

# Índice

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
1.1	CARACTERÍSTICAS TÍPICAS DE LAS AGUAS RESIDUALES .....	4
1.2	PROCESOS BIOLÓGICOS EN AGUAS RESIDUALES .....	4
1.3	ORGANISMOS PROCARIOTA Y EUCARIOTA.....	6
1.3.1	Clasificación Microbiana.....	8
1.4	DOMINIO ARQUEA .....	9
1.4.1	Phylum <i>Crenarchaeota</i> .....	12
1.4.2	Phylum <i>Euryarchaeota</i> .....	13
1.5	DOMINIO BACTERIA .....	21
1.5.1	Phylum bacterianos.....	25
1.5.2	Grupos Funcionales Bacterianos .....	43
1.5.3	Bacterias acumuladoras de poli-fosfatos (PAO).....	48
1.5.4	Bacterias acumuladoras de glucógeno (GAO).....	51
1.5.5	Bacterias acidogénicas/acetogénicas .....	53
1.5.6	Organismos metanotróficos .....	57
1.5.7	Bacterias Sulfato Reductoras (SRB).....	58
1.6	FILOGENIA EUCARIOTA.....	65
1.7	IMPORTANCIA DE IDENTIFICAR LOS MICROORGANISMOS EN LOS TRATAMIENTOS DE LAS AGUAS .....	66
1.8	TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS. HIBRIDACIÓN MOLECULAR FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH) .....	67
1.8.1	Fijación de la biomasa para la hibridación .....	76
1.8.2	Sondas.....	79
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>83</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>87</b>
3.1	MATERIALES Y MÉTODOS.....	87
3.1.1	Procedencia de la muestra.....	87
3.1.2	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> , FISH .....	88
3.2	PROCEDIMIENTO .....	89
3.2.1	Sondas.....	92
3.2.2	Cuantificación de los microorganismos.....	96
3.2.3	Problemas asociados con la detección de la fluorescencia .....	99
3.3	PRETRATAMIENTO ENZIMÁTICO.....	100
3.4	ANÁLISIS DE LA FIGURA DE LA SEÑAL DE HIBRIDACIÓN.....	101
3.4.1	Análisis estadístico de las medidas de intensidad de la señal .....	102
3.5	IDENTIFICACIÓN Y RECUENTO DE PROTOZOOS .....	103
3.6	PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	103
3.6.1	Fijación formas media luna para determinar la actividad Fosfatasa .....	104
3.6.2	Fijación formas media luna para determinar la actividad Glucuronidasa .....	104
3.6.3	Tinción Neisser (Eikelboom y van Buijsen, 1981) .....	105
3.6.4	Observación al microscopio.....	105
3.6.5	Doble tinción para gránulos intracelulares de polifosfato (Poli P) y polihidroxibutirato (PHB) .....	105
3.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	107

<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>117</b>
4.1	PERMEABILIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LAS MUESTRAS .....	117
4.2	IDENTIFICACIÓN Y VARIACIÓN DE LA POBLACIÓN DE ARQUEAS .....	125
4.2.1	Identificación y cuantificación de los diversos grupos funcionales del dominio <i>Archaea</i> ....	126
4.3	IDENTIFICACIÓN Y VARIACIÓN DE LA POBLACIÓN DE BACTERIAS .....	132
4.3.1	Identificación y cuantificación de los diversos grupos funcionales del dominio Bacteria....	146
4.4	DINÁMICA POBLACIONAL EN CADA LÍNEA DE LA EDAR. ....	162
4.5	IDENTIFICACIÓN DEL DOMINIO EUCARIOTA .....	170
4.6	ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LAS RELACIONES ENTRE BACTERIAS Y ARQUEAS CON LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS, OPERACIONALES Y PROTOZOOS.....	173
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>217</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>233</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>237</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS</b>	

# Índice de Figuras

Figura 1. División de los seres vivos. ....	6
Figura 2. Unión de los lípidos con el glicerol. ....	8
Figura 3. Secuencia RNA ribosómico de <i>Escherichia coli</i> . ....	9
Figura 4. Reacciones por la vía acetil-CoA de las metanogénicas. ....	10
Figura 5. Subdivisiones del dominio Arquea. ....	11
Figura 6. Posible relación dominio/actividad de la comunidad AOA. ....	13
Figura 7. Arqueas metanogénicas. A) Arqueas <i>methanosarciales</i> en una muestra de digester anaerobio en la EDAR Carraixet. ....	14
Figura 8. Clasificación de las sondas metanogénicas en relación con las bacterias metanogénicas que hibridan. ....	18
Figura 9. Sustratos de las metanogénicas. ....	19
Figura 10. Reacciones llevadas a cabo en los fangos activados. ....	22
Figura 11. Subdivisión del dominio Bacteria. ....	23
Figura 12. Secuencias halladas en muestras de fangos activados con proceso de nitrificación. ....	24
Figura 13. <i>Cloroflexi</i> encontradas con FISH en un reactor a escala de laboratorio con las sondas CFX1223 y GNSB941. ....	26
Figura 14. Organismos <i>Nitrospira</i> encontrados en aguas residuales con MAR-FISH. ....	28
Figura 15. <i>Alphaproteobacterias</i> encontradas con FISH en muestras de un reactor MBR. Las células en verde bacterias hibridadas con EUBmix. ....	30
Figura 16. <i>Betaproteobacteria</i> encontradas con FISH en un proceso EBPR. ....	31
Figura 17. <i>Gammaproteobacterias</i> en muestra de un reactor desnitrificante. ....	32
Figura 18. <i>Deltaproteobacterias</i> en un digester anaerobio. ....	33
Figura 19. <i>Epsilonbacteria</i> en aguas residuales. ....	34
Figura 20. <i>Firmicutes</i> en una biopelícula de un reactor anaerobio. Figura capturada con un microscopio confocal de fluorescencia. ....	37
Figura 21. <i>Actinobacteria</i> en fangos activados con proceso de eliminación de fósforo. ....	39
Figura 22. <i>Planctomycetes</i> en fangos activados aerobios. ....	41
Figura 23. Colonia de <i>Acidobacteria</i> en una muestra extraída en un acuífero en EEUU. ....	42
Figura 24. Diagrama de la técnica DGGE. ....	68
Figura 25. Diagrama de la técnica T-RFLP. ....	69
Figura 26. Diagrama de la técnica SSCP. ....	70
Figura 27. Diagrama de la técnica PCR. ....	71
Figura 28. Esquema de la hibridación fluorescente in situ FISH. ....	74
Figura 29. Composición de la comunidad bacteriana en diversas EDAR por análisis semi- cuantitativo FISH. ....	75
Figura 30. Composición de la comunidad de bacterias en una EDAR in Skagen Dinamarca, usando las sondas FISH. ....	75
Figura 31. Estructura de la pared celular de las bacterias Gram positivo. ....	76
Figura 32. Estructura de la pared celular de las bacterias gram negativas. ....	77
Figura 33. Representación esquemática de los peptidoglicanos. ....	78
Figura 34. Peptidoglicano de la pared celular de arquea. ....	79
Figura 35. Esquema de la EDAR del Carraixet (EPSAR). ....	88
Figura 36. Descomposición a escala de grises por el MATLAB. ....	98
Figura 37. Hoja de cálculo que genera el programa de cuantificación. ....	99
Figura 38. Actinobacterias hibridadas durante la prueba de tratamiento enzimático. ....	119
Figura 39. Variación de la población de arqueas durante el muestreo. ....	125
Figura 40. Arqueas en fangos activados de la EDAR del Carraixet. ....	126
Figura 41. Arqueas oxidadoras de amonio (AOA) <i>Nitrosopumilus maritimus</i> en fangos activos de la EDAR del Carraixet. ....	127
Figura 42. Variación poblacional de las arqueas metanogénicas en la línea 1. ....	128
Figura 43. Variación poblacional de las arqueas metanogénicas durante el muestreo en la línea 2. ....	129

Figura 44. Arqueas <i>Methanosarciales</i> en fangos activos de la EDAR del Carraixet. ....	130
Figura 45. Arqueas <i>Methanomicrobiales</i> hibridadas con la sonda MG1200b en fangos activos de la EDAR del Carraixet. ....	131
Figura 46. Arqueas <i>Methanobacterales</i> hibridadas con la sonda MB311 en fangos activos de la EDAR del Carraixet. ....	131
Figura 47. <i>Firmicutes</i> presentes en las muestras de la EDAR del Carraixet. ....	133
Figura48. <i>Actinobacterias</i> presentes en la muestras de la EDAR del Carraixet. ....	133
Figura49. Células del phylum <i>Bacteroidetes</i> en las muestras de la EDAR del Carraixet. Hibridadas con la sonda CF319b. ....	134
Figura50. <i>Acidobacterias</i> presentes en las muestras de la EDAR del Carraixet hibridadas con la sonda SS_HOL1400. ....	135
Figura51. Dinámica poblacional de las bacterias <i>Chloroflexi</i> en las líneas 1 y 2 de la EDAR del Carraixet. ....	136
Figura52. Bacterias del phylum <i>Chloroflexi</i> en flóculos de la EDAR del Carraixet. ....	137
Figura53. Variación de la población de $\alpha$ - <i>Proteobacterias</i> en la EDAR del Carraxeit. ....	138
Figura54. $\alpha$ - <i>Proteobacteria</i> en la EDAR del Carraixet. ....	139
Figura55. Variación de la población $\beta$ - <i>Proteobacteria</i> en la EDAR del Carraixet. ....	140
Figura56. $\beta$ - <i>Proteobacteria</i> en la EDAR del Carraixet. ....	141
Figura57. Variación de la población de $\gamma$ - <i>Proteobacterias</i> en la EDAR del Carrixet. ....	142
Figura58. $\gamma$ - <i>Proteobacteria</i> en la EDAR del Carraixet. ....	142
Figura59. Cocobacilos $\gamma$ - <i>Proteobacteria</i> presentes en la EDAR del Carraixet. ....	143
Figura 60. Variación de la población de $\delta$ - <i>Proteobacteria</i> en la EDAR del Carraixet. ....	144
Figura61. $\delta$ - <i>Proteobacteria</i> en fangos activos de la EDAR del Carraixet. ....	144
Figura62. Variación de la población de <i>Planctomycetes</i> en fangos activos de la EDAR del Carraixet. ....	145
Figura63. <i>Planctomycetes</i> en fangos activos en la EDAR del Carraixet. ....	146
Figura64. Variación de la población de AOB en fangos activos de la EDAR del Carraixet. ....	147
Figura65. AOB presentes en los fangos activos de la EDAR del Carraixet. ....	147
Figura 66. Variación en el tiempo del phylum <i>Nitrospira</i> en la EDAR del Carraixet. ....	148
Figura67. Células de <i>Nitrospira</i> en los flóculos de la EDAR del Carraixet. ....	149
Figura68. Variación de las bacterias Desnitrificantes <i>Azoarcus</i> , <i>Thauera</i> , <i>Castellaniella</i> en los fangos activos de la EDAR del Carraixet. ....	150
Figura69. <i>Azoarcus</i> , <i>Thauera</i> , <i>Castellaniella</i> en fangos activos en la EDAR del Carraixet. ....	151
Figura70. <i>Paracoccus</i> presente en los fangos activos de la EDAR del Carraixet. ....	151
Figura71. Variación de las PAO en la EDAR del Carraixet. ....	152
Figura72. PAO presentes en fangos activos en la EDAR del Carraixet. ....	153
Figura 73. Variación de la población de GAO en la EDAR del Carraixet. ....	154
Figura 74. GAO presentes en fangos activos en la EDAR del Carraixet. ....	155
Figura 75. Metanotrofas <i>cluster</i> Tipo 1 en fangos activos en la EDAR del Carraixet. ....	155
Figura 76. Metanotrofas <i>cluster</i> tipo 2 presentes en fangos activos en la EDAR del Carraixet. ....	156
Figura 77. SRB presentes en los fangos activados de la EDAR del Carraixet. ....	157
Figura 78. Variación de la población de <i>Desulfonema</i> en la EDAR del Carraixet. ....	158
Figura 79. Variación de las SRB hibridadas con la sonda SRB385 en fangos activos en la EDAR del Carraixet. ....	159
Figura 80. Variación de las SRB hibridadas con la sonda SRB385Db en fangos activos en la EDAR del Carraixet. ....	160
Figura 81. SRB <i>Desulfonema</i> presentes en fangos activos en la EDAR del Carraixet. ....	161
Figura 82. SRB presentes en fangos activos en la EDAR del Carraixet. ....	162
Figura 83. SRB presentes en fangos activos en la EDAR del Carraixet. ....	162
Figura 84. Dinámica poblacional en la línea 1 de la EDAR del Carraixet. ....	163
Figura 85. Dinámica poblacional en la línea 2 de la EDAR del Carraixet. ....	164
Figura 86. Dinámica poblacional de los grupos funcionales en la línea 1 de la EDAR del Carraixet. ....	168
Figura 87. Dinámica poblacional de los grupos funcionales en la línea 2 de la EDAR del Carraixet. ....	169
Figura 88. Esporas de hongos encontradas en la EDAR del Carraixet. ....	172

Figura 89. Acumulación de PHB de las esporas de hongos en forma de media luna. ....	173
Figura 90. Formas elipsoidales con actividad Glucuronidasa y Fosfatasa. ....	173
Figura 91. Gráfico de las correlaciones Canónicas entre bacterias, arqueas y variables operacionales. ...	175
Figura 92. Análisis de correspondencia entre los phylum y las variables operacionales. ....	177
Figura 93. Análisis de correspondencia canónico de las comunidades de bacterias y arqueas con las variables operacionales. ....	178
Figura 94. Gráfico de las correlaciones Canónicas entre bacterias, arqueas y variables físico-químicas. ....	181
Figura 95. Análisis de correspondencia para las comunidades de bacterias y arqueas y variables físico-químicas. ....	183
Figura 96. Biplot de las comunidades de bacterias y arqueas con contribución a las columnas. ....	184
Figura 97. Análisis de correspondencia canónica para las comunidades de bacterias y arqueas con las variables físico-químicas. ....	185
Figura 98. Gráfico de las correlaciones Canónicas entre las poblaciones de los grupos funcionales y las variables operacionales. ....	187
Figura 99. Análisis de correspondencia de los grupos funcionales y las variables operacionales. ....	188
Figura 100. Analisis de correspondencia Canónico de los grupos funcionales y las variables operacionales. ....	190
Figura 101. Gráfico de las correlaciones canónicas entre los grupos funcionales y las variables físico-químicas. ....	192
Figura 102. Análisis de correspondencia de los grupos funcionales y las variables físico-químicas. ....	193
Figura 103. Análisis de correspondencia canónica de los grupos funcionales y las variables físico-químicas. ....	194
Figura 104. Análisis de correspondencia canónica entre las comunidades de bacterias, arqueas y los protozoos flagelados, sarcodinos y carnívoros. ....	201
Figura 105. Análisis de correspondencia canónica entre las comunidades de bacterias, arqueas y el los protozoos bacterívoros. ....	202
Figura 106. Análisis de correspondencia canónica entre las comunidades de bacterias, arqueas los protozoos sésiles. ....	202
Figura 107. Análisis de correspondencia canónica entre los grupos funcionales de bacterias, arqueas y protozoos flagelados, sarcodinos y carnívoros. ....	209
Figura 108. Análisis de correspondencia canónica entre los grupos funcionales de bacterias, arqueas y protozoos bacterívoros. ....	209
Figura 109. Análisis de correspondencia canónica entre los grupos funcionales de bacterias, arqueas y protozoos sésiles. ....	210

## Índice de Tablas

Tabla 1. Grupos nutricionales de las arqueas metanogénicas .....	20
Tabla 2. Bacterias acidogénicas hidrolíticas de la digestión Anaerobia .....	54
Tabla 3. Bacterias acidogénicas fermentativas de la digestión anaerobia .....	55
Tabla 4. Bacterias acetogénicas sintróficas obligatorias de la digestión anaerobia .....	56
Tabla 5. Cantidades de formamida y agua para la preparación de la solución de hibridación .....	91
Tabla 6. Cantidades de NaCl para la solución de lavado.....	92
Tabla 7. Sondas generales .....	93
Tabla 8. Sondas para las Arqueas.....	93
Tabla 9. Sondas para cada phylum bacteriano.....	94
Tabla 10. Sondas usadas para la detección de los grupos funcionales .....	95
Tabla 11. Sondas para la detección de Eucaryota.....	96
Tabla 12. Datos operacionales de la línea 1 .....	107
Tabla 13. Datos operacionales de la línea 2 .....	108
Tabla 14. Datos Físico-químicos de la línea 1 .....	109
Tabla 15. Datos Físico-químicos de la línea 2.....	110
Tabla 16. Prueba de permeabilización enzimática.....	118
Tabla 17. Células control en la prueba de tratamiento enzimático .....	118
Tabla 18. Cepas control del phylum <i>Firmicutes</i> .....	121
Tabla 19. Resultados hibridación cepas control <i>Firmicutes</i> .....	121
Tabla 20. Resultados prueba fijación cultivos puros + hibridación con y sin tratamiento enzimático .....	122
Tabla 21. Cepas control para prueba lisis celular por lisozima .....	123
Tabla 22. Resultado de lisis celular por lisozima .....	124
Tabla 23. Cepas control de bacterias .....	132
Tabla 24. Promedio de las poblaciones más representativas en la EDAR del Carraixet .....	167
Tabla 25. Promedios de la población de Protozoos .....	171
Tabla 26. Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas .....	174
Tabla 27. Partición de la inercia explicada.....	178
Tabla 28. Correlaciones entre las variables de entrada y las variables canónicas.....	180
Tabla 29. Partición de la inercia explicada.....	184
Tabla 30. Correlaciones entre las variables de entrada y variables canónicas.....	186
Tabla 31. Partición de la inercia explicada.....	189
Tabla 32. Correlación entre variables de entrada y variables canónicas .....	191
Tabla 33. Partición de la inercia explicada.....	194
Tabla 34. Grupos de los datos biológicos para estadísticos.....	196
Tabla 35. Correlaciones de los factores canónicos y las variables de las comunidades de bacterias y arqueas junto con los grupos de flagelados, sarcodinos y carnívoros.....	197
Tabla 36. Correlaciones de los factores canónicos con las variables de las comunidades de bacterias y arqueas junto con la del grupo bacterívoros .....	198
Tabla 37. Correlaciones entre los factores canónicos y las variables de las comunidades de bacterias y arqueas junto con el grupo de bacterívoros sésiles .....	199
Tabla 38. Correlaciones entre los factores canónicos y las variables de las comunidades de bacterias y arqueas junto con el grupo micrometazoos .....	200
Tabla 39. Correlaciones entre los factores canónicos y los grupos funcionales de bacterias y arqueas y los protozoos flagelados, sarcodinos y carnívoros .....	205
Tabla 40. Correlaciones entre los factores canónicos y los grupos funcionales de bacterias, arqueas y los protozoos bacterívoros nadadores, reptantes y omnívoros .....	206
Tabla 41. Correlación entre los factores canónicos y los grupos funcionales de bacterias, arqueas y los protozoos sésiles.....	207
Tabla 42. Correlación de los factores canónicos y los grupos funcionales de bacterias, arqueas y los micrometazoos.....	208