

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	3
1.2 Tratamientos convencionales para la depuración de aguas residuales	5
1.3 Definición de los principales parámetros operacionales de diseño en EDAR	6
1.4 El ciclo del nitrógeno	7
1.4.1 Alteraciones en el ciclo del nitrógeno.....	9
1.4.2 El nitrógeno en las aguas residuales urbanas	10
1.5 Sistemas para la eliminación de nitrógeno en las aguas residuales.....	11
1.6 Bioquímica del proceso de nitrificación.....	17
1.7 Bacterias del proceso de nitrificación	19
1.7.1 Las bacterias oxidantes de amonio.....	20
1.7.2 Las bacterias oxidantes del nitrito	23
1.7.3 Principales factores que afectan a la actividad y la abundancia de las bacterias nitrificantes en las EDAR	26
1.8 Aplicación de ozono para el tratamiento de aguas residuales.....	31
1.9 Métodos moleculares para la identificación y cuantificación de poblaciones microbianas.....	33
1.9.1 Técnica molecular de hibridación <i>in situ</i> con sondas marcadas con fluoróforos (FISH)	34
1.9.2 Metagenómica de secuenciación dirigida	36
1.10 Técnicas respirométricas para la medida de la actividad	47
1.11 Técnicas de cuantificación del ATP	48

1.12	Principales técnicas de ordenación multivariante empleadas en estudios de ecología.....	50
1.12.1	Exploración de datos.....	51
1.12.2	Pretratamiento de datos.....	51
1.12.3	Análisis exploratorio multivariante	52
1.12.4	Interpretación ambiental.....	56
2.	Objetivos	63
3.	Materiales y métodos	69
3.1	Origen de las muestras de fango activo.....	71
3.2	Toma de muestras	74
3.3	Determinación de las variables fisicoquímicas.....	75
3.4	Determinación de variables operacionales.....	77
3.5	Identificación y cuantificación de poblaciones de bacterias nitrificantes mediante la técnica molecular FISH	78
3.5.1	Procesado de las muestras de fango activo para el análisis FISH	78
3.5.2	Fijación de las muestras	78
3.5.3	Hibridación de las muestras	78
3.5.4	Visualización de muestras y cuantificación con microcopia de epifluorescencia	82
3.6	Identificación y cuantificación de poblaciones nitrificantes mediante técnicas metagenómicas	83
3.6.1	Extracción y cuantificación del DNA.....	84
3.6.2	Amplificación y secuenciación masiva de genes ribosomales.....	84
3.7	Valoración de la actividad nitrificante mediante respirometría.	87
3.7.1	Equipo de respirometría	87

3.7.2	Análisis respirométricos.....	89
3.8	Detección de la biomasa activa mediante técnicas de cuantificación del ATP.....	92
3.9	Análisis estadístico de datos.....	93
3.9.1	Análisis descriptivo y tratamiento preliminar de los datos.....	94
3.9.2	Análisis exploratorio.....	95
3.9.3	Análisis de interpretación ambiental.....	95
4.	Resultados.....	99
4.1	Estudio de la dinámica de las poblaciones de bacterias nitrificantes en las EDAR CT, CX, DN y QB.....	101
4.1.1	Resultados de la aplicación de la técnica FISH para la identificación y cuantificación de bacterias nitrificantes en las EDAR CT, CX, DN y QB.....	101
4.1.2	Análisis de los rendimientos de eliminación de las fracciones del nitrógeno en las EDAR CT, CX, DN y QB.....	119
4.2	Estudio de la dinámica poblacional de las bacterias nitrificantes en la EDAR ML.....	139
4.2.1	Resultados de la aplicación de la técnica FISH para la identificación y cuantificación de bacterias nitrificantes en la EDAR ML.....	139
4.2.2	Análisis de los rendimientos de eliminación de nitrógeno en la EDAR ML.....	147
4.3	Análisis de la actividad de las bacterias nitrificantes mediante respirometría.....	154
4.3.1	Evolución temporal de la actividad nitrificante en el EDAR ML.....	154
4.3.2	Interpretación ambiental de la actividad nitrificante.....	157
4.4	Aplicación de técnicas metagenómicas para la identificación y cuantificación de comunidades bacterianas en sistemas de fangos activos.....	161

4.4.1	Resultados de la secuenciación dirigida del gen 16S rRNA de segunda generación haciendo uso de la plataforma Illumina	162
4.4.2	Resultados de la secuenciación dirigida del gen 16S rRNA de tercera generación haciendo uso de la plataforma PacBio	167
4.4.3	Modelos de interpretación ambiental	175
4.5	Valoración del índice de estrés y la carga másica calculada en función del ATP.....	181
5.	Discusión	189
5.1	Análisis de la dinámica poblacional de las bacterias nitrificantes.....	191
5.1.1	Dinámica poblacional de las bacterias oxidantes del amonio	193
5.1.2	Dinámica poblacional de las bacterias oxidantes del nitrito.....	196
5.1.3	Variables ambientales y operacionales relacionadas con la dinámica poblacional de las bacterias nitrificantes	198
5.2	Análisis de la actividad de las bacterias nitrificantes determinada mediante respirometría.....	205
5.2.1	Relación de las variables respirométricas con las variables ambientales	206
5.2.2	Relación de las bacterias nitrificantes con las variables respirométricas	207
5.3	Análisis la biomasa activa mediante técnicas de medición de atp de segunda generación.....	208
5.4	Rendimientos de eliminación del nitrógeno y su relación con la dinámica poblacional de las bacterias nitrificantes	210
5.4.1	Contribución de las poblaciones nitrificantes a la eliminación del amonio	210
5.4.2	Análisis de los rendimientos respecto a las variables ambientales y biológicas.....	211
5.5	Influencia del ozono en los sistemas biológicos de eliminación de nitrógeno.....	214
5.6	Composición de la comunidad de bacterias nitrificantes según metagenómica	216
5.6.1	Secuenciación mediante la plataforma Illumina	216

5.6.2 Secuenciación mediante la plataforma PacBio y comparativa de las técnicas moleculares para la identificación y cuantificación de poblaciones microbianas	219
6. Conclusiones	223
7. Difusión de resultados.....	229
Referencias.....	235
Anexos.....	259
Anexo 1. Esquema de las EDAR analizadas en este estudio	261
Anexo 2. Preparación de reactivos y soluciones. Técnica FISH	264
Anexo 3. Abundancia relativa de las bacterias nitrificantes.....	269
Anexo 4. Tasas de respiración de las bacterias nitrificantes determinadas mediante respirometría ..	278
Anexo 5. Calidad del efluente, rendimientos de eliminación, variables fisicoquímicas y parámetros	280
Anexo 7. Calidad del efluente, rendimientos de eliminación, variables fisicoquímicas y parámetros operacionales medidos en la EDAR ML.....	284
Anexo 8. Calidad del efluente, rendimientos de eliminación, variables fisicoquímicas y parámetros operacionales medidos en la EDAR CT, CX, DN y ML	289
Anexo 9. Datos de ATP, SSVATP y CMATP	293