROFORESIS EN GEL DE GRADIENTE DESNATURALIZANTE (DGGE, DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS)

La Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante o DGGE fue descrita por Fischer y Lerman en 1983. Es un método electroforético que permite separar fragmentos de ADN en función de su secuencia de nucleótidos. Es capaz de detectar mutaciones puntuales, es decir, cambios de hasta una sola base en una secuencia de ADN.

En la DGGE, un fragmento de ADN de doble hélice se hace correr por un gel de poliacrilamida con ambiente desnaturalizante creciente, de manera que se va desnaturalizando en pequeños segmentos denominados “*melting domain*” o dominios de desnaturalización o fusión. A medida que la molécula de ADN se va desnaturalizando y la doble hélice se va abriendo, disminuye su movilidad en el gel de

electroforesis. Como la temperatura de desnaturalización es específica de la secuencia de nucleótidos, dos fragmentos de ADN diferentes se desnaturalizarán de forma diferente y, por tanto, su movilidad electroforética será distinta, quedando separados en el gel. El ambiente desnaturalizante se consigue por la combinación de una temperatura constante (entre 50 °C y 65 °C) y un gradiente desnaturalizante lineal formado con urea y formamida. Una solución 100% desnaturalizante se consigue con una concentración 7M de urea y 40% de formamida. Cada mol de urea equivale a un aumento de temperatura de 2 °C y cada 1% de formamida a 0,5 °C.

El gradiente desnaturalizante puede ser perpendicular o paralelo a la dirección del campo eléctrico, hablándose de DGGE perpendicular o paralela, respectivamente. En la DGGE perpendicular suelen usarse rangos desnaturalizantes amplios que permiten establecer las condiciones en las que se desnaturaliza una determinada serie de muestras, las cuales son cargadas en un único pocillo. Por el contrario, en la DGGE paralela se usan rangos determinados para cada grupo de fragmentos que se quiere analizar, las muestras se cargan en pocillos individuales y se obtiene una banda o patrón de bandas característico de cada muestra (véase **Figura 6**, en la Introducción).

Una condición indispensable para someter una molécula de ADN a una DGGE es que tenga una cola rica en GCs en uno de sus extremos. Esto se consigue añadiendo dicha cola en el extremo 5' de uno de los cebadores utilizados durante la PCR. La unión entre este tipo de bases nitrogenadas (G y C) se establece a través de tres puentes de hidrógeno, por lo que es necesario un ambiente desnaturalizante mayor para separar la doble hélice. Esta cola de GCs evita la desnaturalización del ADN por ambos extremos lo que provocaría la formación de moléculas difíciles de resolver en el gel y evita la desnaturalización completa de la doble hélice de ADN, que supondría que la separación de los fragmentos no fuese en función de la secuencia de nucleótidos.

3.9.1. PUESTA A PUNTO DE LAS CONDICIONES DE DGGE

Para poner a punto la técnica de DGGE para analizar los fragmentos de ADN de las muestras de agua, tanto cultivables como ambientales, fue necesario controlar una serie de parámetros que intervienen en el desarrollo de la electroforesis:

- Rango desnaturalizante
- Tiempo
- Voltaje

Para una aproximación teórica a las condiciones desnaturalizantes se utilizó el Programa *WinMelt v.2.0* (BIO-RAD) en el que se introdujeron las secuencias de microorganismos encontrados en muestras similares. A continuación se realizó una DGGE perpendicular con varias muestras de microorganismos cultivables y se compararon los resultados con los del *WinMelt* para establecer las condiciones desnaturalizantes más adecuadas. Tras ello, se realizó una DGGE paralela cargando varias muestras a distintos tiempos, de manera que se pudo determinar la duración de la electroforesis para separar los fragmentos de ADN de las muestras de agua. El tiempo y el voltaje están íntimamente relacionados, de manera que si se utilizan voltajes elevados, será necesarios tiempos más cortos y viceversa. También se consideraron las condiciones empleadas por otros autores (Krsek y cols., 1999; Schabereiter-Gutner y cols., 2001) de manera que se fueron realizando DGGE variando los parámetros hasta conseguir los más adecuados para las muestras cultivables y ambientales.

3.9.2. MUESTRAS CULTIVABLES

En cada pocillo del gel se cargaron 9 μ L del producto de 500 pares de bases del gen 16S rRNA amplificado por PCR, junto con 9 μ L de *Gel Loading Dye 2 X* (BIO-RAD).

3.9.3. MUESTRAS AMBIENTALES

Como se mencionó en el Apartado 3.8.2., de cada muestra ambiental se realizaron dos PCR anidadas. El producto de ambas PCR se juntó en un *Eppendorf* de 1,5 mL y se precipitó con etanol y cloruro de magnesio, tal y como se describía en el Apartado 3.7.5. El *pellet* de ADN se resuspendió en 10 μ L de agua desionizada estéril, al que se le añadió 10 μ L de *Gel Loading Dye 2X*, para cargar 18 μ L de la mezcla en el gel de DGGE.

Tabla 14. Composición del tampón TAE.

| Tampón Tris Acetato EDTA (TAE) | | | |
|--------------------------------|---------|-----------------------------|---------|
| Concentración Stock: 50 X | | Concentración de uso: 0,5 X | |
| Tris base | 242 g | | |
| Acido acético glacial | 57,1 mL | Tris Acetato | 0,02 M |
| 0,5M EDTA (pH 8,0) | 100 mL | EDTA | 0,05 mM |
| Agua desionizada estéril | 1000 mL | | |

La DGGE se realizó en geles al 6% en el sistema *DcodeTM Universal Mutation Detection System*, Modelo 475 (BIO-RAD) en tampón Tris Acetato EDTA (TAE)

0,5X (véase composición en la **Tabla 14**). El gradiente de urea y formamida se estableció entre el 20 % y el 60% desnaturalizante. La electroforesis se desarrolló a 180 voltios durante 210 minutos a una temperatura constante de 60 °C.

Finalizada la electroforesis, se desensambló el gel y se tiñó en una solución de bromuro de etidio (BIO-RAD) a una concentración de 1 mg·mL⁻¹ en tampón TAE 0,5X durante 15 minutos. Tras ello, se lavó el gel con agua desionizada y se observó en un analizador de imágenes *Gel Doc 2000* (BIO-RAD) empleando el software de adquisición de imágenes de BIO-RAD (*Quantity One* v.4.4.0).

3.9.4. PREPARACIÓN DEL GEL PARA DGGE

- Llenar la cubeta de electroforesis del sistema *Dcode™ Universal Mutation Detection System*, Modelo 475 (BIO-RAD) con tampón TAE 0,5X y encenderla para que se caliente a 60 °C.
- Limpiar los cristales, los separadores del gel, y el peine para hacer los pocillos con etanol y secarlos bien.
- Ensamblar el “sándwich” (los cristales con los separadores) en el soporte y preparar el sistema de gradiente.
- Poner 16 mL de poliacrilamida solución desnaturalizante 20% en un vaso de precipitado y 16 mL de poliacrilamida solución desnaturalizante 60% en otro (véase la preparación de las soluciones de poliacrilamida desnaturalizantes más adelante).
- Añadir a cada vaso con las soluciones de poliacrilamida desnaturalizantes 15 µL de TEMED (*N, N, N', N'-Tetra-methyl-ethylenediamine*, BIO-RAD) y 75 µL de persulfato de amonio al 10% (BIO-RAD).

- Cargar las soluciones desnaturalizantes en el sistema formador de gradientes, y generar el gradiente entre los cristales del sándwich siguiendo las indicaciones del fabricante del sistema *Dcode™* de BIO-RAD.
- Dejar polimerizar el gel alrededor de 1-1,5 horas.
- Una vez alcanzada la temperatura adecuada (60 °C), introducir el sándwich con el gel de poliacrilamida en la cubeta de electroforesis.
- Lavar los pocillos del gel con tampón TAE 0,5 X.
- Cargar las muestras con los productos de PCR y desarrollar la DGGE tal y como se mencionaba en el apartado anterior.

3.9.5. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTES

Una vez preparado el tampón TAE 50X, se prepara la solución de acrilamida/bisacrilamida (37,5:1) al 40% tal y como se describe en la **Tabla 15**. Esta solución puede mantenerse guardada a 4 °C y protegida de la luz durante un mes aproximadamente.

Tabla 15. Composición de la solución Acrilamida/Bisacrilamida (37,5:1) al 40%.

| Reactivos | Cantidad |
|-------------------|-----------------|
| Acrilamida | 38,93 g |
| Bis-Acrilamida | 1,07 g |
| dH ₂ O | hasta 100 mL |

Filtrar en filtro de 0,45 µm de diámetro de poro (HAWP04700, MILLIPORE) y mantener a 4 °C

Las soluciones de poliacrilamida desnaturalizantes al 20% y 60% se preparan igual que la solución desnaturalizante al 0% (**Tabla 16**) añadiéndoles las cantidades correspondientes de formamida y urea (**Tabla 17**).

Tabla 16. Composición de la solución de poliacrilamida desnaturalizante al 0%.

| Reactivo | Gel al 6% | Gel al 8% | Gel al 10% | Gel al 12% |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 40% Acrilamida/Bis | 15 mL | 20 mL | 25 mL | 30 mL |
| TAE 50 X | 2 mL | 2 mL | 2 mL | 2 mL |
| Agua desionizada estéril | Hasta 100 mL | Hasta 100 mL | Hasta 100 mL | Hasta 100 mL |

Desgasificar durante 10-15 minutos con nitrógeno. Filtrar en filtros de 0,45 µm de diámetro de poro (HAWP04700, MILLIPORE). Mantener a 4 °C protegido de la luz no más de un mes

Tabla 17. Composición de las soluciones desnaturalizantes para geles al 6%.

| Solución desnaturalizante | 10% | 20% | 30% | 40% | 50% | 60% | 70% | 80% | 90% |
|---------------------------|-----|-----|------|------|-----|------|------|------|------|
| Formamida (mL) | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 | 32 | 36 |
| Urea (g) | 4,2 | 8,4 | 12,6 | 16,8 | 21 | 25,2 | 29,4 | 33,6 | 37,8 |

3.9.6. EXTRACCIÓN DEL ADN DE LAS BANDAS DEL GEL DE DGGE

En el gel de DGGE pueden observarse una o varias bandas características de cada microorganismo aislado. En las DGGE de muestras ambientales, se obtiene un patrón de bandas característico de cada muestra de agua. El ADN de estas bandas se

puede extraer para ser amplificado mediante PCR y posterior secuenciación con el fin de identificar a los microorganismos que componen la muestra de agua.

Se utilizaron tres protocolos para extraer el ADN de estas bandas. En todos los casos las bandas de interés se cortaron con una cuchilla y se introdujeron en un *Eppendorf* de 1,5 mL estéril.

3.9.6.1. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGUA (JENSEN Y COLS., 1998; MIAMBI Y COLS., 2003)

- Añadir al *Eppendorf* de 1,5 mL conteniendo la banda de ADN entre 50-100 μL de agua desionizada estéril.
- Dejar difundir a 37 °C durante unas 8 horas o a 4 °C durante 48 horas.
- Centrifugar a 3.000 rpm durante 5 minutos.
- Recoger el sobrenadante conteniendo el ADN en un *Eppendorf* limpio y medir la concentración y pureza del ADN extraído.

3.9.6.2. MÉTODO DEL MERCAPTOETANOL (MUYZER Y COLS., 1996)

- Lavar las bandas con agua destilada estéril durante 10 minutos.
- Eliminar el agua y repetir el lavado.
- Eliminar el agua y añadir 100 μL de 2-mercaptoetanol 98% (SIGMA) e incubar a 37 °C durante 8 horas.
- Añadir 100 μL de agua desionizada estéril, 1/10 volúmenes de NaCl 5 M y 2,5 volúmenes de etanol 70% frío (-20°C).
- Centrifugar a 10.000 rpm durante 20 minutos.
- Eliminar el etanol y dejar secar el *pellet*.

- Resuspender el ADN en agua desionizada estéril y medir la concentración y pureza del ADN extraído.

3.9.6.3. MÉTODO DEL TAMPÓN DE ELUCIÓN (ROLLEKE Y COLS., 1996)

- Preparar el tampón para elución del ADN (NaCl 0,3 M, EDTA 3 mM y Tris base 30 mM a pH 7,6).
- Añadir 100 µL del tampón a las bandas de ADN.
- Incubar a 37 °C toda la noche.
- Centrifugar a 3.000 rpm durante 5 minutos.
- Recoger el sobrenadante en un *Eppendorf* limpio.
- Precipitar el ADN con etanol y cloruro de magnesio, tal y como se describió previamente.
- Resuspender el ADN en agua desionizada estéril y medir la concentración y pureza del ADN extraído.

3.10. SECUENCIACIÓN DEL ADN

Los métodos de secuenciación del ADN permiten “leer” el código genético de un microorganismo, es decir, determinar la secuencia de bases de un determinado fragmento de ADN previamente amplificado por PCR. Posteriormente, la secuencia de ADN se puede comparar con bases de datos para averiguar la identidad de dicho microorganismo.

Para identificar los microorganismos obtenidos de cultivos puros así como de las bandas de DGGE se realizó la secuenciación automática de los fragmentos de ADN amplificados por PCR. La secuenciación automática se basa en el método del

dideoxi desarrollado por Sanger y cols., (1977), y utiliza dideoxidonucleótidos trifosfato marcados en 3' con un colorante fluorescente diferente para cada base (A, C, T y G). Cada colorante emite luz a una longitud de onda distinta al ser excitado por un láser iónico de argón. Cuando un dideoxidonucleótido trifosfato se incorpora al extremo 3' de la cadena de ADN creciente, la elongación de la cadena termina selectivamente en A, T, C o G por la falta del grupo hidroxil-3', por lo que las cuatro bases pueden ser detectadas y diferenciadas (**Figura 14**).

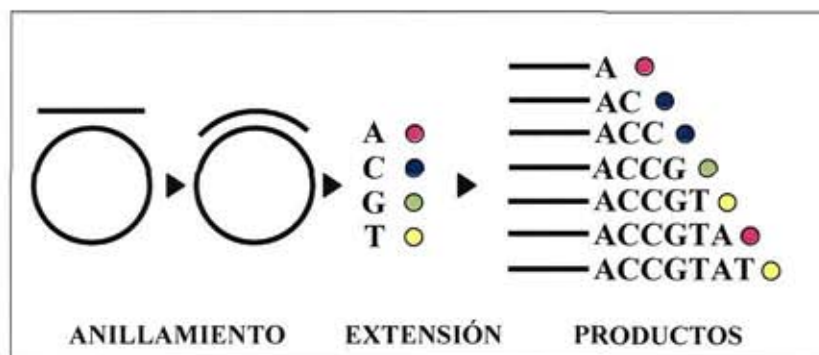


Figura 14. Esquema del sistema de secuenciación por el método del dideoxi.

Para la secuenciación se utilizó un secuenciador automático (*ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems*) que analiza fragmentos de ADN por electroforesis capilar. El ingreso de las muestras en el capilar, se realiza por inyección electrocinética, es decir, un corto período de electroforesis donde el capilar y el cátodo se encuentran inmersos en la muestra. Después, el extremo del capilar cercano al cátodo se sumerge en tampón y se aplica corriente para continuar la electroforesis (*ABI PRISM 310 Genetic Analyzer User's Manual, 1998*). Cuando los fragmentos de ADN alcanzan la ventana del capilar, el láser excita los colorantes fluorescentes y la

fluorescencia emitida es colectada por el detector, a longitudes de onda particulares, y registrada como señales digitales en el ordenador (**Figura 15**). Para el procesamiento de los datos se utilizó el software "Sequencing Analysis" v.3.3 (Applied Biosystems) que asigna las bases para cada intensidad de fluorescencia detectada.

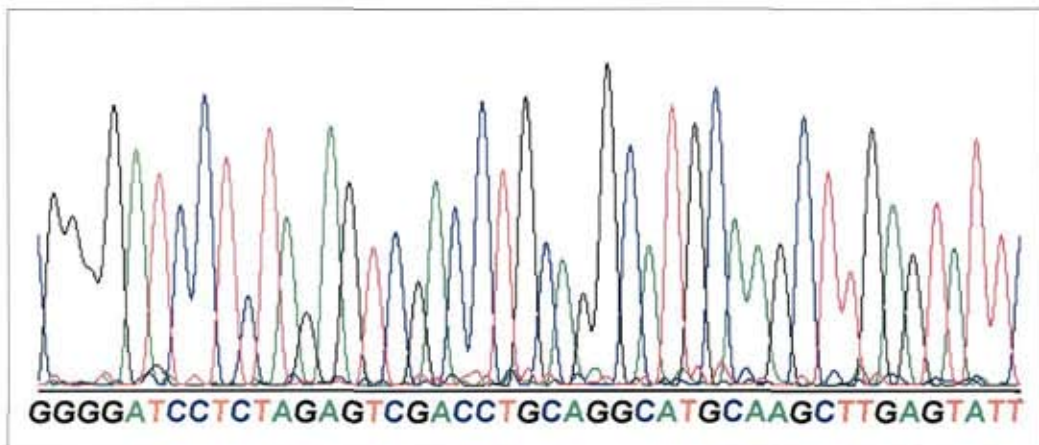


Figura 15. Imagen de una secuencia obtenida por secuenciación automática.

Se utilizaron dos protocolos de secuenciación diferentes: el kit *Microseq 500TM* y *Big Dye[®] Terminator v.1.1.*

3.10.1. SECUENCIACIÓN CON EL KIT *MICROSEQ 500TM*

El kit *Microseq 500TM 16S rDNA Bacterial Sequencing kit (Applied Biosystems)* se utilizó para secuenciar un fragmento del gen 16S rRNA comprendido entre las posiciones 5 y 531 de *Escherichia coli*, de los microorganismos aislados por cultivo puro.

Se siguió el protocolo descrito por *Applied Biosystems*, que implica la realización de dos amplificaciones por PCR.

En la primera PCR se utilizó como molde o *template* el ADN extraído de los cultivos puros. Además, se utilizó como control negativo agua desionizada estéril y como control positivo, el ADN de *Escherichia coli*.

La concentración de reactivos utilizada se muestra en la **Tabla 18** y la rampa de temperaturas de la PCR en la **Figura 16**.

Tabla 18. Reactivos empleados en la 1ª PCR de secuenciación con el kit *Microseq 500™*.

| Reactivo | Volumen |
|-----------------------|---------|
| <i>PCR Master Mix</i> | 25 µL |
| ADN molde | 25 µL |
| Volumen total | 50 µL |

Finalizada la PCR, se purificó el ADN mediante columnas *Microcon™-100* (MILLIPORE), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante:

- Colocar la columna *Microcon-100* sobre su soporte correspondiente.
- Añadir 400 µL de agua desionizada estéril para hidratar el filtro.
- Añadir todo el producto resultante de la PCR (50 µL).
- Centrifugar a 3.000 rpm durante 15 minutos.
- Volcar la columna sobre un nuevo soporte y añadir 25 µL de agua desionizada estéril.

- Centrifugar a 3.000 rpm durante 5 minutos para arrastrar el ADN.
- Retirar la columna y utilizar el ADN como *template* para la segunda PCR de secuenciación.

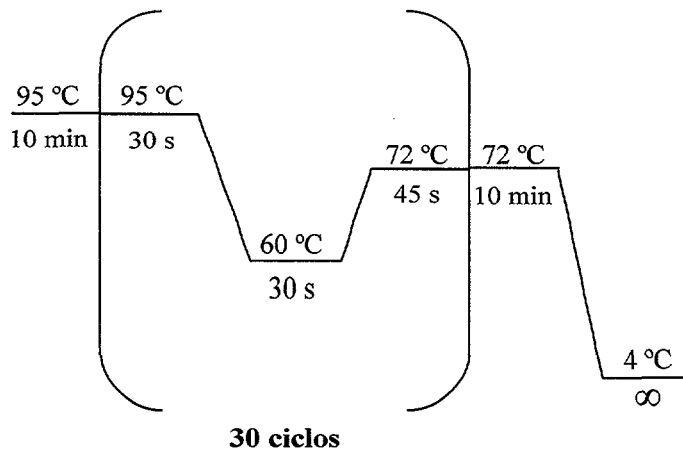


Figura 16. Rampa de temperaturas de la primera PCR de secuenciación con el kit *Microseq 500™*.

En la segunda PCR de secuenciación, se preparan dos reacciones para cada muestra, una conteniendo el cebador *Forward* y otra el *Reverse* del kit *MicroSeq™ 500 16S rDNA Bacterial Sequencing Module (Applied Biosystems)*. Los reactivos empleados se muestran en la **Tabla 19** y la rampa de temperaturas en la **Figura 17**.

Tabla 19. Reactivos empleados en la 2ª PCR de secuenciación con el kit *Microseq 500™*.

| | Reactivo | Volumen |
|----------------|-------------------------------|------------|
| <i>Forward</i> | <i>Forward Sequencing Mix</i> | 13 μ L |
| | ADN molde | 3 μ L |
| | Agua desionizada estéril | 4 μ L |
| <i>Reverse</i> | <i>Reverse Sequencing Mix</i> | 13 μ L |
| | ADN molde | 3 μ L |
| | Agua desionizada estéril | 4 μ L |

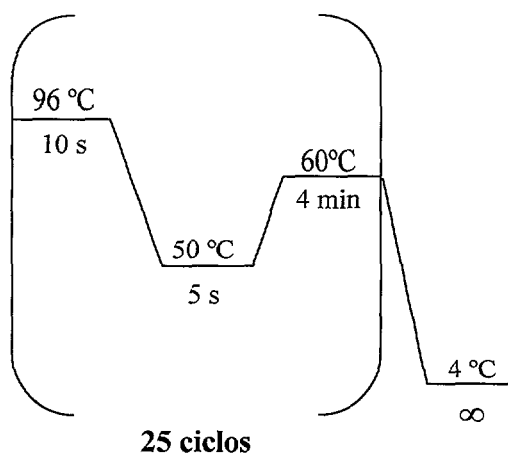


Figura 17. Rampa de temperaturas de la 2ª PCR de secuenciación con el kit *Microseq 500™*.

Finalizada la PCR, se precipitó el ADN con etanol y cloruro de magnesio, tal como se describe en el Apartado 3.7.5.

3.10.2. SECUENCIACIÓN CON *BIGDYE*[®] *TERMINATOR* v.1.1

Para secuenciar el ADN de los microorganismos cultivables aislados y el extraído de las bandas del gel de DGGE se utilizó el kit *BigDye*[®] *Terminator* v.1.1 *Cycle Sequencing kit* (*Applied Biosystems*). Éste permite secuenciar cualquier fragmento de ADN utilizando los cebadores adecuados. Se parte de un producto de PCR previamente purificado por las columnas *Microcon-100* (MILLIPORE) que contenga suficiente cantidad de ADN (véase **Tabla 20**).

En el caso del ADN extraído de las bandas del gel de DGGE, se realizó una PCR intermedia para aumentar la cantidad de ADN, utilizando como *template* el ADN extraído de las bandas del gel y los cebadores y condiciones utilizados en la segunda PCR ambiental. El producto de esta PCR intermedia también se purificó utilizando columnas *Microcon-100* (MILLIPORE), antes de ser utilizado en la PCR de secuenciación.

Tabla 20. Cantidad de ADN necesaria para la amplificación por PCR con el kit *BigDye*[®] *Terminator* v.1.1.

| Producto de PCR | Cantidad de ADN |
|-----------------------------|-----------------|
| 100-200 pares de bases (pb) | 1-3 ng |
| 200-500 pb | 3-10 ng |
| 500-1000 pb | 5-20 ng |
| 1000-2000 pb | 10-40 ng |
| >2000 pb | 20-50 ng |

Los reactivos empleados en la PCR de secuenciación con el kit *BigDye*[®] *Terminator* v.1.1 se muestran en la **Tabla 21** y la rampa de temperaturas en la **Figura 18**. Se siguieron las directrices marcadas por el fabricante y, como en el kit *Microseq*

500TM, se realizaron dos reacciones por cada muestra, una con el cebador *Forward* y otra con el *Reverse*.

Se realizaron además dos reacciones de PCR de secuenciación que sirvieron de controles: una con agua desionizada estéril de control negativo y otra usando como *template* el pGEM[®] -3Zf (+) con el cebador 21 M13 de control positivo, tal y como se describe en la **Tabla 22**.

Tabla 21. Reactivos empleados en la PCR de secuenciación con el kit *BigDye[®] Terminador v.1.1*.

| Reactivos | Concentración | Volumen |
|--|---------------|------------------------------|
| <i>BigDye Sequencing Buffer</i> | 5 X | 2 µL |
| <i>BigDye[®] Terminador v.1.1 Cycle Sequencing RR-100</i> | 2.5 X | 4 µL |
| Cebador | 25 µM | 2,6 µL |
| AND molde | — | Según fragmento a secuenciar |
| Agua desionizada estéril | — | Hasta 20 µL |
| Volumen total | 1 X | 20 µL |

Tabla 22. Reactivos empleados en la PCR del control positivo de secuenciación con el kit *BigDye[®] Terminador v.1.1*.

| Reactivos | Concentración | Volumen |
|---|---------------------------|---------|
| <i>BigDye Sequencing Buffer</i> | 5 X | 2 µL |
| <i>BigDye[®] Terminador v1.1 Cycle Sequencing RR-100</i> | 2.5 X | 4 µL |
| Cebador 21 M13 | 0,8 pmol·µL ⁻¹ | 4 µL |
| pGEM [®] -3Zf (+) | 0,2 µg·µL ⁻¹ | 1 µL |
| Agua desionizada estéril | — | 9 µL |
| Volumen total | 1 X | 20 µL |

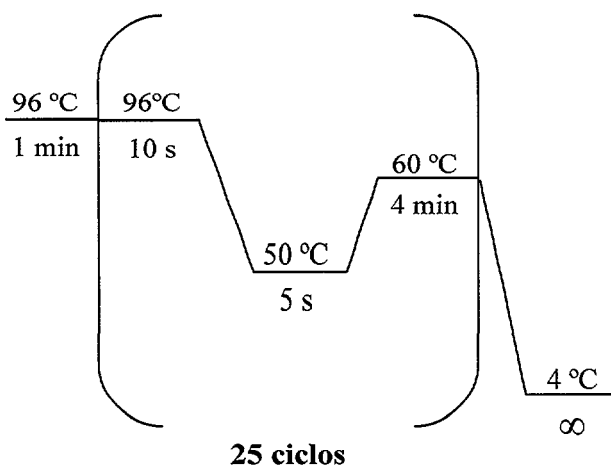


Figura 18. Rampa de temperaturas de la PCR de secuenciación con el kit *BigDye[®] Terminator v.1.1.*

Terminada la PCR, se precipitó el ADN para eliminar los terminadores no incorporados durante la reacción y aumentar el rendimiento de la secuenciación. Se siguió el protocolo descrito por el fabricante (*BigDye[®] Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit Protocol*, 2002):

- Transferir el producto de PCR (20 μ L) a un *Eppendorf* limpio cubierto con papel de aluminio para protegerlo de la luz.
- Añadir 5 μ L de EDTA 125 mM y 60 μ L de etanol 100%.
- Mezclar invirtiendo el *Eppendorf* varias veces.
- Incubar 15 minutos en oscuridad.
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 20 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y añadir 60 μ L de etanol 70% frío (-20 °C).

- Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y dejar secar el *pellet* de ADN al aire o en estufa a 30 °C y en oscuridad.

3.10.3. DESARROLLO DE LA SECUENCIACIÓN DEL ADN

La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador automático *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*, siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante:

- Resuspender el *pellet* de ADN que se pretende secuenciar, en 30 µL de TSR (*Template Suppression Reagent; Applied Biosystems*).
- Dar un pulso a 10.000 rpm.
- Desnaturalizar el ADN a 94 °C durante 3 minutos y a continuación enfriar a 4 °C para evitar la renaturalización.
- Transferir el ADN a los tubos del secuenciador (*Genetic Analyzer 0,5 mL Sample Tubes, Applied Biosystems*) y taparlos con sus tapones correspondientes (*Genetic Analyzer Septa for 0,5 mL Sample Tubes, Applied Biosystems*) para evitar su evaporación.
- Transferir los tubos a la gradilla para 48 muestras.
- Poner el secuenciador siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para recoger los datos de fluorescencia, se utilizó el programa *ABI PRISM 310 Collection (Applied Biosystems)*.

La electroforesis capilar se desarrolló a 50 °C, 12-15 kV y 9,9 mW de potencia de láser con polímero POP-6 (*Performance Optimizad Polymer-6, Applied Biosystems*). El capilar empleado fue de 47 cm (*310 Genetic Analyzer Capillary 5-47 cm x 50 μm, Applied Biosystems*). Se utilizó el electrolito propuesto por el fabricante (*Buffer 10 X with EDTA, Applied Biosystems*) a una concentración de 1X.

Para el procesamiento de los datos se utilizó el *software Sequencing Analysis v.3.3 (Applied Biosystems)* que asigna las bases para cada intensidad de fluorescencia detectada.

El análisis de las secuencias obtenidas se llevó a cabo con el programa *Microseq v.1.4 (Applied Biosystems)* que permite alinear las secuencias del *forward* y del *reverse* y obtener una secuencia consenso en formato texto, para realizar las búsquedas en las bases de datos y los correspondientes análisis filogenéticos.

3.11. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Las secuencias de ADN obtenidas para cada muestra fueron comparadas en las bases de datos públicas del NCBI (*National Center of Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov*) y del EMBL (*European Molecular Biology Laboratory; www.embl.org*) mediante los algoritmos *blastn* y *FASTA*, respectivamente. De esta manera, se obtuvo una primera aproximación a la identidad de los microorganismos secuenciados, puesto que estos algoritmos nos muestran aquellas secuencias con mayor porcentaje de homología a la secuencia problema.

A continuación, se guardaron entre 10 y 15 secuencias homólogas a la muestra analizada en un archivo de texto, con el número de acceso y el nombre de cada microorganismo, en formato *FASTA* (**Figura 19**). Con el programa *ClustalX v.1.81*. (Thompson y cols., 1997) se alinearon todas las secuencias y se guardaron en formato

.msf, para comprobar el correcto alineamiento de las mismas usando el programa *GeneDoc v.2.5.000*. Este programa permite comprobar de forma sencilla y visual el alineamiento de las secuencias y recortarlas por ambos extremos para que tengan la misma longitud con el fin de que los análisis filogenéticos posteriores sean lo más adecuados posibles (**Figura 20**).

```
>14.2 MW 14
GAGCGGACCGATTCCGAGGTCAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTG
TAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTATGTCAAACCGCATGG
TTTGACATTCAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGT
TGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC
ACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC
AATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAA
ACTCTGTTGTCAGCCAA

>AJ583158-Bacillus indicus
TTGAGTTTTTGATCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAG
CGGACCTCTTCGGAGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAG
ACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTATGTCAAACCGCATGGTTTG
ACATTCAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGG
TGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCT
GTTGTCAGGGAAGAACAAGTGCCGGAGTAAGTCCGGCGCCTTGACGGTACCTGACCAGAA
AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGCCCCGGCTC
AACCGGGGAGGGTCAATTGGAA
```

Figura 19. Secuencia de nucleótidos en formato *FASTA*.

Con el programa *MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) v 2.1* (Kumar y cols., 2001) se realizaron los análisis filogenéticos propiamente dichos. Este programa transforma los alineamientos realizados con anterioridad en formato *.meg*, a partir del cual se realizan los árboles filogenéticos una vez determinados los parámetros a utilizar.

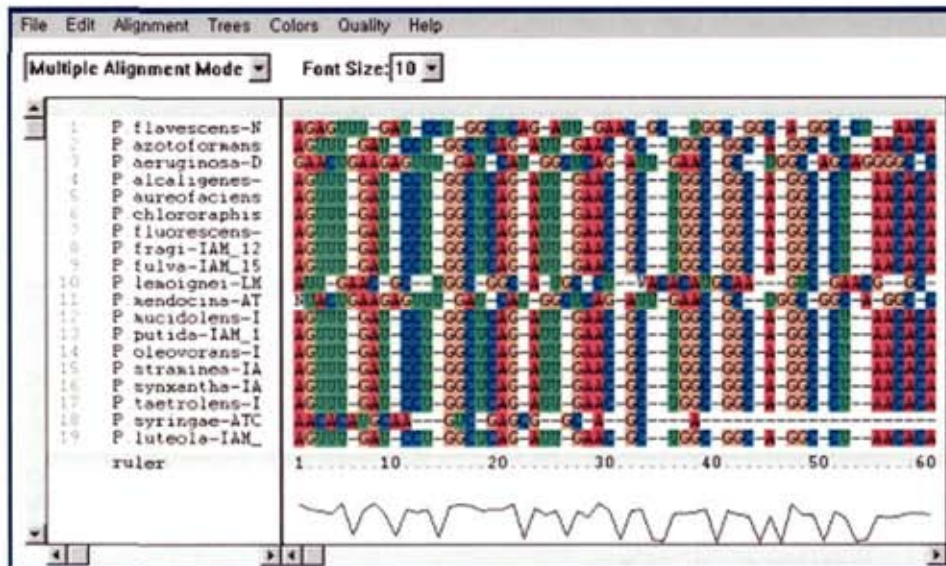


Figura 20. Alineamiento de las secuencias con el programa *ClustalX*.

Los árboles filogenéticos se construyeron según el método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) utilizando el algoritmo de Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969) con la corrección gamma, para el cálculo de la distancia entre las secuencias. La validación de los árboles filogenéticos se efectuó con el Test Bootstrap de Felsenstein con 500-1000 replicaciones.

3.12. TÉCNICAS DE CLONAJE

El clonaje en términos de Biología Molecular, se refiere a producir múltiples copias de una secuencia de ADN. El principio de la técnica consiste en la inserción de un fragmento de ADN de interés en un huésped por medio de un vector de clonaje,

como puede ser un virus o un plásmido. Una vez que el fragmento de ADN se ha introducido en el huésped, comienza el proceso de clonaje molecular y la recombinación, dando como resultado la expresión del gen o los genes introducidos en un organismo diferente (**Figura 21**). El clonaje tiene multitud de aplicaciones: se ha utilizado para la producción de vacunas (Klug y Cummings, 1999), proteínas, aminoácidos, vitaminas y ribonucleótidos (Hashimoto y Ozaki, 1999) y en terapia génica. Asimismo, ha sido empleado en la obtención de microorganismos transgénicos para ser utilizados en procesos de biorremediación de hidrocarburos (Keasling y Bang, 1998; Pieper y Reineke, 2000), metales pesados (Chen y Wilson, 1997; Saylor y Ripp, 2000), etc.

Una aplicación muy interesante la constituyen los estudios filogenéticos de comunidades microbianas, basados en el clonaje del gen 16S rRNA (Jackson y cols., 2001b; Bano y Hollibaugh., 2002; Bowman y McCuaig, 2003), que permiten la caracterización microbiológica de muestras ambientales.

Una vez seleccionado el fragmento de ADN de interés, hay que unirlo a un vector de clonación por medio de sitios de restricción compatibles. Los vectores son el vehículo de transporte del ADN de interés o inserto al huésped. Existen diferentes tipos de vectores (bacteriófagos, cósmicos, cromosomas artificiales, etc.) pero los más utilizados son los plásmidos.

Los plásmidos son moléculas de ADN bicatenario de carácter extracromosómico, que tienen la capacidad de replicarse autónomamente. Suelen contener genes que confieren ciertas propiedades al huésped, como la resistencia a antibióticos.

Para que el inserto se exprese, es necesario introducir el vector en un sistema vivo o huésped, que suele ser una bacteria. Un huésped adecuado para la producción

de clones debe tener un crecimiento rápido en un medio de cultivo económico, no ser patógeno y tener el mismo origen de replicación que el vector, entre otras propiedades.

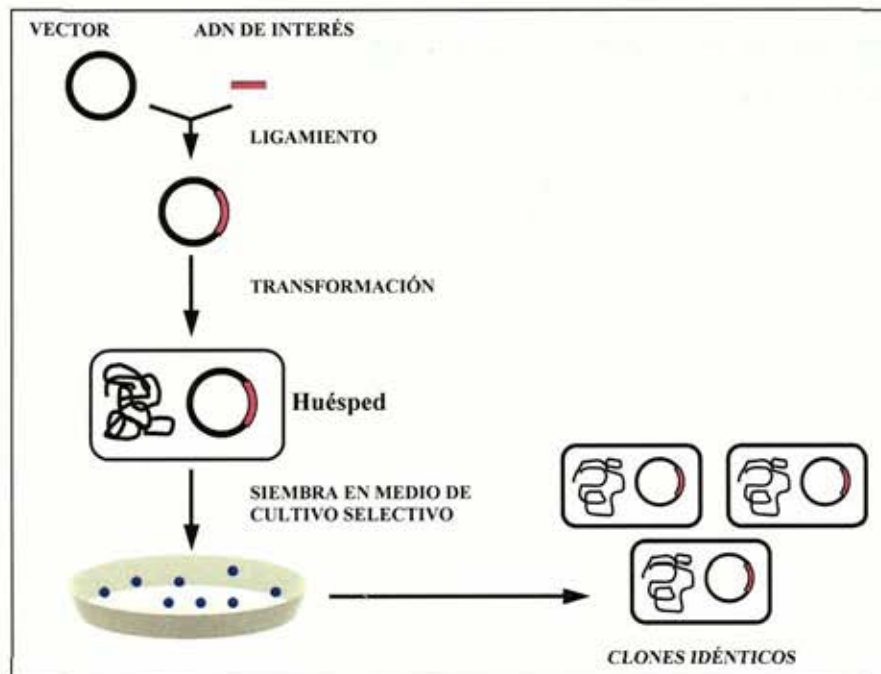


Figura 21. Esquema del protocolo de clonaje de un gen en una bacteria a través de un plásmido.

La inserción del ADN contenido en el vector en el huésped se realiza a través de un proceso de transformación, que puede ser por permeabilización de la membrana celular, microinyección, electroporación, etc. Las células receptoras del inserto crecen luego en placas de cultivo produciendo células genéticamente idénticas llamadas clones. La transformación de las células no es al 100%, porque éstas deben estar en un estado competente, y hay algunas que no reciben el fragmento de ADN de interés.

Estas células no transformadas deben separarse de las que sí lo están mediante el uso de medios de cultivo selectivos.

Para identificar los microorganismos del agua del sistema de circulación de la Central que no crecen en medios de cultivo (VBNC), se pusieron a punto técnicas de clonaje basadas en la expresión de un fragmento del gen 16S rRNA.

3.12.1. SELECCIÓN DEL INSERTO: FRAGMENTO DE ADN DE INTERÉS

El ADN total extraído de las diferentes muestras de agua, se amplificó utilizando los cebadores 341 F y 907 R y las condiciones descritas para la primera PCR ambiental (PCR-MW 001).

Una vez comprobada la amplificación del ADN en un gel de agarosa, se purificó el producto de PCR mediante columnas *Microcon-100* (MILLIPORE), tal y como se describía en apartados anteriores, y se resuspendió el ADN en 10 μ L de agua desionizada estéril.

3.12.2. LIGAMIENTO

Se utilizó el plásmido *pGEM[®]-T Easy Vector (Promega)* que contiene un gen de resistencia a ampicilina (Amp^R), el gen Lac Z, que codifica para la enzima β -galactosidasa, y dos promotores T7 y SP6 (**Figura 22**). El plásmido viene preparado en forma lineal y tiene una T (timidina) en cada uno de sus extremos 3', por lo que no hace falta tratarlo con enzimas de restricción. Sin embargo, para que el ADN de interés se una al plásmido conviene colocarle una A (adenosina) en cada uno de sus extremos para hacerlos compatibles con los del plásmido.

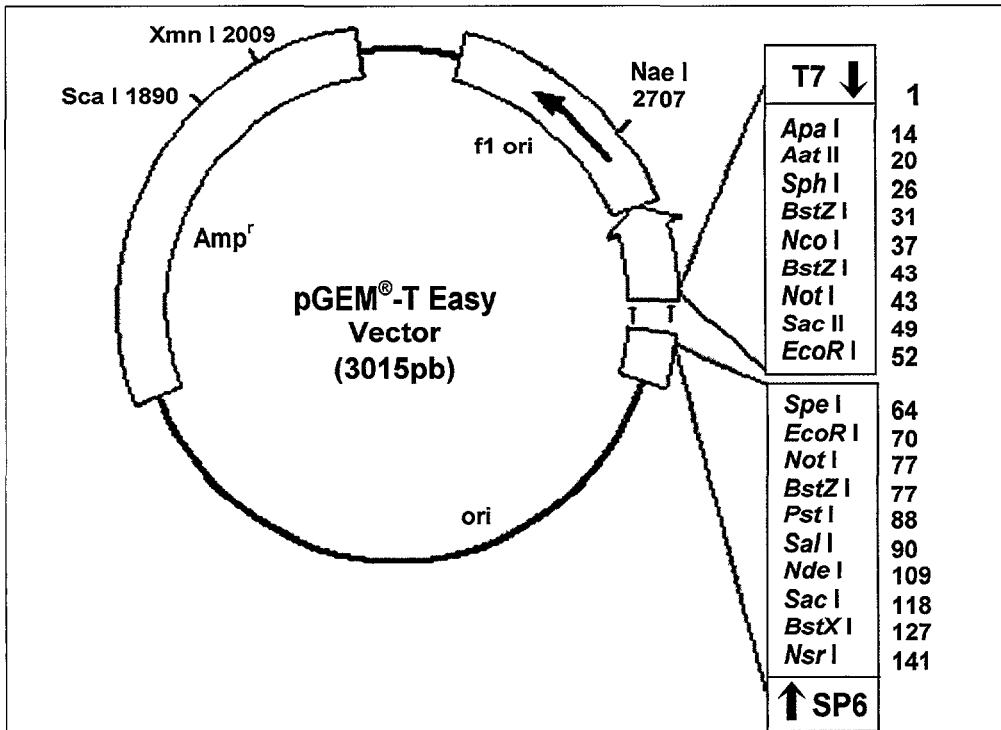


Figura 22. Mapa del plásmido pGEM[®]-T Easy Vector.

La unión de la A en los extremos del ADN se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (*Technical manual N° 042, Promega*):

- En un *Eppendorf* de 0,2 mL, poner de 1 a 7 μ L de producto de PCR purificado.
- Añadir 1 μ L de Buffer 10X (*Thermophilic DNA polymerase 10X Buffer, Promega*) con MgCl₂ a una concentración final de 15 mM.
- Añadir 1 μ L de dATP 2 mM (*Promega*).

- Añadir 1 μL de Taq DNA polimerasa 5 Unidades/ μL (*Taq DNA Polymerase Storage Buffer B, Promega*).
- Añadir agua desionizada estéril hasta un volumen de 10 μL .
- Incubar a 70 °C durante 25 minutos, utilizando el termociclador *GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer)*.

A continuación se llevó a cabo el ligamiento o unión del fragmento de interés al plásmido *pGEM[®]-T*, según se muestra en la **Tabla 23** y siguiendo las instrucciones del manual de *Promega*.

Tabla 23. Reactivos empleados en el ligamiento del inserto en el plásmido *pGEM[®]-T*.

| | Reacción estándar | Control Positivo | Control negativo |
|---|------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>2X Rapid Ligation Buffer</i> | 5 μL | 5 μL | 5 μL |
| <i>pGEM[®]-T Easy Vector</i> | 1 μL | 1 μL | 1 μL |
| Producto de PCR modificado | 3 μL | — | — |
| Inserto control (4 ng· μL^{-1}) | — | 2 μL | — |
| T4 DNA Ligasa (3 Unidades· μL^{-1}) | 1 μL | 1 μL | 1 μL |
| Agua desionizada estéril | Hasta 10 μL | Hasta 10 μL | Hasta 10 μL |

La reacción se llevó a cabo durante toda la noche a 4 °C para obtener el mayor número de plásmidos transformados con los diferentes fragmentos del gen 16S rRNA. Se realizaron dos reacciones adicionales para comprobar el rendimiento del ligamiento utilizando agua desionizada estéril como control negativo y un inserto proporcionado con el sistema *pGEM[®]-T Easy Vector* como control positivo.

3.12.3. TRANSFORMACIÓN

Se utilizaron células competentes de *Escherichia coli* (*JM 109 High Efficiency Competent Cells, Promega*) como huésped. La reacción de transformación de las células con el plásmido se efectuó siguiendo el protocolo proporcionado por *Promega*:

- Colocar un *Eppendorf* de 1,5 mL en hielo y añadir 2 μ L de la reacción de ligamiento.
- Añadir 50 μ L de células competentes y agitar suavemente.
- Incubar en hielo durante 20 minutos.
- Dar un choque térmico, colocando los tubos en un baño a 42 °C durante 50 segundos.
- Incubar en hielo durante 2 minutos.
- Añadir 950 μ L de medio SOC (véase composición más adelante).
- Incubar a 37 °C durante 90 minutos.
- Inocular 100 μ L de cada reacción de transformación en placas Petri de agar LB/Amp/IPTG/X-Gal (véase composición más adelante) y extender con la ayuda del asa de Drigalsky.
- Incubar a 37 °C durante toda la noche.

3.12.4. SELECCIÓN DE CLONES TRANSFORMADOS

Las células de *E. coli* que no han sido transformadas por el plásmido *pGEM*[®]-*T*, no crecen en las placas de LB/Amp/IPTG/X-Gal puesto que no tienen el gen de resistencia a dicho antibiótico, el cual ha sido incorporado en el medio de cultivo.

En las placas de cultivo, pueden observarse UFC de color blanco y de color azul. Las células de *E. coli* que hayan sido transformadas con un plásmido que no lleva incorporado el inserto serán de color azul. En este caso el plásmido tiene el gen *Lac Z* intacto, el cual se ve estimulado por el IPTG y produce β -galactosidasa. Esta enzima transforma el sustrato X-Gal en índigo, que es una sustancia de color azul.

Las UFC o clones que tengan el plásmido con el inserto incorporado, no pueden producir β -galactosidasa, puesto que el gen *Lac Z* se encuentra interrumpido por el inserto y son de color blanco.

Se seleccionaron todos los clones blancos que crecieron sobre las placas de agar de LB/Amp/IPTG/X-Gal. Éstos se crecieron en placas de agar LB/Amp (véase composición más adelante) y se incubaron durante 24 h a 37 °C para tenerlos separados e identificados.

3.12.5. VERIFICACIÓN/COMPROBACIÓN DE LOS CLONES SELECCIONADOS

El ADN de los clones seleccionados se extrajo por el método de congelación-descongelación, previamente descrito, y se utilizó como *template* en una PCR con los cebadores del plásmido *pGEM*[®]-*T*, SP6 y T7, para comprobar la presencia del inserto.

Los reactivos empleados en la PCR se muestran en la **Tabla 24** y la rampa de temperaturas utilizada está basada en el trabajo de Schabereiter-Gutner y cols., (2001), y se muestra en la **Figura 23**.

Finalizada la PCR, se comprobó la amplificación del ADN en un gel de agarosa al 1 % en TBE 1X, tal y como se describía en apartados anteriores.

Los clones positivos, es decir, con el inserto incorporado en el plásmido *pGEM[®]-T*, generan un producto de PCR de unas 760 pb (600 pb del inserto y las dos regiones flanqueantes del plásmido de 80 pb), mientras que los clones sin el inserto generan productos de 160 pb.

Tabla 24. Reactivos empleados en la reacción de PCR para comprobación de la presencia del inserto.

| | Concentración inicial | Concentración final | Volumen |
|-------------------------|------------------------------|---|----------------|
| PCR Master | 2X | (1,5 mM MgCl ₂ ; 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; 0,2 mM dNTPs; 1,25 U Taq DNA polimerasa) | 12,5 µL |
| Cebador SP6 | 25 µM | 1µM | 1 µL |
| Cebador T7 | 25 µM | 1µM | 1 µL |
| MgCl₂ | 12,5 mM | 0,4 mM | 0,8 µL |
| H₂O | — | — | 4,7 µL |
| ADN molde | — | Entre 10 y 30 µg·mL ⁻¹ | 5 µL |
| Volumen total | | | 25 µL |

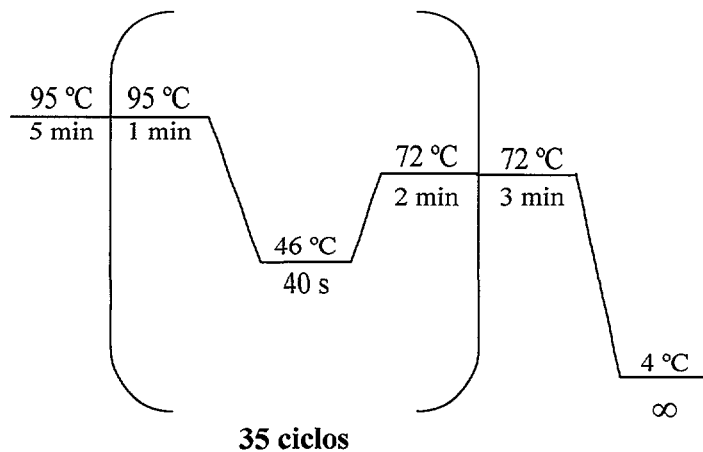


Figura 23. Rampa de temperaturas utilizada en la PCR para comprobación de la presencia del inserto.

Los clones con el inserto fueron seleccionados y utilizados en una PCR-DGGE en busca de aquellos insertos diferentes, para su posterior identificación mediante secuenciación.

3.12.6. BÚSQUEDA DE INSERTOS DIFERENTES

Se realizó una PCR tipo *Nested* utilizando como *template* el producto de PCR obtenido con los cebadores SP6 y T7 en el apartado anterior y los cebadores 341 F-GC y 531 R. Los reactivos empleados se muestran en la **Tabla 25** y la rampa de temperaturas empleada fue MW-002.

Tabla 25. Reactivos empleados en la reacción de PCR para búsqueda de insertos diferentes.

| | Concentración inicial | Concentración final | Volumen |
|-------------------------|-----------------------|---|---------|
| PCR Master | 2X | (1,5 mM MgCl ₂ ; 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; 0,2 mM dNTPs; 1,25 U Taq DNA polimerasa) | 12,5 μL |
| 341 F-GC | 25 μM | 1 μM | 1 μL |
| 531 R | 25 μM | 1 μM | 1 μL |
| MgCl₂ | 12,5 mM | 0,4 mM | 0,8 μL |
| H₂O | — | — | 4,7 μL |
| ADN molde | — | Entre 10 y 30 μg·mL ⁻¹ | 5 μL |
| Volumen total | | | 25 μL |

Los productos de esta PCR fueron sujeto de análisis mediante DGGE, con el fin de detectar aquellos clones presentando insertos diferentes. Se cargaron 8 μL del producto de PCR junto con 8 μL de *Gel Loading Dye 2X* (BIO-RAD) en cada pocillo del gel. La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE 0,5X en un gel al 6% con un gradiente desnaturizante de poliacrilamida entre el 20% y el 60%, a 60 °C de temperatura, 180 voltios y durante 210 minutos.

Finalizada la DGGE, se tiñó el gel en una solución de bromuro de etidio (BIO-RAD) a una concentración de 1 mg·mL⁻¹ en tampón TAE 0,5X durante 15 minutos. Después se lavó el gel con agua desionizada y se observó en un analizador de imágenes *Gel Doc 2000* (BIO-RAD) empleando el software de adquisición de imágenes de BIO-RAD (*Quantity One v.4.4.0*).

3.12.7. IDENTIFICACIÓN DE LOS INSERTOS DIFERENTES

Los clones que presentaron insertos con diferente patrón de bandas en el gel de DGGE fueron seleccionados para ser identificados mediante secuenciación.

En primer lugar, se extrajo el ADN plasmídico de dichos clones, para lo cual se utilizaron las columnas *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). El protocolo de extracción fue el descrito por el fabricante (*Technical Bulletin n° 225, Promega*):

- Inocular los clones seleccionados en *Falcon* de 50 mL conteniendo 4 mL de medio LB/Amp (véase composición más adelante).
- Incubar toda la noche a 37 °C en agitación suave.
- Centrifugar a 3.000 rpm durante 10 minutos.
- Eliminar el sobrenadante.
- Resuspender el *pellet* bacteriano en 250 µL de solución “*Cell Resuspension Solution*” (Promega) y transferirlo a un *Eppendorf* de 1,5 mL.
- Añadir 250 µL de solución de lisis “*Cell Lysis Solution*” (Promega) y mezclar invirtiendo el *Eppendorf* varias veces.
- Incubar 1-5 minutos hasta que la suspensión se aclare.
- Añadir 10 µL de proteasa alcalina “*Alkaline Proteasa Solution*” (Promega) e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 350 µL de solución de neutralización “*Wizard[®] Plus SV Neutralization Solution*” (Promega) y mezclar invirtiendo el *Eppendorf* varias veces.

- Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 minutos.
- Colocar las columnas de purificación del ADN plasmídico “*Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System*” (*Promega*) sobre sus soportes correspondientes.
- Volcar el sobrenadante de la centrifugación (lisado bacteriano, 850 μ L aproximadamente) sobre las columnas de purificación de ADN plasmídico con cuidado de no transferir el *pellet*.
- Centrifugar a 13.000 rpm 1 minuto.
- Retirar la columna de purificación y eliminar el líquido arrastrado en el soporte de la columna.
- Reinsertar la columna en su soporte y añadir 750 μ L de solución de lavado “*Colum Wash Solution*” (*Promega*) previamente diluida con etanol 95%.
- Centrifugar a 13.000 rpm 1 minuto.
- Retirar la columna de purificación y eliminar el líquido arrastrado en el soporte de la columna.
- Reinsertar la columna en su soporte y repetir el lavado con 250 μ L de solución de lavado.
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 2 minutos.
- Transferir la columna a un *Eppendorf* de 1,5 mL limpio.
- Arrastrar el ADN añadiendo 100 μ L de agua libre de nucleasas “*Nuclease-Free Water*” (*Promega*) a la columna y centrifugando a 13.000 rpm 1 minuto.
- Eliminar la columna y guardad el ADN en el *Eppendorf* a -20 °C.

La secuenciación del ADN de los diferentes insertos, se realizó utilizando el kit *BigDye[®] Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)*.

En la PCR de secuenciación se utilizaron los cebadores 341 F y 907 R, 3 μ L de ADN plasmídico como *template* y los reactivos y la rampa de temperaturas de la PCR de secuenciación con el kit *BigDye[®] Terminator v.1.1* descritas en apartados anteriores.

La identificación de los microorganismos y los análisis filogenéticos se realizaron como ha sido descrito previamente.

3.12.8. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN EL CLONAJE

Medio SOC

| Reactivos | Cantidad |
|--|-----------------|
| Triptona de soja, SIGMA | 0,2 g |
| Extracto de levadura, OXOID | 0,5g |
| NaCl para análisis, PANREAC, 1M | 1 mL |
| KCl, purísimo, PANREAC, 1M | 0,25 mL |
| Mg ²⁺ 2M ^(*) | 1 mL |
| Glucosa D(+) anhidra, purísima, 2M (previamente esterilizada por filtros GVWP04700, MILLIPORE) | 1 mL |
| Agua desionizada | Hasta 100 mL |

^(*) Se prepara tal y como se describe en la **Tabla 26**

Se prepara la triptona, el extracto de levadura, el cloruro sódico y el cloruro potásico y se disuelve en el agua. Una vez preparado se esteriliza en autoclave “Autester” (SELECTA) a 1 atmósfera de presión, 121 °C, durante 20 minutos.

Se deja enfriar a 50 °C, y se añade la glucosa y el magnesio en condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar (TELSTAR AV100). Después se filtra por filtros de 0,22 µm de diámetro de poro (GVWP04700, MILLIPORE) y se guarda en nevera a 4 °C.

Tabla 26. Composición del Mg²⁺ 2M.

| Reactivos | Cantidad |
|---|-----------------|
| MgCl ₂ ·6H ₂ O, PANREAC | 20,33 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O, PANREAC | 24,65 g |
| Agua desionizada | Hasta 100 mL |

Esterilizar por filtros GVWP04700, MILLIPORE

▪ **Medio LB**

| Reactivos | Concentración |
|-----------------------------|----------------------|
| Triptona de soja, SIGMA | 10 g·L ⁻¹ |
| Extracto de levadura, OXOID | 5 g·L ⁻¹ |
| NaCl para análisis, PANREAC | 5 g·L ⁻¹ |
| Agua desionizada | Hasta 1000 mL |

Ajustar el pH a 7 con NaOH.

Esterilizar en autoclave “Autester” (SELECTA) a 1 atmósfera de presión, 121 °C, durante 20 minutos. Dejar enfriar y guardar a 4 °C.

▪ **Medio LB/Amp**

Preparar medio LB tal y como se describe previamente. Dejar enfriar a 50 °C y añadir ampicilina (SIGMA) a una concentración final de 100 µg·mL⁻¹ en condiciones de esterilidad y en cabina de flujo laminar (TELSTAR AV100). Guardar a 4 °C.

▪ **Placas de agar de LB/Amp**

Preparar medio LB tal y como se describía anteriormente, añadiendo además 15 g·L⁻¹ de agar (Agar (UPS) purísimo, PANREAC). Esterilizar en autoclave y dejar enfriar a 50 °C antes de añadir la ampicilina a una concentración final de 100 µg·mL⁻¹. Dispensar en placas de Petri en condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar (TELSTAR AV100) y dejar solidificar el agar.

▪ **Placas de agar LB/Amp/IPTG/X-Gal**

Preparar medio LB suplementado con agar, tal y como se describe previamente. Una vez, enfriado a 50 °C, añadir ampicilina a una concentración final de 100 µg·mL⁻¹, IPTG (*Promega*) a una concentración final de 0,5 mM y X-Gal (*Promega*) a una concentración final de 80 µg·mL⁻¹. Dispensar en placas de Petri en condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar (TELSTAR AV100) y dejar solidificar el agar.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL AGUA

La caracterización físico-química del agua del sistema de circulación de la Central Nuclear de Cofrentes, se realizó en los laboratorios que Iberdrola, S.A. posee dentro de la propia Central.

4.1.1. AGUA DE APORTE

Se han realizado análisis del agua de aporte con el fin de conocer los parámetros más representativos para la aplicación de posteriores tratamientos, ya que el agua que se utiliza tiene que presentar unas características adecuadas para el buen funcionamiento de los equipos (**Tabla 27**). Puesto que su procedencia es el embalse de Embarcaderos donde confluyen dos ríos, el Júcar y el Cabriel, la calidad del agua puede variar, aunque la turbidez se mantiene siempre constante ya que sus valores se

reducen a 5 NTU en el efluente de los clarificadores y a 1 NTU a la salida de los filtros Mono-Pack. No obstante, se utilizan unos valores orientativos, que si se desvían significativamente deben ser evaluados con el fin de estimar el posible impacto sobre los sistemas a los que se aporta el agua y las acciones correctoras.

Tabla 27. Parámetros analizados en el agua de aporte y valores de referencia.

| PARÁMETROS | VALORES ORIENTATIVOS | FRECUENCIA DEL ANÁLISIS |
|--|-----------------------------|-------------------------|
| Turbidez (NTU) | $\leq 1,5$ | Diario |
| pH | $\leq 8,2$ | Semanal |
| Calcio (ppm CO_3Ca) | 250-360 | Semanal |
| Dureza total (ppm CO_3Ca) | 350-500 | Semanal |
| Cloruros (ppm Cl^-) | 50-110 | Semanal |
| Cloro residual (ppm Cl_2) | 0,1-0,25 | Diario |
| Conductividad ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) | ≤ 1100 | Semanal |
| Alcalinidades P y M (ppm CO_3Ca) | P ≤ 10 M ≤ 190 | Semanal |
| Isotópico γ | $\leq \text{LID}^{(*)}$ | Mensual |

^(*)LID: Límite inferior de actividad detectable

En la **Figura 24** se muestran las concentraciones de fósforo total, nitratos, sólidos en suspensión y DQO (Demanda Química de Oxígeno) del agua de aporte a la CNC.

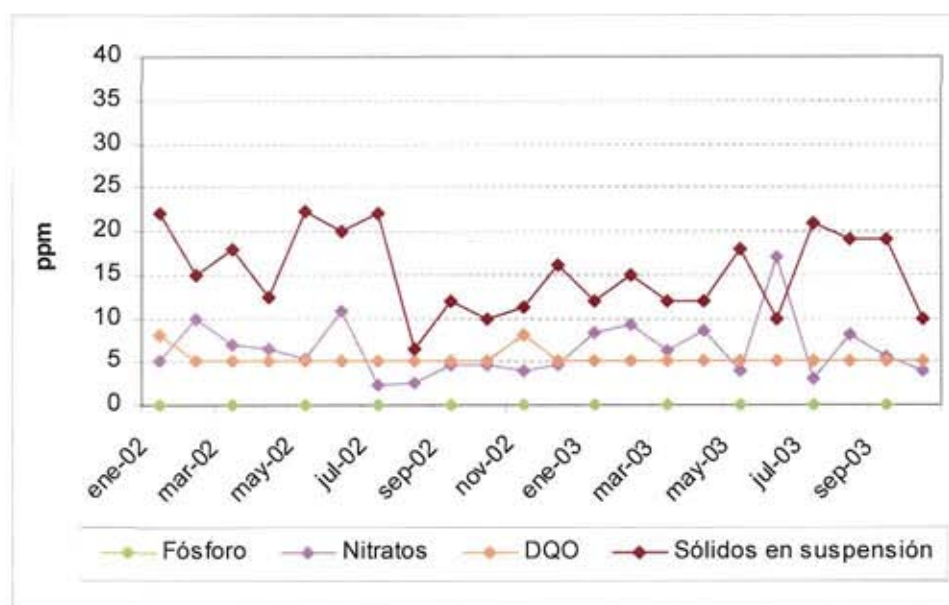


Figura 24. Concentración de fósforo total, nitratos, sólidos en suspensión y DQO del agua de aporte a la CNC.

La DQO se mantuvo constante, alrededor de 5 ppm, durante la duración del estudio; el fósforo total estuvo en torno a 0,02 ppm, los nitratos oscilaron entre 2,5 y 10 ppm y los sólidos en suspensión entre 6,5 y 22 ppm.

La conductividad se mantuvo entre 800 y 1100 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (**Figura 25**) y el pH mostró valores en torno a 8. También se determinaron los cloruros, que variaron entre 50 y 100 ppm, y los sulfatos, que estuvieron entre 200 y 385 ppm, y cuyos valores aparecen en la **Figura 26**.

La temperatura del agua de aporte a la CNC no se determina de forma habitual, aunque se hacen controles cada dos meses del agua del embalse de Embarcaderos cerca de la zona de captación de la Central. Los valores de temperatura de este punto se muestran en la **Tabla 28**.

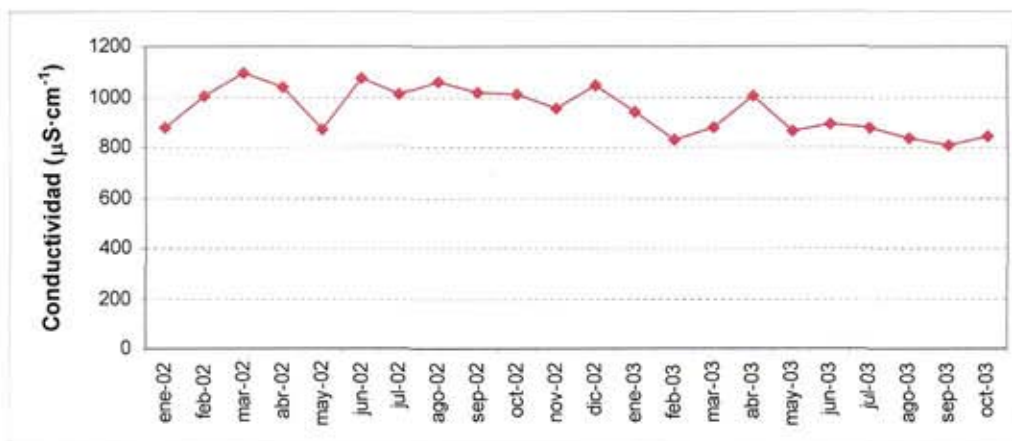


Figura 25. Conductividad del agua de aporte a la CNC.

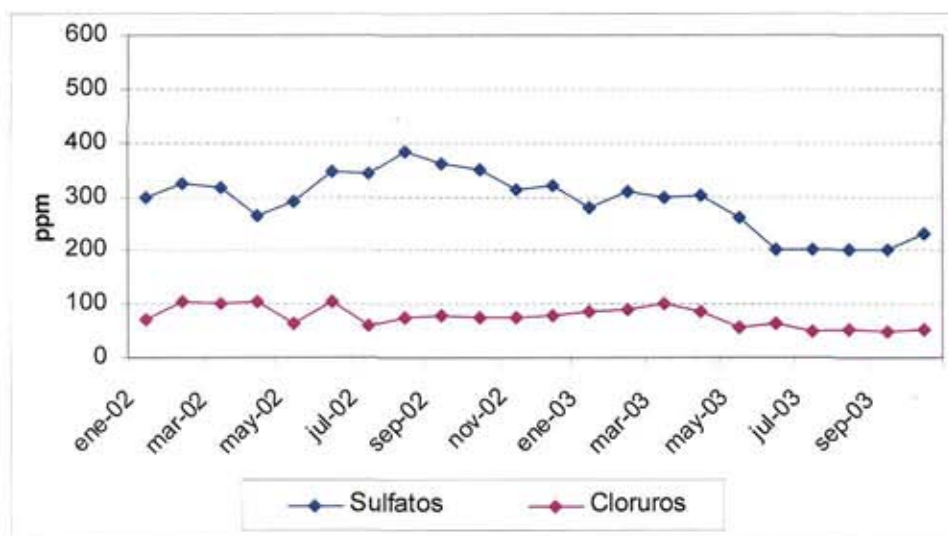


Figura 26. Concentración de sulfatos y cloruros del agua de aporte a la CNC.

Tabla 28. Temperatura del agua del Embalse de Embarcaderos, cerca de la zona de captación de la CNC (°C).

| AÑO | ENERO | MARZO | MAYO | JULIO | SEPTIEMBRE | NOVIEMBRE |
|------------|--------------|--------------|-------------|--------------|-------------------|------------------|
| 2002 | 10,1 | 17,1 | 21,7 | 25,9 | 23,6 | 16,2 |
| 2003 | 10,3 | 14,1 | 22,2 | 22,7 | 22,0 | 14,4 |

4.1.2. AGUA DE VERTIDO

Por otro lado, es necesario controlar y supervisar las características de los vertidos antes de proceder a su liberación al río con el fin de mantener la calidad del agua dentro de los límites establecidos en el Real Decreto 849/1986, de 11 Abril, por el que se aprueba el Reglamento del Dominio Publico Hidráulico (BOE, 1986) (véase **Tabla 29**). Para ello, se realizan una serie de análisis químicos y radioquímicos del agua de las balsas de almacenamiento temporal de vertidos, en los que se certifica la “potabilidad radiológica” acorde con los requisitos exigidos por la Confederación Hidrográfica del Júcar, especificados en el “Reglamento de Vertidos de la Central Nuclear de Cofrentes”, validado por el Consejo de Seguridad Nuclear.

En las balsas de vertidos se analiza la actividad alfa total, beta total y los isótopos gamma Co-60, Cs-134 y Cs-137, Mn-54 y Zn-65. Los valores obtenidos han estado siempre por debajo del Límite inferior de actividad detectable (LID).

Tabla 29. Tabla 3 del Anexo al título IV del Reglamento del Dominio Público Hidráulico. (Real Decreto 849/1986, de 11 Abril, por el que se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico. 30 de Abril 1986, BOE núm. 103)

| PARÁMETRO | VALOR LÍMITE PARA CNC | UNIDAD DE MEDIDA |
|--------------------------|-------------------------------|--------------------|
| pH | 5,5 – 9,5 | — |
| Sólidos en suspensión | 80 | mg·L ⁻¹ |
| Materiales sedimentables | 0,5 | mg·L ⁻¹ |
| Sólidos gruesos | Ausencia | — |
| DBO | 40 | mg·L ⁻¹ |
| DQO | 160 | mg·L ⁻¹ |
| Temperatura | 3 | °C |
| Color* | Inapreciable en solución 1:20 | Escala Pt/Co |
| Aluminio | 1 | mg·L ⁻¹ |
| Arsénico | 0,5 | mg·L ⁻¹ |
| Bario | 20 | mg·L ⁻¹ |
| Boro | 2 | mg·L ⁻¹ |
| Cadmio | 0,1 | mg·L ⁻¹ |
| Cromo III | 2 | mg·L ⁻¹ |
| Cromo IV | 0,2 | mg·L ⁻¹ |
| Hierro | 2 | mg·L ⁻¹ |
| Manganeso | 2 | mg·L ⁻¹ |
| Níquel | 2 | mg·L ⁻¹ |
| Mercurio | 0,05 | mg·L ⁻¹ |
| Plomo | 0,2 | mg·L ⁻¹ |
| Selenio | 0,03 | mg·L ⁻¹ |
| Estaño | 10 | mg·L ⁻¹ |
| Cobre | 0,2 | mg·L ⁻¹ |
| Cinc | 3 | mg·L ⁻¹ |
| Tóxicos metálicos** | 3 | mg·L ⁻¹ |
| Cianuros | 0,5 | mg·L ⁻¹ |
| Cloruros | 2000 | mg·L ⁻¹ |
| Sulfuros | 1 | mg·L ⁻¹ |
| Sulfitos | 1 | mg·L ⁻¹ |
| Sulfatos | 2000 | mg·L ⁻¹ |
| Fluoruros | 6 | mg·L ⁻¹ |
| Fósforo Total | 0,5 | mg·L ⁻¹ |
| Amoníaco | 15 | mg·L ⁻¹ |
| Nitrógeno nítrico | 10 | mg·L ⁻¹ |
| Nitrógeno total | 10 | mg·L ⁻¹ |
| Aceites y grasas | 20 | mg·L ⁻¹ |
| Fenoles | 0,5 | mg·L ⁻¹ |
| Aldehídos | 1 | mg·L ⁻¹ |
| Detergentes*** | 2 | mg·L ⁻¹ |
| Pesticidas**** | 0,05 | mg·L ⁻¹ |

*Medida en escala Pt-Co sobre muestra diluida

**La suma de las fracciones concentración real/límite de los elementos tóxicos (As, Cd, Cr, Ni, Hg, Pb, Se, Cu, Zn) no superará el valor 3

***Concentración expresada en mg·L⁻¹ de laurel-sulfato

****Si los pesticidas fuesen exclusivamente fosforados puede admitirse un valor de 0,1 mg·L⁻¹

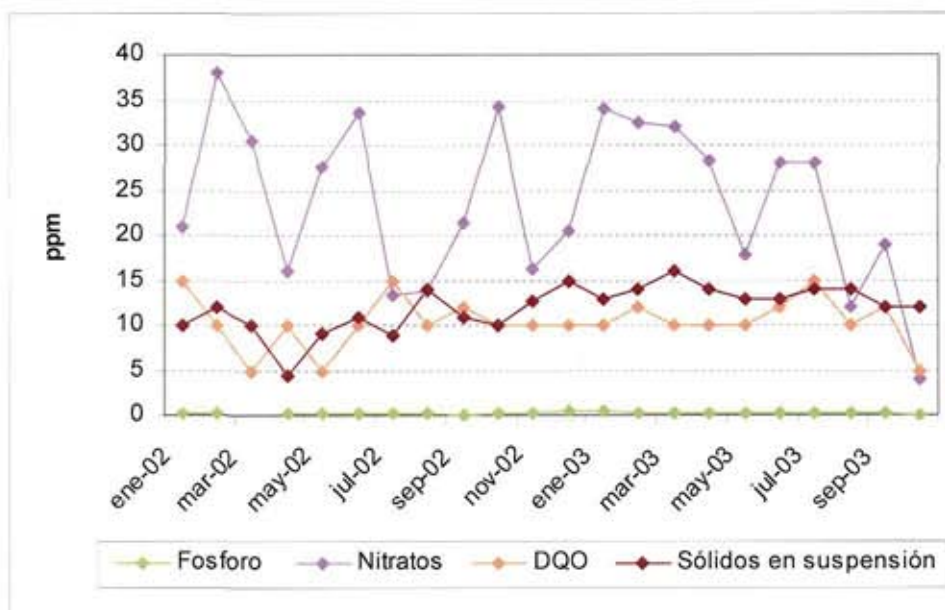


Figura 27. Concentración de fósforo total, nitratos, sólidos en suspensión y DQO del agua de vertidos de la CNC.

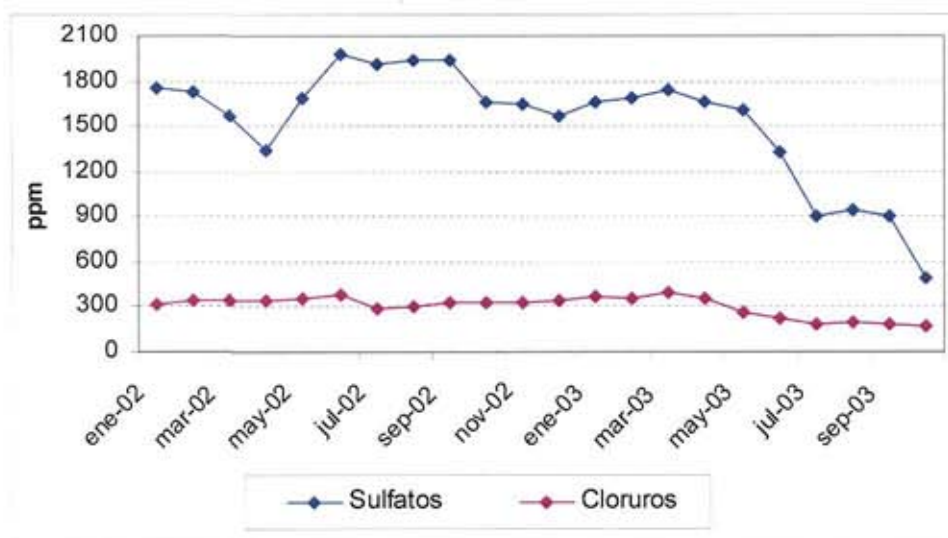


Figura 28. Concentración de sulfatos y cloruros del agua de de vertidos de la CNC.

Resultados

En la **Figura 27** se muestran las concentraciones de fósforo total, nitratos, sólidos en suspensión y DQO medidas de una muestra compuesta de los vertidos del mes de las balsas de almacenamiento temporal.

El fósforo total se mantuvo más o menos constante alrededor de 0,2 ppm, al igual que la DQO, que estuvo en torno a 10-12 ppm, y los sólidos en suspensión que mostraron valores entre 10 y 15 ppm. La concentración de nitratos presentó oscilaciones y se encontraron valores entre 4 y 38 ppm. Los sulfatos variaron entre 490 y 1940 ppm y los cloruros se mantuvieron entre 170 y 400 ppm (**Figura 28**).

Asimismo, se midieron los valores de aluminio, cobre y zinc, cuyos máximos y mínimos se muestran en la **Tabla 30**.

Tabla 30. Concentración de aluminio, cobre y zinc en las balsas de almacenamiento temporal de vertidos.

| ELEMENTO | CONCENTRACIÓN (ppm) |
|-----------------|----------------------------|
| Aluminio | 0,02-0,69 |
| Cobre | 0,002-0,022 |
| Cinc | 0,002-0,034 |

La conductividad del agua de vertidos varió entre 1300 y 3800 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (**Figura 29**) y el pH de las balsas se mantuvo siempre entre 8,3-8,5.

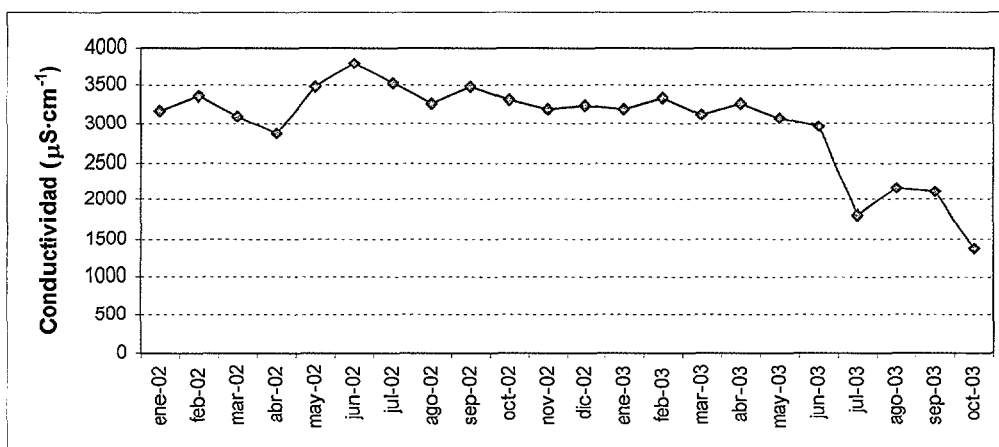


Figura 29. Conductividad del agua de vertidos de la CNC.

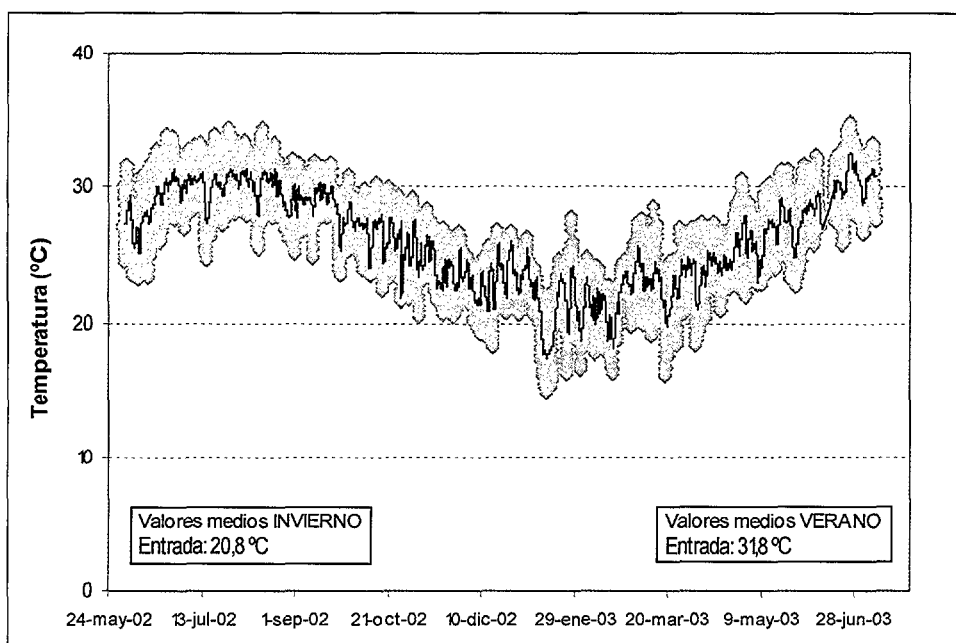


Figura 30. Temperatura del agua a la entrada al condensador de la CNC.

En la **Figura 30** se muestra una gráfica de la temperatura del agua de entrada al condensador, que es la que se purga de las torres de refrigeración y representa más del 98% de toda el agua vertido a las balsas. La temperatura del agua de vertidos puede estar en torno a 2-3 °C por debajo de la media del periodo en que esta en servicio la balsa, debido al tiempo de residencia en la misma.

4.2. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DEL AGUA

4.2.1. MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA

Se empleó esta técnica microscópica para cuantificar los microorganismos presentes en el agua del sistema de circulación de la Central. En primer lugar se utilizó el kit L-7012 (*Live/Dead BacLight™ Bacterial Viability Kit, Molecular Probes*) que permite diferenciar entre células vivas, de color verde, y células muertas, de color rojo. Se utilizaron varios volúmenes de agua y se hicieron diferentes diluciones, y se filtraron a través de filtros de 0,2 µm de diámetro de poro, haciendo o no un prefiltrado de las muestras a través de filtros de 0,8 µm de diámetro de poro, todo ello con el fin de optimizar el sistema de tinción. Asimismo, se utilizaron diferentes concentraciones de fluorocromos (SYTO-9 y Yoduro de Propidio). En ningún caso esta técnica permitió la diferenciación clara entre células vivas y muertas y tampoco fue posible el recuento de microorganismos, probablemente debido a la cantidad de partículas en suspensión que contenía el agua, por lo que estos fluorocromos no resultaron adecuados para analizar el agua del sistema de refrigeración de la Central.

Sin embargo, con el fluorocromo DAPI que tiñe ADN, sí pudo efectuarse el recuento de microorganismos totales en las diferentes muestras de agua. En este caso, y para optimizar el sistema de tinción, también se filtraron diferentes volúmenes de

agua y se hicieron varias diluciones, utilizándose diferentes concentraciones del fluorocromo. Los mejores resultados se obtuvieron filtrando 1 mL de la dilución 1:10 del agua del sistema de circulación y tiñendo el filtro con una solución de DAPI a una concentración de $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

En la **Figura 31** puede observarse la concentración de microorganismos en el agua en los diferentes puntos del sistema de circulación de la Central.

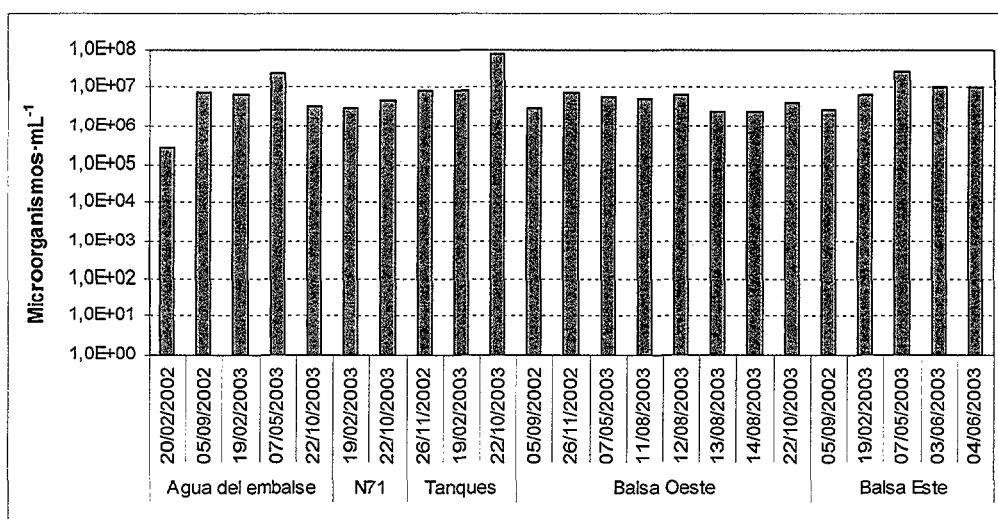


Figura 31. Recuento de microorganismos en los diferentes puntos del sistema de circulación de la CNC por Microscopía de Epifluorescencia con el fluorocromo DAPI.

La Microscopía de Epifluorescencia también permitió la observación de los microorganismos que componen las poblaciones del sistema de circulación de la Central. Pudieron detectarse bacilos y cocos de diferentes tamaños, así como diatomeas de simetría radial y bilateral, estas últimas de aspecto similar a *Navicula* (**Figura 32**). No se detectaron hongos ni levaduras, así como tampoco cianobacterias.

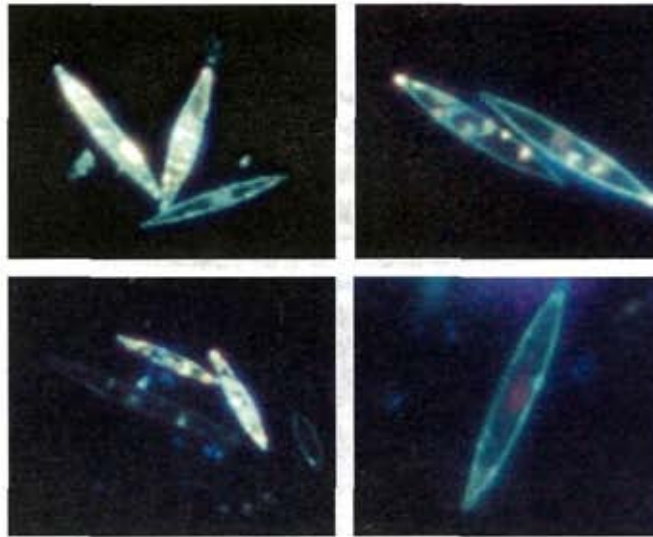


Figura 32. Micrografías de epifluorescencia con el fluorocromo DAPI (x100 Inmersol) mostrando la morfología de diatomeas observadas en las balsas de almacenamiento temporal de vertidos.

La presencia de diatomeas empezó a hacerse patente a partir del muestreo 7, haciéndose recuentos de las mismas desde dicho momento en aquellos puntos de muestreo en los que se encontraron (**Figura 33**).

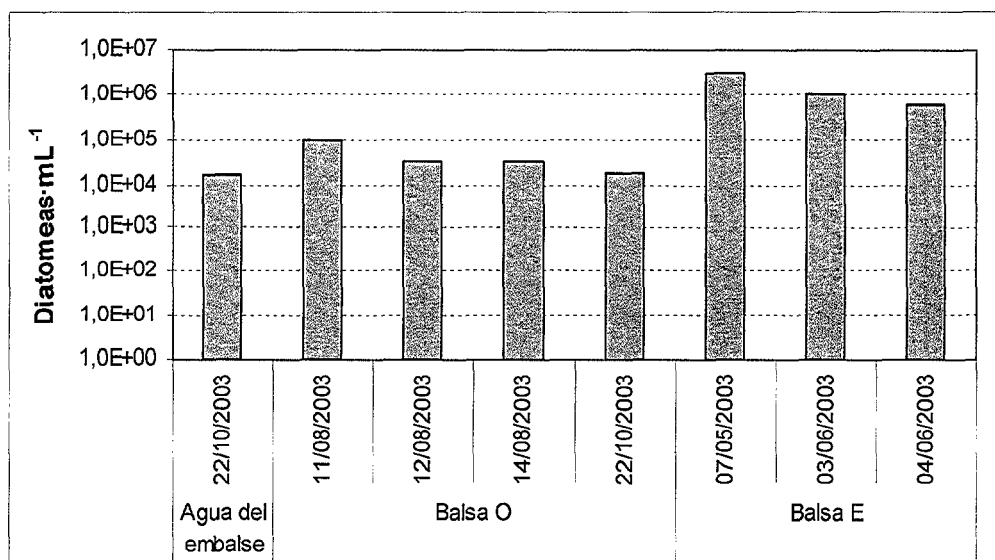


Figura 33. Recuento de diatomeas en diferentes puntos del sistema de circulación de la CNC por Microscopía de Epifluorescencia con el fluorocromo DAPI.

En las muestras que se tomaron del fondo de las balsas de almacenamiento temporal de vertidos el número de diatomeas fue del orden de 10^6 diatomeas por mL de agua y la gran mayoría del tipo *Navicula*. En las muestras de agua de las balsas cuando se encontraban llenas, el número de diatomeas fue menor (10^4 por mL de agua). También se detectaron diatomeas en el agua de aporte a la CNC, pero no en el punto N71 ni en los depósitos de hormigón.

4.2.2. MICROSCOPIA ÓPTICA

Las muestras de agua del sistema de circulación de la Central también se observaron en fresco mediante Microscopía Óptica. Pudieron observarse bacilos y

cocos de diferentes tamaños, así como diatomeas de simetría radial y bilateral, y pequeños fragmentos de algas filamentosas.

En la **Figura 34** se muestran varias micrografías tomadas en contraste de fases de las diatomeas observadas en el agua de las balsas de almacenamiento temporal de vertidos.



Figura 34. Micrografía en contraste de fases de las diatomeas observadas en el agua de las balsas de almacenamiento temporal de vertidos (x100 Inmersol).

En el muestreo 3 MW (Abril de 2002), se recogieron muestras de algas de la superficie de las balsas de almacenamiento temporal de vertidos. Estas algas se examinaron en el microscopio en campo oscuro y por contraste de fases y se identificaron de *visu* como *Cladophora glomerata* y *Oedogonium pringsheimii*. En las **Figuras 35** y **36** puede observarse la morfología de los filamentos de ambas algas.



Figura 35. Micrografía en campo oscuro de las algas observadas en las balsas de almacenamiento temporal de vertidos (x10 aumentos).
A: *Oedogonium pringsheimii*, B: *Cladophora glomerata*.

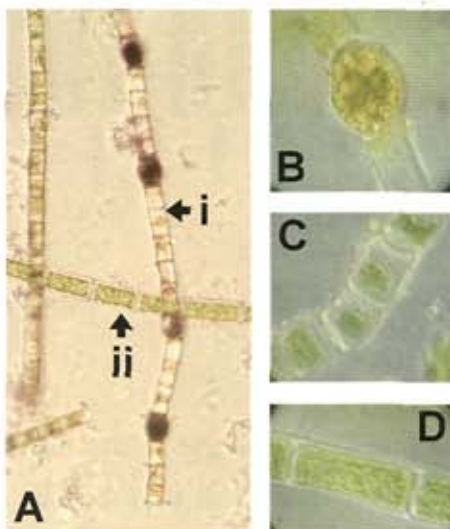


Figura 36. Micrografía en contraste de fases de las algas observadas en las balsas de almacenamiento temporal de vertidos.
A: i *Oedogonium pringsheimii*, ii *Cladophora glomerata* (x10 aumentos); B: Detalle de un oogonio de *O. pringsheimii* (x100 Inmersol); C: Detalle de un filamento de *O. pringsheimii* (x100 Inmersol); D: Detalle de un filamento de *C. glomerata* (x100 Inmersol).

4.3. RECUENTO DE MICROORGANISMOS CULTIVABLES

Para conocer la cantidad de microorganismos cultivables del agua de los diferentes puntos del sistema de circulación de la CNC, se hicieron diluciones seriadas en agua desionizada estéril y se sembraron alícuotas de 100 μL en placas de TSA por duplicado. Posteriormente, se hicieron también recuentos en STC y R2A.

En la **Figura 37** se muestran las $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ de agua que crecieron sobre los distintos medios de cultivo a lo largo del desarrollo del estudio.

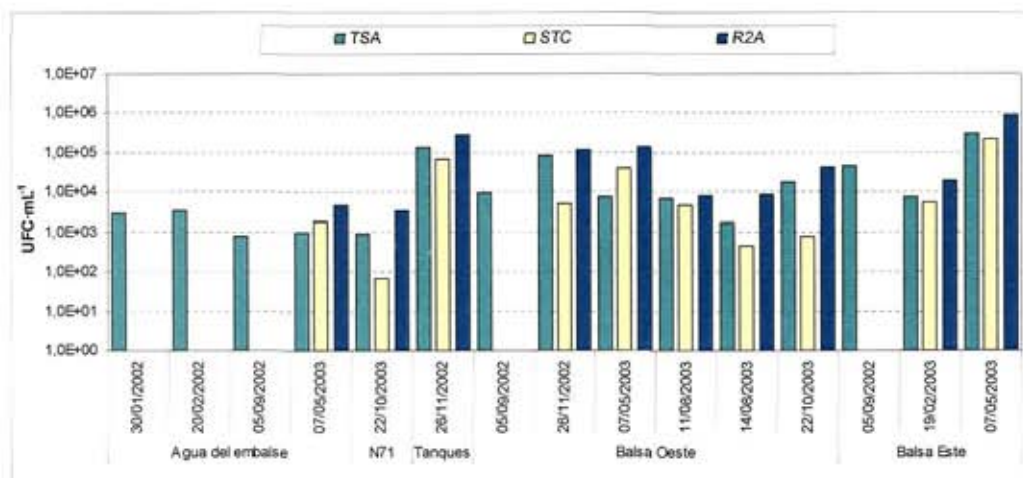


Figura 37. Recuento de microorganismos cultivables en los diferentes puntos de muestreo del sistema de circulación de la CNC.

Al analizar los diferentes puntos de muestreo, se observó que el agua del río, que abastece a la Central, se mantuvo más o menos constante a lo largo de todo el estudio, con una cantidad de 10^3 - 10^4 microorganismos cultivables por mL de agua. En

el punto N71 y en los tanques de hormigón, solamente se hicieron recuentos de cultivables en una ocasión, mostrando valores de 10^3 y 10^5 microorganismos por mL de agua, respectivamente. Respecto a las balsas de almacenamiento temporal de vertidos, la Balsa Este mostró mayor número de microorganismos cultivables por mL cuando estaba vacía (10^5 - 10^6) que en servicio (10^4 - 10^5). La Balsa Oeste, por su parte, presentó los valores más altos cuando estaba en servicio (10^5 microorganismos cultivables por mL de agua). En ambas balsas, los recuentos mayores se dieron durante el mes de Mayo.

4.4. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CULTIVABLES

Como se comentó en el Apartado 3.5, de Materiales y Métodos, se siguieron dos procedimientos para el aislamiento de los microorganismos cultivables del agua. Por un lado, la filtración de un volumen de agua por filtros de 0,45 y 0,22 μm de diámetro de poro y la incubación de estos filtros en diferentes medios de cultivo y, por otro, la dilución de las muestras de agua y la siembra en varios medios de cultivo. Hasta el muestreo 4MW se utilizaron filtros, pero debido a que el aislamiento de las bacterias resultó más complicado de esta manera, a partir del muestreo 5 MW se procedió al aislamiento de las mismas mediante la técnica de dilución y siembra en placa.

En ambos casos, las colonias aisladas se purificaron por resiembra en el mismo medio de cultivo de partida. Se utilizó TSA, que es un medio general, STC, que facilita el aislamiento de actinomicetos, y R2A, que es un medio oligotrófico, para aislar la mayor cantidad de microorganismos diferentes. De todas las colonias aisladas, se extrajo el ADN y se realizó una caracterización mediante PCR-DGGE,

seleccionándose aquellos microorganismos que presentaron diferente patrón bandas en el gel de electroforesis para su posterior secuenciación e identificación. También se secuenciaron microorganismos con el mismo patrón de bandas con el fin de comprobar la validez de la DGGE como técnica de “*screening*”.

En los filtros de 0,45 μm y 0,22 μm crecieron los mismos tipos de UFC, no apreciándose diferencias entre ellos.

La nomenclatura utilizada para la identificación de las bacterias aisladas fue el nombre del muestreo seguido de un número indicando el orden de aislamiento de la colonia. Por ejemplo, 4.1 MW-12 es la colonia n° 12 aislada en el muestreo 4 MW del agua de aporte a la CNC (punto de muestreo n° 1).

4.4.1. AGUA DE APORTE

El aislamiento e identificación de los microorganismos se efectuó en dos ocasiones. Las colonias aisladas en cada medio de cultivo figuran en la **Tabla 31**.

En el muestreo 4 MW, tres de las bacterias que se aislaron del agua de aporte no crecieron en la resiembra para su purificación, por lo que resultó imposible su procesamiento posterior y en el muestreo 7 MW, sucedió lo mismo con dos de los microorganismos.

Tabla 31. UFC aisladas en el agua de aporte a la CNC sobre los diferentes medios de cultivo utilizados en el estudio.

| Muestreo | Medio de Cultivo | Muestra |
|----------------------|------------------|-----------|
| 4 MW (05/09/2002) | TSA | 4.1 MW-1 |
| | | 4.1 MW-2 |
| | | 4.1 MW-3 |
| | | 4.1 MW-4 |
| | | 4.1 MW-5 |
| | | 4.1 MW-6 |
| | | 4.1 MW-7 |
| | | 4.1 MW-8 |
| | | 4.1 MW-9 |
| | | 4.1 MW-10 |
| | STC | 4.1 MW-11 |
| | | 4.1 MW-12 |
| | | 4.1 MW-13 |
| | | 4.1 MW-14 |
| | | 4.1 MW-15 |
| | | 4.1 MW-16 |
| | | 4.1 MW-17 |
| | R2A | 4.1 MW-18 |
| | | 4.1 MW-19 |
| | | 4.1 MW-20 |
| | | 4.1 MW-21 |
| 7 MW (07/05/2003) | TSA | 7.1 MW-1 |
| | | 7.1 MW-2 |
| | | 7.1 MW-3 |
| | | 7.1 MW-4 |
| | | 7.1 MW-5 |
| | | 7.1 MW-6 |
| | | 7.1 MW-7 |
| | R2A | 7.1 MW-8 |
| | | 7.1 MW-9 |
| | | 7.1 MW-10 |
| | STC | 7.1 MW-11 |
| | | 7.1 MW-12 |
| | | 7.1 MW-13 |
| | | 7.1 MW-14 |

Se realizó una PCR de todas ellas, y las que dieron amplificación positiva se analizaron mediante DGGE. En la **Figura 38** pueden observarse los patrones de bandas de algunos microorganismos aislados en estos dos muestreos.

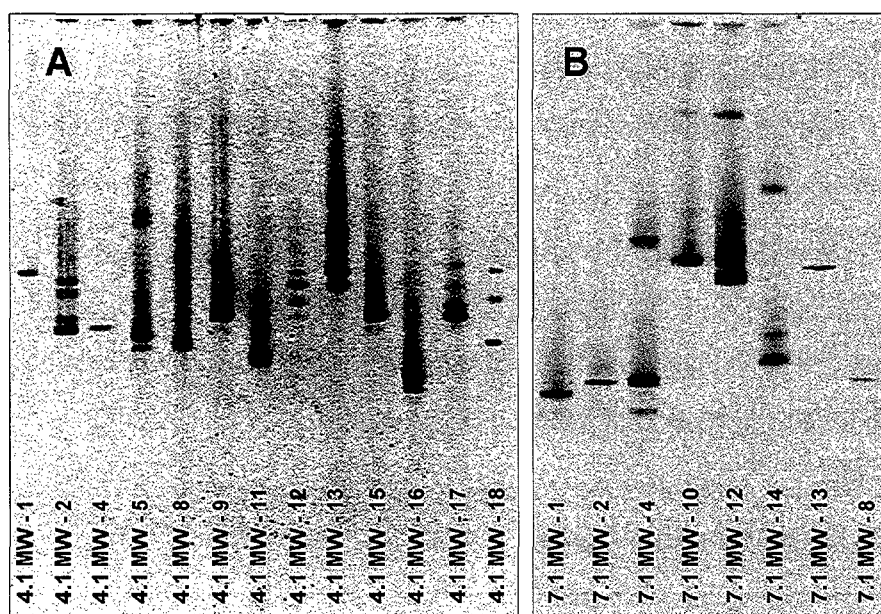


Figura 38. Geles de DGGE mostrando los patrones de bandas de algunos microorganismos aislados del agua de aporte a la CNC en los muestreos 4 MW (A) y 7MW (B).

En el muestreo 4 MW se identificaron 12 microorganismos diferentes, mientras que en el muestreo 7 MW solo fueron 8.

En las **Tablas 32** y **33** se presentan los microorganismos secuenciados, con los porcentajes de homología de los más próximos depositados en el NCBI y su número de acceso correspondiente.

Tabla 32. Microorganismos identificados en el agua de aporte en el muestreo 4 MW.

| Muestras | Microorganismo | Nº acceso NCBI | % Homología |
|----------------------------------|--|----------------|-------------|
| 4.1 MW-1 | NI | — | — |
| 4.1 MW-2 | <i>Bacillus mojavenis</i> | AY436360 | 99% |
| 4.1 MW-3, 4.1 MW-6, 4.1 MW-10 | <i>Aeromonas culicicola</i> | AY130992 | 99% |
| 4.1 MW-4 | <i>Aeromonas veronii</i> | AF418211 | 99% |
| 4.1 MW-5 | <i>Stenotrophomonas</i> sp | AJ002814 | 100% |
| 4.1 MW-8 | <i>Bacillus</i> sp | AY028328 | 100% |
| 4.1 MW-9 | <i>Bacillus macroides</i> | X70312 | 99% |
| 4.1 MW-11 | <i>Unidentified β-proteobacterium</i> | AB013258 | 96% |
| 4.1 MW-12 | <i>Pseudomonas</i> sp | AF408929 | 100% |
| 4.1 MW-13,4.1 MW-14 | <i>Bacillus endophiticus</i> | AF295302 | 100% |
| 4.1 MW-15 | <i>Bacillus</i> sp | AF128875 | 100% |
| 4.1 MW-16 | <i>Rhodococcus rhodochrous</i> | AF439261 | 100% |
| 4.1 MW-17 | <i>Glacial ice bacterium</i> | AF479360 | 100% |
| 4.1 MW-18 | NI | — | — |
| 4.1 MW-20 | NI | — | — |

NI: No Identificado

En el muestreo 4 MW se identificaron 5 bacterias diferentes del género *Bacillus*. En el gel de DGGE (Figura 38, A) puede observarse que los patrones de bandas de las 5 son diferentes, a pesar de que hay dos *Bacillus* sp con un porcentaje de homología de 100%, pero se trata de dos cepas diferentes puesto que corresponden a dos microorganismos con distinto número de acceso en el NCBI. Las muestras 4.1 MW-13 y 4.1 MW-14 presentaron el mismo patrón de bandas y al ser secuenciadas

originaron secuencias idénticas. Lo mismo sucedió con las muestras 4.1 MW-3, 4.1 MW-6 y 4.1 MW-10.

Tabla 33. Microorganismos identificados en el agua de aporte en el muestreo 7 MW.

| Muestras | Microorganismo | N° acceso NCBI | % Homología |
|--------------------|--|----------------|-------------|
| 7.1 MW-1 | <i>Deinococcus sp</i> | AB022911 | 99% |
| 7.1 MW-2, 7.1 MW-8 | <i>Agrobacterium sp</i> | AF482682 | 98% |
| 7.1 MW-3 | NI | — | — |
| 7.1 MW-4 | <i>Curtobacterium citreum</i> | X77436 | 99% |
| 7.1 MW-5 | NI | — | — |
| 7.1 MW-9 | <i>Unidentified bacterium</i> | Y11465 | 99% |
| 7.1 MW-10 | <i>Flavobacterium limicola</i> | AB075231 | 97% |
| 7.1 MW-11 | NI | — | — |
| 7.1 MW-12 | <i>Uncultured Bacteroidetes</i> | AJ318181 | 95% |
| 7.1 MW-13 | <i>Pseudomonas sp</i> | AY275480 | 100% |
| 7.1 MW-14 | <i>Uncultured β-proteobacterium</i> | AF431218 | 99% |

NI: No Identificado

En el muestreo 7 MW, sólo el género *Pseudomonas* aparece en común con el muestreo 4 MW. En la DGGE (**Figura 38, B**) puede observarse que hay dos muestras con patrones de bandas idénticos (7.1 MW-2 y 7.1 MW-8) que al ser secuenciadas dieron lugar al mismo microorganismo.

4.4.2. PUNTO N71

En este punto del sistema de circulación, se efectuó el aislamiento de las colonias sobre medio de cultivo en un solo muestreo, aislándose 33 UFC (**Tabla 34**).

Tabla 34. UFC aisladas en el agua del punto N71 sobre los diferentes medios de cultivo utilizados en el estudio.

| Muestreo | Medio de Cultivo | Muestra |
|-------------------------|------------------|------------|
| 14.2 MW (22/10/2003) | TSA | 14.2 MW-1 |
| | | 14.2 MW-2 |
| | | 14.2 MW-3 |
| | | 14.2 MW-4 |
| | | 14.2 MW-5 |
| | | 14.2 MW-6 |
| | | 14.2 MW-7 |
| | | 14.2 MW-8 |
| | | 14.2 MW-9 |
| | | 14.2 MW-10 |
| | | 14.2 MW-11 |
| | | 14.2 MW-12 |
| | | 14.2 MW-13 |
| | | 14.2 MW-14 |
| | | 14.2 MW-15 |
| | | 14.2 MW-16 |
| | | 14.2 MW-17 |
| | | 14.2 MW-18 |
| | | 14.2 MW-19 |
| | 14.2 MW-20 | |
| | STC | 14.2 MW-21 |
| | | 14.2 MW-22 |
| | | 14.2 MW-23 |
| | | 14.2 MW-24 |
| | | 14.2 MW-25 |
| | R2A | 14.2 MW-26 |
| | | 14.2 MW-27 |
| | | 14.2 MW-28 |
| | | 14.2 MW-29 |
| | | 14.2 MW-30 |
| | | 14.2 MW-31 |
| | | 14.2 MW-32 |
| | | 14.2 MW-33 |

Tres no consiguieron recuperarse de las placas de cultivo y dos no pudieron amplificarse mediante PCR. Del resto se obtuvieron 18 patrones de bandas diferentes mediante caracterización por PCR-DGGE. En la **Figura 39** pueden observarse dos DGGE realizadas con algunos de los microorganismos aislados en este punto.

La secuenciación del ADN de las bacterias aisladas y su comparación con las bases de datos depositadas en el NCBI facilitó su identificación, tal y como se indica en la **Tabla 35**.

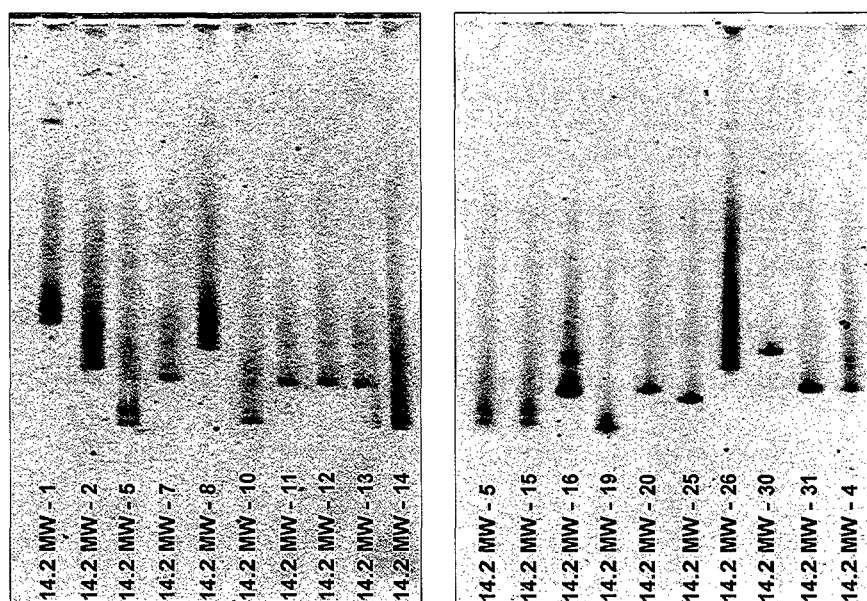


Figura 39. Geles de DGGE mostrando los patrones de bandas de algunos microorganismos aislados en el punto de muestreo N71.

Como se desprende de la **Figura 39**, la muestra 14.2 MW-16 presenta un patrón de bandas que parece diferente de 14.2 MW-20 y 14.2 MW-31 (14.2 MW-16 presenta un par de bandas adicional), pero sin embargo al analizar las secuencias (**Tabla 35**) se pudo comprobar que corresponden al mismo microorganismo. Por otro lado, 14.2 MW-10 y 14.2 MW-28 que presentaron un patrón de bandas diferente de los anteriores fueron identificados también como *Bacillus* sp, aunque con un porcentaje de homología del 100% con un microorganismo de diferente número de acceso. Respecto de los dos *Bacillus indicus* identificados (el grupo de 14.2 MW-5 y 14.2 MW-19), tanto las secuencias como los patrones de bandas de la DGGE muestran que se trata de bacterias distintas.

La muestra 14.2 MW-21, aunque presenta un porcentaje de homología del 99% con el mismo *Deinococcus* sp (AB022911) que las muestras 14.2 MW-6, 14.2 MW-22, 14.2 MW-23 y 14.2 MW-24, al comparar sus secuencias entre sí se observó que eran diferentes, como también lo mostraba el gel de DGGE.

Las muestras 14.2 MW-32 y 14.2 MW-33 corresponden a dos cepas de *Blastomonas natatoria* distintas, como lo demostró su patrón de bandas en el gel de DGGE y posterior secuenciación de su material genético.

En este punto, los microorganismos aislados con mayor frecuencia pertenecieron a los de los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Deinococcus*.

Tabla 35. Microorganismos identificados en el agua del punto de muestreo N71.

| Muestras | Microorganismo | Nº acceso NCBI | % Homología |
|--|-----------------------------------|----------------|-------------|
| 14.2 MW-1 | <i>Staphylococcus hominis</i> | AJ514249 | 99% |
| 14.2 MW-2 | <i>Brevibacillus</i> sp | AY397774 | 97% |
| 14.2 MW-4 | <i>Brevibacillus borstelensis</i> | D78456 | 96% |
| 14.2 MW-5, 14.2 MW-14, 14.2 MW-15 | <i>Bacillus indicus</i> | AJ583158 | 99% |
| 14.2 MW-6, 14.2 MW-22, 14.2 MW-23, 14.2 MW-24 | <i>Deinococcus</i> sp | AB022911 | 99% |
| 14.2 MW-7, 14.2 M-11, 14.2 MW-12, 14.2 MW-13 | <i>Deinococcus</i> sp | AB022911 | 98% |
| 14.2 MW-8 | <i>Brevibacillus</i> sp | AF228763 | 99% |
| 14.2 MW-10, 14.2 MW-28 | <i>Bacillus</i> sp | AF492843 | 100% |
| 14.2 MW-16 | <i>Bacillus</i> sp | AF414443 | 99% |
| 14.2 MW-18 | <i>Hydrogenophaga defluvii</i> | AJ585993 | 98% |
| 14.2 MW-19 | <i>Bacillus indicus</i> | AJ583158 | 98% |
| 14.2 MW-20, 14.2 MW-31 | <i>Bacillus</i> sp | AF414443 | 99% |
| 14.2 MW-21 | <i>Deinococcus</i> sp | AB022911 | 99% |
| 14.2 MW-25 | <i>Deinococcus</i> sp | AJ585237 | 99% |
| 14.2 MW-26 | <i>Brevibacillus reuszeri</i> | D78464 | 98% |
| 14.2 MW-30 | <i>Sphingomonas ursincola</i> | AB024289 | 99% |
| 14.2 MW-32 | <i>Blastomonas natatoria</i> | Y13774 | 99% |
| 14.2 MW-33 | <i>Blastomonas natatoria</i> | Y13774 | 98% |

4.4.3. Balsa Oeste

Se tomaron muestras de agua de la Balsa Oeste (N74-AA001) en 8 de los muestreos realizados durante el estudio. El aislamiento e identificación de los microorganismos cultivables se efectuó en 6 ocasiones ya que los muestreos 10 MW, 11 MW, 12 MW y 13 MW se realizaron en días sucesivos y la carga de trabajo solo permitió hacer los aislamientos en dos de ellos.

Uno de los muestreos coincidió con la balsa casi vacía (muestreo 4 MW), mientras que en el resto de los muestreos la balsa estaba llenándose.

En la **Tabla 36** se presentan las UFC aisladas en diferentes medios de cultivo en cada uno de los muestreos realizados en la Balsa Oeste.

En todas las muestras de las que pudieron recuperarse los cultivos puros, se extrajo el material genético y se efectuó la caracterización mediante PCR-DGGE, observándose los patrones de bandas que permitieron seleccionar aquellos microorganismos diferentes para su secuenciación. Algunos ejemplos de los geles de DGGE de cada muestreo se muestran en las **Figuras 40 y 41**.

Tabla 36 (I). UFC aisladas en el agua de la Balsa Oeste sobre los diferentes medios de cultivo utilizados en el estudio.

| Muestreo | Medio de Cultivo | Muestra |
|----------------------|------------------|-----------|
| 4 MW (05/09/2002) | TSA | 4.3 MW-1 |
| | | 4.3 MW-2 |
| | | 4.3 MW-3 |
| | | 4.3 MW-4 |
| | | 4.3 MW-5 |
| | | 4.3 MW-6 |
| | | 4.3 MW-7 |
| | STC | 4.3 MW-8 |
| | | 4.3 MW-9 |
| | | 4.3 MW-10 |
| | R2A | 4.3 MW-11 |
| | | 4.3 MW-12 |
| | | 4.3 MW-13 |
| | | 4.3 MW-14 |
| | | 4.3 MW-15 |
| 5 MW (26/11/2002) | TSA | 5.5 MW-1 |
| | | 5.5 MW-2 |
| | | 5.5 MW-3 |
| | | 5.5 MW-4 |
| | | 5.5 MW-5 |
| | | 5.5 MW-6 |
| | | 5.5 MW-7 |
| | | 5.5 MW-8 |
| | STC | 5.5 MW-9 |
| | | 5.5 MW-10 |
| | | 5.5 MW-11 |
| | R2A | 5.5 MW-12 |
| | | 5.5 MW-13 |
| | | 5.5 MW-14 |
| | | 5.5 MW-15 |
| | | 5.5 MW-16 |

Tabla 36 (II). UFC aisladas en el agua de la Balsa Oeste sobre los diferentes medios de cultivo utilizados en el estudio.

| Muestreo | Medio de Cultivo | Muestra |
|-----------------------|------------------|------------|
| 7 MW (07/05/2003) | TSA | 7.5 MW-1 |
| | | 7.5 MW-2 |
| | | 7.5 MW-3 |
| | | 7.5 MW-4 |
| | | 7.5 MW-5 |
| | | 7.5 MW-6 |
| | R2A | 7.5 MW-7 |
| | | 7.5 MW-8 |
| | | 7.5 MW-9 |
| | | 7.5 MW-10 |
| | STC | 7.5 MW-11 |
| | | 7.5 MW-12 |
| | | 7.5 MW-13 |
| | | 7.5 MW-14 |
| 14 MW (22/10/2003) | TSA | 14.5 MW-1 |
| | | 14.5 MW-2 |
| | | 14.5 MW-3 |
| | | 14.5 MW-4 |
| | | 14.5 MW-5 |
| | | 14.5 MW-6 |
| | | 14.5 MW-7 |
| | | 14.5 MW-8 |
| | | 14.5 MW-9 |
| | | 14.5 MW-10 |
| | | 14.5 MW-11 |
| | | 14.5 MW-12 |
| | | 14.5 MW-13 |
| | | 14.5 MW-14 |
| | 14.5 MW-15 | |
| | 14.5 MW-16 | |
| | 14.5 MW-17 | |
| | STC | 14.5 MW-18 |
| | | 14.5 MW-19 |
| | | 14.5 MW-20 |
| | | 14.5 MW-21 |
| | | 14.5 MW-22 |
| | | 14.5 MW-23 |
| | R2A | 14.5 MW-24 |
| | | 14.5 MW-25 |
| | | 14.5 MW-26 |
| | | 14.5 MW-27 |
| | | 14.5 MW-28 |
| | | 14.5 MW-29 |
| | | 14.5 MW-30 |
| | 14.5 MW-31 | |

Tabla 36 (III). UFC aisladas en el agua de la Balsa Oeste sobre los diferentes medios de cultivo utilizados en el estudio.

| Muestreo | Medio de Cultivo | Muestra |
|-----------------------|------------------|------------|
| 10 MW (11/08/2003) | TSA | 10.5 MW-1 |
| | | 10.5 MW-2 |
| | | 10.5 MW-3 |
| | | 10.5 MW-4 |
| | | 10.5 MW-5 |
| | | 10.5 MW-6 |
| | | 10.5 MW-7 |
| | | 10.5 MW-8 |
| | STC | 10.5 MW-9 |
| | | 10.5 MW-10 |
| | | 10.5 MW-11 |
| | | 10.5 MW-12 |
| | R2A | 10.5 MW-13 |
| | | 10.5 MW-14 |
| | | 10.5 MW-15 |
| | | 10.5 MW-16 |
| | | 10.5 MW-17 |
| | | 10.5 MW-18 |
| | | 10.5 MW-19 |
| | | 10.5 MW-20 |
| 13 MW (14/08/2003) | TSA | 13.5 MW-1 |
| | | 13.5 MW-2 |
| | | 13.5 MW-3 |
| | | 13.5 MW-4 |
| | | 13.5 MW-5 |
| | | 13.5 MW-6 |
| | | 13.5 MW-7 |
| | | 13.5 MW-8 |
| | STC | 13.5 MW-9 |
| | | 13.5 MW-10 |
| | | 13.5 MW-11 |
| | | 13.5 MW-12 |
| | | 13.5 MW-13 |
| | | 13.5 MW-14 |
| | R2A | 13.5 MW-15 |
| | | 13.5 MW-16 |
| | | 13.5 MW-17 |
| | | 13.5 MW-18 |
| | | 13.5 MW-19 |
| | | 13.5 MW-20 |
| | | 13.5 MW-21 |
| | | 13.5 MW-22 |
| | | 13.5 MW-23 |

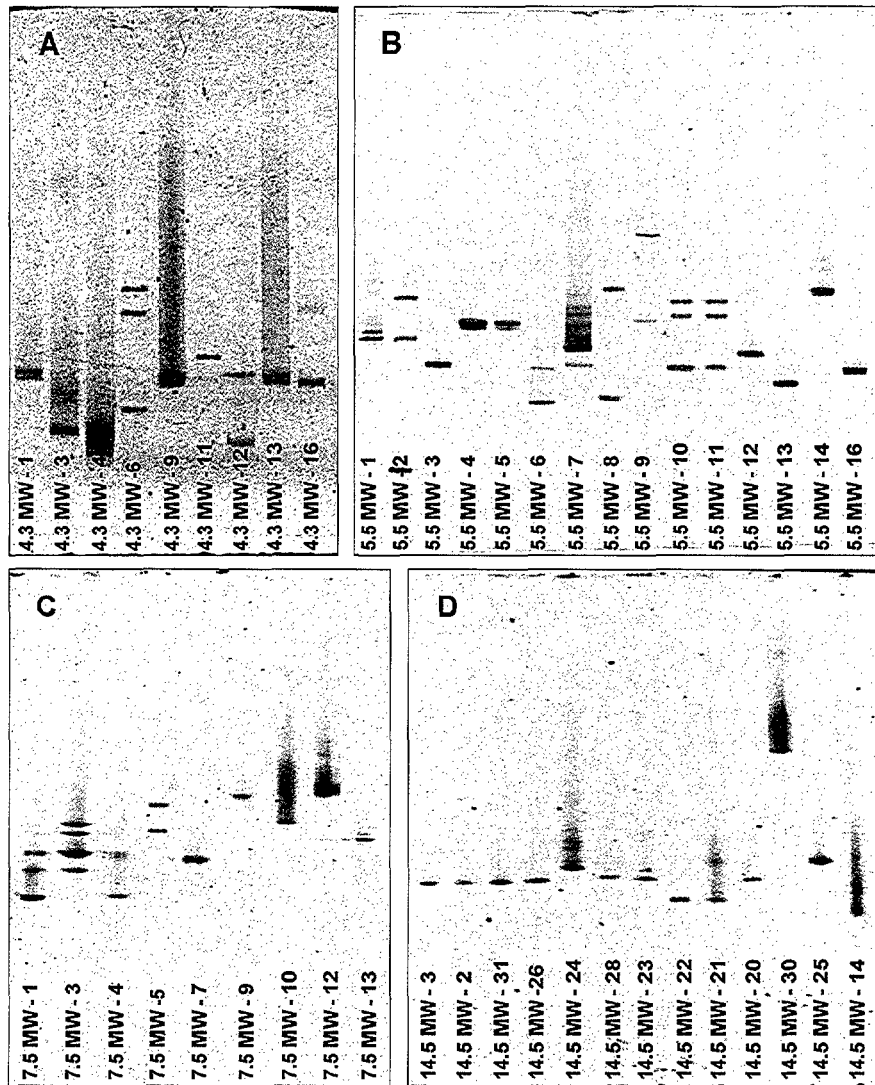


Figura 40. Geles de DGGE mostrando los patrones de bandas de algunos microorganismos aislados en la Balsa Oeste en los muestreos 4 MW (A), 5 MW (B), 7MW (C) y 14 MW (D).

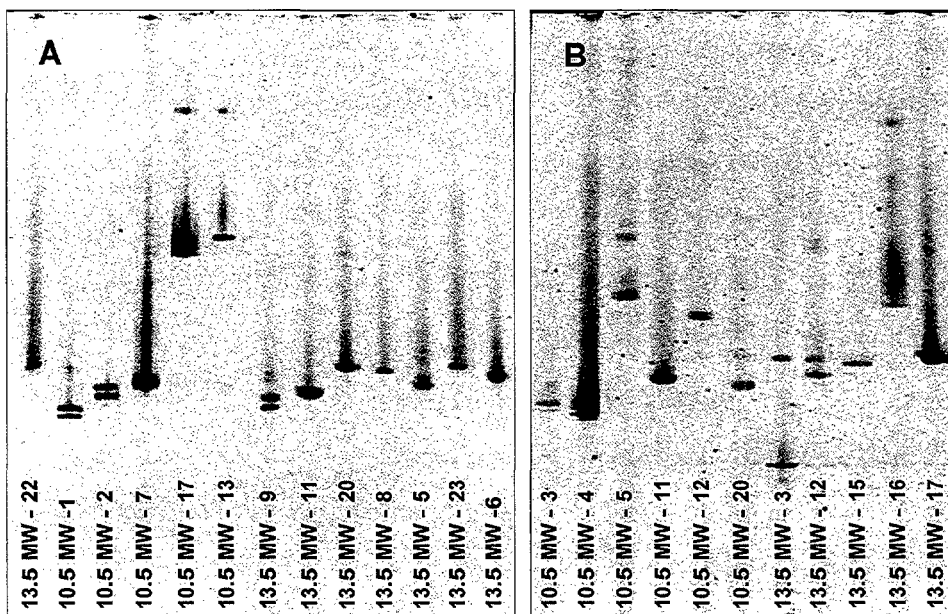


Figura 41. Geles de DGGE mostrando los patrones de bandas de algunos microorganismos aislados en la Balsa Oeste en los muestreos 10 MW y 13 MW.

Las secuencias obtenidas de las distintas muestras microbianas fueron comparadas con todas las depositadas en las bases de datos del NCBI para la identificación de las mismas. En las siguientes **Tablas (37-42)** se muestran los nombres y los números de acceso de los microorganismos que presentaron mayor porcentaje de homología con los que se fueron secuenciados en cada muestreo.

Los 16 microorganismos que se aislaron en el muestreo 5 MW pudieron caracterizarse mediante PCR-DGGE. Todos fueron secuenciados, incluida la muestra 5.5 MW-8 pero la secuencia obtenida fue muy ambigua por lo que no pudo ser identificada.

Tabla 37. Microorganismos identificados en el agua de la Balsa Oeste en el muestreo 5 MW.

| Muestras | Microorganismo | Nº acceso NCBI | % Homología |
|----------------------|--|----------------|-------------|
| 5.5 MW-1 | <i>Sphingomonas sp</i> | X94098 | 100% |
| 5.5 MW-2 | <i>Pseudomonas sp</i> | AF521652 | 98% |
| 5.5 MW-3 | <i>Uncultured β Proteobacterium</i> | AF445688 | 99% |
| 5.5 MW-4 | <i>Acidovorax sp</i> | AY093698 | 99% |
| 5.5 MW-5 | <i>Acidovorax sp</i> | AF235010 | 99% |
| 5.5 MW-6 | <i>Deinococcus sp</i> | AB022911 | 98% |
| 5.5 MW-7 | <i>Bacillus licheniformis</i> | X68416 | 99% |
| 5.5 MW-8 | NI | – | – |
| 5.5 MW-9 | <i>Pseudomonas putida</i> | AY297752 | 99% |
| 5.5 MW-10, 5.5 MW-11 | <i>Hydrogenophaga defluvii</i> | AJ585993 | 100% |
| 5.5 MW-12 | <i>Novoshingobium hassiacum</i> | AJ416411 | 99% |
| 5.5 MW-13 | <i>Paracoccus sp</i> | AB025188 | 95% |
| 5.5 MW-14 | <i>Uncultured Bacteroidetes</i> | AJ318181 | 94% |
| 5.5 MW-15 | <i>Pseudomonas putida</i> | AY308050 | 99% |
| 5.5 MW-16 | <i>Hydrogenophaga defluvii</i> | AJ585993 | 98% |

NI: No Identificado

Las muestras 5.5 MW-10 y 5.5 MW-11, identificadas como *Hydrogenophaga defluvii* presentan idéntico patrón de bandas en el gel de DGGE, mientras que la muestra 5.5 MW-16 es algo diferente y como consecuencia de ello el porcentaje de homología con dicho microorganismo es algo menor.

Aunque aparecen dos muestras identificadas como *Acidovorax* sp, y dos como *Pseudomonas putida*, al comparar las secuencias de nucleótidos se comprobó que no se trataba del mismo microorganismo. En el caso de *Acidovorax* sp el patrón de bandas es bastante similar (muestras 5.5 MW-4 y 5.5 MW-5), pero en el de *Pseudomonas putida* el patrón de bandas es distinto.

Tabla 38. Microorganismos identificados en el agua de la Balsa Oeste en el muestreo 7 MW.

| Muestras | Microorganismo | Nº acceso NCBI | % Homología |
|-----------|-------------------------------------|----------------|-------------|
| 7.5 MW-1 | <i>Deinococcus</i> sp | AB022911 | 98% |
| 7.5 MW-3 | <i>Bacillus</i> sp | AB017591 | 100 % |
| 7.5 MW-4 | <i>Deinococcus</i> sp | AB022911 | 99% |
| 7.5 MW-5 | <i>Shewanella</i> sp | AB111109 | 99% |
| 7.5 MW-6 | NI | — | — |
| 7.5 MW-7 | <i>Novosphingobium subterraneum</i> | AB025014 | 98% |
| 7.5 MW-8 | NI | — | — |
| 7.5 MW-9 | <i>Pseudomonas alcaligenes</i> | AF094721 | 99% |
| 7.5 MW-10 | <i>Hongiella mannitolivorans</i> | AY264838 | 95% |
| 7.5 MW-11 | <i>Pseudomonas</i> sp | AJ272546 | 99% |
| 7.5 MW-12 | <i>Uncultured Bacteroidetes</i> | AJ318181 | 95% |
| 7.5 MW-13 | <i>Sphingomonas</i> sp | X94098 | 100% |

NI: No Identificado

En el muestreo 7 MW, solo pudieron caracterizarse 12 microorganismos mediante PCR-DGGE. Las muestras 7.5 MW-2 y 7.5 MW-14 no pudieron recuperarse en los medios de cultivo para la extracción de su material genético y las muestras 7.5

MW-6 y 7.5 MW-8 proporcionaron secuencias imposibles de identificar por ser muy ambiguas.

En total se identificaron 10 bacterias diferentes. Las muestras 7.5 MW-1 y 7.5 MW-4, identificadas como *Deinococcus* sp y con el mismo número de acceso presentan ligeras diferencias en la secuencia de nucleótidos, y en la DGGE puede observarse que el patrón de bandas es también distinto.

Tabla 39. Microorganismos identificados en el agua de la Balsa Oeste en el muestreo 10 MW.

| Muestras | Microorganismo | Nº acceso NCBI | % Homología |
|------------|--------------------------------------|----------------|-------------|
| 10.5 MW-1 | NI | — | — |
| 10.5 MW-2 | <i>Exiguobacterium</i> sp | AJ518821 | 100% |
| 10.5 MW-3 | <i>Aeromonas veronii</i> | AF418211 | 100% |
| 10.5 MW-4 | <i>Exiguobacterium acetylicum</i> | AY297792 | 99% |
| 10.5 MW-5 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> | AJ628163 | 100% |
| 10.5 MW-6 | NI | — | — |
| 10.5 MW-7 | <i>Bacillus</i> sp | AF169519 | 93% |
| 10.5 MW-11 | <i>Pseudomonas</i> sp | AJ617689 | 99% |
| 10.5 MW-12 | γ <i>Proteobacterium</i> | AF541930 | 97% |
| 10.5 MW-13 | <i>Bacteroidetes bacterium</i> | AJ622887 | 95% |
| 10.5 MW-15 | NI | — | — |
| 10.5 MW-17 | <i>Bacteroidetes bacterium</i> | AJ622887 | 94% |
| 10.5 MW-20 | <i>Rahnella</i> sp | AB030924 | 99% |

NI: No Identificado

Los muestreos 10 MW y 13 MW corresponden a muestras de agua de la Balsa Oeste tomadas con tres días de diferencia y por tanto a diferentes alturas de llenado.

Resultados

Como puede observarse en las **Tablas 39 y 40**, en ambos muestreos está presente el género *Pseudomonas*. Las muestras 10.5 MW-11 y 13.5 MW-11 presentan un 99% de homología con el mismo microorganismo y al comparar sus secuencias de nucleótidos con el programa *ClustalX* se observó que sólo diferían en dos bases. También aparecen en común *Bacteroidetes bacterium* (siendo 10.5 MW-13 y 13.5 MW-13 idénticas) y γ *Proteobacterium*.

Tabla 40. Microorganismos identificados en el agua de la Balsa Oeste en el muestreo 13 MW.

| Muestras | Microorganismo | Nº acceso NCBI | % Homología |
|---------------------------------------|------------------------------------|----------------|-------------|
| 13.5 MW-1, 13.5 MW-14 | <i>Pseudomonas</i> sp | AY394845 | 100% |
| 13.5 MW-5 | <i>Brevibacillus borstelensis</i> | AY373322 | 98% |
| 13.5 MW-6 | β <i>Proteobacterium</i> | AY299334 | 96% |
| 13.5 MW-7, 13.5 MW-15 | <i>Sphingomonas</i> sp | AF128870 | 99% |
| 13.5 MW-8 | <i>Brevibacillus</i> sp | AJ438305 | 99% |
| 13.5 MW-9 | <i>Vogesella indigofera</i> | AB021385 | 96% |
| 13.5 MW-10 | <i>Uncultured bacterium</i> | AJ307938 | 100% |
| 13.5 MW-11 | <i>Pseudomonas</i> sp | AJ617689 | 99% |
| 13.5 MW-12 | <i>Stenotrophomonas maltophila</i> | AJ518813 | 98% |
| 13.5 MW-13 | <i>Bacteroidetes bacterium</i> | AJ622887 | 93% |
| 13.5 MW-16 | <i>Hongiella mannitolivorans</i> | AY264838 | 95% |
| 13.5 MW-17 | <i>Pseudoxanthomonas</i> sp | AY124375 | 100% |
| 13.5 MW-18 | <i>Comamonadaceae bacterium</i> | AJ505858 | 99% |
| 13.5 MW-19, 13.5 MW-22, 13.5 MW-23 | <i>Brevibacillus reuszeri</i> | AB112715 | 99% |
| 13.5 MW-20 | <i>Dechloromonas</i> sp | AJ318917 | 97% |
| 13.5 MW-21 | γ <i>Proteobacterium</i> | AY077611 | 98% |

Los microorganismos aislados en el muestreo 10 MW, no pudieron ser procesados hasta 4 días después. Se mantuvieron en las placas de cultivo a temperatura ambiente en el Laboratorio de Química de la Central hasta que se llevaron al Laboratorio de Biodeterioro de la UPM. Allí, se hicieron resiembras para su purificación, pero fue imposible recuperar 7 de los microorganismos que se aislaron. En total, se identificaron 10 bacterias diferentes, tal y como se muestra en la **Tabla 39**. Aparecen dos bacterias identificadas como *Bacteroidetes bacterium* aunque con distinto porcentaje de homología y como puede observarse en el gel de DGGE sus patrones de bandas son también diferentes.

En el muestreo 13 MW dos de los microorganismos aislados no pudieron caracterizarse mediante PCR-DGGE por problemas durante la amplificación del material genético. Las muestras 13.5 MW-22 y 13.5 MW-23, que presentaron la misma movilidad en la DGGE dieron también secuencias idénticas. Sin embargo, las muestras 13.5 MW-5 y 13.5 MW-8, que también son del género *Brevibacillus*, presentan diferente patrón de bandas y corresponden a especies distintas. Al comparar la secuencia de 13.5 MW-3 con todas aquellas depositadas en el NCBI, solo se encontró homología con 22 bases que coinciden exactamente con el *primer* 5 F. Por ello se pasó a comparar esta secuencia con las depositadas en las diferentes bases de datos del EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*). Con la base de datos de *Procarionotas* se encontró una homología del 63,54% con una cianobacteria, *Thermosynechococcus elongatus* (AP005375).

En el muestreo 14 MW, se identificaron 16 microorganismos diferentes. Los géneros *Hydrogenophaga*, *Bacillus* y *Deinococcus* fueron los más frecuentes.

Resultados

Tabla 41. Microorganismos identificados en el agua de la Balsa Oeste en el muestreo 14 MW.

| Muestras | Microorganismo | Nº acceso NCBI | % Homología |
|--|--------------------------------------|----------------|-------------|
| 14.5 MW-2, 14.5 MW-3, 14.5 MW-5, 14.5 MW-11, 14.5 MW-12, 14.5 MW-26, 14.5 MW-31 | <i>Hydrogenophaga defluvii</i> | AJ585993 | 98% |
| 14.5 MW-4 | <i>Vogesella indigofera</i> | AB021385 | 95% |
| 14.5 MW-6, 14.5 MW-14 | <i>Bacillus indicus</i> | AJ583158 | 100% |
| 14.5 MW-8, 14.5 MW-15 | <i>Bacillus</i> sp | AF414443 | 99% |
| 14.5 MW-9 | <i>Deinococcus grandis</i> | AY424359 | 100% |
| 14.5 MW-10 | <i>Brevibacillus</i> sp | AY397774 | 97% |
| 14.5 MW-13 | <i>Shewanella</i> sp | AB111109 | 100% |
| 14.5 MW-16 | <i>Acidovorax</i> sp | AY463206 | 100% |
| 14.5 MW-17 | <i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i> | AF078768 | 99% |
| 14.5 MW-18 | <i>Bacillus cereus</i> | AF526899 | 98% |
| 14.5 MW-19 | NI | — | — |
| 14.5 MW-20, 14.5 MW-28 | <i>Deinococcus</i> sp | AB022911 | 99% |
| 14.5 MW-21, 14.5 MW-22 | <i>Deinococcus grandis</i> | AY424359 | 95% |
| 14.5 MW-23 | <i>Deinococcus</i> sp | AB022911 | 99% |
| 14.5 MW-24 | <i>Brevibacillus invocatus</i> | AB112718 | 97% |
| 14.5 MW-25 | <i>Pseudoxantomonas</i> sp | AY124375 | 99% |
| 14.5 MW-27 | NI | — | — |
| 14.5 MW-30 | <i>Antartic bacterium</i> | AJ440977 | 98% |

NI: No Identificado

En la **Figura 40 (D)** se puede comprobar que los patrones de bandas de 14.5 MW-2, 14.5 MW-3, 14.5 MW-26 y 14.5 MW-31 son idénticos y corresponden a la misma bacteria. Las muestras 14.5 MW-20 y 14.5 MW-28, que tienen el mismo patrón de bandas en la DGGE, corresponden al mismo microorganismo, pero la muestra 14.5 MW-23, que aparece también con un 99% de homología con el mismo *Deinococcus* que las anteriores, presenta ciertas diferencias en la secuencia de nucleótidos y se puede observar en el gel que el patrón de bandas no es el mismo. Por otro lado, las muestras 14.5 MW-21 y 14.5 MW-22, que parecen tener diferente patrón de bandas en la DGGE representan al mismo microorganismo.

Tabla 42. Microorganismos identificados en el agua de la Balsa Oeste en el muestreo 4 MW.

| Muestras | Microorganismo | Nº acceso NCBI | % Homología |
|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------|-------------|
| 4.3 MW-1 | <i>Aeromonas sp</i> | AB064357 | 99% |
| 4.3 MW-2, 4.3 MW-5, 4.3 MW-7 | <i>Aeromonas culicicola</i> | AY130992 | 99% |
| 4.3 MW-3, 4.3 MW-11, 4.3 MW-14 | <i>Paenibacillus alvei</i> | AJ320491 | 99% |
| 4.3 MW-4 | <i>Exiguobacterium acetylicum</i> | AY297792 | 100% |
| 4.3 MW-6 | <i>Pseudomonas nitroreducens</i> | AY297786 | 99% |
| 4.3 MW-9, 4.3 MW-13 | <i>Bacillus thuringiensis</i> | AY138290 | 99% |
| 4.3 MW-12 | <i>Exiguobacterium acetylicum</i> | AY297792 | 99% |
| 4.3 MW-16 | <i>Shewanella sp</i> | AB111109 | 98% |

En el muestreo 4 MW, dos de las colonias aisladas en STC y una en R2A no pudieron identificarse debido a que no crecieron en sendos medios de cultivo en la resiembra para su purificación y extracción del ADN.

Como ya se ha mencionado, en este muestreo la Balsa Oeste estaba vacía. Se identificaron 8 microorganismos diferentes. Si se comparan los géneros aislados en este muestreo con los que aparecen cuando la balsa estaba en servicio puede observarse que *Paenibacillus* es el único que aparece solo cuando la balsa está vacía. El resto de géneros aislados aparecen también cuando la balsa está llena.

4.4.4. Balsa Este

En la Balsa Este (N74-AA002) se efectuó el aislamiento e identificación de los microorganismos cultivables en 5 de los muestreos. Dos de ellos (muestreo 4 MW y 7 MW) coincidieron con el mismo tipo de caracterización en la Balsa Oeste, estando ambas en distinto modo de operación, de forma que en el muestreo 4 MW, la Balsa Oeste estaba vacía y la Balsa Este llena y en el muestreo 7 MW, la Balsa Oeste estaba llena y la Balsa Este vacía.

Las UFC aisladas en cada uno de los muestreos se presentan en la **Tabla 43** y la identificación de aquellos microorganismos en los que fue posible la amplificación del material genético en las **Tablas 44-48**.

Tabla 43 (I). UFC aisladas en el agua de la Balsa Este sobre los diferentes medios de cultivo utilizados en el estudio.

| Muestreo | Medio de Cultivo | Muestra |
|----------------------|------------------|-----------|
| 4 MW (05/09/2002) | TSA | 4.5 MW-1 |
| | | 4.5 MW-2 |
| | | 4.5 MW-3 |
| | | 4.5 MW-4 |
| | | 4.5 MW-9 |
| | | 4.5 MW-10 |
| | | 4.5 MW-11 |
| | | 4.5 MW-12 |
| | STC | 4.5 MM-5 |
| | | 4.5 MW-6 |
| | R2A | 4.5 MW-7 |
| | | 4.5 MW-8 |
| 6 MW (19/02/2003) | TSA | 6.5 MW-1 |
| | | 6.5 MW-2 |
| | | 6.5 MW-3 |
| | | 6.5 MW-4 |
| | | 6.5 MW-5 |
| | | 6.5 MW-6 |
| | | 6.5 MW-7 |
| | | 6.5 MW-8 |
| | | 6.5 MW-9 |
| | R2A | 6.5 MW-10 |
| | | 6.5 MW-11 |
| | | 6.5 MW-12 |
| | | 6.5 MW-13 |
| | | 6.5 MW-14 |
| | | 6.5 MW-15 |
| | | 6.5 MW-16 |
| | STC | 6.5 MW-17 |
| | | 6.5 MW-18 |
| | | 6.5 MW-19 |
| | | 6.5 MW-20 |
| | | 6.5 MW-21 |
| | | 6.5 MW-22 |
| | | 6.5 MW-23 |

Tabla 43 (II). UFC aisladas en el agua de la Balsa Este sobre los diferentes medios de cultivo utilizados en el estudio.

| Muestreo | Medio de Cultivo | Muestra |
|----------------------|------------------|-----------|
| 7 MW (07/05/2003) | TSA | 7.3 MW-1 |
| | | 7.3 MW-2 |
| | | 7.3 MW-3 |
| | | 7.3 MW-4 |
| | | 7.3 MW-5 |
| | | 7.3 MW-6 |
| | | 7.3 MW-7 |
| | R2A | 7.3 MW-8 |
| | | 7.3 MW-9 |
| | | 7.3 MW-10 |
| | | 7.3 MW-11 |
| | | 7.3 MW-12 |
| | STC | 7.3 MW-13 |
| | | 7.3 MW-14 |
| | | 7.3 MW-15 |
| | | 7.3 MW-16 |
| 8 MW (03/06/2003) | TSA | 8.3 MM-1 |
| | | 8.3 MW-2 |
| | | 8.3 MW-3 |
| | | 8.3 MW-4 |
| | | 8.3 MW-5 |
| | | 8.3 MW-6 |
| | | 8.3 MW-7 |
| | R2A | 8.3 MW-8 |
| | | 8.3 MW-9 |
| | | 8.3 MW-10 |
| | | 8.3 MW-11 |
| | | 8.3 MW-12 |
| | | 8.3 MW-13 |
| | STC | 8.3 MW-14 |
| | | 8.3 MW-15 |
| | | 8.3 MW-16 |
| | | 8.3 MW-17 |
| | | 8.3 MW-18 |

Tabla 43 (III). UFC aisladas en el agua de la Balsa Este sobre los diferentes medios de cultivo utilizados en el estudio.

| Muestreo | Medio de Cultivo | Muestra |
|----------------------|------------------|-----------|
| 9 MW (04/06/2003) | TSA | 9.3 MW-1 |
| | | 9.3 MW-2 |
| | | 9.3 MW-3 |
| | | 9.3 MW-4 |
| | | 9.3 MW-5 |
| | | 9.3 MW-6 |
| | | 9.3 MW-7 |
| | | 9.3 MW-8 |
| | | 9.3 MW-9 |
| | R2A | 9.3 MW-10 |
| | | 9.3 MW-11 |
| | | 9.3 MW-12 |
| | | 9.3 MW-13 |
| | | 9.3 MW-14 |
| | | 9.3 MW-15 |
| | | 9.3 MW-16 |
| | | 9.3 MW-17 |
| | STC | 9.3 MW-18 |
| | | 9.3 MW-19 |
| | | 9.3 MW-20 |
| | | 9.3 MW-21 |

En cada muestreo se efectuaron las DGGEs correspondientes, utilizadas para seleccionar a aquellos microorganismos con diferente patrón de bandas para su posterior secuenciación e identificación. Algunos ejemplos de los geles de DGGE efectuados en este punto de muestreo aparecen en la **Figura 42**.

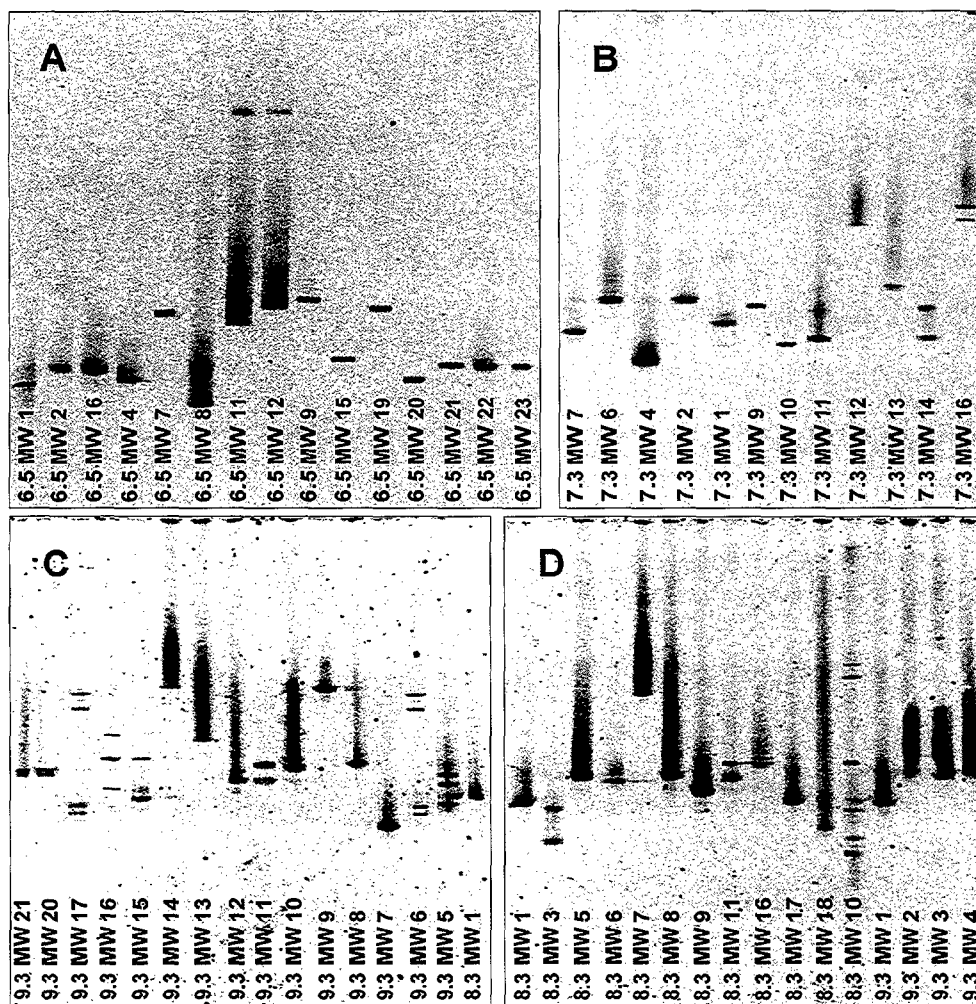


Figura 42. Geles de DGGE mostrando los patrones de bandas de algunos microorganismos aislados en la Balsa Este en los muestreos 6 MW (A), 7MW (B), 8MW y 9 MW (C y D).

En el muestreo 4 MW se utilizaron filtros para el aislamiento e identificación de los microorganismos cultivables. Esto ocasionó problemas de crecimiento en masa sobre el filtro, resultando muy difícil aislar colonias puras. Por ello, aunque se hicieron

sucesivas resiembras solo se identificaron 4 microorganismos diferentes en la Balsa Este.

Tabla 44. Microorganismos identificados en el agua de la Balsa Este en el muestreo 4 MW.

| Muestras | Microorganismo | Nº acceso NCBI | % Homología |
|----------------------------------|-----------------------------|----------------|-------------|
| 4.5 MW-1 | <i>Klebsiella</i> sp | AY363386 | 100% |
| 4.5 MW-2, 4.5 MW-9, 4.5 MW-10 | <i>Aeromonas culicicola</i> | AY130992 | 99% |
| 4.5 MW-3, 4.5 MW-7, 4.5 MW-11 | <i>Bacillus cereus</i> | AJ586344 | 100% |
| 4.5 MW-4, 4.5 MW-5, 4.5 MW-8 | <i>Bacillus cereus</i> | AE017013 | 100% |

En el muestreo 6 MW, se procesaron todas las muestras a excepción de la 6.5 MW-3, que dió problemas durante la amplificación por PCR. De los 22 microorganismos que se analizaron mediante DGGE se obtuvieron patrones de bandas diferentes, que fueron secuenciados e identificados (**Tabla 45**). Los microorganismos más frecuentes fueron los del género *Acidovorax*. Como puede observarse en el gel de DGGE los miembros que presentaron el mismo patrón de bandas dieron lugar a secuencias idénticas.

La muestra 6.5 MW-8 que presenta distinto patrón de bandas en la DGGE que la 6.5 MW-4 y 6.5 MW-17, tiene también diferente secuencia de nucleótidos a pesar de que al ser comparadas con las bases de datos del NCBI dan el mismo porcentaje de homología con el mismo *Deinococcus*. Lo mismo sucede con las muestras 6.5 MW-15 y 6.5 MW-20, que tienen distinto patrón de bandas y sus secuencias también son diferentes.

Tabla 45. Microorganismos identificados en el agua de la Balsa Este en el muestreo 6 MW.

| Muestras | Microorganismo | N° acceso NCBI | % Homología |
|---|--|----------------|-------------|
| 6.5 MW-1 | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | AF406666 | 99% |
| 6.5 MW-2, 6.5 MW-14, 6.5 MW-16, 6.5 MW-21, 6.5 MW-22, 6.5 MW-23 | <i>Acidovorax</i> sp | AY463206 | 100% |
| 6.5 MW-3 | NI | — | — |
| 6.5 MW-4, 6.5 MW-17 | <i>Deinococcus</i> sp | AB022911 | 99% |
| 6.5 MW-5, 6.5 MW-6 | <i>Uncultured β Proteobacterium</i> | AJ582191 | 100% |
| 6.5 MW-7, 6.5 MW-13 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | AY162139 | 100% |
| 6.5 MW-8 | <i>Deinococcus</i> sp | AB022911 | 99% |
| 6.5 MW-9 | <i>Flavobacterium</i> sp | AF493646 | 93% |
| 6.5 MW-10 | <i>Acidovorax</i> sp | AY093698 | 100% |
| 6.5 MW-11 | <i>Flexibacter flexilis</i> | AB078054 | 85% |
| 6.5 MW-12 | <i>Flavobacterium</i> sp | AF493641 | 99% |
| 6.5 MW-15 | γ <i>Proteobacterium</i> | AF542077 | 100% |
| 6.5 MW-18 | <i>Bacillus</i> sp | AY461699 | 100% |
| 6.5 MW-19 | <i>Pseudomonas</i> sp | AY259121 | 99% |
| 6.5 MW-20 | γ <i>Proteobacterium</i> | AF542077 | 100% |

NI: No Identificado

En la Balsa Este durante el muestreo 7 MW no pudieron caracterizarse mediante PCR-DGGE tres de los microorganismos que se aislaron por problemas en la amplificación del material genético. Del resto de microorganismos, se obtuvieron 12

secuencias diferentes (Tabla 46), siendo las más frecuentes las de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Deinococcus*.

Tabla 46. Microorganismos identificados en el agua de la Balsa Este en el muestreo 7 MW.

| Muestras | Microorganismo | N° acceso NCBI | % Homología |
|----------------------|--------------------------------|----------------|-------------|
| 7.3 MW-1 | <i>Deinococcus</i> sp | AB022911 | 99% |
| 7.3 MW-2 | <i>Pseudomonas</i> sp | AF015487 | 99% |
| 7.3 MW-3 | NI | — | — |
| 7.3 MW-4 | <i>Exiguobacterium</i> sp | AJ518821 | 100 % |
| 7.3 MW-5 | NI | — | — |
| 7.3 MW-6 | <i>Bacillus cereus</i> | AJ508706 | 99% |
| 7.3 MW-7 | <i>Bacillus</i> sp | AB017591 | 100% |
| 7.3 MW-8 | NI | — | — |
| 7.3 MW-9 | <i>Unidentified bacterium</i> | Z93973 | 99% |
| 7.3 MW-10 | <i>Bacillus</i> sp | X86600 | 98% |
| 7.3 MW-11, 7.3 MW-14 | <i>Deinococcus</i> sp | AB022911 | 98% |
| 7.3 MW-12 | <i>Uncultured Cytophagales</i> | AY136073 | 100% |
| 7.3 MW-13 | <i>Bacillus</i> sp | AY124766 | 100% |
| 7.3 MW-15 | <i>Pseudomonas alcaligenes</i> | AF094721 | 99% |
| 7.3 MW-16 | <i>Flavobacterium limicola</i> | AB075231 | 97% |

NI: No Identificado

Tabla 47. Microorganismos identificados en el agua de la Balsa Este en el muestreo 8 MW.

| Muestras | Microorganismo | Nº acceso NCBI | % Homología |
|-----------------------------------|--------------------------------------|----------------|-------------|
| 8.3 MW-1, 8.3 MW-15 | <i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i> | AF078768 | 99% |
| 8.3 MW-3, 8.3 MW-12, 8.3 MW-13 | <i>Microbacteriaceae bacterium</i> | AY504472 | 98% |
| 8.3 MW-4 | NI | — | — |
| 8.3 MW-5 | <i>Bacillus cereus</i> | AJ577275 | 100% |
| 8.3 MW-6, 8.3 MW-11 | <i>Rhizobium</i> sp | AJ294417 | 100% |
| 8.3 MW-7 | <i>Bacteroidetes bacterium</i> | AJ622887 | 91% |
| 8.3 MW-8 | <i>Bacillus</i> sp | AY124766 | 100% |
| 8.3 MW-9 | <i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i> | AF078768 | 98% |
| 8.3 MW-10 | <i>Aeromonas veronii</i> | AF418213 | 99% |
| 8.3 MW-16 | <i>Sphingomonas</i> sp | X94098 | 100% |
| 8.3 MW-17 | <i>Hydrogenophaga defluvii</i> | AJ585993 | 98% |
| 8.3 MW-18 | <i>Bacillus ehimensis</i> | AY116666 | 100% |

NI: No Identificado

En el muestreo 8 MW una de las colonias aisladas en TSA y otra en STC no pudieron identificarse debido a que no crecieron en sendos medios de cultivo en la resiembra para su purificación y extracción del ADN. Lo mismo sucedió en el muestreo 9 MW con las muestras 9.3 MW-18 y 9.3 MW-19.

Estos dos muestreos (8 MW y 9 MW) corresponden a muestras de agua de la Balsa Este cuando estaba vacía tomadas en dos días sucesivos. Así, varios microorganismos como *Bacillus cereus*, *Bacillus* sp, *Hydrogenophaga defluvii* y un *Bacteroidetes bacterium*, aparecen en ambos puntos con idéntico patrón de bandas en la DGGE. También aparecen en común miembros del género *Aeromonas*, aunque no de la misma especie. Sin embargo, algunos microorganismos aislados en el muestreo 8 MW, como *Rhizobium* y *Sphingomonas*, no aparecen en el 9 MW y otros que sí aparecen en el muestreo 9 MW (*Brevibacillus*, *Exiguobacterium*, *Vibrio* y *Hongiella*) no se han aislado el día anterior.

Las muestras 8.3 MW-6 y 8.3 MW-11, cuyo patrón de bandas en el gel de DGGE parece diferente, corresponden al mismo microorganismo como pudo compararse al secuenciar su ADN.

En el muestreo 9 MW, las muestras 9.3 MW-2, 9.3 MW-4, 9.3 MW-8, 9.3 MW-11, 9.3 MW-20 y 9.3 MW-21, presentan un patrón de bandas muy similar en el gel; se secuenciaron la 9.3 MW-2, la 9.3 MW-11 y la 9.3 MW-21 para comprobar que se trataba del mismo microorganismo.

La mayoría de los géneros encontrados en la balsa llena, estaban también en la balsa fuera de servicio, como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Deinococcus*, *Aeromonas*, *Hydrogenophaga* y *Flavobacterium*.

Tabla 48. Microorganismos identificados en el agua de la Balsa Este en el muestreo 9 MW.

| Muestras | Microorganismo | Nº acceso NCBI | % Homología |
|---|-----------------------------------|----------------|-------------|
| 9.3 MW-1, 9.3 MW-15 | <i>Hydrogenophaga defluvii</i> | AJ585993 | 98% |
| 9.3 MW-2, 9.3 MW-4, 9.3 MW-8, 9.3 MW-11, 9.3 MW-20, 9.3 MW-21 | <i>Brevibacillus reuszeri</i> | AB112715 | 99% |
| 9.3 MW-3 | <i>Bacillus cereus</i> | AJ577275 | 100% |
| 9.3 MW-5 | <i>Bacillus</i> sp | AF326371 | 100% |
| 9.3 MW-6, 9.3 MW-17 | <i>Aeromonas</i> sp | AY178568 | 100% |
| 9.3 MW-7 | <i>Exiguobacterium acetylicum</i> | AY297792 | 100% |
| 9.3 MW-9 | <i>Vibrio cholerae</i> | AY513501 | 100% |
| 9.3 MW-10 | <i>Bacillus</i> sp | AY124766 | 100% |
| 9.3 MW-12 | <i>Brevibacillus invocatus</i> | AB112718 | 96% |
| 9.3 MW-13 | <i>Hongiella mannitolivorans</i> | AY264838 | 95% |
| 9.3 MW-14 | <i>Bacteroidetes bacterium</i> | AJ622887 | 91% |
| 9.3 MW-16 | <i>Aeromonas veronii</i> | AF418211 | 100% |

4.4.5. TANQUES DE HORMIGÓN

Se recogieron muestras de agua de los tanques de hormigón en los muestreos 5 MW, 6 MW y 14 MW, pero solo en el muestreo 5 MW se procedió al aislamiento y secuenciación de los microorganismos cultivables. En este muestro, el tanque analizado fue el N74-AA005, que estaba recién puesto en servicio y lleno hasta una

altura de 1,16 m. Las UFC aisladas sobre los distintos medios de cultivo empleados se muestran en la **Tabla 49**.

Tabla 49. UFC aisladas en el agua del tanque de hormigón N74-A005 sobre los diferentes medios de cultivo utilizados en el estudio.

| Muestreo | Medio de Cultivo | Muestra |
|----------------------|------------------|-----------|
| 5 MW (26/11/2002) | TSA | 5.6 MW-1 |
| | | 5.6 MW-2 |
| | | 5.6 MW-3 |
| | | 5.6 MW-4 |
| | | 5.6 MW-5 |
| | | 5.6 MW-6 |
| | | 5.6 MW-7 |
| | | 5.6 MW-8 |
| | STC | 5.6 MW-9 |
| | | 5.6 MW-10 |
| | | 5.6 MW-11 |
| | R2A | 5.6 MW-12 |
| | | 5.6 MW-13 |
| | | 5.6 MW-14 |
| | | 5.6 MW-15 |

Uno de ellos (5.6 MW-12) dejó de crecer al hacer la resiembra para su purificación, pero del resto se extrajo el ADN y se amplificó mediante PCR para ser caracterizado por DGGE. Una imagen del gel mostrando los distintos patrones de bandas obtenidos se muestra en la **Figura 43**.

Como puede observarse, aparecen 9 patrones de bandas diferentes. Las muestras 5.6 MW-10 y 5.6 MW-14, que tienen un 99% de homología con *Acidovorax* sp (AJ012071) son diferentes en el gel de DGGE y se comprobó mediante

secuenciación y alineamiento con el programa *ClustalX* que presentaban diferencias en algunas bases.

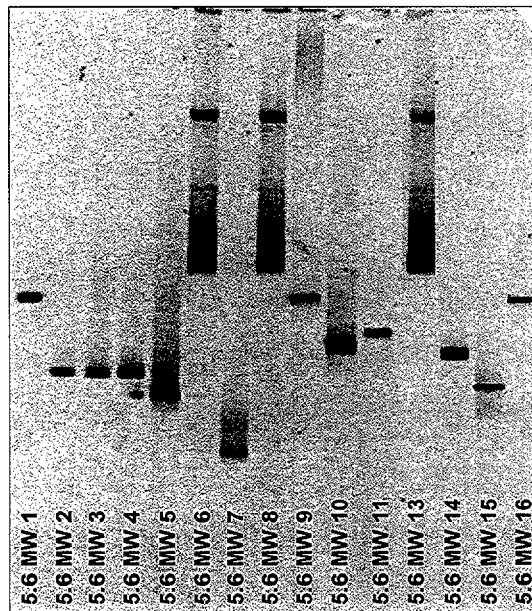


Figura 43. Gel de DGGE mostrando los patrones de bandas de los microorganismos aislados en el tanque de hormigón N74-A005.

En la **Tabla 50** se muestran los microorganismos identificados con el porcentaje de homología de los más próximos depositados en las bases de datos del NCBI y sus números de acceso.

Tres de los microorganismos no pudieron ser identificados por originar secuencias ambiguas.

Tabla 50. Microorganismos identificados en el agua del tanque de hormigón N74-A005.

| Muestras | Microorganismo | Nº acceso NCBI | % Homología |
|----------------------------------|-----------------------------------|----------------|-------------|
| 5.6 MW-1, 5.6 MW-9, 5.6 MW-16 | NI | — | — |
| 5.6 MW-2 ,5.6 MW-3, 5.6 MW-4 | <i>Acidovorax</i> sp | Y18617 | 99% |
| 5.6 MW-5 | <i>Bacillus pumilus</i> | AY456263 | 100% |
| 5.6 MW-6, 5.6 MW-8 5.6 MW-13 | <i>Flavobacteriales bacterium</i> | AY275497 | 98% |
| 5.6 MW-7 | NI | — | — |
| 5.6 MW-10 | <i>Acidovorax</i> sp | AJ012071 | 99% |
| 5.6 MW-11 | NI | — | — |
| 5.6 MW-14 | <i>Acidovorax</i> sp | AJ012071 | 99% |
| 5.6 MW-15 | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | AF508094 | 98% |

NI: No Identificado

4.4.6. CULTIVO DE BACTERIAS REDUCTORAS DE SULFATO

Para estudiar la presencia de bacterias reductoras de sulfato (SRB) en el sistema de agua de circulación de la CNC se filtró agua de los diferentes puntos de muestreo y se inocularon los filtros en medio *Postgate* B y condiciones anaerobias, tal y como se describía en el Apartado 3.5 de Materiales y Métodos.

Las SRB utilizan el sulfato del medio de cultivo como aceptor final en la cadena respiratoria y lo transforman en sulfuro de hidrógeno (H₂S) en condiciones anaerobias, que reacciona con el hierro presente en el medio para originar sulfuro de

hierro, un compuesto de color negro. Cuando se observa el ennegrecimiento del medio de cultivo se puede presumir la presencia de SRB.

Todas las muestras que fueron sometidas al aislamiento e identificación de microorganismos cultivables en TSA, R2A y STC también se inocularon en *Postgate B*. A saber: 4.1 MW, 4.3 MW, 4.5 MW, 5.5 MW, 5.6 MW, 6.5 MW, 7.1 MW, 7.3 MW, 7.5 MW, 8.3 MW, 9.3 MW, 10.5 MW, 13.5 MW, 14.2 MW y 14.5 MW. En todas ellas se observó el cambio en el color del medio de cultivo, por lo que se supone que a lo largo de todo el sistema de circulación de agua desde su origen, el río, hasta su vuelta al mismo (las balsas de almacenamiento temporal de vertidos), podrían estar presente este tipo de bacterias.

En el último muestreo, se hizo una prueba adicional. Se filtraron 5 mL del cultivo positivo en *Postgate B* por filtros de 0,2 μm de diámetro de poro (como los descritos en el Apartado 3.5 de Material y Métodos) y se inocularon los filtros en medio *Postgate B* y *Postgate B* suplementado con molibdato de sodio (Na_2MoO_4) a una concentración de 10^{-2} M, incubándose a 30 °C. Al cabo de 9 días se observó crecimiento bacteriano en ambos medios de cultivo, con y sin molibdato. Esto indica que además de bacterias reductoras de sulfato, hay otro tipo de microorganismos anaerobios capaces de utilizar compuestos del azufre en su metabolismo y producir H_2S . Si sólo existiesen SRB, no se hubiera detectado crecimiento en el medio *Postgate B* con molibdato ya que este compuesto es un inhibidor de la reducción del sulfato.

Para obtener cultivos puros de los microorganismos creciendo en *Postgate B*, se hicieron diluciones y se sembraron en placas de agar *Postgate E*. Se incubaron en bolsitas Anaerocult A Mini para crear condiciones de anaerobiosis y a 30 °C. Al cabo de 5 días se observaron colonias de color negro. Estas colonias se diluyeron en agua estéril y se extrajo el material genético mediante ciclos de congelación-descongelación. El ADN fue sometido a amplificación por PCR con los cebadores 385

F y 907 R, muy utilizados para SRB en la bibliografía consultada. La amplificación con estos cebadores fue negativa por lo que se usaron los cebadores 5 F y 531 R. En este caso la PCR dió resultados positivos, y el material genético de las UFC aisladas en *Postgate E* fue sujeto de secuenciación con los citados cebadores para identificar a los microorganismos. En la **Tabla 51** se muestran las bacterias identificadas con el porcentaje de homología de aquellas más próximas encontrados en las bases de datos del NCBI.

Tabla 51. Microorganismos del agua del sistema de circulación aislados en medio *Postgate E* en anaerobiosis.

| Muestras | Microorganismo | N° acceso NCBI | % Homología |
|------------------|-------------------------------|----------------|-------------|
| PS-1 | <i>Clostridium</i> sp | AY554421 | 99% |
| PS-2, PS-3, PS-6 | <i>Uncultured Clostridium</i> | AY128089 | 100% |
| PS-4 | <i>Uncultured Clostridium</i> | AY128089 | 93% |
| PS-5 | <i>Clostridium glycolicum</i> | AJ318903 | 99% |
| PS-7 | <i>Uncultured bacterium</i> | AY537324 | 98% |

Se identificaron 5 microorganismos diferentes, 4 de ellos del género *Clostridium*. Los miembros de este género son microorganismos anaerobios que generan H₂S en su metabolismo, de ahí la coloración negra del medio *Postgate B* y el crecimiento positivo en presencia de molibdato de sodio. También se identificó un microorganismo relacionado con el Filo *Bacteroidetes*. No se identificó ninguna bacteria reductora de sulfato entre los microorganismos aislados, por lo que no se puede confirmar su presencia.

4.5. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS AMBIENTALES

Para poder establecer relaciones entre los diferentes puntos del sistema de agua de circulación de la Central así como para evaluar las variaciones en las poblaciones microbianas de cada punto de muestreo a lo largo del estudio se procedió a caracterizar las muestras de agua mediante PCR-DGGE.

Tal y como se comentó en el Apartado 3.8.2 de Material y Métodos se usaron diferentes pares de cebadores en un protocolo de PCR denominado *Seminested* o PCR anidada.

Los mejores resultados, en cuanto a amplificación del material genético total y número de bandas en el gel de DGGE, se obtuvieron con el par de cebadores 341 F y 907 R en la primera PCR y 341 F-GC y 531 R en la segunda.

Se efectuaron dos PCR de cada punto de muestro para obtener 200 μ L de producto final de PCR, el cual se precipitó y se resuspendió en 10 μ L de agua desionizada estéril para ser cargado posteriormente en un gel de DGGE. Los geles de DGGE se hicieron con un rango desnaturalizante del 20% al 60% y se efectuaron a 180 V, durante 210 minutos en tampón TAE 0,5X a 60 °C de temperatura.

4.5.1. DGGES AMBIENTALES POR MUESTREOS

En primer lugar se caracterizaron las muestras de agua de los puntos del sistema de circulación que se recogían en cada muestreo.

En la **Figura 44** pueden observarse los patrones de bandas de diferentes puntos de muestreo analizados durante los muestreos 4 MW (Septiembre 2002), 5 MW (Noviembre 2002) y 6 MW (Febrero 2003).

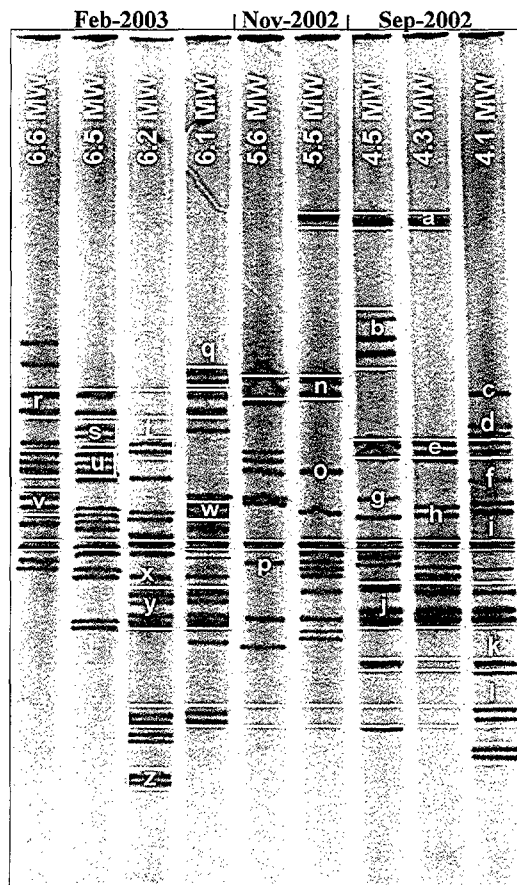


Figura 44. DGGE ambiental de los puntos de muestreo analizados durante los muestreos 4 MW, 5 MW y 6 MW.

En el muestreo 4 MW, se analizó el agua de aporte a la Central (4.1 MW), el agua de la Balsa Oeste (4.3 MW), que se encontraba vacía y el agua de la Balsa Este (4.5 MW) que se encontraba en servicio. Como se puede observar, aparecen bandas

comunes en los tres puntos muestreados, como son las bandas “h” e “i” y los grupos de bandas “e” y “j”. Por el contrario, el agua del río presenta una serie de bandas características que no están en ninguna de las dos balsas analizadas en este muestreo, como son la banda “c”, “d” y “f”, y dos grupos de pares de bandas (“l” y “m”) que tampoco aparecen en las balsas. Respecto a las balsas, se observa que la banda “a” es característica de ambas balsas, ya que no aparece en el agua de aporte y que en la Balsa Este aparecen un grupo de bandas “b” y una banda “g” que no están en la Balsa Oeste. La banda “k” curiosamente aparece tanto en el agua de aporte como en la Balsa Este, pero no en la Balsa Oeste que estaba vacía.

Con respecto al muestreo 5MW, sólo se analizó la Balsa Oeste (5.5 MW) que se encontraba en servicio y el tanque de hormigón N74-AA005 (5.6 MW). Aparecen una serie de bandas comunes, entre las que destacan el grupo “n”, la banda “o”, la “i” que también aparecía en el muestreo 4 MW, la banda “p”, y la tercera banda del grupo “j” señalado en el muestreo 4 MW. Asimismo, se observan también bandas que aparecen en la balsa y no en el tanque y viceversa. De todas ellas resulta interesante destacar la banda “a” que también se observa en el muestreo 4 MW. En la Balsa Oeste aparece la primera banda del grupo “j” que no se encuentra en el tanque de hormigón.

En el muestreo 6 MW, se tomaron muestras de cuatro puntos del sistema de circulación de agua de la Central: el agua de aporte (6.1 MW), el punto N71 (6.2 MW), la Balsa Este (6.5 MW), que estaba en servicio y el tanque de hormigón N74-AA004 (6.6 MW). La única banda que aparece en común en los citados puntos es la banda “i”, que también aparece en todos los demás puntos analizados en este gel de DGGE. La tercera banda del grupo “j” también está en el agua de todos los puntos de muestreo, excepto en el tanque de hormigón del muestreo 6 MW.

Como se puede observar, cada punto de muestreo presenta bandas exclusivas, que no aparecen en los demás puntos analizados. Así, en el agua de aporte aparecen

dos pares de bandas “q” y “w” que no aparecen en los otros puntos de muestreo. El grupo “w” también está en el punto de muestreo 4.1 MW, así como el grupo “l”, sin embargo el grupo “m” que aparece en 4.1 MW no está presente en el muestreo 6 MW.

En el agua del punto N71 se aprecian dos grupos de pares de bandas, el “t” y el “z”, que son exclusivos de este punto de muestreo. Esta agua comparte con el agua de aporte el grupo de bandas “y” y el “l”.

El punto 6.5 MW presenta también bandas exclusivas, como el par de bandas “s”, y el agua del tanque de hormigón el grupo “v”. Estos dos puntos presentan bandas comunes entre sí, como son las bandas “u” y las bandas “r” que también están presentes en el agua de aporte de este muestreo. La banda “x”, sin embargo, está presente en todos los puntos de este muestreo, excepto en el agua del tanque de hormigón. En este muestreo 6 MW la banda “a” y la primera banda del grupo “j”, que aparecían en las Balsas Este y Oeste analizadas en los muestreos 4 MW y 5 MW, no está presente. Cabe señalar que el grupo de bandas “u” del tanque de hormigón N74-AA004 tiene su homólogo en el tanque N74-AA005 analizado en el muestreo 5 MW, y la banda “p” también se encuentra en ambos puntos.

En la **Figura 45** se muestran dos geles de DGGE en los que se analizaron diferentes muestras de agua recogidas en los muestreos 7 MW, 8 MW y 9 MW (gel A) y 10 MW-13 MW (gel B).

En el muestreo 7 MW (Mayo 2003), se caracterizó el agua de aporte a la Central (7.1 MW), el agua de la Balsa Este que se encontraba vacía (7.3 MW) y el de la Balsa Oeste que estaba en servicio (7.5 MW). De forma similar a lo que ocurría en los otros muestreos, aparecen bandas comunes a los tres puntos y bandas exclusivas de cada uno de ellos. En este sentido, el grupo de bandas “i” y la banda “k” están presentes en las tres muestras de agua. Las bandas “d” y “j” aparecen en el río y en la

balsa que estaba vacía pero no en la balsa que se encontraba en servicio, mientras que la banda “c” se encuentra en las dos balsas, pero no en el agua del río. Además el grupo de bandas “h” aparece en el agua del río y en la balsa llena pero no en la balsa que se encontraba vacía. Como bandas características de cada punto de muestreo se encuentran las bandas “e” y “g” y los grupos de bandas “b” y “n” que sólo aparecen en el agua del río. En la Balsa Este son únicas las bandas “a” y “f” y en la Balsa Oeste la banda “l”.

Los muestreos 8 MW y 9 MW (Junio 2003) corresponden al agua de la Balsa Este vacía recogida en dos días sucesivos. Como se puede comprobar en la **Figura 45**, los patrones de bandas son exactamente iguales, lo que indica que no ha habido ningún cambio en la composición de la población microbiana. En común con el muestreo 7 MW, aparecen las bandas “d”, “e”, la primera y la tercera banda del grupo “h”, el grupo “i” y la banda “k”. Si comparamos este muestreo (8.3 MW y/o 9.3 MW) con la Balsa Este, que también estaba vacía, en el muestreo anterior (7.3 MW) se puede observar que algunas bandas coinciden (banda “d”, grupo “i” y banda “k”), mientras que otras bandas que aparecen en el muestreo 7 MW (banda “a”, banda “c”, banda “f” y banda “j”) no están presentes en los muestreos 8 MW y 9 MW. Por su parte, en los muestreos 8 MW y 9 MW aparecen bandas nuevas que no se encontraban en el muestreo anterior (banda “e”, primera y tercera banda del grupo “h” y grupo “m”).

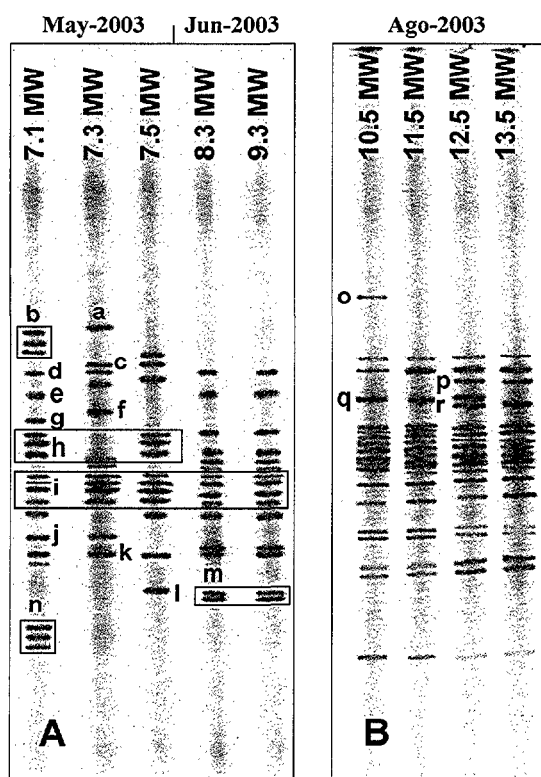


Figura 45. DGGEs ambientales de los puntos de muestreo analizados durante los muestreos 7 MW, 8 MW y 9 MW (A) y 10 MW, 11 MW, 12 MW y 13 MW (B).

En el gel B de la **Figura 45** se analizó el agua de la Balsa Oeste en servicio en el mes de Agosto de 2003, durante los cuatro días que dura el llenado de la misma, de forma que en el muestreo 10 MW la balsa acababa de empezar a llenarse (se encontraba a una altura de 1,90 m) y en el 13 MW estaba prácticamente llena (8,66 m). Se puede comprobar que el patrón de bandas es prácticamente el mismo, a excepción de la banda “o” que sólo aparece en el muestreo 10 MW, las bandas “p” y “r” que aparece en los muestreos 12 MW y 13 MW y la banda “q” que no está en el muestreo 13 MW.

4.5.2. DGGES AMBIENTALES POR PUNTOS DE MUESTEO

Además de comparar los patrones de bandas del agua de los diferentes puntos analizados en cada muestreo, también se trató de comparar el mismo punto en los diferentes muestreos para observar si se producían variaciones a lo largo del tiempo.

El agua de aporte a la Central, analizado durante los muestreos 4 MW (Septiembre de 2002), 6 MW (Febrero de 2003) y 7 MW (Mayo de 2003) aparece en la **Figura 46**. Se observa que los patrones de bandas son diferentes, si bien aparecen algunas bandas comunes en los tres puntos de muestreo, como son los pares de bandas “f”, “g” y “k” y la banda “j”. Por otro lado, el muestreo 4 MW y 6 MW comparten las bandas “b”, “d” e “i” que no aparecen en el muestreo 7 MW, y el muestreo 6 MW y 7 MW presentan en común las bandas “a”, “c” y “h”, además de una banda que aparece justo encima del grupo “f”, las cuales no se presentan en el muestreo 4 MW. La banda “e” aparece tanto en el muestreo 4 MW como en el 7 MW, pero no en el 6 MW.

En la **Figura 47** se muestran los patrones de bandas del agua de los tanques de almacenamiento de vertidos analizados mientras se encontraban en servicio durante los muestreos 5 MW (N74-AA005), 6 MW (N74-AA004) y 14 MW (N74-AA003).

En el agua de los tres tanques pueden observarse bandas comunes (grupo “c” y las bandas “d”, “e” y “f”) a pesar de ser muestreos diferentes. Los muestreos 5 MW y 6 MW comparten la banda “a”, los muestreos 6 MW y 14 MW tienen la banda “b” en común y por último los muestreos 5 MW y 14 MW coinciden en la banda “g”. Asimismo, pueden observarse bandas que sólo están presentes en cada uno de los muestreos, es decir, que son características de cada uno de ellos.

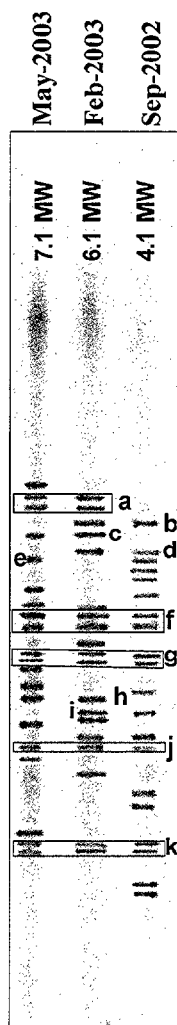


Figura 46. DGGE ambiental del agua de aporte a la CNC en los muestreos 4 MW, 6 MW y 7 MW.

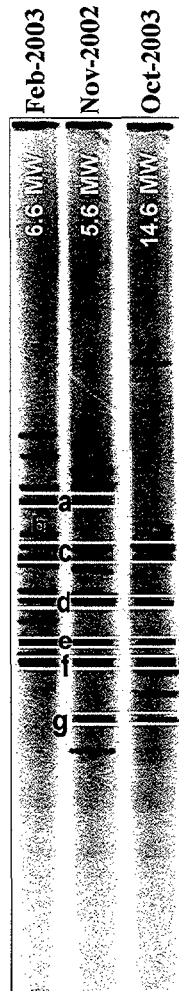


Figura 47. DGGE ambiental del agua de los tanques de hormigón en los muestreos 5 MW, 6 MW y 14 MW.

Los patrones de bandas de la Balsa Este en los diferentes muestreos se presentan en la **Figura 48**.

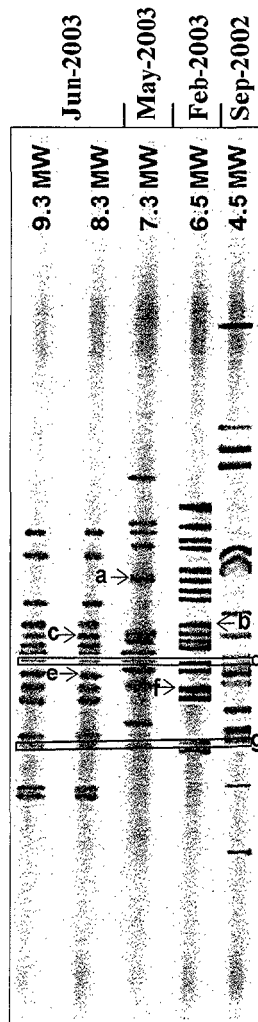


Figura 48. DGGE ambiental del agua de la Balsa Este en los muestreos 4 MW, 6 MW, 7 MW, 8 MW y 9 MW.

Como se puede apreciar, los patrones de bandas son bastante distintos. Ya se comentaron las semejanzas y diferencias entre los patrones de bandas cuando la balsa estaba en servicio (muestreos 4 MW y 6 MW) y cuando la balsa estaba vacía (muestreos 7 MW, 8 MW y 9 MW). De este gel de DGGE cabe destacar que aparecen dos bandas comunes en los cinco puntos analizados, las bandas “d” y “g”. Además la banda “a” se encuentra en los muestreros 6 MW y 7 MW; las bandas “b” y “f” están presentes en los muestreros 6 MW, 8 MW y 9 MW; y las bandas “c” y “e” son comunes en los muestreros 4 MW, 8 MW y 9 MW.

En la **Figura 49** se muestran los patrones de bandas del agua de la Balsa Oeste analizados durante varios muestreros. En el muestreo 4 MW la balsa se encontraba vacía pero en el resto de los muestreros estaba en servicio. En el gel A se puede apreciar que los patrones de bandas de la balsa en servicio son parecidos y presentan mayor número de bandas que la balsa vacía, aunque en los tres muestreros se aprecian bandas comunes (bandas “d”, “e”, “f” y “h”). En los muestreros 5 MW y 7 MW aparece la banda “b” y un grupo de cuatro bandas entre las bandas “e” y “f” que no están en la balsa vacía. Por otro lado, la banda “a” y la “g” están en el muestreo 4MW y en el 5 MW, pero no en el 7 MW; y la banda “c” aparece en el muestreo 4 MW y 7 MW pero no en el 5 MW.

En el gel B se muestran los patrones de bandas de la balsa durante 4 días consecutivos y como ya se ha mencionado previamente apenas se observan variaciones. Si se compara el gel B con los patrones de bandas de la balsa en servicio del gel A parece apreciarse cierta homología en la parte superior donde aparece un grupo extenso de bandas, que es mucho más numeroso en los muestreros 10 MW-13 MW.

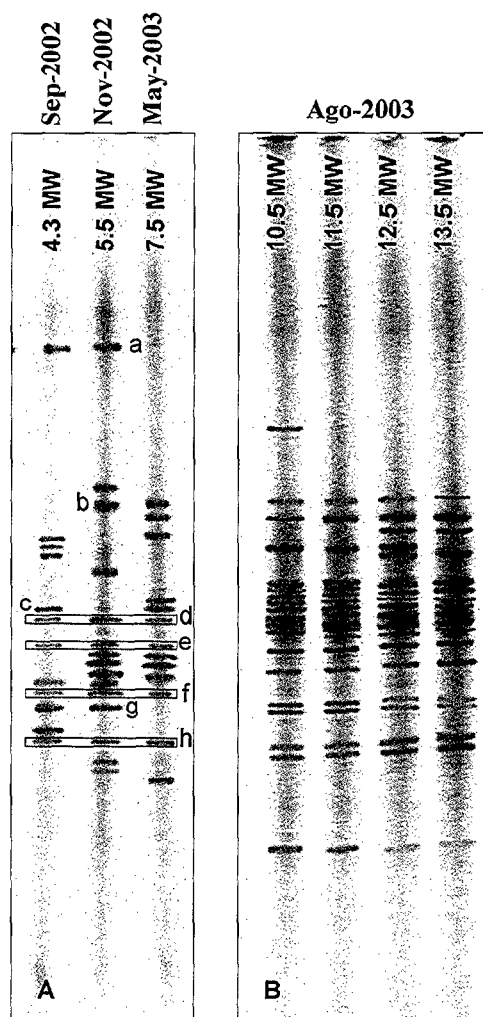


Figura 49. DGGE ambiental del agua de la Balsa Oeste en los muestreos 4 MW, 5 MW y 7 MW (gel A) y 10 MW-13 MW (gel B).

4.5.3. IDENTIFICACIÓN DE LAS BANDAS DE DGGE

Una vez caracterizada la población microbiana de cada punto de muestreo mediante PCR-DGGE, se procedió a extraer el ADN de las bandas más representativas del gel de cada muestra de agua con el fin de identificar a los microorganismos que componían dichas poblaciones.

La extracción del material genético se efectuó mediante tres procedimientos diferentes, ya comentados en el Apartado 3.9.6 de Materiales y Métodos. En los tres casos la cantidad de ADN obtenida fue muy parecida, oscilando entre 0,5 – 4,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, por lo que se optó por usar el método de elución en agua, que además proporcionaba un ADN de mejor calidad ($A_{260/280} = 1,4 - 1,7$).

Se amplificó el material genético extraído en una PCR de secuenciación con los cebadores 341 F y 531 R, utilizados en la segunda PCR ambiental. Las secuencias obtenidas no produjeron resultados satisfactorios. En la mayoría de los casos, las secuencias eran ambiguas, siendo imposible su lectura. En otros casos, podían leerse sólo unas pocas bases (aproximadamente 50 pb) que al ser comparadas con las depositadas en las bases de datos del NCBI no proporcionaban datos significativos.

Por ello, en la última fase del estudio se han puesto a punto las técnicas de clonaje para intentar identificar los microorganismos “no cultivables” presentes en las diferentes muestras de agua.

Al no ser uno de los objetivos iniciales de esta tesis doctoral, sólo se han incluido los resultados del clonaje de algunas muestras de agua tomadas durante el último muestreo.

En la **Tabla 52** figuran los clones obtenidos en el punto N71 y en la **Tabla 53** los identificados en la Balsa Oeste en el muestro 14 MW.

Tabla 52. Identificación de los clones obtenidos en el punto N71 del muestreo 14 MW.

| Muestras | Microorganismo | Nº acceso NCBI | % Homología |
|-------------|--------------------------|----------------|-------------|
| 14.2 clon 1 | <i>Pseudomonas</i> sp | AF331664 | 99% |
| 14.2 clon 2 | <i>Pseudomonas</i> sp | AF331664 | 99% |
| 14.2 clon 3 | <i>Sphingomonas mali</i> | AF311984 | 100% |
| 14.2 clon 5 | <i>Rhodococcus</i> sp | AF181690 | 100% |

Los clones 1 y 2 del punto de muestreo 14.2 MW, que presentan un 99% de homología con el mismo microorganismo, no son iguales como se pudo comprobar mediante el programa *ClustalX* que permite el alineamiento de las secuencias.

Tabla 53. Identificación de los clones obtenidos en la Balsa Oeste en el muestreo 14 MW.

| Muestras | Microorganismo | Nº acceso NCBI | % Homología |
|--------------|--|----------------|-------------|
| 14.5 clon 4 | <i>Uncultured Sphingobacterales</i> | AJ697706 | 93% |
| 14.5 clon 11 | <i>Uncultured Cyanobacterium</i> | AY711779 | 94% |
| 14.5 clon 15 | <i>Melosira varians chloroplast</i> | AJ536464 | 92% |
| 14.5 clon 16 | <i>Uncultured Cyanobacterium</i> | AY711779 | 93% |
| 14.5 clon 18 | <i>Uncultured β-Proteobacterium</i> | AF361193 | 91% |
| 14.5 clon 19 | <i>Uncultured Coscinodiscophyceae</i> | AY038449 | 90% |
| 14.5 clon 22 | <i>Bacillaria paxillifer chloroplast</i> | AJ536452 | 91% |

Los clones identificados en este punto de muestreo muestran bajo porcentaje de homología con los depositados en la base de datos del NCBI. Además todos ellos

presentan semejanzas con microorganismos no cultivables o bien con los cloroplastos de cianobacterias. Este tipo de microorganismos no se habían detectado por ninguna de las técnicas empleadas en este estudio, salvo en el muestreo 13 MW en el que se identificó la muestra 13.5 MW-3 como *Thermosynecococcus elongatus*.

5. DISCUSIÓN

5.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL AGUA

El agua de aporte a la Central procede, como ya se ha citado anteriormente, del embalse de Embarcaderos. La temperatura del agua sigue un patrón acorde con la variación estacional de la temperatura, del aire y la insolación. La conductividad es moderadamente alta debido a la litología y el pH mantiene valores ligeramente superiores a 8, lo que es habitual en aguas con elevada reserva alcalina. La concentración de sulfatos es alta, alrededor de $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y esto responde al contenido en yesos de la cuenca. El fósforo total es propio de aguas que no reciben grandes aportaciones de nutrientes, pudiendo hablarse de aguas oligotróficas-mesotróficas, y el nitrato es moderadamente alto aunque no alcanza valores de aguas contaminadas.

El agua de vertido procede de las purgas de las torres de refrigeración de tiro natural y de tiro mecánico, de la balsa de neutralización, las aguas residuales, los tanques de exceso de agua procedentes del “*Radwaste*” y el agua de la red de

pluviales. El “*Radwaste*” es el sistema de tratamiento de residuos radiactivos líquidos de la central. A él se envían todas las aguas sobrantes o las que fugan los sistemas y procesos de la zona controlada. Esta agua es purificada y devuelta al ciclo de la central. Cuando no existe capacidad para almacenarla, por ejemplo, durante una parada en la que se vacían otros muchos sistemas, esta agua se vierte a las balsas de almacenamiento temporal de vertidos con sus correspondientes controles radioquímicos. El agua de las torres de tiro mecánico y de los tanques de exceso procedentes del “*Radwaste*” se recoge en los tanques de hormigón y el resto en las balsas de vertido. A su vez, y tras los análisis correspondientes, el agua de los tanques de hormigón se vierte a las balsas. De toda el agua que llega a las balsas aproximadamente el 98% procede de la purga de las torres de refrigeración.

La concentración de nitratos, sulfatos, cloruros, fósforo total, así como la DQO y los sólidos en suspensión del agua de vertidos se encuentran por debajo de los límites establecidos en la Tabla 3 del Anexo al Título IV del Reglamento del Dominio Público Hidráulico (BOE, 1986). Los valores de aluminio, cobre y cinc también cumplen con lo establecido por la Ley vigente, así como el pH y la temperatura. Por ello, los vertidos de la Central pueden ser liberados al río.

Sin embargo, cuando se comparan estos valores con los del agua de aporte se aprecia un incremento considerable en la concentración de fósforo, sulfatos, cloruros, nitratos, así como en la conductividad del agua. Esto se debe, fundamentalmente, a la evaporación que tiene lugar en las torres de refrigeración que hace que la concentración de sales del agua que se purga sea tres-cuatro veces más alta. De esta manera, el agua de las balsas presenta mayor contenido en nutrientes que el agua de captación y puede ser considerada eutrófica. El término eutrófico se refiere a aquellas aguas ricas en nutrientes donde la productividad es del orden de 75 a 250 g de carbono por m² al año (Grant y Long, 1989). La eutrofización de los sistemas acuáticos, como

lagos y embalses, se refiere principalmente a los niveles de fósforo y nitrógeno, que son los nutrientes limitantes más importantes (Prescott y cols., 1999; Atlas y Bartha, 2002). Esto puede provocar cambios en la composición de la población microbiana y el fósforo, en particular, con frecuencia estimula el crecimiento de algas que pueden llegar a producir verdaderos afloramientos o “*blooms*”. La concentración de fósforo en ambientes acuáticos puede estar entre 0,01 y 0,07 mg·L⁻¹, aunque pueden encontrarse concentraciones superiores en zonas contaminadas y/o afectadas por la acción humana (Jones, 2001).

El incremento en la concentración de estos parámetros químicos en el agua de las balsas también se debe a los aditivos que se emplean para el tratamiento del agua de la Central. Entre ellos, el sulfato de alúmina ((SO₄)₃Al₂) se utiliza como coagulante para el ablandamiento del agua, los polifosfatos (P₂O₇⁻⁴, HP₂O₇⁻³, H₂P₂O₇⁻², etc.) como antiincrustantes, el hipoclorito sódico (NaClO) como desinfectante en distintos puntos del sistema de circulación y también se añaden ácido sulfúrico (H₂SO₄) y fosfonatos ((HPO₃)²⁻) en varios puntos como el N71, lo cual puede incrementar el contenido en cloruros, sulfatos y fósforo total. Además las balsas reciben aguas residuales, que aunque no son muy abundantes, pueden afectar a los niveles de sulfatos, nitratos y fosfatos.

La temperatura del agua de las balsas también es mayor que la del agua de captación, habiendo una diferencia de unos 4-5 °C como consecuencia de la evaporación que tiene lugar en las torres de refrigeración.

A pesar de las diferencias que existen entre los parámetros del agua de captación y los de vertido, su efecto sobre el agua del medio receptor es escaso, ya que el caudal del río es capaz de diluir los aportes efectuados desde la Central. Un estudio de seguimiento de los sistemas acuáticos en los alrededores de la CNC efectuado por la empresa Limnos S.A. (2001), por encargo de la Central, así lo ponía de manifiesto y

las características de los vertidos y del agua receptora no ha mostrado variaciones significativas desde entonces.

5.2. RECUENTO DE MICROORGANISMOS

En microbiología ambiental existen diferentes técnicas que permiten determinar de forma rápida el número total de microorganismos, y distinguir entre aquellos que están vivos, muertos y los que se encuentran activos desde el punto de vista metabólico. Los recuentos por Microscopía de Epifluorescencia permiten estimar la concentración de microorganismos en el agua sin necesidad de su cultivo en el laboratorio. El número total de microorganismos, independientemente del estado en que se encuentren, suele efectuarse mediante la tinción del ADN con fluorocromos como el DAPI y naranja de acridina (Karner y Fuhrman, 1997). La reducción de la sal de tetrazolio a formazán del CTC permite distinguir a las células que se encuentran activas (Rodríguez y cols., 1992) y el kit *LIVE/DEAD BacLight* (Molecular Probes, 2004) permite distinguir entre células vivas y muertas basándose en la integridad de la membrana celular. Este kit se ha utilizado en muchos estudios de microbiología ambiental (Boulos y cols., 1999; Vollertsen y cols., 2001, Queric y cols., 2004) y fue seleccionado para determinar la viabilidad microbiana en el agua del sistema de circulación de la Central Nuclear de Cofrentes. Sin embargo, tras emplear diferentes diluciones del agua y varias concentraciones de los fluorocromos que componen dicho kit, su uso fue eliminado porque no generaba buenos resultados y fue sustituido por el fluorocromo DAPI. El DAPI se utiliza con frecuencia para el recuento de células totales (Porter y Feig, 1980; Mirto y cols., 2000; Joachimsthal y cols., 2003). Además, se considera mejor agente de tinción que el naranja de acridina (Cloete y Muyima, 1997) porque este último sobreestima ligeramente el valor real. Sin embargo, el DAPI

presenta la desventaja de que no sólo tiñe las células vivas, sino también las muertas y las inactivas.

La concentración de microorganismos totales en los diferentes puntos del sistema de circulación de la Central analizados fue bastante homogénea, estando en torno a 10^6 microorganismos·mL⁻¹ de agua. Valores similares se han obtenido por otros investigadores en muestras de agua de ríos y lagos (Simek y cols., 2001b; Sekiguchi y cols., 2002). Los valores más bajos se presentaron en el muestreo 2 MW, en el agua del embalse, probablemente debido a que en ese muestreo se pusieron a punto las técnicas de tinción con el fluorocromo DAPI; el resto de muestreos realizados en el agua de aporte son más altos y similares entre sí. Las balsas de vertido, tanto la Este como la Oeste, presentaron valores más o menos constantes a lo largo del año e independientemente de su estado, es decir, en servicio o vacías; aunque en la Balsa Este los valores fueron ligeramente superiores cuando estaba vacía. En el muestreo 14 MW aparecieron los valores más altos, en el tanque de hormigón N74-AA003, que estaba en servicio y lleno hasta una altura de aproximadamente 2 m; los otros dos muestreos en este punto, corresponden a los tanques de hormigón N74-AA005 (muestreo 5 MW) y N74-AA004 (muestreo 6 MW) que también estaban en servicio aunque a una altura de aproximadamente 1 m.

Los recuentos efectuados por dilución y siembra en placa corresponden al número de microorganismos cultivables. La cantidad de microorganismos que aparecieron en el agua de captación permaneció muy estable a lo largo de todo el estudio, estando en torno a 10^3 UFC·mL⁻¹. En el punto N71 se obtuvieron valores similares, pero en el tanque de hormigón se obtuvieron recuentos más altos, de 10^5 UFC·mL⁻¹. Respecto a las balsas de vertido aparecieron cantidades mayores y más variables. En la Balsa Oeste, en servicio, los valores más altos de microorganismos cultivables se observaron en primavera y otoño, y los más bajos durante el mes de

Agosto cuando se dieron las temperaturas más altas, aunque las diferencias fueron sólo de un orden de magnitud. Estas variaciones también pueden observarse en los recuentos por Microscopía de Epifluorescencia. En la Balsa Este, también se contaron más microorganismos cultivables en el mes de Mayo, cuando estaba vacía, de igual forma que ocurría con los microorganismos totales.

Al comparar los recuentos efectuados por Microscopía de Epifluorescencia con los que se llevaron a cabo mediante las técnicas de dilución y siembra en placa se observaron diferencias importantes. Así, en el agua del embalse, en el punto N71 y en las balsas de vertidos la cantidad de microorganismos cultivables es tres órdenes de magnitud menor que la de microorganismos totales teñidos con DAPI, lo que significa que sólo una de cada 1000 células bacterianas presentes en las muestras de agua puede ser cultivada en el laboratorio. Respecto a los tanques de hormigón, durante el muestreo 5 MW, en que se hicieron recuentos de cultivables y de totales en el mismo tanque, la diferencia es mucho menor siendo los microorganismos cultivables sólo un orden de magnitud más bajo que los totales. Estas diferencias entre células totales y cultivables son comunes en estudios ambientales (Amann y cols., 1995; Zdanowski y Węgleński, 2001; Joachimsthal y cols., 2003), siendo las cultivables sólo una pequeña fracción de todas las que se observan al microscopio, aunque el rango de bacterias que pueden aislarse en los medios de cultivo depende, por supuesto, de la forma de procesar las muestras, de los medios de cultivo utilizados y de los métodos de recuento empleados, entre otros factores.

Entre las células teñidas con DAPI hay una parte de células muertas o no viables y otras que están inactivas. Pero además, está presente una fracción importante de células conocidas como viables pero no cultivables (VBNC, *Viable But Not Culturable*). El término “no cultivable” fue introducido por primera vez por Xu y cols. (1982), para describir las bacterias que en estado de latencia e incapaces de dividirse

siguen siendo viables, o que por sus requerimientos nutricionales, características metabólicas o ambientales, no pueden cultivarse en laboratorio. Desde entonces, la presencia de este tipo de bacterias se ha puesto de manifiesto en muchos trabajos (Oliver, 1993; Lebaron y cols., 1999; Colwell y Grimes, 2000; Adams y cols., 2003).

También se efectuaron recuentos de diatomeas desde el momento en que su presencia se hizo notoria por Microscopía de Epifluorescencia. La mayoría de las diatomeas que se observaron fueron de simetría bilateral o pennadas, del tipo *Navicula*, aunque también aparecieron algunas diatomeas de simetría radial. Estos organismos aparecieron en el agua de captación y en las balsas de vertidos, aunque no se observaron en el punto N71 ni tampoco en los tanques de hormigón. Respecto a las balsas de vertido se encontraron diatomeas en la Balsa Este estando vacía, y en la Oeste cuando se encontraba en servicio, aunque la cantidad fue mucho mayor en los casos en los que la balsa estaba vacía.

Las diatomeas pertenecen a la clase *Bacillariophyceae*, división *Cryophyta*. Tienen un citoplasma provisto de núcleo, vacuolas, cloroplastos con clorofila a y b, y a menudo con pirenoides. Una característica que las define es que su pared celular está compuesta de dos mitades o tecas que se superponen, de celulosa fuertemente impregnada con sílice y adopta morfologías muy variadas, lo cual se utiliza a menudo para su clasificación.

En el agua que llega del río, la presencia de una cierta cantidad de diatomeas es natural, ya que estas algas son habituales en aguas saladas, dulces y sedimentos húmedos (Prescott y cols., 1999; López-Archilla y cols., 2001). El hecho de que no se hayan detectado en todos los muestreos realizados en el agua de aporte puede deberse fundamentalmente a la concentración en que estuviesen en el río. Normalmente en el embalse de Embarcaderos las densidades más altas de diatomeas se observan en los meses de Mayo y Julio y en el otoño. Antes de llegar a las torres de refrigeración el

agua pasa por un proceso de decantación y filtrado y tras salir de las torres no es extraño que la cantidad de estas algas se haya reducido. Por esta razón podría explicarse el que no se hayan observado diatomeas en el punto N71. Cuando el agua de la purga de las torres de refrigeración llega a las balsas de vertido, las características que allí se dan pueden favorecer el desarrollo de estos organismos.

La aparición de diatomeas está muy relacionado con la disponibilidad de luz; la orientación y velocidad del viento también son un factor determinante pues permiten el movimiento de las aguas y por tanto la renovación de nutrientes del medio acuático (Erga y Heimdal, 1984). Cuando las balsas están vacías, la radiación solar y el calentamiento del agua pueden disparar el crecimiento de las algas. Además la elevada concentración de nutrientes que hay en el agua puede potenciar el proceso. A medida que la balsa se va llenando la disponibilidad de luz va siendo cada vez menor y el desarrollo de las diatomeas queda reducido, sedimentando en el fondo de la balsa, por lo que su detección es menor. Este fenómeno puede apreciarse durante el proceso de llenado de la Balsa Oeste en los muestreos 10 MW a 13 MW. La mayor cantidad de diatomeas se observó durante el mes de Mayo de 2003 cuando la balsa Este estaba en reposo, había estado lloviendo durante los tres días previos produciéndose después un aumento de la temperatura ambiental. Estas condiciones podrían asemejarse a las que se dan en algunos lagos ricos en nutrientes cuando se producen afloramientos de diatomeas. Estos afloramientos suelen aparecer en primavera y otoño cuando el agua superficial aeróbica (*epilimnion*) se mezcla con la profunda que suele ser anaeróbica (*hipolimnion*) por efecto de la temperatura y se producen cambios en la disponibilidad de nutrientes que estimulan el crecimiento de las algas (Willen, 1991; Arhonditsis y cols., 2003).

5.3. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

5.3.1. ALGAS FILAMENTOSAS

En Abril de 2002 (Muestreo 3 MW), se observó la aparición de masas de algas filamentosas en las balsas de vertido, que anteriormente sólo se habían detectado en cantidades mínimas. Las algas fueron identificadas por técnicas de Microscopía Óptica como *Cladophora glomerata* y *Oedogonium pringsheimii*.

Cladophora glomerata es un alga filamentosa muy abundante en ríos eutróficos de corrientes lentas, lagos y estanques (Dodds y Gudder, 1992). Pertenece a la clase *Clorophyceae*, conocida como clorofitas o algas verdes. Presentan cloroplastos con clorofila a y b y realizan fotosíntesis con producción de oxígeno. También tienen xantofilas y carotenoides como pigmento accesorio. *C. glomerata* crece formando hebras gruesas y tapices adheridos a sustratos. Se han observado afloramientos o “*blooms*” de este alga a finales de primavera y durante el verano como consecuencia del aumento de la temperatura del agua y la radiación solar (Menéndez y Comín, 2000).

Oedogonium pringsheimii también pertenece al grupo de las clorofitas y forma filamentos, aunque su crecimiento no genera hebras de la misma intensidad que *C. glomerata*. Su desarrollo en las balsas de vertido de la CNC fue mucho menor y por ello, en un sentido amplio, se asume que el comportamiento de ambas algas es similar.

La aparición de estas algas en las balsas de vertidos podría ser atribuida al descenso en la concentración de cobre en el agua tras la sustitución del primitivo condensador de latón de la Central en Septiembre de 2000 por uno de titanio. Tras la disminución del cobre los crecimientos masivos de algas filamentosas se iniciaron a raíz de las condiciones estacionales favorables.

Desde ese momento, a finales de Abril - primeros de Mayo se producen estos afloramientos de algas filamentosas en las balsas. Para combatirlas, por un lado se aumenta la frecuencia de cloración de los sistemas que aportan agua a las balsas de vertido, y por otro se hacen tratamientos mensuales en las balsas vacías desde Mayo a Octubre con un algicida (Aquaplex). Este producto es sulfato de cobre pentahidratado y acomplejado para que no precipite a pH básico. El tratamiento consiste en dosificar la cantidad de producto necesaria para alcanzar unos 250-500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ión cobre en el agua de las balsas. A medida que las balsas se llenan de agua la concentración de cobre queda diluida unas 20 veces por lo que no se superan los límites establecidos para el vertido del agua al río.

Sin embargo, el cobre tiene una gran tendencia a unirse a una amplia variedad de moléculas orgánicas, por lo que puede acumularse en lugares dentro y alrededor de las células en cantidades importantes. En este sentido los polisacáridos de la pared celular de las algas proporcionan grupos amino y carboxilo a los que pueden unirse metales pesados como el cobre (Wilde y Benemann, 1993; Wehrheim y Wettern, 1994; Knauer y cols., 1997).

Cladophora glomerata tiene la capacidad de unir cobre y otros metales pesados (Vymazal, 1990; Vymazal, 1995; Aksu y Kutsal, 1998; Sternberg y Dorn, 2002) y es una de las algas más utilizadas como bioindicador de metales pesados por su presencia frecuente en ambientes contaminados con este tipo de elementos y su capacidad de acumularlos. Por esta razón cuando aparecen los afloramientos de algas en las balsas de vertidos, éstas son retiradas mecánicamente y depositadas en contenedores donde se dejan secar al sol de dos a tres semanas hasta que quedan prácticamente deshidratadas. En ese momento la cantidad de metales pesados, fundamentalmente cobre y cinc, que contienen las algas es lo bastante reducida como

para ser catalogadas como residuo no tóxico ni peligroso (BOE, 1989) y susceptible de ser enviadas al vertedero de inertes de la Central.

5.3.2. BACTERIAS

En el Apartado 3, dedicado a Materiales y Métodos, se detallaban las técnicas empleadas para el estudio de la población microbiana en el sistema de agua de circulación de la CNC, basadas en el aislamiento de los microorganismos en placa sobre diferentes medios de cultivo.

El R2A es un medio oligotrófico muy utilizado para el cultivo de bacterias de ambientes acuáticos (Reasoner y Geldreich, 1985). Aunque el agua de las balsas no reúne las características para ser considerada oligotrófica, en el agua de aporte así como en el punto N71 se esperaba aislar el mayor número de microorganismos en este medio de cultivo. Sin embargo el TSA, que es un medio general, fue donde se aislaron mayor número de bacterias diferentes (45%) en todos los puntos de muestreo analizados, seguido del R2A (31,2%) y el STC (23,8%).

A todos los microorganismos aislados, se les extrajo el material genético y fueron sometidos a caracterización mediante PCR-DGGE. En los geles de poliacrilamida se observó que para algunos microorganismos, perfectamente aislados a partir de una UFC, un fragmento amplificado del gen 16S rRNA daba lugar a la aparición de un patrón de bandas característico en vez de una única banda (véanse **Figuras 38-43**). Esto se relaciona íntimamente con la heterogeneidad del gen y el número de operones del mismo dentro del genoma bacteriano (Farrelly y cols., 1995; Ueda y cols., 1999). Mediante secuenciación se comprobó que las diferentes bandas del patrón observado en la DGGE correspondían a la misma cepa bacteriana.

También se secuenciaron microorganismos con el mismo patrón de bandas para comprobar que sus secuencias eran idénticas y gracias a ello la DGGE ha podido ser empleada en este estudio como técnica de “*screening*” en la selección de los microorganismos diferentes para ser secuenciados. La DGGE utilizada en este sentido facilita el procesamiento de gran cantidad de muestras y evita la identificación mediante secuenciación de muestras idénticas, lo que acelera el tiempo del estudio y supone un ahorro económico adicional. Además la DGGE ha permitido seleccionar microorganismos con diferencias en unas pocas bases de ADN, por lo que no se está perdiendo información en cuanto a cantidad y variedad de cepas bacterianas.

Ya se ha discutido que las técnicas de cultivo permiten determinar un porcentaje muy pequeño de la población microbiana real que está presente en el agua (entre el 1% y el 1%). Teniendo en cuenta las limitaciones de esta técnica (Bernard y cols., 2001; Porter y cols., 2004), en el sistema de circulación de la Central Nuclear de Cofrentes se han identificado diferentes microorganismos pertenecientes a varios grupos filogenéticos: α -, β -, y γ -*Proteobacteria*, *Bacillus-Staphylococcus*, *Actinomycetales*, *Deinococcus-Thermus*, y *Bacteroidetes* (véase **Tabla 54**). Los más abundantes en términos de cantidad y de especies diferentes han sido los del grupo *Bacillus-Staphylococcus*, γ -*Proteobacteria* y β -*Proteobacteria*.

En algunos ríos se ha detectado que los grupos de α -, y β -*Proteobacteria*, *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (*Bacteroidetes*), y las bacterias Gram-positivas con alto contenido en G+C eran los grupos predominantes (Brumer y cols., 2000; Simek y cols., 2001a; Simek y cols., 2001b). Estos grupos también parecen ser los dominantes en la mayoría de estudios realizados sobre comunidades bacterianas en lagos (Hiorns y cols., 1997; Glöckner y cols., 2000; Urbach y cols., 2001). Además, Hugenholtz y cols. (1998), que han revisado la composición de las comunidades microbianas en varios ambientes naturales, han determinado la presencia frecuente de

α -, y β -*Proteobacteria* y de actinobacterias. De todas formas la composición de las comunidades microbianas depende del medio en que se encuentren y por tanto de las condiciones hidrológicas, pH, temperatura, cantidad de nutrientes, disponibilidad de sustrato, y consumidores de bacterias, entre otros factores. Por ello, en algunos estudios en este tipo de ambientes acuáticos se ha observado que el grupo de β -*Proteobacteria* era el más abundante (Kenzata y cols., 1998; Araya y cols., 2003), mientras que en otros el grupo de las α -*Proteobacteria* era el predominante y el de *Bacteroidetes* estaba ausente (Feris y cols., 2003). Por su parte, Methé y cols. (1998) observaron una baja frecuencia del grupo γ -*Proteobacteria* en agua dulce.

En total se han identificado 30 géneros distintos sin tener en cuenta los que se han clasificado como “no cultivables” (*uncultured*) o “no identificados” (*unidentified*) en la base de datos de NCBI. Entre ellos aparecen bacterias Gram-positivas (43,4%) y Gram-negativas (56,6%), no existiendo grandes diferencias entre ambas.

La mayoría de los géneros que se han aislado en el sistema de circulación de la Central han sido detectados en otros ambientes acuáticos (Schwarz y cols., 2004; Wu y cols., 2004). En este sentido, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Cytophaga* y *Vibrio* son bastante frecuentes en la microbiota natural de aguas dulces (Atlas y Bartha, 2002).

Tabla 54 (I). Microorganismos aislados en el agua del sistema de circulación de la Central Nuclear de Cofrentes.

| Grupo Filogenético | Microorganismo | N° acceso NCBI | Agua río | N71 | N74-A001 Balsa Oeste | N74-A002 Balsa Este | N74-A005 Tanque | |
|-----------------------------------|----------------------------------|----------------|----------|-----|----------------------|---------------------|-----------------|--|
| <i>Bacillus-Staphylococcus</i> | <i>Bacillus</i> sp | AY028328 | X | | | | | |
| | | AY124766 | | | | X | | |
| | | AY461699 | | | | | X | |
| | | AF128875 | X | | | | | |
| | | AF492843 | | X | | | | |
| | | AF414443 | | X | X | | | |
| | | AB017591 | | | X | X | | |
| | | AF169519 | | | | X | | |
| | | AF326371 | | | | | X | |
| | | X86600 | | | | | X | |
| | <i>Bacillus cereus</i> | AF526899 | | | | X | | |
| | | AJ586344 | | | | | X | |
| | | AJ577275 | | | | | X | |
| | | AJ508706 | | | | | X | |
| | | AE017013 | | | | | X | |
| | <i>Bacillus ehimensis</i> | AY116666 | | | | X | | |
| | <i>Bacillus endophiticus</i> | AF295302 | X | | | | | |
| | <i>Bacillus mojavenis</i> | AY436360 | X | | | | | |
| | <i>Bacillus macroides</i> | X70312 | X | | | | | |
| | <i>Bacillus licheniformis</i> | X68416 | | | | X | | |
| | <i>Bacillus indicus</i> | AJ583158 | | X | X | | | |
| | <i>Bacillus thuringiensis</i> | AY138290 | | | | X | | |
| | <i>Bacillus pumilus</i> | AY456263 | | | | | X | |
| | <i>Brevibacillus</i> sp | AY397774 | | | X | X | | |
| | | AF228763 | | | X | | | |
| | | AJ438305 | | | | X | | |
| | <i>Brevibacillus bortelensis</i> | D78456 | | | X | | | |
| AY373322 | | | | | X | | | |
| <i>Brevibacillus invocatus</i> | AB112718 | | | | X | X | | |
| <i>Brevibacillus reuszeri</i> | D78464 | | | X | | | | |
| | AB112715 | | | | X | X | | |
| <i>Paenibacillus alvei</i> | AJ320491 | | | | X | | | |
| <i>Exiguobacterium</i> sp | AJ518821 | | | | X | X | | |
| <i>Exiguobacterium acetylicum</i> | AY297792 | | | | X | X | | |
| <i>Glacial ice bacterium</i> | AF479360 | X | | | | | | |
| <i>Staphylococcus hominis</i> | AJ514249 | | | X | | | | |

Tabla 54 (II). Microorganismos aislados en el agua del sistema de circulación de la Central Nuclear de Cofrentes.

| Grupo Filogenético | Microorganismo | Nº acceso NCBI | Agua río | N71 | N74-A001 Balsa Oeste | N74-A002 Balsa Este | N74-A005 Tanque | |
|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------|-----|----------------------|---------------------|-----------------|---|
| <i>α-Proteobacteria</i> | <i>Agrobacterium</i> sp | AF482682 | X | | | | | |
| | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | AF406666 | | | | X | | |
| | <i>Rhizobium</i> sp | AF508094 | | | | | X | |
| | | AJ294417 | | | | X | | |
| | <i>Sphingomonas</i> sp | X94098 | | | X | X | | |
| | | AF128870 | | | X | | | |
| | <i>Sphingomonas ursincola</i> | AB024289 | | X | | | | |
| | <i>Blastomonas natatoria</i> | Y13774 | | X | | | | |
| | <i>Novosphingobium hassiacum</i> | AJ416411 | | | X | | | |
| | <i>Novosphingobium subterraneum</i> | AB025014 | | | X | | | |
| | <i>Paracoccus</i> sp | AB025188 | | | X | | | |
| | <i>Uncultured bacterium</i> | AJ307938 | | | X | | | |
| | <i>β-Proteobacteria</i> | <i>Hydrogenophaga defluvii</i> | AJ585993 | | X | X | X | |
| <i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i> | | AF078768 | | | X | X | | |
| <i>Acidovorax</i> sp | | AY093698 | | | | X | X | |
| | | AY463206 | | | | X | X | |
| | | AF235010 | | | | X | | |
| | | AJ012071 | | | | | | X |
| | | Y18617 | | | | | | X |
| <i>Vogesella indigifera</i> | | AB021385 | | | X | | | |
| <i>Dechloromonas</i> sp | | AJ318917 | | | X | | | |
| <i>Comamonadaceae bacterium</i> | | AJ505858 | | | X | | | |
| <i>Pseudomonas</i> sp | | AF015487 | | | | | X | |
| | | AJ617689 | | | | X | | |
| <i>Unidentified β-proteobacterium</i> | | AB013258 | | X | | | | |
| <i>Uncultured β-proteobacterium</i> | | AF431218 | | X | | | | |
| | | AF445688 | | | | X | | |
| | | AJ582191 | | | | | X | |
| <i>β Proteobacterium</i> | | AY299334 | | | | X | | |
| <i>Unidentified bacterium</i> | Y11465 | | X | | | | | |
| <i>Unidentified bacterium</i> | Z93973 | | | | | X | | |

Tabla 54 (III). Microorganismos aislados en el agua del sistema de circulación de la Central Nuclear de Cofrentes.

| Grupo Filogenético | Microorganismo | Nº acceso NCBI | Agua río | N71 | N74-A001 Balsa Oeste | N74-A002 Balsa Este | N74-A005 Tanque | |
|--------------------------|--------------------------------------|----------------|----------|-----|----------------------|---------------------|-----------------|--|
| <i>γ-Proteobacteria</i> | <i>Aeromonas</i> sp | AB064357 | | | X | | | |
| | | AY178568 | | | | X | | |
| | <i>Aeromonas culicicola</i> | AY130992 | X | | X | X | | |
| | <i>Aeromonas veronii</i> | AF418211 | X | | X | X | | |
| | | AF418213 | | | | X | | |
| | <i>Stenotrophomonas</i> sp | AJ002814 | X | | | | | |
| | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | AJ518813 | | | X | | | |
| | <i>Pseudoxantomonas</i> sp | AY124375 | | | X | | | |
| | <i>Pseudomonas</i> sp | AF408929 | X | | | | | |
| | | AY259121 | | | | | X | |
| | | AY275480 | X | | | | | |
| | | AY394845 | | | | X | | |
| | | AF521652 | | | | X | | |
| | | AJ272546 | | | | X | | |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | AY162139 | | | | | X | |
| | <i>Pseudomonas putida</i> | AY297752 | | | | X | | |
| | | AY308050 | | | | X | | |
| | <i>Pseudomonas alcaligenes</i> | AF094721 | | | | X | X | |
| | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> | AJ628163 | | | | X | | |
| | <i>Pseudomonas nitroreducens</i> | AY297786 | | | | X | | |
| | <i>Shewanella</i> sp | AB111109 | | | | X | | |
| <i>Rahnella</i> sp | AB030924 | | | | X | | | |
| <i>Klebsiella</i> sp | AY363386 | | | | | X | | |
| <i>Vibrio cholerae</i> | AY513501 | | | | | X | | |
| <i>γ-Proteobacterium</i> | AF541930 | | | | X | | | |
| | AF542077 | | | | | X | | |
| | AY077611 | | | | X | | | |
| <i>Actinomycetales</i> | <i>Rhodococcus rhodochrous</i> | AF439261 | X | | | | | |
| | <i>Curtobacterium citreum</i> | X77436 | X | | | | | |
| | <i>Microbacteriaceae bacterium</i> | AY504472 | | | | X | | |

Tabla 54 (IV). Microorganismos aislados en el agua del sistema de circulación de la Central Nuclear de Cofrentes.

| Grupo Filogenético | Microorganismo | Nº acceso NCBI | Agua río | N71 | N74-A001 Balsa Oeste | N74-A002 Balsa Este | N74-A005 Tanque |
|----------------------------|-----------------------------------|----------------|----------|-----|----------------------|---------------------|-----------------|
| <i>Deinococcus-Thermus</i> | <i>Deinococcus</i> sp | AB022911 | X | X | X | X | |
| | | AJ585237 | | X | | | |
| | <i>Deinococcus grandis</i> | AY424359 | | | X | | |
| <i>Bacteroidetes</i> | <i>Flexibacter flexilis</i> | AB07054 | | | | X | |
| | <i>Hongiella mannitolivorans</i> | AY264838 | | | X | X | |
| | <i>Uncultured Cytophagales</i> | AY136073 | | | | X | |
| | <i>Flavobacterium</i> sp | AF493646 | | | | X | |
| | | AF493641 | | | | X | |
| | <i>Flavobacterium limicola</i> | AB075231 | X | | | X | |
| | <i>Flavobacteriales bacterium</i> | AY275497 | | | | | X |
| | <i>Antartic bacterium</i> | AJ440977 | | | X | | |
| | <i>Uncltured bacteroidetes</i> | AJ318181 | X | | X | | |
| | <i>Bacteroidetes bacterium</i> | AJ622887 | | | X | X | |

La proporción de microorganismos de cada grupo aislados en los diferentes puntos de muestreo aparece en la Tabla 55.

Tabla 55. Porcentaje de microorganismos aislados en los diferentes puntos del sistema de circulación de la Central Nuclear de Cofrentes.

| Grupo Filogenético | Porcentaje de microorganismos aislados | | | | |
|--------------------------------|--|------|----------------------|---------------------|----------|
| | Agua río | N71 | N74-A001 Balsa Oeste | N74-A002 Balsa Este | N74-A005 |
| <i>Bacillus/Staphylococcus</i> | 29,2 | 50 | 25,5 | 32,9 | 10 |
| <i>α-Proteobacteria</i> | 8,3 | 10,7 | 8,5 | 5,1 | 10 |
| <i>β-Proteobacteria</i> | 12,5 | 3,6 | 23,4 | 21,5 | 50 |
| <i>γ-Proteobacteria</i> | 29,2 | – | 24,5 | 19 | – |
| <i>Actinomycetales</i> | 8,3 | – | – | 3,8 | – |
| <i>Deinococcus-Thermus</i> | 4,2 | 35,7 | 9,6 | 7,6 | – |
| <i>Bacteroidetes</i> | 8,3 | – | 8,5 | 10 | 30 |

En el agua de aporte se encuentran representados todos los grupos filogenéticos identificados en el estudio. En la **Figura 50** se presenta la relación filogenética entre los microorganismos aislados en los dos muestreos que se efectuaron en este punto.

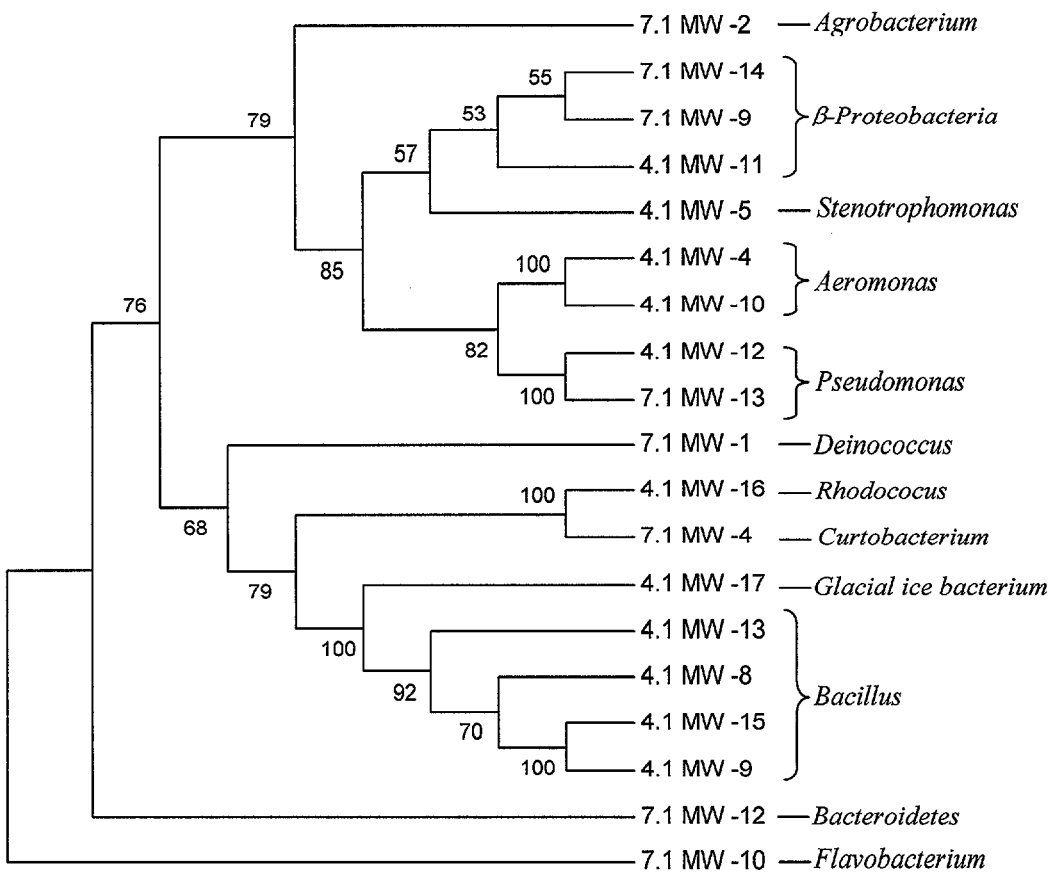


Figura 50. Árbol filogenético de los diversos microorganismos aislados en el agua de aporte a la CNC.

Uno de los microorganismos identificados en el muestreo 4 MW (4.1 MW-2) tuvo que ser eliminado del árbol porque la cantidad de pares de bases secuenciadas era insuficiente para incluirlo en el análisis filogenético. El género *Bacillus* del que se identificaron 6 UFC en el muestreo 4 MW no se detectó en el muestreo 7 MW, mientras que *Deinococcus*, y los grupos *Bacteroidetes* y α -*Proteobacteria* se detectaron en el muestreo 7 MW pero no en el 4 MW.

La relación filogenético de las bacterias identificadas en el punto N71 se muestra en la **Figura 51**.

Con un único muestreo, en este punto se identificaron 7 géneros diferentes estando representados todos los grupos filogenéticos excepto el de γ -*Proteobacteria*, *Actinomycetales* y *Bacteroidetes*.

En la Balsa Oeste se detectaron todos los grupos filogenéticos excepto el de los *Actinomycetales* (**Figura 52**). Uno de los microorganismos *D. grandis* (14.5 MW-9) fue eliminado del árbol filogenético por tener pocas pares de bases para ser incluido en el análisis. En el grupo de las β -*Proteobacteria* aparecen dos *Pseudomonas* (cuando este género pertenece al grupo de las γ -*Proteobacteria*). Este fenómeno se debe a una incorrecta identificación de ambas bacterias en la base de datos de NCBI. En este trabajo, a estos dos microorganismos se les ha mantenido el nombre de *Pseudomonas* pero se han considerado dentro del grupo de las β -*Proteobacteria* ya que el análisis filogenético las encuadra en este grupo.

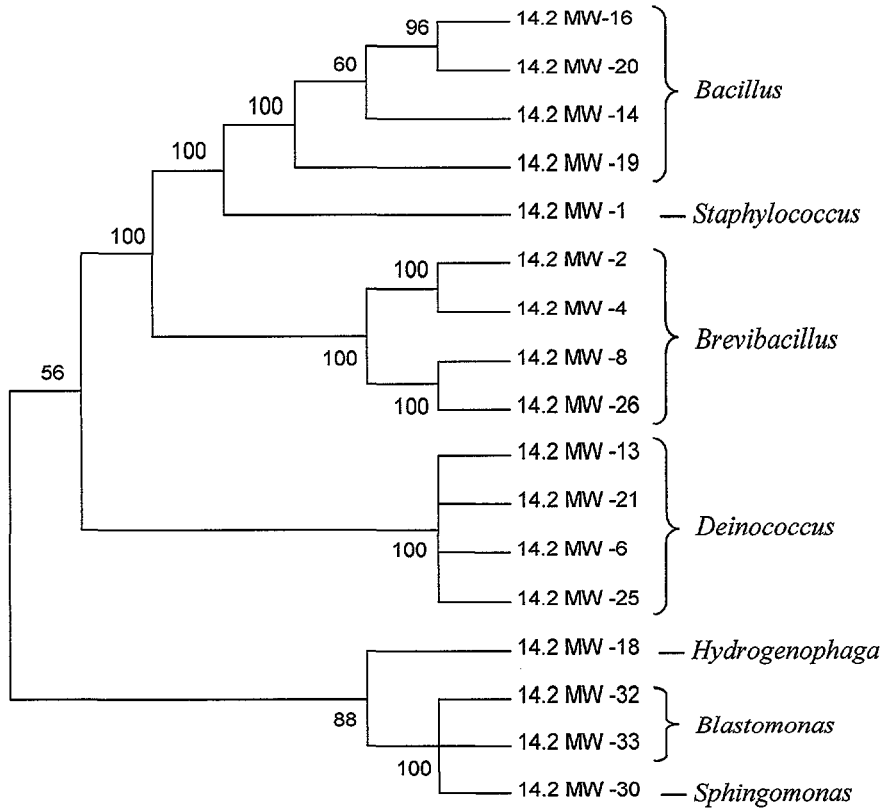


Figura 51. Árbol filogenético de los microorganismos aislados en el punto N71.

Todas las bacterias identificadas en la balsa vacía han aparecido también en la balsa en servicio, excepto el género *Paenibacillus*. Hay que tener en cuenta que en la balsa en servicio se han identificado además otros muchos géneros bacterianos que no aparecen en la balsa vacía puesto que en ella solo se efectuó un muestreo.

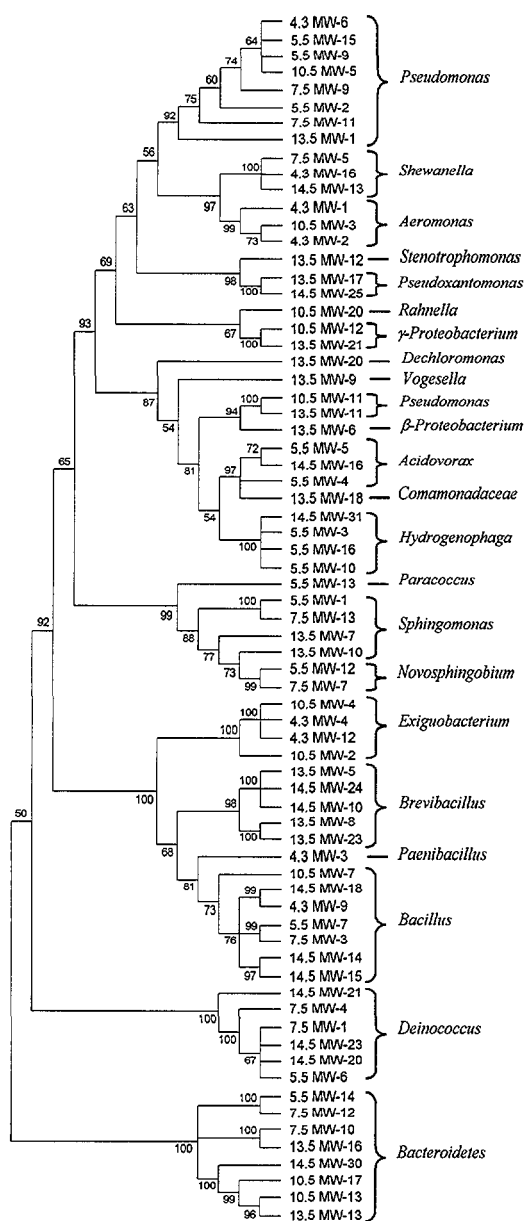


Figura 52. Árbol filogenético de los microorganismos aislados en la Balsa Oeste.

En los muestreos 10 MW y 13 MW, aunque aparecen varios microorganismos idénticos se observan diferencias en las bacterias aisladas a diferente altura de llenado de la balsa. Por un lado, esto podría atribuirse a las técnicas de cultivo, ya que el muestreo 10 MW tardó en ser procesado unos días y por ello algunos de los microorganismos no pudieron recuperarse de las placas de cultivo. Por otro, hay que considerar que en el muestreo 13 MW la Balsa Oeste ha recibido más cantidad de agua que le ha podido aportar variabilidad microbiana.

Al comparar los microorganismos identificados en los diferentes muestreos efectuados en la Balsa Oeste se aprecia que la mayor variabilidad se detecta durante el mes de Agosto, a pesar de que en ese mes los recuentos de cultivables fueron menores. En la primavera de 2003, donde se contaron más microorganismos cultivables fue, sin embargo, donde se detectaron menos géneros de bacterias diferentes. Queda mencionar que el grupo de las *β -Proteobacteria* no se detectó en el muestreo 7 MW, el de *α -Proteobacteria* no estuvo presente en el muestreo 14 MW y *Deinococcus* falta en los muestreos 10 MW a 13 MW.

Respecto a la Balsa Este, se identificaron 16 géneros diferentes cuyas relaciones filogenéticas se muestran en la **Figura 53**. Algunas de las secuencias tuvieron que ser eliminadas al efectuar el árbol filogenético debido a que las distancias evolutivas impedían aplicar el modelo Jukes-Cantor. Todos los grupos filogenéticos están presentes, incluido el de los *Actinomycetales* que no aparecía en la Balsa Oeste, aunque sólo se detectó un microorganismo durante el muestreo 8 MW.

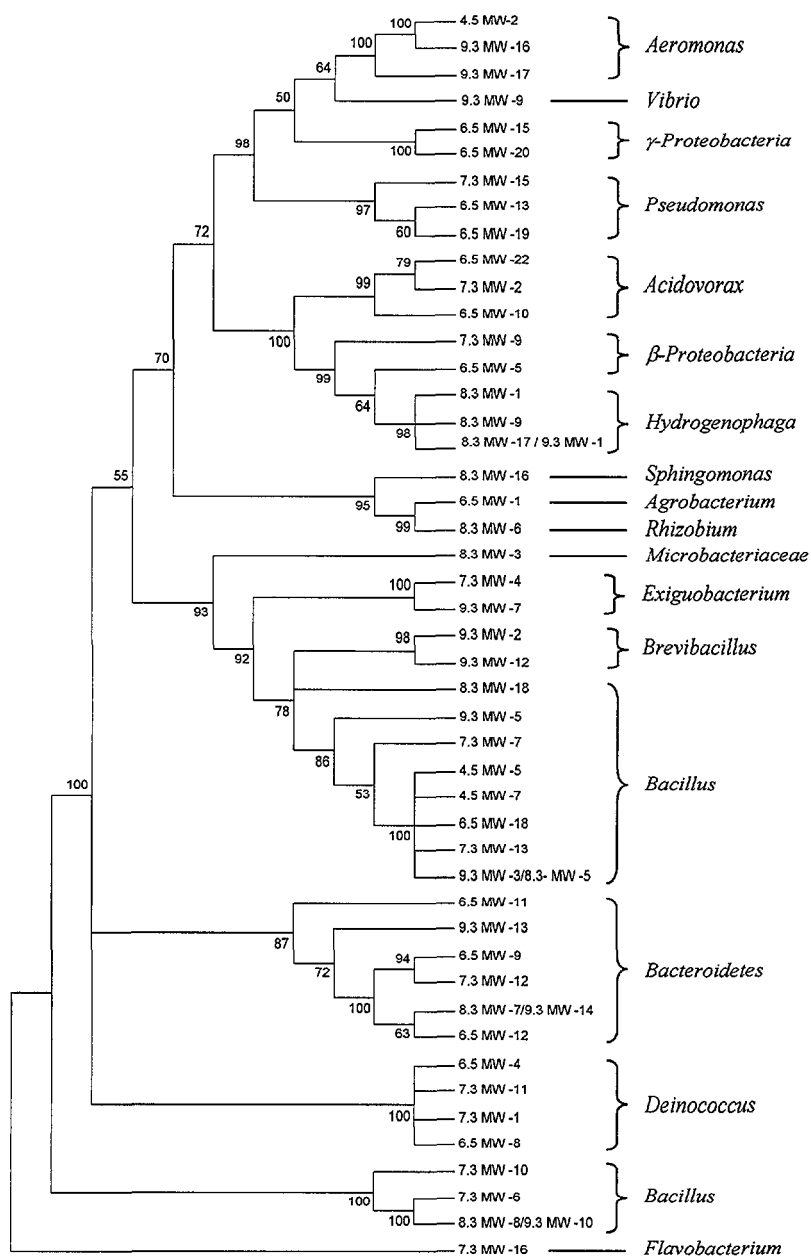


Figura 53. Árbol filogenético de los microorganismos aislados en la Balsa Este.

En el muestreo 4 MW sólo se identificaron 3 géneros diferentes por problemas durante el cultivo microbiano. Sin tener en cuenta este muestreo, los demás grupos filogenéticos están presentes en la balsa llena y fuera de servicio. Los muestreos 8 MW y 9 MW, que corresponden a la Balsa Este vacía, se realizaron en días consecutivos y puede apreciarse que hay diferencias en la composición de microorganismos, lo que puede ser atribuible a las limitaciones de las técnicas de cultivo mencionadas con anterioridad.

Por último, en el tanque de hormigón el recuento de microorganismos cultivables fue el más alto de todos los efectuados en este trabajo, pero sólo pudieron identificarse 4 géneros diferentes (**Figura 54**).

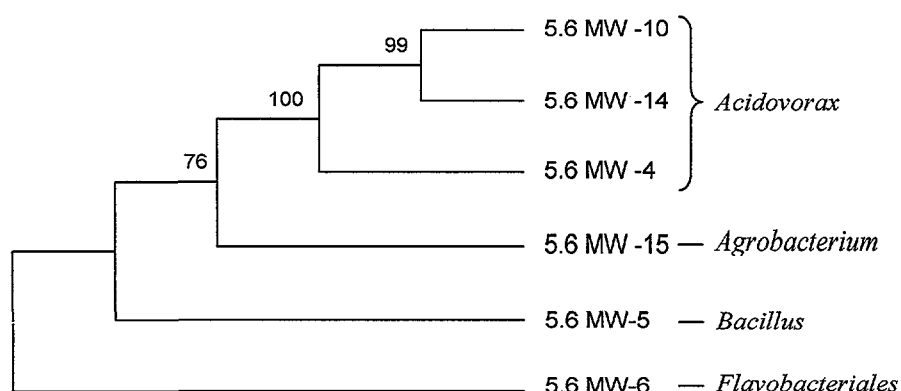


Figura 54. Árbol filogenético de los microorganismos aislados en el tanque de hormigón N74-AA005.

Si se tienen en cuenta los microorganismos identificados en todos los puntos de muestreo del sistema de circulación de agua de la Central, se aprecia que *Bacillus*

es el único que apareció en todos ellos. Los miembros de este género son bacilos, Gram-positivos, aerobios, quimioheterótrofos versátiles, capaces de utilizar una amplia gama de compuestos orgánicos simples, y mesófilos con temperaturas óptimas de crecimiento entre 30 °C y 45 °C. Gracias a su capacidad de formar esporas pueden resistir variaciones de las condiciones ambientales. En este sentido, se ha detectado en el agua del río Tinto en España, el cual tiene unas características bastante peculiares sobre todo respecto a pH y concentración de metales pesados que hacen que las poblaciones microbianas que lo componen sean muy diferentes a las encontradas en otros ríos considerados “normales” (López-Archilla y Amils, 1999).

Pseudomonas y *Deinococcus* se identificaron en todos los puntos excepto en el tanque de hormigón; el grupo *Bacteroidetes* se detectó a lo largo de todo el sistema menos en el punto N71. Como ya se ha mencionado, es necesario considerar que en estos dos puntos, el N71 y el tanque de hormigón, sólo se realizó el aislamiento de microorganismos cultivables en una ocasión por lo que no es extraño que muchas de las bacterias aisladas en otros puntos del sistema no estén presentes.

Todos los géneros microbianos identificados en el agua del río aparecen también en el agua de las balsas excepto los del grupo *Actinomycetales*, aunque en la Balsa Oeste se detectó un microorganismo distinto de este grupo filogenético. En las balsas aparecen además nuevos microorganismos procedentes de otros puntos del sistema de agua de circulación de la Central. Por ejemplo, los géneros *Exiguobacterium*, *Sphingomonas*, *Novosphingobium* y *Acidovorax*, están presentes en el agua de vertido pero no en el agua de aporte. Otros géneros que aparecen en las balsas como *Brevibacillus* e *Hydrogenophaga*, no se detectaron en el agua del río pero la causa de ello puede ser que en los muestreos en los que se detectaron estos microorganismos no se hicieron aislamientos en el agua de aporte.

En el muestreo 13 MW en la Balsa Oeste se identificó una cianobacteria, *Thermosynechococcus elongatus* con un 63,54% de homología con el microorganismo de número de acceso AP005375 en la base de datos del EMBL. Ni las técnicas de microscopía, ni la amplificación por PCR del agua del sistema de circulación de la Central con cebadores específicos de este grupo, permitieron la detección de estas bacterias en otra ocasión, a pesar de ser consideradas microorganismos frecuentes en aguas dulces (Prescott y cols., 1999; Nübel y cols., 2000).

El medio de cultivo *Postgate B*, utilizado para la detección de bacterias reductoras de sulfato, viró a color negro en todos los puntos del sistema de circulación de agua de la Central, lo que indica producción de sulfuro de hidrógeno y la posible presencia de estas bacterias. Sin embargo, mediante secuenciación no fue posible su detección y tan sólo se identificaron microorganismos del género *Clostridium* y uno relacionado con el filo *Bacteroidetes* (**Figura 55**), los cuales son capaces de generar sulfuro de hidrógeno a partir de compuestos del azufre pero no mediante reducción de sulfato. Estos microorganismos forman parte de la flora natural del tracto intestinal del ser humano y otros animales (Prescott y cols., 1999) por lo que su presencia en aguas es habitual y su capacidad de formar esporas hace que puedan tolerar condiciones ambientales extremas.

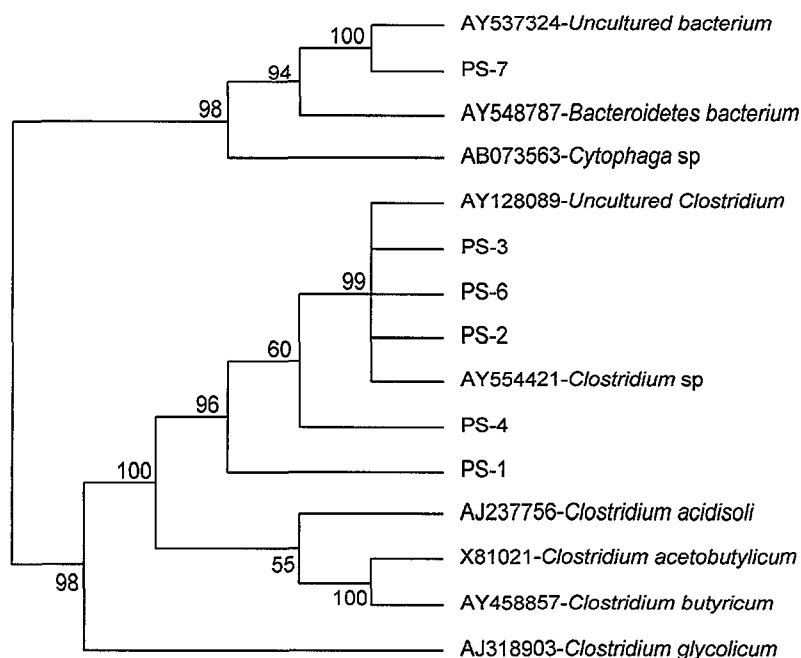


Figura 55. Árbol filogenético de los microorganismos aislados en *Postgate E*.

De todos los microorganismos que se han identificado en el agua de aporte de la CNC sólo 3 géneros, *Bacillus*, *Pseudomonas*, y *Stenotrophomonas*, se han aislado también en el agua de las piscinas de almacenamiento de combustible nuclear gastado de la misma central en estudios anteriores (Sarró, 2003; Chicote, 2004). Por el contrario, otros microorganismos que han aparecido con mucha frecuencia en el agua de estas piscinas como *Ralstonia*, *Nocardia* y *Burkholderia*, no se han detectado en ninguno de los puntos del sistema de circulación de la Central. Esto significa que en el agua de las piscinas de almacenamiento de combustible nuclear gastado se están

seleccionando aquellos microorganismos que reúnen las características adecuadas para tolerar las condiciones de radiactividad que se dan en ellas. Una curiosidad es que el género *Deinococcus*, que se ha detectado en todos los puntos analizados del sistema de agua de circulación de la Central no se ha encontrado en las piscinas de almacenamiento de combustible nuclear gastado. Este microorganismo Gram-positivo, aerobio, se ha aislado en multitud de ambientes como carne picada, heces, aire, suelo, agua dulce, etc. (Makarova y cols., 2001). Es extremadamente resistente a los efectos letales y mutagénicos de la radiación ionizante (Battista, 2000) debido a su capacidad de reparación del ADN, en cuyo mecanismo se encuentra implicada, entre otros mecanismos, una proteína Rec A excepcionalmente eficaz (Daly y cols., 1994).

Por otro lado, *Staphylococcus* y *Sphingomonas*, que se han aislado en las piscinas de almacenamiento de combustible nuclear gastado también se han detectado en las balsas de vertido, lo que implica su presencia en el sistema de refrigeración de la Central aunque no se hayan observado en el río.

5.4. CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS AMBIENTALES

La caracterización de poblaciones microbianas mediante el empleo de la PCR-DGGE es una técnica muy habitual en el estudio de muestras ambientales de distinta procedencia (Iwamoto y cols., 2000; Watanabe y cols., 2000; Jackson y cols., 2001b; Ogino y cols., 2001; Sekiguchi y cols., 2002; Crump y cols., 2003; Ercolini, 2004). Los patrones de bandas que se generan permiten detectar de forma rápida cambios en la estructura de la comunidad microbiana (Muyzer y cols., 1997; Casamayor y cols., 2000; Schäfer y cols., 2000) y variaciones en la composición de las poblaciones de unas muestras a otras.

La determinación de la diversidad de especies basándose exclusivamente en el número de bandas diferentes observadas en el gel de DGGE resulta complicado, puesto que hay muchas bacterias que presentan varias copias del gen 16S rRNA (Klappenbach y cols., 2000). Sin embargo, este criterio se ha utilizado previamente como una estimación de la riqueza de especies en sistemas acuáticos y terrestres (Van Hannen y cols., 1999; Zhou y cols., 2002; Feris y cols., 2003). Asimismo, la intensidad de las bandas de DGGE se ha empleado en estudios previos como una medida relativa de la densidad de población (Jackson y cols., 2001a; Mccaig y cols., 2001), aunque existen dudas al respecto debido a la influencia del desarrollo de la PCR en el número de bandas que pueden ser detectadas posteriormente en la DGGE (Becker y cols., 2000).

En la caracterización microbiológica de muestras ambientales muchos investigadores utilizan cebadores universales, mientras que otros se decantan por el uso de cebadores específicos del dominio *Bacteria* o *Archea* y otros, en cambio, aplican cebadores universales para amplificar el material genético total y posteriormente cebadores específicos de los diferentes grupos bacterianos de interés. En este trabajo se han empleado cebadores universales en un protocolo denominado *Seminested*-PCR para amplificar el material genético de las comunidades microbianas presentes en el sistema de circulación de agua de la Central Nuclear de Cofrentes. Como ya se comentó en el Apartado 3.8.2, de Materiales y Métodos, se emplearon varios pares de cebadores para comprobar cuales generaban mejores resultados. En función de las secuencias de los cebadores y las condiciones de temperatura en la rampa de la PCR la amplificación del material genético puede verse modificada (Suzuki y Giovannoni, 1996; Marchesi y cols., 1998; Chang y cols., 2000) y afectar a los resultados en la DGGE (Fox y cols., 1992; Ferris y Ward, 1997). Por ello tras utilizar diferentes protocolos de amplificación se llegó a la conclusión de que los

mejores resultados en el gel de DGGE se obtenían con los pares de cebadores 341 F//907 R y 341 F-GC//531 R, que ya han sido utilizados por otros autores en trabajos similares (Schäfer y cols., 2000; Watanabe y cols., 2001; Schabereiter-Gutner y cols., 2002).

También fue necesario poner a punto las condiciones de la DGGE y para ello se utilizaron diferentes gradientes desnaturalizantes en la elaboración del gel, y se probaron electroforesis a diferentes voltajes y con tiempos variables. En este caso se comprobó que se obtenían resultados bastante buenos en un periodo de tiempo no demasiado largo si se efectuaba la DGGE a 180 V durante 210 minutos con un gel de rango desnaturalizante 20%-60% en tampón TAE 0,5X.

Con las condiciones de PCR-DGGE establecidas se pudo efectuar la comparación de la comunidad microbiana de los diferentes puntos del sistema de circulación de agua de la CNC, así como a lo largo del periodo que duró el presente estudio.

En los muestreos 4 MW, 6 MW y 7 MW se efectuó la caracterización microbiana de las muestras de agua en diversos puntos del sistema. En la **Figura 44** puede observarse el muestreo 6 MW en el que se analizó el agua de aporte, el punto N71, la Balsa Este y el tanque de hormigón N74-AA004 que se encontraban en servicio. Cada punto de muestreo presenta un patrón característico con bandas exclusivas que sólo se detectan en dicho punto. Asimismo, aparecen bandas que se repiten en varios puntos de muestreo. Es el caso de algunas de las bandas que aparecen en el agua de aporte, que se encuentran también en el punto N71, en la balsa de vertidos y en el tanque de hormigón, lo cual es lógico dado que el agua que llega del río y sale de las torres de refrigeración llega a los tres puntos. De la misma manera algunas de las bandas que aparecen en el tanque de hormigón están presentes en la

balsa de vertidos, pues el agua de los tanques se libera a las balsas tras una serie de controles radioquímicos que ya se han mencionado.

Por otro lado, es necesario considerar que el sistema de refrigeración no es aséptico y está abierto a las condiciones ambientales del exterior. Además recibe una serie de tratamientos químicos y aportes de agua procedentes de otros sistemas de la Central que pueden afectar a la comunidad microbiana haciendo que aparezcan nuevos microorganismos o que se seleccionen o se inhiban otros, por lo que es normal que aparezcan bandas diferentes en cada punto.

Las semejanzas y diferencias en la comunidad microbiana del agua de aporte y de vertido de las balsas también puede apreciarse en los muestreos 4 MW (véase **Figura 44**) y 7 MW (véase **Figura 45**). En el Apartado 4.5.1, de Resultados, ya se comentaron las bandas que aparecían en común en el agua del río y la balsa que estaba en servicio, que en los tres casos vienen a ser unas 8 bandas. Además aparecen también bandas afines en el agua del río y la balsa que se encuentra fuera de servicio, lo cual no es extraño ya que, como se ha descrito previamente, gran parte del agua que llega a las balsas procede de las torres de refrigeración.

En el muestreo 5 MW (*Figura 44*) se compararon los patrones de bandas de la Balsa Oeste y el tanque de hormigón N74-AA005, ambos en servicio, y puede apreciarse de la misma manera que en el muestreo 6 MW, que aparecen bastantes bandas en común entre ambos puntos.

En los muestreos 8 MW y 9 MW se analizó el patrón de bandas de la Balsa Este fuera de servicio en dos días consecutivos (véase **Figura 45, A**). Ambos patrones son idénticos, no existiendo diferencias en la composición de la población microbiana de un día a otro. Sin embargo, mediante las técnicas de cultivo sí se observaron diferencias en las UFC identificadas los dos días, lo que pone de manifiesto lo que ya

se ha mencionado en varias ocasiones, es decir, las limitaciones de las técnicas tradicionales de cultivo en el estudio de las comunidades microbianas de muestras ambientales.

La evolución de la población microbiana durante el proceso de llenado de la Balsa Oeste se analizó en los muestreos 10 MW a 13 MW. En la **Figura 45 (B)** se puede apreciar que apenas existen variaciones en la composición de microorganismos, pues los patrones de bandas son prácticamente idénticos. Sólo se aprecia la aparición de dos bandas nuevas en los dos últimos días de llenado de la balsa. En este caso, las técnicas de cultivo permitieron detectar mayor número de bacterias diferentes en el muestreo 13 MW, cuando la balsa estaba totalmente llena, que en el 10 MW, cuando acababa de empezar a llenarse, por los problemas en la manipulación de las muestras de agua y los ya mencionados inconvenientes de las técnicas de cultivo.

En la CNC también se analizó la evolución de la población a lo largo del estudio en los diferentes puntos del sistema de circulación de agua para ver si existía estacionalidad. En ambientes acuáticos, como ríos y lagos, se han descrito patrones estacionales en la estructura de la comunidad microbiana (Leff y cols., 1998; Pernthaler y cols., 1998; Sekiguchi y cols., 2002) y se ha observado que aunque la abundancia total de células bacterianas se mantiene más o menos constante a lo largo del año, los diferentes grupos filogenéticos presentes muestran variaciones (Glöckner y cols., 1999; Glöckner y cols., 2000; Brumer y cols., 2000; Feris y cols., 2003). Así, Bano y Hollibaugh (2002) detectaron que el grupo de γ -*Proteobacteria* era más abundante en invierno que en verano y que el género *Cytophaga* sólo se encontraba presente en verano.

En el agua de aporte puede observarse que hay una variación importante en la composición microbiana a lo largo del tiempo, pues los patrones de bandas son bastante diferentes (véase **Figura 46**) a pesar de que existen algunas bandas comunes.

Sin embargo, el número de bandas de los tres patrones no varía prácticamente por lo que la riqueza de la población puede ser considerada similar.

En el caso de los tanques de hormigón, cada muestreo se efectuó en un tanque diferente (**Figura 47**). Teniendo en cuenta el número de bandas, se puede decir que la población microbiana de los tres tanques es muy parecida puesto que aparecen muchas bandas en común y que el tanque N74-AA005 es donde aparece mayor complejidad bacteriana. Las técnicas de dilución y siembra en placa de cultivo permitieron detectar 9 patrones de bandas diferentes en este mismo tanque aunque sólo pudieron identificarse 6 bacterias diferentes, mientras que la caracterización ambiental por PCR-DGGE ha puesto de manifiesto la presencia de 14 bandas que podrían representar microorganismos diferentes.

Las balsas de vertido se muestran en las **Figuras 48 y 49**. Tanto en un caso como en otro, la mayor riqueza de especies microbianas se aprecia cuando las balsas se encuentran en servicio, apareciendo mayor número de bandas en el gel que cuando están vacías. Los patrones de bandas son bastante diferentes según el estado en que se encuentre la balsa, aunque existen bandas comunes dentro de cada balsa e independientemente de si están llenas o fuera de servicio, lo que implica que hay una parte de la población que se mantiene constante a lo largo del tiempo. También hay diferencias dentro de cada balsa según el estado en que se encuentren. Así, la balsa Este llena presenta patrones muy diferentes en los muestreos efectuados durante Septiembre de 2002 y Febrero de 2003 aunque el número de bandas en el gel es idéntico y lo mismo sucede en Mayo y Junio de 2003 cuando la balsa estaba vacía. En la Balsa Oeste la mayoría de los muestreos se efectuaron en servicio. El patrón de bandas del agua de esta balsa cuando está llena es muy similar en los muestreos de Noviembre de 2002 y Mayo de 2003, apareciendo un grupo de bandas comunes que tienen su homólogo en el muestreo de Agosto de 2003 (véase **Figura 49**). En este

último muestreo fue donde se apreció mayor complejidad bacteriana al igual que sucedía en la identificación de microorganismos cultivables, a pesar de que fue cuando los recuentos de totales y de cultivables fueron más bajos.

Si comparamos unos puntos con otros se puede apreciar que la riqueza de especies en el agua del río y en la de vertido es muy similar, apareciendo de 18 a 20 bandas diferentes, mientras que en los tanques de hormigón es donde se observan menor cantidad de especies distintas.

Las bandas más representativas del gel de DGGE se cortaron y se reamplificaron para ser identificadas, pero ninguna banda produjo secuencias que pudieran ser utilizadas de forma satisfactoria en el NCBI. Aunque algunos autores han puesto de manifiesto la utilidad de esta técnica (Ferris y cols., 1996; Ogino y cols., 2001), en la mayoría de los casos se producen secuencias ambiguas imposibles de ser identificadas (Chang y cols., 2000; Benlloch y cols., 2002). Además, los fragmentos de ADN procedentes de las bandas representan unas 160 pb, lo cual puede proporcionar información a nivel de género pero nunca a nivel de especie.

La incapacidad de secuenciar el ADN de las bandas del gel DGGE hizo imposible la comparación de las comunidades microbianas de unos muestreos con respecto a otros y también de un mismo muestreo a lo largo del tiempo. Por ello no pudo determinarse la existencia o no de relaciones entre la aparición de los afloramientos de algas filamentosas y diatomeas con los grupos bacterianos presentes en el sistema de refrigeración de la Central.

Algunos autores han puesto de manifiesto que cuando se produce un *bloom* tienen lugar cambios en la cantidad y disponibilidad de la materia orgánica, que se pueden reflejar en cambios en la abundancia bacteriana (Smith y cols., 1995; Bratbak y cols., 1998; Li y Dickie, 2001). Estos cambios en el número de células microbianas

pueden ocurrir sin que se produzcan variaciones en la composición filogenética de la comunidad microbiana (Höfle y cols., 1999; Schauer y cols., 2000; Riemann y Middelboe, 2002; Larsen y cols., 2004), o ser el resultado de una sucesión en la población con bacterias con diferentes capacidades metabólicas en los distintos estadios del *bloom* que pueden ser detectados en los patrones de bandas de DGGE (Middelboe y cols., 1995; Acinas y cols., 1999). En este sentido, Riemann y cols. (2000) y Riemann y Winding (2001), observaron un predominio del grupo α -*Proteobacteria* y *Cytophagales* después de un *bloom* de diatomeas que se reflejó en el patrón de bandas de la DGGE. Por su parte Yager y cols. (2001) estudiaron los cambios que tenían lugar en la estructura de la comunidad microbiana con respecto a la aparición de un *bloom* de algas en primavera, observando que el grupo de α -*Proteobacteria* aparecía en los primeros estadios del *bloom* y desaparecía durante su apogeo, mientras que *Cytophaga* estaba presente durante el desarrollo máximo del *bloom*.

En la última parte del estudio se decidió poner a punto las técnicas de clonaje para tratar de identificar las bacterias “no cultivables” presentes en las muestras de agua del sistema de circulación de la Central y establecer las relaciones filogenéticas oportunas.

Al no ser uno de los objetivos del presente estudio y debido a que las técnicas de clonaje son caras y requieren mucho tiempo no han podido incluirse resultados en esta tesis doctoral, quedando pendiente como parte de los objetivos a desarrollar en un futuro próximo.

6. CONCLUSIONES

1. Las características físico-químicas del agua de aporte a la Central Nuclear de Cofrentes son diferentes a las del agua de vertido, debido fundamentalmente a la evaporación que se produce en las torres de enfriamiento. Sin embargo, el agua de vertido tiene escaso efecto sobre el medio receptor, ya que el caudal del río es capaz de diluir los aportes efectuados desde la Central. Además, los vertidos cumplen con la legislación vigente por lo que pueden ser liberados al río.
2. El número total de microorganismos encontrados en el sistema de circulación de la Central (10^6 microorganismos·mL⁻¹) está en concordancia con los referenciados por otros autores en aguas dulces, y no muestra diferencias importantes a lo largo del sistema de circulación de agua de la Central, ni en función de la época del año.

3. Del total de microorganismos presentes en las muestras de agua sólo un pequeño porcentaje puede ser detectado en los medios de cultivo, siendo el medio TSA el que permite el aislamiento de mayor número de UFC diferentes en el agua de la Central.
4. Las técnicas de recuento por dilución y siembra en placa ponen de manifiesto las limitaciones de las técnicas tradicionales de cultivo en el estudio de la comunidad microbiana del agua del sistema de circulación de agua de la Central Nuclear de Cofrentes.
5. En el agua del sistema de circulación de la Central se han identificado diferentes microorganismos pertenecientes a varios grupos filogenéticos: α -, β -, y γ -*Proteobacteria*, *Bacillus-Staphylococcus*, *Actinomycetales*, *Deinococcus-Thermus*, y *Bacteroidetes*. Los más abundantes en términos de cantidad y de especies diferentes han sido *Bacillus-Staphylococcus*, γ -*Proteobacteria* y β -*Proteobacteria*. Entre los microorganismos aislados han aparecido bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, siendo estas últimas un poco más abundantes.
6. La composición de la población de bacterias cultivables varía entre puntos de muestreo, así como de unos muestreos a otros. *Bacillus* es el único género que se presenta en todos los puntos de muestreo.
7. Todos los géneros microbianos identificados en el agua del río aparecen también en el agua de las balsas, excepto los del grupo *Actinomycetales*. En las balsas de vertido aparecen además microorganismos procedentes de otros puntos del sistema de agua de circulación de la Central.
8. En las balsas de vertidos se han encontrado los mismos géneros bacterianos cuando están llenas y fuera de servicio.

9. La utilización de la PCR-DGGE ha permitido la caracterización de la población microbiana del agua del sistema de refrigeración de la Central, siendo los pares de cebadores 341 F//907 R y 341 F-GC//531 R los seleccionados para llevar a cabo tal proceso.
10. La PCR-DGGE ha permitido poner de manifiesto que cada punto de muestreo presenta un patrón de bandas característico representativo de la comunidad bacteriana que hay en el agua. Estos patrones de bandas muestran diferencias a lo largo del sistema de circulación de la Central Nuclear de Cofrentes, así como en función de la época en que se efectúen los análisis.
11. La riqueza de especies, dada por el número de bandas en la DGGE, es muy similar en el agua de aporte y de vertido, aunque no correspondan a los mismos microorganismos. En el tanque de hormigón es donde se detectan menor número de especies distintas.
12. En las balsas de vertido, la mayor diversidad bacteriana se observa cuando se encuentran en servicio.
13. Los afloramientos de algas filamentosas que se producen en las balsas de vertido en primavera podrían estar asociados al descenso en la concentración de cobre en el agua tras la sustitución del condensador principal en la Central.
14. No se ha podido establecer relaciones entre la aparición de los afloramientos de algas filamentosas y diatomeas con los grupos bacterianos presentes en el sistema de refrigeración de la Central por la incapacidad de secuenciar las bandas del gel de DGGE.

Conclusiones

15. Es necesario llevar a cabo técnicas de clonaje, que permitan llevar a cabo el establecimiento de estas relaciones.

7. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS

Como se ha comentado previamente, la dificultad en la secuenciación del ADN de las bandas del gel de DGGE ha provocado que se busquen otras alternativas para la identificación de las comunidades microbianas del agua. Por ello, durante las últimas fases del estudio se han estado poniendo a punto técnicas de clonaje, que permitirán la identificación de las bandas más representativas de los geles de DGGE. Así, podrán establecerse relaciones filogenéticas entre los miembros de la comunidad bacteriana presente en los distintos puntos del sistema de circulación, así como a lo largo del transcurso del tiempo. Con ello se pretende buscar una asociación entre la aparición de *blooms* de algas y los grupos filogenéticos presentes en el agua del sistema. De esta manera podría preverse la formación de afloramientos masivos de microorganismos, proponiendo el tratamiento del sistema antes de su aparición, lo que evitaría peligros potenciales para el sistema y para el medio ambiente además de suponer un abaratamiento en los tratamientos.

Además de la DGGE y del clonaje y secuenciación de fragmentos amplificados del 16S rRNA, otra técnica bastante frecuente en la caracterización de muestras ambientales es la hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH), que además de la identificación de los microorganismos permite la cuantificación de su abundancia. Pero todas estas técnicas son laboriosas y el número de muestras para las que se obtienen resultados cuantitativos queda bastante reducido. Estas limitaciones se pueden superar, al menos parcialmente, con el uso de microarrays para la detección del 16S rRNA o sus genes. Los microarrays constituyen la última línea de técnicas basadas en la interacción de cadenas complementarias de ADN. Consisten básicamente en una matriz de “pocillos” donde se colocan determinados fragmentos de ADN de cadena sencilla (sondas de ADN). A continuación se ponen en contacto con la muestra de ADN problema, en forma de cadena sencilla y previamente marcada con fluorocromos, para que hibride con aquellas sondas que sean complementarias. Dado que se conoce la posición y la identidad de cada una de las sondas, se puede saber cuáles de ellas están presentes en la muestra. Actualmente, los microarrays están siendo implementados en la caracterización de poblaciones microbianas y la detección de ciertos microorganismos en muestras complejas. Esta técnica podría desarrollarse para la caracterización microbiana de las muestras de agua del sistema de circulación de la CNC. En el diseño de estos microarrays se tendrían en cuenta los resultados obtenidos a partir de las técnicas de cultivo y la información existente a partir de bibliografía sobre poblaciones microbianas en ambientes similares. Sobre un soporte adecuado se fijarían las sondas seleccionadas, representativas de los grupos microbianos prioritarios, y se pondrían en contacto con el RNA de las muestras del agua del sistema de circulación de la CNC, que habría sido extraído, purificado y marcado con fluorocromos (Cy3 y Cy5) para que hibridasen. Posteriormente se evaluaría cualitativa y cuantitativamente la fluorescencia mediante el empleo de un escáner.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. ABI Prism 310 Genetic Analyzer User's Manual. (1998) PE Applied Biosystems.
2. Acinas, S.G.; Antón, J.; Rodríguez-Valera, F. (1999) Diversity of free-living and attached bacteria in offshore western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:514-522.
3. Adams, B.L.; Bates, T.C.; Oliver, J.D. (2003) Survival of *Helicobacter pylori* in a natural freshwater environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 7462-7466.
4. Aksu, Z.; Kutsal, T. (1998) Determination of kinetics parameters in the biosorption of copper (II) on *Cladophora* sp., in a packed bed column reactor. *Process in Biochemistry*, 33: 7-13.
5. Amann, R.I.; Binder, B.J.; Olsen, R.J.; Chisholm, S.W.; Devereux, R.; Stahl, D. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analysing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 56:1919-1925.

6. Amann, R.I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59:143-169.
7. Amann, R.I.; Zarda, B.; Stahl, D.A.; Schleifer, K.H. (1992) Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 58:3007-3011.
8. Arana, I.; Muela, A.; Iriberry, J.; Egea, L.; Barcina, I. (1992) Role of hydrogen peroxide in loss of culturability mediated by visible light in *Escherichia coli* in freshwater ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, 58:3903-3907.
9. Araya, R.; Tani, K.; Takagi, T.; Yamaguchi, N.; Nasu, M. (2003) Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescence in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 43:111-119.
10. Arhonditsis, G.; Brett, M.T.; Frodge, J. (2003) Environmental control and limnological impacts of a large recurrent spring bloom in Lake Washington, USA. *Environmental Management*, 31:603-618.
11. Atlas, R.M.; Bartha, R. (2002) Los microorganismos en sus hábitats naturales: microbiología del aire, del agua y del suelo. En: *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. 4ª Edición, Pearson Educación, S.A., Madrid, pp 329-380.
12. AWWA-APHA-WEF. (1998) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th edition. American Public Health Association, Washington D.C.
13. Awong, J.; Bitton, G.; Chaudhry, G.R. (1990) Microcosms for assessing survival of genetically engineered microorganisms in aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 56:977-983.
14. Baeza, A.; Brogueira, A.M.; Carreiro, M.C.V.; García, E.; Gil, J.M.; Miró, C.; Sequeiro, M.M.; Teixeira, M.R. (2001) Spatial and temporal evolution of the levels of tritium in the Tagus River in its passage through Cáceres (Spain) and the Alentejo (Portugal). *Water Research*, 35:705-714.
15. Baeza, A.; del Río, M.; Miró, C.; Paniagua, J. (1991) Radiological impact of the Almaraz Nuclear Power Plant (SPAIN) during 1986-1989 on the surrounding environment. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 152:175.

16. Bamber, R.N.; Seaby, R.M. (2004) The effects of power station entrainment passage on three species of marine planktonic crustacean, *Acartia tonsa* (Copepoda), *Cragnon cragnon* (Decapoda) and *Homarus gammarus* (Decapoda). *Marine Environmental Research*, 57:281-294.
17. Bano, N.; Hollibaugh, J.T. (2002) Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Artic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:505-518.
18. Barcina, I.; Arana, I.; Fernández-Astorga, A.; Iriberry, J.; Egea, L. (1992) Survival strategies of plasmid-carrier and plasmidless *Escherichia coli* strains under illuminated and non-illuminated conditions in a fresh water ecosystem. *Journal of Applied Bacteriology*, 73:229-236.
19. Barcina, I.; Arana, I.; Iriberry, J.; Egea, L. (1986) Influence of light and natural microbiota of the Butrino River on *Escherichia coli* survival. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 52:555-566.
20. Barcina, I.; Ayo, B.; Muela, A.; Egea, L.; Iriberry, J. (1991) Predation rates of flagellate and ciliated protozoa on bacterioplankton in a river. *FEMS Microbiology Ecology*, 85:141-150.
21. Barcina, I.; Lebaron, P.; Vives-Rego, J. (1997) Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach. *FEMS Microbiology Ecology*, 23:1-9.
22. Barnthouse, L.W. (2000) Impacts of power-plant cooling systems on estuarine fish populations: the Hudson River after 25 years. *Environmental Science & Policy*, 3 Suppl. 1:341-348.
23. Battista, J.R. (2000) Radiation resistance: The fragments that remain. *Current Biology*, 10: 204-205.
24. Becker, S.; Boger, P.; Oehlmann, R. Ernst, A. (2000) PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative Taq nuclease assays in analyses of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:4945-4953.
25. Benlloch, S.; López-López, A.; Casamayor, E.O.; Ovreas, L.; Goddard, V.; Daae, F.L.; Thingstad, F.; Pedrós-Alió, C.; Rodríguez-Valera, F. (2002) Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environmental Microbiology*, 4:349-360.

26. Bernard, L.; Courties, C.; Duperray, C.; Schafer, H.; Muyzer, G.; Lebaron, P. (2001) A new approach to determine the genetic diversity of viable and active bacteria in aquatic ecosystems. *Cytometry*, 43:314-321.
27. BOE (1989) Orden Ministerial del 13 de Octubre de 1989 del Ministerio de Obras Públicas y Urbanismo sobre Métodos de Caracterización de Residuos Tóxicos y Peligrosos. 10 Noviembre 1989, BOE núm. 270.
28. BOE (1986) Real Decreto 849/1986, de 11 Abril, por el que se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico. 30 de Abril 1986, BOE núm. 103.
29. Boulos, L.; Prévost, M.; Barbeau, B.; Coallier, J.; Desjardins, R. (1999) LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiology Methods*, 37:77-86.
30. Bowman, J.P.; McCuaig, R.D. (2003) Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:2463-2483.
31. Bratbak, G.; Jacobsen, A.; Heldal, M. (1998) Viral lysis of *Phaeocystis pouchetii* and bacterial secondary production. *Aquatic Microbial Ecology*, 16:11-16.
32. Brumer, I.H.M.; Fehr, W.; Wagner-Dobler, I. (2000) Biofilm community structure in polluted rivers: abundance of dominant phylogenetic groups over a complete annual cycle. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:3078-3082.
33. Casamayor, E.O.; Schäfer, H.; Bañeras, L.; Pedrós-Alió, C.; Muyzer, G. (2000) Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:499-508.
34. Cavigelli, M.A.; Robertson, G.P.; Klug, M.J. (1995) Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as measures of soil microbial community structure. *Plant and Soil*, 70:99-113.
35. Chandler, D.P.; Brockman, F.J.; Fredrickson, J.K. (1997) Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. *Molecular Ecology*, 6:475-482

36. Chang, Y.-J.; Stephen, J.R.; Richter, A.P.; Venosa, A.D.; Brüggemann, J.; Macnaughton, S.J.; Kowalchuk, G.A.; Haines, J.R.; Kline, E.; White, D.C. (2000) Phylogenetic analysis of aerobic freshwater and marine enrichment cultures efficient in hydrocarbon degradation: effect of profiling method. *Journal of Microbiological Methods*, 40:19-31.
37. Chao, W.L.; Feng, R.L. (1990) Survival of genetically engineered *Escherichia coli* in natural soil and river water. *Journal of Applied Bacteriology*, 68:319-325.
38. Characklis, W.G.; Marshall, K.C. (1990) Biofilms. En: Characklis, W.G.; Marshall, K.C. (Eds.), *Biofilms: A Basis for an Interdisciplinary Approach*, Wiley Interscience, pp. 3-15.
39. Chen, C.; Shi, P.; Mao, Q. (2003) Application of remote sensing techniques for monitoring the thermal pollution of cooling-water discharge from nuclear power plant. *Journal of Environmental Sciences and Health Part A – Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 38:1659-1668.
40. Chen, H.; Ponía, G.; Salonen, N.; Blum, P. (2004) Culture-independent analysis of fecal enterobacteria in environmental samples by single-cell mRNA profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:4432-4439.
41. Chen, S.; Wilson D.B. (1997) Construction and characterization of *Escherichia coli* genetically engineered for bioremediation of Hg²⁺-contaminated environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:2442-2445.
42. Chicote, E (2004) Análisis microbiológico de aguas radiactivas oligotróficas y bioensuciamiento en piscinas nucleares. Tesis Doctoral, ETSI Industriales, UPM, Madrid, España.
43. Christensen, H.; Hansen, M.; Sorensen, J. (1999) Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence in situ hybridization with an rRNA oligonucleotide probe. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:1753-1761.
44. Cloete, T.E.; De Bruyn, E.E. (1995) The dominant sulphide-producing bacteria, isolated from industrial cooling-water systems. En: Boucher, A.; Chandra, M.; Edyvean, E. (Eds.) *Biodeterioration and Biodegradation*, Institution of Chemical Engineers. Warwickshire, pp. 507-511.

45. Cloete, T.E.; Muyima, N.Y.O. (1997) Microbial community analysis: the key to the design of biological wastewater treatment systems. International Association on Water Quality. Scientific and Technical Report No. 5.
46. Colwell, R.R.; Grimes, D.J. (2000) Nonculturable microorganisms in the environment. ASM Press, Washington DC, USA.
47. Costerton, J.W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D.E.; Korber, D.R.; Lappin-Scott, H.M. (1995) Microbial biofilms. Annual Review Microbiology, 49:71-745.
48. Crump, B.C.; Kling, G.W.; Bahar, M.; Hobbie, J.E. (2003) Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. Applied and Environmental Microbiology, 69:2253-2268.
49. Daly, M.J.; Ouyang L.; Fuchs P.; Minton K.W. (1994) In vivo damage and rec A-dependent repair of plasmid and chromosomal DNA in the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. Journal of Bacteriology, 176:3508-3517.
50. Degrange, V.; Bardin, R. (1995) Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR. Applied and Environmental Microbiology, 61:2093-2098.
51. DeLong, E.F.; Taylor, L.T.; Marsh, T.L.; Preston, C.M. (1999) Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescence in situ hybridization. Applied and Environmental Microbiology, 65:5554-5563.
52. DeLong, E.F.; Wickham, G.S.; Pace, N.R. (1989) Phylogenetic stains: Ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. Science, 243:1360-1363.
53. Dieffenbach, C.W.; Lowe, T.M.; Dveksler, G.S. (1993) General concepts for PCR primer design. PCR Methods and Applications, 3: 30-37.
54. Dodds, W.K.; Gudder, D.A. (1992) The ecology of *Cladophora*. Journal of Phycology, 28:415-427.
55. Doty, P.; Marmur, J.; Eigner, J.; Schildkraut, C. (1960) Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: physical chemical studies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 46:461-476.

56. Ehrler, C.P.; Steinbeck, J.R.; Laman, E.A.; Hedgepeth, J.B.; Skalski, J.R.; Mayer, D.L. (2002) A process for evaluating adverse environmental impacts by cooling-water system entrainment at a California power plant. *Scientific World Journal*, 2 Suppl., 1:81-105.
57. Eichner, C.A.; Erb, R.W.; Timmis, K.N.; Wagner-Dobler, I. (1999) Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:102-109.
58. Ercolini, D. (2004) PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for determination of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 56:297-314.
59. Erga, S.R.; Heimdal, R. (1984) Ecological studies on the phytoplankton of Korsfjorden, western Norway. The dynamics of a spring bloom seen in relation to hydrographical conditions and light regime. *Journal of Plankton Research*, 6:67-90.
60. European Commission. (2003) The EU-US Scientific Initiative on Harmful Algal Blooms. Workshop Report. EUR 20578.
61. Evdokimova, N.V.; Dorofeev, A.G.; Panikov, N.S. (1994) Dynamics of survival and transition to dormant state of nitrogen-starving bacteria *Pseudomonas fluorescens*. *Mikrobiologiya*, 63:99-104.
62. Farrelly, V.; Rainey, F.A.; Stackebrandt, E. (1995). Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:2798-2801.
63. Federle, T.W. (1986) Microbial distribution in soil – new techniques. En: Megusar, F.; Gantar, M. (Eds.), *Perspectives in Microbial Ecology*. Ljubljana: Slovene Society for Microbiology, pp. 493-498.
64. Felske, A.; Engelen, B.; Nübel, U.; Backhaus, H. (1996) Direct ribosomal isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:4162-4167.
65. Feris, K.P.; Ramsey, P.W.; Frazar, C.; Rillig, M.C.; Gannon, J.E.; Holben, W.E. (2003) Structure and seasonal dynamics of Hyporheic zone microbial communities in free-stone rivers of western United States. *Microbial Ecology*, 46:200-215.

66. Ferris, M.J.; Nold, S.C.; Revsbech, N.P.; Ward, D.M. (1997) Population structure and physiological changes within a hot spring microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:340-346.
67. Ferris, M.J.; Ward, D.M. (1997) Seasonal distribution of dominant 16S rRNA-defined population in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:1375-1381.
68. Ferris, M.J.; Muyzer, G.; Ward, D.M. (1996) Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S RNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:340-346.
69. Fischer, S.; Lerman, L. (1983) DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(6):1579-1583.
70. Fox, G.E.; Wisotzkey, J.D.; Jurtschuk, P. (1992) How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42:166-170.
71. Fuchs, B.; Zobkov, M.V.; Sahm, K.; Burkill, P.H.; Amann, R. (2000) Changes in community composition during dilution cultures of marine bacterioplankton as assessed by flow cytometric and molecular biological techniques. *Environmental Microbiology*, 2:191-201.
72. Gich, F.B.; Amer, E.; Figueras, J.B.; Abella, C.A.; Balaguer, M.D.; Poch, M. (2000) Assessment of microbial community structure changes by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *International Microbiology*, 3:103-106.
73. Glöckner, F.O.; Fuschs, B.M.; Amann, R. (1999) Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:3721-3726.
74. Glöckner, F.O.; Zaichikov, E.; Belkova, N.; Denissova, L.; Pernthaler, J.; Pernthaler, A.; 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.

75. González, J.M.; Iriberry, I.; Egea, L.; Barcina, I. (1990) Differential rates of digestion of bacteria by freshwater and marine phagotrophic protozoa. *Applied and Environmental Microbiology*, 56:1851-1857.
76. Grant, W.D.; Long, P.E. (1989) El Medio Acuático. En: *Microbiología Ambiental*. Acribia, S.A., Zaragoza, España, pp37-52.
77. Grattard, F.; Gaudin, O.G.; Pozzetto, B.; Ros, A.; Mbida, A.D. (1993) Genotypic homogeneity of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* O12 strains demonstrated by analysis of protein profiles, DNA fingerprints and rRNA gene restriction patterns. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12:57-61.
78. Gutner, C.; Heyrman, J.; Piñar, G.; Lubitz, W.; Swings, J.; Rölleke, S. (2000) Comparative analyses of the bacterial diversity on two different biodeteriorated wall paintings by DGGE and 16S rDNA sequence analysis. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 46:229-239.
79. Hansen, M.C.; Tolker-Nielsen, T.T.; Givskov, M.; Molin, S. (1998) Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiology Ecology*, 26:141-149.
80. Hashimoto, S.; Ozaki, A. (1999). Whole microbial cell processes for manufacturing amino acids, vitamins or ribonucleotides. *Current Opinion in Biotechnology*, 10:604-608.
81. Head, I.M.; Saunders, J.R.; Pickup, R.W. (1998) Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, 35:1-21
82. Hiorns, W.D.; Methé, B.A.; Nierzwicki-Bauer, S.A.; Zehr, J.P. (1997) Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:2957-2960.
83. Höfle, M.G.; Haas, H.; Dominio, K. (1999) Seasonal dynamics of bacterioplankton community structure in an eutrophic lake as determined by 5S rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:3164-3174.
84. Howard, B.J.; Wright, S.M.; Salbu, B.; Skuterud, K.L.; Hove, K.; Loe, R. (2004) Long-term consequences for Northern Norway of a hypothetical release from the Kola nuclear power plant. *Science on the Total Environment*, 327:53-68.

85. Hugenholtz, P.; Goebel, B.M.; Pace, N.R. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 180:4765-4774.
86. IBERDROLA, S.A. (1994) El Medio Ambiente y la Central Nuclear de Cofrentes. Depósito Legal: V-3799-1994.
87. Innis, M.A.; Myambo, K.B.; Gelfand, D.H.; Brow, M.A. (1988) DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85:9436-9440.
88. Iriberry, J.; Azua, I.; Labirua-Iturburu, A.; Artolozaga, I.; Barcina, I. (1994) Differential elimination of enteric bacteria by protist in a fresh water system. *Journal of Applied Bacteriology*, 77:476-483.
89. Iwamoto, T.; Tani, K.; Nakamura, K.; Suzuki, Y.; Kitagawa, M.; Eguchi, M.; Nasu, M. (2000) Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, 32:129-141.
90. Jackson, C.R.; Churchill, P.F.; Roden, E.E. (2001a) Successional changes in bacterial assemblage structure during epilithic biofilm development. *Ecology*, 82:555-566.
91. Jackson, C.R.; Langner, H.W.; Donahoe-Christiansen, J.; Inskeep, W.P.; McDermott, T.R. (2001b) Molecular analysis of microbial community structure in an arsenite-oxidizing acidic thermal spring. *Environmental Microbiology*, 3:532-542.
92. Jensen, S.; Ovreas, L.; Daae, F.L.; Torsvik, V. (1998). Diversity in methane enrichments from agricultural soil reveals by DGGE separation of PCR amplified 16S rDNA fragments. *FEMS Microbiology Ecology*, 26: 7-26.
93. Joachimsthal, E.L.; Ivanoy, V.; Tay, J.-H.; Tay, S. T.-L. (2003) Flow cytometry and conventional enumeration of microorganisms in ships ballast water and marine samples. *Marine Pollution Bulletin*, 46: 308-313.
94. Jones, J.G. (2001) Freshwater ecosystems – Structure and Response. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 50:107-113.
95. Jukes, T.H.; Cantor, C.R. (1969) Evolution of protein molecules. En: Munro, H.N. (Eds.), *Mammalian Protein Metabolism*, Academic Press, pp. 21-132.

96. Karner, M.; Fuhrman, T. (1997) Determination of active bacterioplankton: a comparison of universal 16S rRNA probes, autoradiography, and nucleoid staining. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:1208-1213.
97. Keasling, J.D.; Bang, S.W. (1998) Recombinant DNA techniques for bioremediation and environmentally-friendly synthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 9:135-140.
98. Kenzaka, T. Yamaguchi, N.; Tani, K.; Nasu, M. (1998) RNA-targeted fluorescence in situ hybridization analysis of bacterial community structure in river water. *Microbiology*, 144:2085-2093.
99. Klappenbach, J.A.; Dunbar, J.M.; Schmidt, T.M. (2000) rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:1328-1333.
100. Klug, W.S.; Cummings, M.R. (1999). *Conceptos de Genética*, Prentice Hall, Madrid. pp, 453-515.
101. Knauer, K.; Behra R.; Sigg, L. (1997) Effects of free Cu and Zn ions on growth and metal accumulation in freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16:220-229.
102. Kozdroj, J.; Van Elsas, J.D. (2001) Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialised area determined by PCR-DGGE fingerprinting and FAME profiling. *Applied Soil Ecology*, 17:31-42.
103. Krsek, M.; Wellington, E.M.H. (1999) Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *Journal of Microbiological Methods*, 39:1-16.
104. Kumar, S.; Tamura K.; Jakobsen, I.B.; Nei, M. (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics*, 17:1244-1245.
105. Kuwae T.; Hosokawa, Y. (1999) Determination of abundance and biovolume of bacteria in sediments by dual staining with 4', 6-diamidino-2-phenylindole and acridine orange: relationship to dispersion treatment and sediment characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:3407-3412.
106. LaMontagne, M.G.; Michel, F.C. Jr; Holden, P.A.; Reddy, C.A. (2002) Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 49:255-264.

107. LaPara, T.M.; Nakatsu, C.H.; Pantea, L.; Alleman, J.E. (2002) Stability of the bacterial communities supported by a seven-stage biological process treating pharmaceutical wastewater as revealed by PCR-DGGE. *Water Research*, 36:638-646.
108. Larsen, A.; Flaten, G.A.F.; Sandaa, R.A.; Castberg, T.; Thyrhaug, R.; Erga, S.R.; Jacquet, S.; Bratbak, G. (2004) Spring phytoplankton bloom dynamics in Norwegian coastal waters: Microbial community succession and diversity. *Limnology and Oceanography*, 49:180-190.
109. Larsen, N.; Olsen, G.J.; Maidak, B.L.; McCaughey, M.J., Overbeek, R.; Macke, T.J.; Marsh, T.L.; Woese, C.R. (1993) The ribosomal database Project. *Nucleic Acid Research*, 21:3021-3023.
110. Lebaron, P.; Bernard, L.; Baudart, J.; Courties, C. (1999) The ecological role of VBNC cells in the marine environment. En: Bell, C.R.; Brylinsky, M.; Jonhson-Green, P. (Eds.), *Microbial biosystems: New frontiers. To Grow or not to Grow: Nonculturability revisited*, Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology, Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
111. Lee, D.H.; Zo, Y.G.; Kim, S.J. (1996) Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:3112-3120.
112. Lee, N.; Nielsen, P.H.; Andeasen, K.H.; Juretschko, S.; Nielsen, J.L.; Schleifer, K.H.; Wagner, M. (1999) Combined microautoradiography – a new tool for structure function analysis in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:1289-1297.
113. Leff, G.; Leff, A.A.; Lemke, M.J. (1998) Seasonal changes in planktonic bacterial assemblages of two Ohio streams. *Freshwater Biology*, 39:129-134.
114. Lerman, L.S.; Fisher, S.G.; Hurley, I.; Silverstain, K.; Lumelsky, N. (1984) Sequence-determined DNA separations. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 13:399-423.
115. Li, W.K.W.; Dickie, P.M. (2001) Monitoring phytoplankton, bacterioplankton and virioplankton in a coastal inlet (Bedford basin) by flow cytometry. *Cytometry*, 44:236-246.
116. Licina, G.J. (1988) *Sourcebook for Microbiologically Influenced Corrosion in Nuclear Power Plants*. EPRI NP-5580, Electric Power Research Institute.

117. Limnos, S.A. (2001) Seguimiento de los sistemas acuáticos en los alrededores de la Central Nuclear de Cofrentes. Ciclo 2000. Abril, 2001.
118. Liu, W.T.; Marsh, T.L.; Cheng, H.; Forney, L.J. (1997) Characterisation of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphism of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:4516-4522.
119. López-Archilla, A.I.; Amils, R. (1999) A comparative ecological study of two acidic rivers in southwestern Spain. *Microbial Ecology*, 38:146-156.
120. López-Archilla, A.I.; Marin, I.; Amils, R. (2001) Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: the Tinto River, Spain. *Microbial Ecology*, 41:20-35.
121. Lutterbach, M.T.S.; de Franca, F.P. (1996) Biofilm formation in water cooling systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12:391-394.
122. Makarova, K.S.; Aravind, L.; Wolf, Y.I.; Tatusov, R.L.; Minton, K.W.; Koonin, E.V.; Daly, M.J. (2001) Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65:44-79.
123. Marchesi, J.R.; Sato, T.; Weightman, A.J.; Martin, T.A.; Fry, J.C.; Hiom, S.J.; Wade, W.G. (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:795-799.
124. Mc Bain, A.J.; Bartolo, R.G.; Catrenich, C.E.; Charbonneau, D.; Ledder, R.G.; Gilbert, P. (2003) Growth and molecular characterization of dental plaque microcosm. *Journal of Applied Microbiology*, 94:655-664.
125. McCaig, A.E.; Glover, L.A.; Prosser, J.I. (2001) Numerical analysis of grassland management regimens by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:4554-4559.
126. McDougald, D.; Rice, S.A.; Weichart, D.; Kjelleberg, S. (1998) Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology*, 25:1-9.

127. Menéndez, M.; Comín, F.A. (2000) Spring and summer proliferation of floating macroalgae in a Mediterranean coastal lagoon (Tancada Lagoon, Ebro Delta, NE Spain). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 51:215-226.
128. Methé, B.A.; Hiorns, W.D. Zehr, J.P. (1998) Contrast between marine and freshwater bacterial community composition: analyses of communities in Lake George and six other Adirondack lakes. *Limnology and Oceanography*, 43:368-374.
129. Miambi, E.; Guyot, J.-P.; Ampe, F. (2003). Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 82:111-120.
130. Middelboe, M.; Sondergaard, M., Letarte, Y.; Borch, N.H. (1995) Attached and free-living bacteria: production and polymer hydrolysis during a diatom bloom. *Microbial Ecology*, 29:231-248.
131. Mirto, S.; La Rosa, T.; Danovaro, R.; Mazzola, A. (2000) Microbial and meiofaunal response to intensive mussel-farm biodeposition in coastal sediments of the western Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin*. 40:244-252.
132. Molecular Probes (2004) LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits. Product Information Sheet, Molecular Probes L7007.
133. Morita, R.Y. (1992) Low-nutrient environments. En: *Encyclopaedia of Microbiology*. Academic Press, Inc., New York, Vol. 2, pp. 617-624.
134. Mullis, K.B. (1990) The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, 262:56-61.
135. Muyzer, G.; Brinkhoff, T.; Nübel, U.; Santagoeds, C.; Schäfer, H.; Wawer, C. (1997) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in Microbial Ecology. En: Akkermans, A.D.L.; Van Elsas, J.D.; Bruijn, F.J. (Eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual*, Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, The Netherlands. Vol 3.4.4, pp. 1-27.
136. Muyzer, G.; De Waal, E.C. (1994) Determination of the genetic diversity of microbial communities using DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA. *NATO ASI, Series G35*, pp. 207-214.

137. Muyzer, G.; Hottenträger, S.; Teske, A.; Wawer, C. (1996) Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. En: *Molecular Microbial Ecology Manual*, Kluwer Academic Publishers. Vol 3.4.4, pp. 1-23.
138. Muyzer, G.; 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.
139. Muyzer, G., Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, 59:695-700.
140. Nedveckaitė, T.; Motiejunas, S.; Kucinskas, V.; Mazeika, J.; Filistovic, V.; Jusciencė, D.; Maceika, E.; Morkeliunas, L.; Hamby, D.M. (2000) Environmental releases of radioactivity and the incidence of thyroid disease at the Ignalina Nuclear Power Plant. *Health Physiology*, 79:666-674.
141. Nilsson, J.R. (1987) Structural aspects of digestion of *Escherichia coli* in *Tetrahymena*. *Journal of Protozoology*, 34:1-6.
142. Nilsson, J.R.; Oliver, J.D.; Kjelleberg, S. (1991) Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *Journal of Bacteriology*, 173:5054-5059.
143. Nübel, U.; Engelen, B.; Felske, A.; Snadir, J.; Wieshuber, A.; Amann, R.; Ludwig, W.; Backhaus, H. (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymixa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 178:5636-5643.
144. Nübel, U.; García-Pichel, F.; Clavero, E.; Muyzer, G. (2000) Matching molecular diversity and ecophysiology of benthic cyanobacteria and diatoms in communities along a salinity gradient. *Environmental Microbiology*, 2:217-226.
145. Nübel, U.; García-Pichel, F.; Muyzer, G. (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from *Cyanobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:3327-3332.
146. Ogino, A.; Koshikawa, H.; Nakahara, T.; Uchiyama, H. (2001) Sucesión of microbial communities during a biostimulation process as evaluated by DGGE and clone library analyses. *Journal of Applied Microbiology*, 91:625-635.

147. Oliver, J.D. (1993) Formation of viable but non culturable cells. En: Kjelleberg, S. (Eds.), *Starvation in Bacteria*. Plenum Press, New York, pp. 239–272.
148. Oliver, J.D.; McDougald, D.; Barrett, T.; Glover, L.A.; Prosser, J.J. (1995) Effect of temperature and plasmid carriage on nonculturability in organisms targeted for release. *FEMS Microbiology Ecology*, 17:229-238.
149. Orita, M.; Iwahana, H.; Kanazawa, H.; Hayashi, K.; Sekiya, T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86:2766-2770.
150. Osborn, M.A.; Moore, E.R.B.; Timmins, K.M. (2000) An evolution of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 2:39-50.
151. Ouverney, C.C.; Fuhrman, J.A. (1999) Combined microautoradiography-16S rRNA probe technique for determination of radioisotope uptake by specific microbial cell types. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:1746-1752.
152. Ovreas, L.; Forney, L.; Daae, F.L.; Torsvik, V. (1997) Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:3367-3373.
153. Pace, N.R.; Stahl, D.A.; Lane, D.J.; Olsen, G.J. (1986) The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Advances in Microbial Ecology*, 9:1-55.
154. Parekh, N.R.; Bardgett, R.D. (2002) The characterization of microbial communities in environmental samples. En: Keith-Roach, M.J.; Livens, F.R. (Eds.), *Interactions of Microorganisms with Radionuclides*, Elsevier Science Ltd., pp. 37-60.
155. Pernthaler, J.; Glöckner, F.-O.; Unterholzner, S.; Alfreider, A.; Psenner, R.; Amann, R. (1998) Seasonal community and population dynamics of pelagic bacteria and archaea in a high mountain lake. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:4299-4306.

156. Perry, E.; Seegert, G.; Vondruska, J.; Logner, T.; Lewis, R. (2002) Modelling possible cooling-water intake system impacts on Ohio River fish populations. *Scientific World Journal*, 2 Suppl., 1:58-80.
157. Pettipher, G.; Mansel, R.; McKinnon, C.; Couins, C. (1980) Rapid membrane filtration-epifluorescent microscopy technique for direct enumeration of bacteria in raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 39:423-429.
158. Pieper, D.H.; Reineke, W. (2000) Engineering bacteria for bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 11:262-270.
159. Polz, M.F.; Distel, D.L.; Zarda, B.; Amann, R.; Felbeck, H.; Ott, J.A.; Cavanaugh, C.M. (1994) Phylogenetic analysis of a highly specific association between ectosymbiotic, sulfur-oxidizing bacteria and a marine nematode. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:4461-4467.
160. Porteous, L.A.; Armstrong, J.L.; Seidler, R.J.; Watrud, L.S. (1994) An effective method to extract DNA from environmental samples for polymerase chain reaction amplification and DNA fingerprint analysis. *Current Microbiology*, 29:301-307.
161. Porter, J.; Morris, S.A.; Pickup, R.W. (2004) Effect of trophic status on the culturability and activity of bacteria from a range of lakes in the English Lake District. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:2072-2078.
162. Porter, K.G.; Feig, Y.S. (1980) Use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography*, 25:943-948.
163. Postgate, J.R. (1984) *The Sulfate-Reducing Bacteria*. Cambridge University Press, Cambridge.
164. Poulsen, L.K.; Ballard, G.; Stahl, D.A. (1993) Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:1354-1360.
165. Prescott, L.M.; Harley, J.P.; Klein, D.A. (1999) Los ambientes marinos y de agua dulce. En: Prescott, L.M.; Harley, J.P.; Klein, D.A. (Eds.), *Microbiología*, 4ª edición, McGraw-Hill-INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S.A.U., pp. 887-920.
166. Queric, N.V.; Soltwedel, T.; Arntz, W.E. (2004) Application of a rapid direct viable count method to deep-sea sediment bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 57:351-367.

167. Rajendran, N.; Nagamoto, Y. (1999) Seasonal changes in sedimentary microbial communities of two eutrophic bays as estimated by biomarkers. *Hydrobiologia*, 393:117-125.
168. Rao, T.S.; Nair, K.V.K. (1998) Microbiologically influenced stress corrosion cracking failure of admiralty brass condenser tubes in a nuclear power plant cooled by freshwater. *Corrosion Science*, 40:1821-1836.
169. Ratledge, C.; Wilkinson, S.G. (1988) *Microbial Lipids*. Vol. 1. New York Academic Press.
170. Ravel, J.; Knight, I.T.; Monahan, C.E.; Hill, R.T.; Colwell, R.R. (1995) Temperature induced recovery of *Vibrio cholerae* from the viable but nonculturable state: growth or resuscitation? *Microbiology*, 141:377-383.
171. Reasoner, D.J.; Geldreich, E.E. (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, 49:1-7.
172. Reysenbach, A.L.; Giver, L.J.; Wickham, G.S.; Pace, N.R. (1992) Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 58:3417-3418.
173. Riemann, L.; Middelboe, M. (2002) Stability of bacterial and viral community compositions in Danish coastal waters as depicted by DNA fingerprinting techniques. *Aquatic Microbial Ecology*, 27:219-232.
174. Riemann, L.; Steward, G.F.; Azam, F. (2000) Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:578-587.
175. Riemann, L.; Winding, A. (2001) Community dynamics of free-living and particle-associated bacterial assemblages during a freshwater phytoplankton bloom. *Microbial Ecology*, 42:274-285.
176. Rodriguez, G.G.; Phipps, D.; Ishiguro, K.; Ridgway, H.F. (1992) Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58:1801-1808.
177. Rolleke, S.; Muyzer, G.; Wawer, C.; Lubitz, W. (1996) Identification of bacteria in biodegraded wall painting by DGGE of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:2059-2065.

178. Rolleke, S.; Witte, A.; Wanner, G.; Lubitz, W. (1998) Medieval wall paintings – a habitat for archea: identification of archea by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR amplified gene fragments coding for 16S rRNA in a medieval wall painting. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 41:85-92.
179. Roslev, P.; Iversen, N.; Henriksen, K. (1998) Direct fingerprinting of metabolically active bacteria in environmental samples by substrate specific radiolabelling and lipid analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 31:99-111.
180. Roszak, D.B.; Grimes, D.J.; Colwell, R.R. (1984) Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Canadian Journal of Microbiology*, 30:334-338.
181. Sadowsky, M.J. (1994) DNA fingerprinting and restriction fragment length polymorphism analysis. En: Weaver, R.W.; Angle, S.; Bottomley, P.; Bezdicek, D.; Smith, S.; Tabatabai, A.; Wollum, A. (Eds.), *Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical. Properties*. Madison, WI: American Society of Agronomy, pp. 119-144.
182. Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-491.
183. Sánchez-Cabeza, J.A.; Pujol, Ll.; Merino, J.; Bruach, J.M.; Molero, J. (2000) Artificial radionuclides in waters of the lower section of the River Ebro (Northeast Spain). *Water, Air, and Soil Pollution*, 118:339-356.
184. Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 5463-5467.
185. Santegoeds, C.M.; Ferdelman, T.G.; Muyzer, G.; de Beer, D. (1998) Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:3731-3739.
186. Sarró, M.I. (2003) Análisis del bioensuciamiento en materiales metálicos sumergidos en piscinas nucleares y su aplicación en la biorremediación de aguas radiactivas. Tesis Doctoral, ETSI Industriales, UPM, Madrid, España.

187. Sayler, G.S.; Ripp, S. (2000) Field application of genetically engineered microorganisms for bioremediation process. *Current Opinion in Biotechnology*, 11:286-289.
188. Schabereiter-Gutner, C.; Piñar, G.; Lubitz, W.; Rolleke, S. (2001) An advanced molecular strategy to identify bacterial communities on art objects. *Journal of Microbiological Methods*, 45:77-87.
189. Schabereiter-Gutner, C.; Sáiz-Jiménez, C.; Piñar, G.; Lubitz, W.; Rölleke, S. (2002) Altamira cave Paleolithic paintings harbour partly unknown bacterial communities. *FEMS Microbiology Letters*, 211:7-11.
190. Schäfer, H.; Servais, P. Muyzer, G. (2000) Successional changes in the genetic diversity of a marine bacterial assemblage during confinement. *Archives in Microbiology*, 173:138-145.
191. Schauer, M.; Massana, R.; Pedrós-Alió, C. (2000) Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. *FEMS Microbiology Ecology*, 33:51-59.
192. Scheinert, P.; Krausse, R.; Ullmann, U.; Soller, R.; Krupp, G. (1996) Molecular differentiation of bacteria by PCR amplification of the 16S-23S spacer. *Journal of Microbiological Methods*, 26:103-117.
193. Schramm, A.; Larsen, L.H.; Revsbech, N.P.; Ramsing, N.B.; Amann, R.; Schleifer, K.H. (1996) Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:4641-4647.
194. Schwarz, D.; Grosch, R.; Gross, W.; Hoffmann-Hergarten, S. (2004) Water quality of different reservoir types in relation to nutrient solution use in hydroponics. *Agricultural water management*, *En prensa*.
195. Sekiguchi, H.; Watanabe, M.; Nakahara, T.; Xu, B.; Uchiyama, H. (2002) Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:5142-5150.
196. Simek, K.; Armengol, J.; Comerma, M.; Garcia, J.C.; Kojecka, P.; Nedoma, J.; Hejzlar, J. (2001a) Changes in the epilimnetic bacterial community composition, production, and protist-induced mortality along the longitudinal axis of a highly eutrophic reservoir. *Microbial Ecology*, 42:359-371.

197. Simek, K.; Pernthaler, J.; Weinbauer, M.G.; Hornák, K.; Dolan, J.R.; Nedoma, J.; Masín, M.; Amann, R. (2001b) Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2723-2733.
198. Smit, E.; Leeftang, P.; Wernars, K. (1997) Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 23:249-261.
199. Smith, D.C.; Steward, G.F.; Long, R.A.; Azam, F. (1995). Bacterial mediation of carbon fluxes during a diatom bloom in a mesocosm. *Deep Sea Research. II* 42:75-97.
200. Snaidr, J.; Amann, R.; Huber, I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. (1997) Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:2884-2896.
201. Solovykh, G.N.; Fabarisova, L.G.; Nefedova, E.M.; Karnaukhova, I.V.; Raimova, E.K. (1998) [Effect of thermal power stations on the sanitary and biological conditions of water reservoirs]. *Gigiena i Sanitariya*, 6:24-27.
202. Stamper, D.M.; Walch, M.; Jacobs, R.N. (2003) Bacterial population changes in a membrane bioreactor for graywater treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 852-860.
203. Sternberg, S.P.; Dorn, R.W. (2002) Cadmium removal using *Cladophora* in batch, semi-batch and flow reactors. *Bioresource Technology*, 81:249-255.
204. Stewart, L.F.; Lee, R.; Eng, K.; Ruth, L.; larka, L.; George, L.V.; Zwick, W. (1999) *Alkmi Quick Guide for PCR*. Vol. 1. Alkmi Biosystems, Inc.
205. Stoffels, M.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. (1999) rRNA probe-based cell fishing of bacteria. *Environmental Microbiology*, 1: 259-271.
206. Suzdaleva, A.L. (2001) [Development of opportunistic microorganisms in the area of disposal of heated water from atomic power station]. *Gigiena i Sanitariya*, 4:15-17.
207. Suzuki, M.T.; Giovannoni, S.T. (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:625-630.

208. Tanaka, J.; Syutsubo, K.; Watanabe, K.; Izumida, H.; Harayama, S. (2003) Activity and population structure of nitrifying bacteria in an activated-sludge reactor containing polymer beads. *Environmental Microbiology*, 5:278-286.
209. Technical bulletin No. 225. (2002) Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System. Promega., USA.
210. Technical manual No. 042. (2003). pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. Promega, USA.
211. Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F., Higgins, D. G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25:4876-4882.
212. Torsvik, V.; Daae, F.L.; Sandaa, R.A.; Ovreas, L. (1998) Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology*, 64:53-62.
213. Tresse, O.; Lescob, S.; Rho, D. (2003) Dynamics of living and dead bacterial cells within a mixed-species biofilm during toluene degradation in a biotrickling filter. *Journal of Applied Microbiology*, 94:849-855.
214. Trevors, J.T.; Van Elsas, J.D. (1995) *Nucleic Acids in the Environment*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
215. Ueda, K.; Seki, T.; Kudo, T.; Yoshida, T.; Kataora, M. (1999) Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rDNA. *Journal of Bacteriology*, 181:78-82.
216. Urbach, E.K.; Vergin, K.L.; Young, L.; Morse, A. (2001) Unusual bacterioplankton community structure in ultra-oligotrophic Crater Lake. *Limnology and Oceanography*, 46:557-572.
217. Van Hannen, E.J. Zwart, G.; Van Agterveld, M.P.; Gons, H.J.; Ebert, J.; Laanbroek, H.J. (1999) Changes in bacterial and eukaryotic community structure alter mass lysis of filamentous *Cyanobacteria* associated with viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:795-801.
218. Vollertsen, J.; Jahn, A.; Nielsen, J.L.; Hvitved-Jacobsen, T.; Nielsen, P.H. (2001) Comparison of methods for determination of microbial biomass in wastewater. *Water Research*, 35:1649-1658.

219. Votyakova, T.V.; Kaprelyants, A.S.; Kell, D.B. (1994) Influence of viable cells on the resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase. The population effect. Applied and Environmental Microbiology, 60:3284-3291.
220. Vymazal, J. (1995) Influence of pH on heavy metals uptake by *Cladophora glomerata*. Polish Archives of Hydrobiology, 42:231-237.
221. Vymazal, J. (1990) Uptake of lead, chromium, cadmium and cobalt by *Cladophora glomerata*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 44:468-472.
222. Wagner, M.; Erhart, R.; Manz, W.; Amann, R.; Lemmer, H.; Wedi, D.; Schleifer, K.H. (1994) Development of a rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring of activated sludge. Applied and Environmental Microbiology, 60:792-800.
223. Wang, G.C.; Wang, Y. (1996). The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. Microbiology, 142:1107-1114.
224. Ward, D.M.; Weller, R.; Bateson, M.M. (1990) 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. Nature (London), 345:63-65.
225. Wardle, D.A.; Bonner, K.L.; Barker, G.M.; Bardgett, R.D.; Lovell, R.D.; Hobbs, P.J.; Jarvis, S.C. (1999) Dynamics of below-ground microbial communities in temperate grasslands: influence of management intensity. Soil Biology and Biochemistry, 31:1021-1030.
226. Watanabe, K.; Kodama, Y.; Harayama, S. (2001) Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. Journal of Microbiological Methods, 44:253-262.
227. Watanabe, K.; Watanabe, K.; Kodama, Y.; Syutsubo, K.; Harayama, S. (2000) Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities. Applied and Environmental Microbiology, 66:4803-4809.
228. Wehrheim, B.; Wettern, M. (1994) Biosorption of cadmium, copper and lead by isolated mother cell walls and whole cells of *Chlorella fusca*. Applied Microbiology and Biotechnology, 41:819-825.

229. Weichart, D.; Oliver, J.D.; Kjelleberg, S. (1992) Low temperature induced non-culturability and killing of *Vibrio vulnificus*. FEMS Microbiology Letter, 79:205-210.
230. White, D.C.; Davis, W.M.; Nickels, J.S.; King, J.C.; Bobbie, R.J. (1979) Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. Oecologia, 40:51-62.
231. Widjojoatmodjo, M.N.; Fluit, A.C., Verhoef, J. (1995) Molecular identification of bacteria by fluorescent-based PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. Journal of Clinical Microbiology, 33:2601-2606.
232. Wilde, E.W.; Benemann, J.R. (1993) Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. Biotechnology Advances, 11:781-812.
233. Willen, E. (1991) Planktonic diatoms - an ecological review. Algological Studies, 62: 69-106.
234. Wilson, I.G. (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Applied and Environmental Microbiology, 63:3741-3751.
235. Wingender, J.; Neu, T.R.; Flemming, H.-C. (1999) What are bacterial extracellular polymeric substances? En: Wingender, J.; Neu, T.R.; Flemming, H.-C. (Eds.), Microbial Extracellular Polymeric Substances. Characterization, Structure and Function, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 1-19.
236. Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. Microbiology Reviews, 51:221-271.
237. Wu, J.; Buchak, E.M.; Edinger, J.E.; Kolluru, V.S. (2001) Simulation of cooling-water discharges from power plants. Journal of Environmental Management, 73:24-29.
238. Wu, M.; Song, L.; Ren, J. Kan, J.; Quian, P.-Y. (2004) Assessment of microbial dynamics in the Pearl River estuary by 16S rRNA terminal restriction fragment analysis. Continental Shelf Research, *En prensa*.
239. Xu, H.S.; Roberts, N.; Singleton, F.L.; Attwell, R.W.; Grimes, D.J.; Colwell, R.R. (1982). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. Microbial Ecology, 8:313-323.

240. Yager, P.L.; Conelly, T.L.; Mortazavi, B.; Wommack, K.E.; Bano, N.; Bauer, J.E.; Opsahl, S.; Hollibaugh, J.T. (2001) Dynamic bacterial and viral response to an algal bloom at subzero temperatures. *Limnology and Oceanography*, 46:790-801.
241. Yang, C.K.; Yang, S.S. (2001) Microbial ecology of soils surrounding nuclear and thermal power plants in Taiwan. *Environment International*, 26:315-322.
242. Yeates, G.W.; Bardgett, R.D.; Cook, R.; Hobbs, P.J.; Bowling, P.J.; Potter, J.F. (1997) Faunal and microbial diversity in three Welsh grassland soils under conventional and organic management regimes. *Journal of Applied Ecology*, 34:453-470.
243. Yeates, G.W.; Nicholson, K.S.; Bardgett, R.D.; Watson, R.N.; Ghani, A. (1999) Plant removals in perennial grassland: vegetation dynamics, decomposers, soil biodiversity, and ecosystem properties. *Ecological Monographs*, 69:535-568.
244. Zdanowski, M.K.; Węgleński, P. (2001) Ecophysiology of soil bacteria in the vicinity of Henryk Arctowski Station, King George Island, Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry*, 33:819-829.
245. Zelter, N.; Flandreau, J.R.; Spataro, W.H.; Chapple, K.R.; Characklis, W.G.; Roe, F.L. (1982) Analysis and monitoring of heat transfer fouling. En: 82 Joint Power Generation Conference / Pwr 7, ASME, Denver, CO.
246. Zhou, J.; Xia, B.; Treves, D.S.; Wu, L.-Y.; Marsh, T.L.; O'Neill, R.V.; Palumbo, A.V.; Tiedje, J.M. (2002) Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:326-334.
247. Zumstein, E.; Moletta, R.; Godon, J.J. (2000) Examination of 2 years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescent polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology*, 2:69-78.

Páginas WEB:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (NCBI, *National Center of Biotechnology Information*)
- <http://www.embl.org/> (EMBL, *European Molecular Biology Laboratory*)
- <http://217.127.34.207/VIGILANCIA.HTM> (La Central Nuclear de Cofrentes, Medios y Métodos de Vigilancia)

