

INTRODUCCIÓN.....	1
1.- Diversidad microbiana.....	3
2.- <i>Phylum Actinobacteria</i>	6
2.1.- Orden <i>Actinomycetales</i>	7
2.1.1. Suborden <i>Corynebacterineae</i>	10
2.1.1.1.- Familia <i>Corynebacterineae</i>	10
2.1.1.1.1.- Género <i>Corynebacterium</i>	11
2.1.1.2.- Familia <i>Dietziaceae</i>	11
2.1.1.2.1.- Género <i>Dietzia</i>	11
2.1.1.3.- Familia <i>Mycobacteriaceae</i>	12
2.1.1.3.1.- Género <i>Amycolicococcus</i>	12
2.1.1.3.2.- Género <i>Mycobacterium</i>	12
2.1.1.4.- Familia <i>Nocardiaceae</i>	13
2.1.1.4.1.- Género <i>Gordonia</i>	13
2.1.1.4.2.- Género <i>Millisia</i>	14
2.1.1.4.3.- Género <i>Nocardia</i>	15
2.1.1.4.4.- Género <i>Rhodococcus</i>	16
2.1.1.4.5.- Género <i>Skermania</i>	16
2.1.1.4.6.- Género <i>Williamsia</i>	17
2.1.1.5.- Familia <i>Segniliparaceae</i>	17
2.1.1.5.1.- Género <i>Segniliparus</i>	17
2.1.1.6.- Familia <i>Tsukamurellaceae</i>	18
2.1.1.6.1.- Género <i>Tsukamurella</i>	18
2.1.2.- Suborden <i>Pseudonocardineae</i>	18
2.1.2.1.- Familia <i>Pseudonocardiaceae</i>	18
2.1.2.1.1.- Género <i>Pseudonocardia</i>	19
2.1.3.- Suborden <i>Micrococcineae</i>	19
2.1.3.1.- Familia <i>Microbacteriaceae</i>	19
2.1.3.1.1.- Género <i>Microbacterium</i>	19
3.- Detección e identificación de actinomicetos nocardioformes en fangos activos.....	20
3.1.- Aislamiento y recuento.....	20
3.2.- Identificación y caracterización.....	21

3.2.1.- Métodos clásicos.....	21
3.2.1.1.- Caracteres morfológicos.....	21
3.2.1.2.- Quimiotaxonomía.....	22
3.2.2.- Métodos genotípicos.....	24
3.2.2.1.- Análisis de las secuencias del 16S rDNA.....	25
3.2.2.2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	27
3.2.3.- Métodos fenotípicos.....	29
4.- Aguas residuales.....	30
4.1.- Depuración aguas residuales.....	32
4.1.1.- Antecedentes.....	32
4.1.2.- Clasificación de los métodos de tratamiento de aguas residuales.....	32
4.2.- Aguas residuales urbanas.....	36
4.3.- Aguas residuales en la industria petroquímica.....	37
4.4.- Sistema de fangos activos.....	40
4.4.1.- El flóculo.....	40
4.4.2.- Composición de la microbiota.....	41
4.4.3.- Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos.....	42
4.4.3.1.- Tasa de crecimiento.....	42
4.4.3.2.- Tolerancia a factores abióticos y toxinas.....	42
4.4.3.3.- Capacidad para contribuir a la formación del flóculos.....	43
4.5.- Problemas producidos por microorganismos en sistemas de fangos activos.....	43
4.5.1.- Aumento del volumen de los sólidos sedimentables o “Bulking”.....	43
4.5.2.- Formación de espumas biológicas o “Foaming”.....	43
4.5.3.- Microorganismos productores de espumas.....	46
4.5.4.- Principales factores que influyen en la formación de espumas.....	49
4.5.4.1.- Burbujas de aire.....	49
4.5.4.2.- Partículas hidrofóbicas.....	50
4.5.4.3.- Tensoactivos.....	51
4.5.5.- Factores que afectan al crecimiento de los microorganismos productores de espumas.....	51
4.5.5.1.- Requisitos nutricionales.....	51
4.5.5.2.- Requisitos de oxígeno.....	52
4.5.5.3.- Temperatura.....	52

4.5.5.4.- pH.....	53
4.5.6.- Métodos de control.....	53
4.5.6.1- Manipulación de la edad del fango.....	53
4.5.6.2.- Cloración.....	53
4.5.6.3.- Empleo de selectores.....	54
4.5.6.4.- Eliminación física.....	54
4.5.6.5.- Otros métodos.....	54
4.6.- Identificación de microorganismos filamentosos en fangos activos.....	55
4.6.1.- Método clásico de identificación de microorganismos filamentosos.....	55
5.- Biodegradación.....	57
5.1.- Antecedentes.....	57
5.2.- Contaminación por hidrocarburos.....	58
5.2.1.- Composición del crudo del petróleo.....	59
5.2.1.1.- Hidrocarburos monoaromáticos.....	61
5.2.1.2.- Hidrocarburos poliaromáticos.....	61
5.2.2.- Fuentes de contaminación.....	62
5.3.- Biorremediación.....	63
5.3.1.- Factores condicionantes de la biorremediación microbiana.....	65
5.3.1.1.- Nutrientes.....	66
5.3.1.2.- Variables ambientales.....	66
5.3.1.2.1.- Oxígeno.....	67
5.3.1.2.2.- Salinidad.....	67
5.3.1.2.3.- Temperatura.....	68
5.3.1.2.4.- pH.....	68
5.3.1.2.5.- Concentración de sustancias contaminantes.....	69
5.3.1.3.- Características del producto petrolífero.....	69
5.3.1.4.- Factores relacionados con los microorganismos.....	69
5.3.2.- Microorganismos degradadores.....	70
5.4.- Biodegradación de fenol y naftaleno.....	74
5.4.1.- Fenol.....	74
5.4.2.- Naftaleno.....	76
5.5.- Gen de la catecol 1,2-dioxigenasa.....	78

OBJETIVOS.....	81
MATERIAL Y MÉTODOS.....	85
1.- Cepas bacterianas de referencia.....	87
2.- Caracterización de muestras de fangos activos.....	88
2.1.- Toma de muestras y aislamiento.....	88
2.2.- Caracterización fenotípica basada en características morfológicas.....	90
2.3.- Caracterización quimiotaxonómica.....	90
2.3.1.- Extracción y análisis de ácidos micólicos.....	91
2.3.1.1.- Materiales.....	91
2.3.1.2.- Metodología.....	91
2.3.2.- Determinación de los isómeros del ácido diaminopimélico (DAP).....	92
2.3.2.1.- Materiales.....	92
2.3.2.2.- Metodología.....	92
2.3.3.- Extracción y análisis de los azúcares predominantes de la pared celular.....	93
2.3.3.1.- Materiales.....	93
2.3.3.2.- Metodología.....	94
2.4.- Caracterización genotípica.....	95
2.4.1.- Extracción de DNA. Protocolo del CTAB.....	95
2.4.2.- Electroforesis en gel de agarosa.....	96
2.4.3.- Amplificación por PCR.....	97
2.4.4.- Purificación del DNA.....	97
2.4.5.- Obtención y análisis de las secuencias del 16S rDNA.....	98
2.4.6.- Árboles filogenéticos.....	98
2.4.7.- Matrices de similaridad.....	99
2.5.- Caracterización fenotípica basada en características metabólicas.....	99
2.5.1.- Crecimiento a diferentes temperaturas.....	99
2.5.2.- Pigmentación de colonias.....	100
2.5.3.- Actividades metabólicas.....	100
2.5.3.1.- Esculina.....	100
2.5.3.2.- L-Tirosina.....	100
2.5.3.3.- Nitratos.....	100

2.5.3.4.- Urea.....	101
2.5.4.- Uso de fuentes de carbono (1%): azúcares.....	101
2.5.4.1.- D+Lactosa.....	101
2.5.4.2.- D+Maltosa.....	101
2.5.4.3.- D-Arabinosa.....	101
2.5.4.4.- D+Fructosa.....	102
2.5.4.5.- D-Galactosa.....	102
2.5.4.6.- D-Glucosa.....	102
2.5.4.7.- D-Manitol.....	102
2.5.4.8.- meso-inositol.....	103
2.5.5.- Uso de fuentes de carbono y nitrógeno (0.1%): aminoácidos.....	103
2.5.5.1.- L-Alanina.....	103
2.5.5.2.- L-Histidina.....	103
2.5.5.3.- L-Prolina.....	103
3.- Biodegradación de compuestos derivados del petróleo.....	104
3.1.- Ensayos biodegradación.....	104
3.2.- Detección molecular del gen catecol 1,2-dioxigenasa.....	105
3.2.1.- Purificación del DNA.....	106
3.2.2.- Obtención y análisis de las secuencias del gen <i>catA</i>	106
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	109
1.- Caracterización de muestras de fangos activos.....	111
1.1.- Aislamiento.....	111
1.2.- Caracterización fenotípica basada en características morfológicas.....	112
1.3.- Caracterización quimiotaxonómica.....	114
1.4.- Caracterización genotípica.....	120
1.4.1.- Árboles filogenéticos y matrices de similaridad.....	121
1.4.1.1.- Género <i>Corynebacterium</i>	127
1.4.1.2.- Género <i>Dietzia</i>	129
1.4.1.3.- Género <i>Gordonia</i>	131
1.4.1.4.- Género <i>Microbacterium</i>	138
1.4.1.5.- Género <i>Mycobacterium</i>	139

1.4.1.6.- Género <i>Pseudonocardia</i>	141
1.4.1.7.- Género <i>Rhodococcus</i>	143
1.4.1.8.- Género <i>Tsakamurella</i>	145
1.4.1.9.- Género <i>Williamsia</i>	146
1.5.- Caracterización fenotípica basada en características metabólicas.....	148
1.5.1.- Género <i>Corynebacterium</i>	149
1.5.2.- Género <i>Dietzia</i>	150
1.5.3.- Género <i>Gordonia</i>	151
1.5.4.- Género <i>Microbacterium</i>	156
1.5.5.- Género <i>Mycobacterium</i>	156
1.5.6.- Género <i>Pseudonocardia</i>	158
1.5.7.- Género <i>Rhodococcus</i>	160
1.5.8.- Género <i>Tsakamurella</i>	161
1.5.9.- Género <i>Williamsia</i>	163
2.- Biodegradación de compuestos derivados del petróleo.....	164
2.1.- Ensayos de biodegradación.....	164
2.2.- Detección molecular del gen catecol 1,2-dioxigenasa.....	169
2.2.1.- Género <i>Corynebacterium</i>	171
2.2.2.- Género <i>Dietzia</i>	171
2.2.3.- Género <i>Gordonia</i>	171
2.2.4.- Género <i>Microbacterium</i>	173
2.2.5.- Género <i>Mycobacterium</i>	173
2.2.6.- Género <i>Pseudonocardia</i>	173
2.2.7.- Género <i>Rhodococcus</i>	173
2.2.8.- Género <i>Tsakamurella</i>	174
2.2.9.- Género <i>Williamsia</i>	174
2.2.10.- Obtención y análisis de las secuencias del gen <i>catA</i>	174
3.- Consideraciones finales.....	176
CONCLUSIONES.....	183
PROPUESTA DE NUEVA ESPECIE.....	187
1.- <i>Pseudonocardia hispalensis</i>	189

BIBLIOGRAFÍA.....	191
ANEXOS.....	215
Anexo 1: Medios de cultivo empleados.....	217
Anexo 2: Soluciones, reactivos y material de identificación para PCR.....	220
Anexo 3: Términos y Abreviaturas empleadas.....	221
Anexo 4: Árbol filogenético completo género <i>Corynebacterium</i>	223
Anexo 5: Árbol filogenético completo género <i>Dietzia</i>	225
Anexo 6: Árbol filogenético completo género <i>Gordonia</i>	227
Anexo 7: Árbol filogenético completo género <i>Microbacterium</i>	229
Anexo 8: Árbol filogenético completo género <i>Mycobacterium</i>	231
Anexo 9: Árbol filogenético completo género <i>Pseudonocardia</i>	233
Anexo 10: Árbol filogenético completo género <i>Rhodococcus</i>	235
Anexo 11: Árbol filogenético completo género <i>Tsukamurella</i>	237
Anexo 12: Árbol filogenético completo género <i>Williamsia</i>	239

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1: Especies descritas y estimadas de los diferentes grupos de microorganismos.....	6
Tabla 2: Clasificación jerárquica del suborden <i>Corynebacterineae</i> basada en las secuencias de DNA y RNA ribosómico 16S.....	10
Tabla 3: Tipos de pared celular según sus constituyentes mayoritarios.....	22
Tabla 4: Tipos de pared celular y tipos glucídicos de los actinomicetos aerobios con <i>meso-DAP</i>	23
Tabla 5: Problemas en estaciones depuradoras de fangos activos: causas y efectos.....	44
Tabla 6: Composición de las fracciones químicas contenidas en un crudo de petróleo.....	60

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 7: Microorganismos de referencia utilizados.....	87
Tabla 8: Aislados obtenidos.....	89
Tabla 9: Ciclos de la reacción de amplificación de la PCR para el gen 16S rDNA.....	97
Tabla 10: Ciclos de la PCR para el gen catecol 1,2-dioxigenasa.....	106

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 11: Descripción macroscópica de los aislados.....	112
Tabla 12: Descripción microscópica de los aislados.....	113
Tabla 13: Resultados pruebas quimiotaxonómicas.....	115
Tabla 14: Identificación obtenida mediante matrices de similaridad de la secuencia del 16S rDNA.....	123
Tabla 15: Porcentaje de similaridad del 16S rDNA diferenciado por géneros.....	126
Tabla 16: Porcentaje de similaridad del 16S rDNA respecto a <i>Gordonia amarae</i>	132
Tabla 17: Porcentaje de similaridad del 16S rDNA respecto a <i>Gordonia hirsuta</i>	133
Tabla 18: Porcentaje de similaridad del 16S rDNA respecto a <i>Gordonia jacobaea</i> y <i>Gordonia sputi</i>	134
Tabla 19: Porcentaje de similaridad del 16S rDNA respecto a <i>Gordonia malaquae</i>	135

Tabla 20: Porcentaje de similaridad del 16S rDNA respecto a <i>Tsukamurella pseudospumae</i> y <i>Tsukamurella sunchonensis</i>	145
Tabla 21: Resultados fenotípicos para el género <i>Corynebacterium</i> (I).....	149
Tabla 22: Resultados fenotípicos para el género <i>Corynebacterium</i> (II).....	150
Tabla 23: Resultados fenotípicos para el género <i>Corynebacterium</i> (III).....	150
Tabla 24: Resultados fenotípicos para el género <i>Dietzia</i> (I).....	150
Tabla 25: Resultados fenotípicos para el género <i>Dietzia</i> (II).....	151
Tabla 26: Resultados fenotípicos para el género <i>Dietzia</i> (III).....	151
Tabla 27: Resultados fenotípicos para el género <i>Gordonia</i> (I).....	152
Tabla 28: Resultados fenotípicos para el género <i>Gordonia</i> (II).....	153
Tabla 29: Resultados fenotípicos para el género <i>Gordonia</i> (III).....	154
Tabla 30: Resultados fenotípicos para el género <i>Microbacterium</i> (I).....	156
Tabla 31: Resultados fenotípicos para el género <i>Microbacterium</i> (II).....	156
Tabla 32: Resultados fenotípicos para el género <i>Microbacterium</i> (III).....	156
Tabla 33: Resultados fenotípicos para el género <i>Mycobacterium</i> (I).....	157
Tabla 34: Resultados fenotípicos para el género <i>Mycobacterium</i> (II).....	158
Tabla 35: Resultados fenotípicos para el género <i>Mycobacterium</i> (III).....	158
Tabla 36: Características de crecimiento aislado PA.3 vs. <i>P. asaccharolytica</i>	159
Tabla 37: Perfil ácidos grasos aislado PA.3 vs. <i>P. asaccharolytica</i>	159
Tabla 38: Tests fenotípicos diferenciadores entre aislado PA.3 y <i>P. asaccharolytica</i>	160
Tabla 39: Resultados fenotípicos para el género <i>Rhodococcus</i> (I).....	161
Tabla 40: Resultados fenotípicos para el género <i>Rhodococcus</i> (II).....	161
Tabla 41: Resultados fenotípicos para el género <i>Rhodococcus</i> (III).....	161
Tabla 42: Resultados fenotípicos para el género <i>Tsukamurella</i> (I).....	162
Tabla 43: Resultados fenotípicos para el género <i>Tsukamurella</i> (II).....	162
Tabla 44: Resultados fenotípicos para el género <i>Tsukamurella</i> (III).....	163
Tabla 45: Resultados fenotípicos para el género <i>Williamsia</i> (I).....	163
Tabla 46: Resultados fenotípicos para el género <i>Williamsia</i> (II).....	163
Tabla 47: Resultados fenotípicos para el género <i>Williamsia</i> (III).....	163
Tabla 48: Resultados ensayos biodegradación a los 21 días de incubación.....	165
Tabla 49: Resultados PCR catecol 1,2-dioxigenasa.....	170
Tabla 50: Resultados BLAST catecol 1,2-dioxigenasa.....	175

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1: Relación intraclase del <i>phylum Actinobacteria</i> , basada en la comparación de las secuencias del 16S rDNA/rRNA.....	8
Figura 2: Modelo propuesto por Minnikin para la cubierta de los mycolata.....	24
Figura 3: Vista esquemática de los componentes celulares y técnicas usadas.....	25
Figura 4: Resolución taxonómica de las técnicas utilizadas.....	26
Figura 5: Esquema general del proceso.....	39
Figura 6: Problema real de espumas en depuradora.....	45
Figura 7: Factores condicionantes en la biorremediación microbiana.....	65
Figura 8: Rutas metabólicas para la degradación del fenol.....	76
Figura 9: Ruta metabólica para la degradación del naftaleno.....	77
Figura 10: Degradación del catecol mediante la escisión orto del anillo aromático.....	79

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 11: Placa aislado CQG-5a.....	111
Figura 12: Placa aislado PA.3.....	111
Figura 13: Placa aislado P175.....	111
Figura 14: <i>Rhodococcus ruber</i> (54B).....	114
Figura 15: <i>Mycobacterium smegmatis</i> (PB.6).....	114
Figura 16: <i>Gordonia paraffinivorans</i> (C2.2).....	114
Figura 17: Cromatopla de ácidos micólicos de los aislados QB8.2, D1.1, QB7.2, P2.3, P1.1, N1, N4, N5, N9-1 y 8V. <i>Gordonia amarae</i> (CECT 5704) (1) y <i>Streptomyces albus</i> (CECT 3051) (2).....	118
Figura 18: Cromatopla de ácidos micólicos de los aislados D3.2, PA.2, 54B, P135, RG-4b, Ca20.2 y PA.3. <i>Gordonia amarae</i> (CECT 5704) (1) y <i>Streptomyces albus</i> (CECT 3051) (2).....	118
Figura 19: Cromatopla de isómeros del DAP de los aislados P26, J4.1, CS7.1, R1, P54, C4.1, C5.5a, D2.3, QB2.2 y CS1.1. En los extremos (1 y 2) se observan los patrones de las formas L-DAP y meso-DAP.....	119
Figura 20: Cromatopla de los azúcares predominantes de los aislados QB8.1, P39, CS20.4, D9.1, L2 y CS32.1. En los extremos (1, 2, 3 y 4) se observan los patrones de	119

arabinosa y galactosa.....	
Figura 21: Comprobación extracción DNA. 1: CQG5.a; 2: L10; 3: CS25.1; 4: D7.1; 5: CS27.2; 6: CS32.3; 7: PB.7; 8: PA.3.....	120
Figura 22: Gel de PCR con los productos de amplificación del 16S rDNA.1 y 16: Marcador de peso molecular; 2: Blanco sin DNA; 3: P26; 4: QB17.2; 5: P1.2; 6:D1.1; 7: CS5.1; 8: Ca10.1; 9: RG4b; 10: C2.1; 11: C5.6; 12: C4.5; 13: 54B; 14: CS20.1; 15: N16-9.....	121
Figura 23: Comparación de la similaridad de las secuencias del gen 16S rDNA y los valores de hibridación DNA:DNA.....	126
Figura 24: Árbol filogenético parcial del género <i>Corynebacterium</i> basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de bootstrap significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.....	128
Figura 25: Árbol filogenético parcial del género <i>Dietzia</i> basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de bootstrap significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.....	130
Figura 26: Árbol filogenético parcial (I) del género <i>Gordonia</i> basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de bootstrap significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.....	136
Figura 27: Árbol filogenético parcial (II) del género <i>Gordonia</i> basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de bootstrap significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.....	137
Figura 28: Árbol filogenético parcial del género <i>Microbacterium</i> basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de bootstrap significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.....	138
Figura 29: Árbol filogenético parcial del género <i>Mycobacterium</i> basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de bootstrap significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.....	140
Figura 30: Árbol filogenético parcial del género <i>Pseudonocardia</i> basado en la comparación	142

de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de bootstrap significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.1 sustituciones por posición de nucleótido.....	
Figura 31: Árbol filogenético parcial del género <i>Rhodococcus</i> basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de bootstrap significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.....	144
Figura 32: Árbol filogenético parcial del género <i>Tsukamurella</i> basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de bootstrap significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.....	147
Figura 33: Árbol filogenético parcial del género <i>Williamsia</i> basado en la comparación de secuencias del 16S rDNA entre los aislados obtenidos y las especies validadas del género. Los porcentajes en los nudos indican los niveles de bootstrap significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.....	148
Figura 34: control positivo glucosa medio MSM (A) y aislado 54B en medio MSM suplementado con fenol (B).....	168
Figura 35: control positivo glucosa medio M9 (A) y aislado C5.5a en medio M9 suplementado con fenol (B).....	168
Figura 36: Gel de PCR con los productos de amplificación del gen catecol 1,2-dioxigenasa. 1: Marcador de peso molecular; 2: Blanco sin DNA; 3: Control negativo; 4: Control positivo; 5: PB.1; 6:P39; 7: Ca27.1; 8: 54B; 9: QB7.1; 10: CS6.1.....	169