



Técnicas moleculares para el estudio de la ecología microbiana y del sistema de nitrificación en las EDAR

Las herramientas de monitorización para el control de los sistemas biológicos en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) deben estar basadas en metodologías precisas, que permitan apuntar hacia la correcta gestión del proceso. En este estudio se han utilizado técnicas de secuenciación dirigida de segunda (Illumina) y tercera generación (PacBio) para caracterizar las comunidades microbianas del fango activo durante un episodio de descenso en los rendimientos de eliminación del amonio. Además, para detectar posibles sesgos en la secuenciación y caracterizar las bacterias involucradas en el proceso de nitrificación, se ha utilizado la técnica de hibridación *in situ* (FISH). Para valorar la actividad de la biomasa se han aplicado técnicas de cuantificación del ATP de última generación. Los análisis realizados aportan información sobre qué tipo de resultados esperar según la tecnología de secuenciación utilizada. Los resultados de la ATPmetría sugieren que la medida de los sólidos suspendidos volátiles activos puede mejorar el cálculo de las variables de diseño y control más habituales de las EDAR.

Palabras clave

EDAR, bacterias oxidantes del amonio, bacterias oxidantes del nitrito, secuenciación de lectura larga, Illumina, fangos activos, ecología microbiana.

MOLECULAR TECHNIQUES TO ASSESS MICROBIAL ECOLOGY AND NITRIFICATION PROCESS IN WASTEWATER TREATMENT PLANTS

Monitoring tools for biological process control in wastewater treatment plants (WWTP) need to be based on accurate methodologies that aim at adequate process management. In this work, second (Illumina) and third (PacBio) amplicon sequencing techniques were used to monitoring microbial communities during nitrification break performance in an activate sludge system. Nitrifying bacterial communities were monitored by fluorescence in situ hybridization (FISH). To assess bacterial activity second-generation ATP determination technique was used. The comparison between techniques provides information about the biases of each sequencing technology. ATP determination techniques suggest that the measurement of active volatile suspended solids can improve the calculation of most common design and control parameters of WWTP.

Keywords

WWTP, ammonia-oxidizing bacteria, nitrite-oxidizing bacteria, PacBio's full-length sequencing, Illumina, activated sludge, microbial ecology.

Paula Barbarroja Ortiz

doctora, investigadora del Grupo de Química y Microbiología del Agua del Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA) de la Universitat Politècnica de València

José Luis Alonso Molina

doctor, responsable del Grupo de Química y Microbiología del Agua del Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA) de la Universitat Politècnica de València

Inmaculada Amorós Muñoz

investigadora del Grupo de Química y Microbiología del Agua del Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA) de la Universitat Politècnica de València

Laura Pastor Alcañiz

doctora, responsable de Innovación de Depuración de Aguas del Mediterráneo (DAM)

Ana M^o Maciá Hernández

jefa de Planta EDAR Molina de Segura, UTE Vectris SAV DAM

Carlos Lardín Mifsut

técnico de Explotación Zona II de la Entidad de Saneamiento y Depuración de Aguas de la Región de Murcia (Esamur)



1. INTRODUCCIÓN

Las EDAR son un instrumento esencial en la protección del medio ambiente. Estas instalaciones emplean procesos biológicos para la eliminación de materia orgánica, nutrientes y otros compuestos potencialmente contaminantes. La operación de estos procesos está basada en la explotación de la actividad de determinados grupos de microorganismos. Por ello, una comprensión integral de la ecología microbiana es crítica para mejorar su desempeño y predecir respuestas a cambios ambientales inesperados.

Entre los tratamientos que se llevan a cabo, o se han de incorporar a las EDAR, la eliminación de nitrógeno suscita especial interés debido a los problemas de toxicidad y eutrofización que su vertido causa en ríos, lagos y costas. El proceso más utilizado en las EDAR urbanas para la eliminación biológica de nitrógeno es la nitrificación-desnitrificación vía nitrato, siendo la nitrificación, frecuentemente, el punto crítico de este proceso.

Durante la nitrificación el amonio es oxidado hasta nitrato aeróbicamente gracias a la acción de las bacterias nitrificantes. Los microorganismos nitrificantes más comunes en las EDAR incluyen las arqueas y bacterias oxidantes del amonio (AOA y BOA), las bacterias oxidantes del nitrito (BON) y las recientemente descubiertas bacterias comammox, capaces de realizar la oxidación completa del amonio a nitrato (Daims *et al.*, 2015; van Kessel *et al.*, 2015).

Los avances en biología molecular en la última década han permitido ampliar los conocimientos sobre la nitrificación. Cada vez son más los estudios que reflejan la diversidad de estos microorganismos y su versatilidad metabólica (Daims *et al.*,

» Este estudio es el primero en utilizar técnicas de secuenciación de tercera generación (STG) para la caracterización del fango activo de un sistema convencional de eliminación de nitrógeno

2016; Kuypers *et al.*, 2018). Por ello, para profundizar en la comprensión de este proceso es esencial partir de una buena caracterización de los microorganismos responsables del mismo.

Las técnicas moleculares son una herramienta excelente para monitorizar la variación en los perfiles de las comunidades microbianas debido a factores externos. Técnicas como la hibridación *in situ* con sondas marcadas con fluoróforos (FISH) son un método preciso y fiable, que permite obtener información cuantitativa sobre un determinado grupo taxonómico de interés. Sin embargo, la aparición de las tecnologías de secuenciación ha supuesto un punto de inflexión en el estudio de los ecosistemas.

El desarrollo de las técnicas de segunda generación (SSG), como la plataforma Illumina, ha permitido su exponencial aplicación gracias a su amplia cobertura, precisión y bajo coste. Sin embargo, la corta longitud de las secuencias (<450 pares de bases) producidas por este tipo de secuenciación dificulta el ensamblaje de secuencias y no permite profundizar en la asignación taxonómica a nivel de especie (Wylie *et al.*, 2012).

Con el fin de solucionar estos problemas nacen las técnicas de secuenciación de tercera generación (STG), también llamadas secuenciación de molécula única. La STG permite realizar directamente la secuenciación en tiempo real de moléculas de DNA individuales sin la necesidad de realizar ampliaciones mediante PCR.

Este tipo de secuenciación permite generar lecturas de cadena larga (2-10 kb), lo cual mejora la sensibilidad y precisión respecto a otras técnicas (Yarza *et al.*, 2014). Los estudios realizados que emplean técnicas de STG para la caracterización de la microbiota en sistemas de tratamiento de aguas son escasos, siendo este el primer estudio en el que se utiliza para la caracterización del fango activo de un sistema convencional de eliminación de nitrógeno.

Aunque la secuenciación dirigida, junto con la bioinformática, permite inferir en la composición y el potencial genético de una determinada comunidad, no informa sobre su actividad. Una de las técnicas que posibilita el seguimiento de la actividad de una comunidad microbiana es la medición del ATP. Su monitorización tiene un alto interés, ya que el ATP es la molécula implicada en el metabolismo de todas las células y, por tanto, una medida directa de la biomasa viva. Sin embargo, su determinación no ha sido ampliamente utilizada debido a las limitaciones que existían de la propia técnica, que han sido solucionadas con la evolución de los sistemas de detección (Whalen *et al.*, 2018).

Las nuevas técnicas de ATPmetría permiten la medida del ATP en matrices complejas como los fangos activos. Su aplicación se ha implementado también para la monitorización de sistemas de distribución (Vang *et al.*, 2014), caracterización de aguas recuperadas (Li *et al.*, 2017) y la monitorización de otros sistemas biológicos (Greenstein y Wert, 2019).

FIGURA 1. Sondas utilizadas para la identificación de bacterias nitrificantes.

Bacteria	Sonda	Especificidad (5'-3')	Especificidad	FA ¹	Referencia
Eubacteria	EUB 338 I	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Eubacteria</i>	0-50	Amann (1990)
	EUB 338 II	GCAGCCACCCG TAGGTGT	<i>Planctomycetes</i>	0-50	Daims et al., (1999)
	EUB 338 III	GCTGCCACCCG TAGGTGT	<i>Verrucomicrobiales</i>	0-50	Daims et al., (1999)
	EUB 338 IV	GCAGCCTCCCG TAGGAGT	Filo <i>Eubacteria</i> ²	0-50	Daims et al., (1999)
BOA	Nso1225	CGCCATTGTATTACGTGTGA ³	β Proteobacteria Amoniooxidantes	45	Mobarry et al., (1996)
	Nse1472	ACCCAGTCATGACCCCC	<i>Nitrosomonas halophila</i> , <i>N. eutropha</i> y <i>N. europaea</i> .	50	Juretschko et al., (1998)
	Nmo218	CGGCCGCTCCAAAAGCAT	<i>Nitrosomonas</i> sp. Nm103	35	Gieseke et al., (2001)
	NEU	CCCCTCTGCTGCACTCTA	<i>Nitrosomonas oligotropha</i>	40	Wagner et al., (1995)
	cNEU	TTCCATCCCCCTCTGCCG	La mayoría de <i>Nitrosomonas</i> spp. halófilas y halotolerantes..	40	Wagner et al., (1995)
	Nmv	TCCTCAGAGACTACGCGG	Competidora ⁴	35	Pommerening-Roser et al., (1996)
	BON	Ntspa662	GGAATTCGCGCTCCTCT	<i>Nitrospira</i> spp.	35
CNtspa662		GGAATTCGCTCCTCT	Competidora ⁴	40	Daims et al., (2001a)
NIT3		CCTGTGCTCCATGCTCCG	<i>Nitrobacter</i> spp.	40	Wagner et al., (1996)
cNIT3		CCTGTGCTCCAGGCTCCG	Competidora ⁴	40	Wagner et al., (1996)
Ntoga122		TCCGGGTACGTTCCGATAT	<i>Nitrotoga</i> sp.	40	Lücker et al., (2014)
c1Ntoga122		TCWGGGTACGTTCCGATAT	Competidora ⁴	40	Lücker et al., (2014)
c2Ntoga122		TCYGGGTACGTTCCGATGT	Competidora ⁴	40	Lücker et al., (2014)
Ntlc804		CAG CGT TTA CTG CTC GGA	<i>Nitrollancetus hollandicus</i>	20	Soroking et al., (2012)
c1Ntlc804		CAG CGT TTA CTG CTC GGA	Competidora ⁴	20	Soroking et al., (2012)
c2Ntlc804	CAT CGT TTA CTG CTC GGA	Competidora ⁴	20	Soroking et al., (2012)	
Arquea	Sonda	Especificidad (5'-3')	Especificidad	FA ¹	Referencia
Arquea	Arch915	GTGCTCCCCGCCAATTCT	Mayor parte de <i>Archaea</i>	10-35	Stahl y Amann (1991)
AOA	Thau1162	TTCTCCGTCTCAGCGAC	Subgrupo <i>Thaumarchaeota</i> grupo I.1b	20	Mubmann et al., (2011)
	cThau1162	TTCTCCGTCTCAGCGGC	Competidora ⁴	20	Mubmann et al., (2011)
	Cren679	TTTTACCCCTTCTCCG	<i>Candidatus 'Nitrosopumilus maritimus'</i>	35	Labrenz et al., (2010)

¹ FA: Porcentaje de Formamida² Fila no cubiertos por EUB 338, 338II y 338III³ Modificada con 4 bases LNA (Alonso et al., 2009)⁴ Sonda competidora sin marcar para aumentar la especificidad de la sonda correspondiente

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. TOMA DE MUESTRAS

La EDAR Molina del Segura, ubicada en la región de Murcia, está diseñada para dar servicio a una población de 271.250 habitantes equivalentes y tratar un caudal medio diario de aproximado de 25.515 m³/día. La EDAR cuenta con un proceso biológico de fangos activos en flujo de pistón con esquema Ludzack-Ettinger que opera con un tiempo de retención celular (TRC) de 12,9±4,8 días y una carga másica (CM) de 0,1±0,0 kgDBO₅/kgSSVLM. La concentración de nitrógeno amoniacal afluyente es de 38,9±12,1 mg/L y los rendimientos de eliminación del amonio y DQO son superiores al 90%.

Para el examen biológico se tomó una muestra integrada a partir de muestras simples recogidas al final de cada uno de los reactores aerobios.

2.2. ANÁLISIS FISH

La técnica FISH ha sido utilizada para identificar y cuantificar la comunidad de bacterias nitrificantes del reactor aerobio. La hibridación se realizó a 46 °C según Daims et al. (2004) con tiempos de hibridación entre 2 y 4 horas según las sondas utilizadas en este estudio (**Figura 1**). Las muestras hibridadas han sido examinadas en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX50 (Olympus) y procesadas para su cuantificación según Borrás (2008).

2.3. PREPARACIÓN DEL DNA, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE GENES RIBOSOMALES

Se extrajo por duplicado el DNA total a partir de 1 mL de muestra de fango activo mediante el kit Fast-DNA SPIN para suelo (MP Biomedicals), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el

DNA se eliminaron los inhibidores presentes mediante el kit comercial One- Step PCR Inhibitor Removal Kit (Zymo Research). A continuación se midió la concentración de DNA por fluorescencia con el fluorímetro QubitTM (Thermo Fisher Scientific). La relación 260/280 se determinó mediante espectrofotometría de UV con el equipo NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

La secuenciación dirigida del gen 16S rRNA se ha llevado a cabo mediante dos tecnologías diferentes, MiSeq Illumina (SSG) y SMRT de PacBio (STG). Las regiones hipervariables V3-V4 del gen bacteriano 16S rRNA han sido amplificadas por el servicio de secuenciación LifeSequencing utilizando los cebadores 341F (Herlemann et al., 2011) y 802R (Claesson et al., 2009). La secuenciación de los amplicones en la plataforma Illumina MiSeq se ha llevado a cabo en modo *paired-end* de 2x300 pares de bases.



Para la amplificación de las regiones V1-V8 del gen 16S rRNA se han utilizado los iniciadores 27F y BS-R407 (Klindworth *et al.*, 2013). En este caso, la secuenciación se ha llevado a cabo en la plataforma de secuenciación PacBio del servicio de secuenciación y bioinformática GATC Biotech, donde se realizó el proceso de construcción de las librerías de amplicones de DNA.

2.4. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

Las secuencias obtenidas tras la secuenciación en la plataforma Illumina se han analizado usando QIIME versión 1.9.1. (Caporaso *et al.*, 2010) y comandos adicionales de la máquina virtual Microbiome Helper (Comeau *et al.*, 2017). Con la herramienta FASTX-Toolkit v0.0.14 se han eliminado las secuencias de menos de 200 pares de bases y de calidad menor de Q30 en el 90% de los casos (Gordon, 2009). La eliminación de las secuencias potencialmente quiméricas se ha llevado a cabo mediante la herramienta VSEARCH v1.11.1 (Rognes *et al.*, 2016). Las secuencias restantes han sido procesadas mediante el comando open reference de QIIME, aplicando los métodos SortMeRNA v2.0 y SUMACLUST v1.0.00 (Mercier *et al.*, 2013). Las OTU se han definido al 97% de la similitud de secuencia, empleando la base de datos SILVA 128 (Quast *et al.*, 2013).

Las secuencias obtenidas de la plataforma PacBio han sido procesadas para la búsqueda y eliminación de quimeras mediante la herramienta UCHIME (Edgar *et al.*, 2011). Las secuencias únicas no quiméricas obtenidas tras este análisis se han sometido a un análisis BLASTn (Altschul *et al.*, 1990). Las secuencias de rRNA del gen 16S de referencia se

han obtenido del Ribosomal Database Project (Cole *et al.*, 2008). La clasificación taxonómica se ha basado en la Taxonomía del NCBI (Federhen, 2011).

2.5. CUANTIFICACIÓN DEL ATP

Para la cuantificación del ATP total (ATPt) y el ATP disuelto (ATPd) en la muestra de fango activo se ha utilizado el kit QG21Waste y el luminómetro PhotonMaster de Luminultra, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ATP celular (ATPc) se ha calculado como la diferencia entre el ATPt y el ATPd. Adicionalmente se ha calculado el índice de estrés de la biomasa (IEB) como el cociente entre el ATPd y el ATPt. A partir del ATPc se han calculado los sólidos suspendidos activos del licor mezcla (SSVALM) considerando que la biomasa contiene aproximadamente el 50% de carbón en peso seco (Tchobanoglous *et al.*, 2003).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. APLICACIÓN DE TÉCNICA FISH PARA LA CUANTIFICACIÓN DE POBLACIONES NITRIFICANTES

De las 11 sondas FISH utilizadas en este estudio, 2 dieron señales positivas para las BOA y 2 para las BON. En el **Tabla 1** se detalla la composición de la comunidad nitrificante determinada según FISH. *Nitrosomonas* ha sido el género dominante responsable de la oxidación del amonio, su abundancia relativa ha sido menor del 1%. Esta comunidad estuvo representada por el linaje *Nitrosomonas halotolerantes* (sonda NEU). El género *Nitrosomonas* se encuentra comúnmente gobernando los sistemas de eliminación biológica de nutrientes, tanto en fangos activos como en fangos granulares y biopelículas (Wells *et al.*, 2009). La

presencia de miembros del linaje de *Nitrosomonas halotolerantes* se atribuyen a sistemas con elevadas concentraciones de amonio (Martens-Habbena *et al.*, 2009).

Los géneros dominantes responsables de la oxidación del nitrito han sido *Nitrospira* (sonda Ntspa662) y *Nitrotoga* (sonda Ntoga122), ambos con abundancias relativas menores del 1%. Ambos géneros han sido identificados previamente como dominantes en sistemas de tratamiento de ARU en numerosos estudios (Lücker *et al.* 2015). La selección de *Nitrospira* como especie dominante suele atribuirse a su estrategia de supervivencia (K-estrategia), gracias a la que se ve favorecida en entornos con bajas concentraciones de nitrito (Chiellini *et al.*, 2013). Mientras que el género *Nitrotoga*, descubierto posteriormente, conecta los rangos de afinidad de *Nitrospira spp.* y *Nitrobacter spp.* y es competitiva a temperaturas menores que el resto de BON (Nowka *et al.*, 2015).

Aunque las especies detectadas en este estudio coinciden con las

TABLA 1

RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES NITRIFICANTES MEDIANTE LA TÉCNICA FISH.

Especies	Muestra A
<i>Nitrosomonas spp</i>	<0,5%
<i>N. oligotropha</i>	0
<i>N. halophila-eutropha</i>	<0,5%
<i>N. europaea</i>	0
<i>Nitrosococcus Mobilis</i>	0
<i>Nitrolancetus hollandicus</i>	0
<i>Nitrospira spp</i>	<0,5%
<i>Nitrotoga sp</i>	<0,5%
<i>Nitrobacter spp</i>	0
Subgrupo thaumarchaeota	0
<i>Nitrosopuymilus maritimus</i>	0

especies habituales en los sistemas de depuración, su abundancia relativa se encuentra por debajo de los valores característicos para este tipo de sistemas (3-6%) (Nielsen *et al.*, 2004) y para los valores habituales del propio sistema (3-4%) (Barbarroja, 2019). El descenso significativo registrado en esta muestra es indicativo de inestabilidad en el proceso de nitrificación. Esta observación se confirma tras el análisis de los rendimientos del amonio, los cuales descendieron hasta el 19% en la fecha de la toma de muestra. Estos resultados indican que el porcentaje de biomasa nitrificante es consistente con los rendimientos de eliminación del amonio observados. Es interesante puntualizar que, aunque existen estudios en los que se ha relacionado la dominancia funcional de la nitrificación con la dominancia numérica de organismos nitrificantes, no son abundantes las investigaciones en las que se ha descrito una correlación directa entre ambos (Barbarroja *et al.*, 2019; Awolusi, 2016).

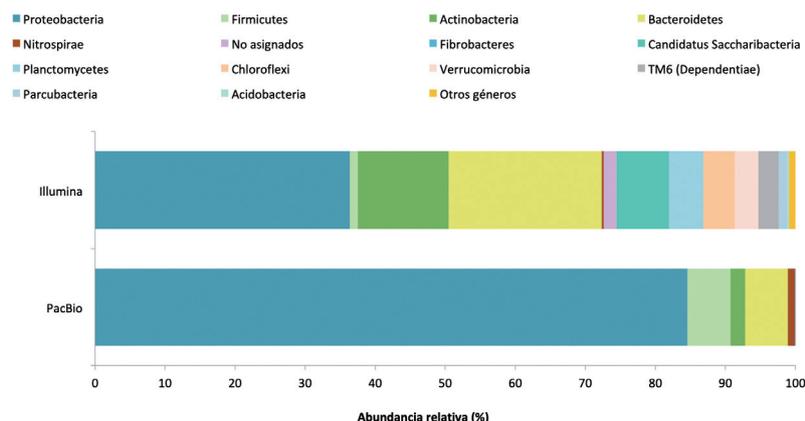
3.2. SECUENCIACIÓN DIRIGIDA DEL GEN 16S rRNA

3.2.1. Secuenciación de segunda generación mediante la plataforma Illumina

Los resultados de la secuenciación dirigida del gen 16S rRNA permitieron obtener información de la composición de comunidad nitrificante y del total de la comunidad bacteriana presente en el fango activo.

La secuenciación mediante Illumina determinó que el filo más abundante en el reactor aerobio ha sido *Proteobacteria* (36%) (Figura 2), al cual pertenecen la totalidad de las BOA conocidas y algunos géneros de BON. Otros filios abundantes han sido *Bacteroidetes* (21,86%), *Actino-*

FIGURA 2. Principales filios detectados mediante secuenciación dirigida del gen 16S rRNA.



bacteria (12,98%), *Saccharibacteria* (7,53%), *Planctomycetes* (4,88%) y *Chloroflexi* (4,50%). Estudios previos en sistemas de fangos activos han determinado que *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Chloroflexi* eran también los filios más abundantes (Xue *et al.*, 2017). El filo *Nitrospirae*, relativo a las BON, presentó una abundancia relativa promedio del 0,26%.

Los géneros de bacterias más abundantes en el promedio de las muestras han sido *Zoogloea* (4,00%), *Candidatus Competibacter* (3,42%), *Planctomyces*, *Defluviicoccus* (2,78%), *Flavobacterium* (2,33%), *Candidatus Microthrix* (1,78%) y *Planctomyces* (1,73%). Dentro de las proteobacterias, el género *Nitrosomonas* ha presentado una abundancia relativa del 0,24%. Los géneros dominantes en la oxidación del nitrito detectados según Illumina han sido *Nitrospira* (0,26%) y *Nitrotoga* (0,04%). Estos géneros han sido previamente identificados mediante Illumina como dominantes en los sistemas de eliminación biológica de amonio (Maet *et al.*, 2015). Sin embargo, y coincidiendo con los resultados de FISH, su abundancia relativa está por debajo del porcentaje habitual (Phan *et al.*, 2016).

3.2.2. Secuenciación de tercera generación mediante plataforma PacBio y comparativa de técnicas

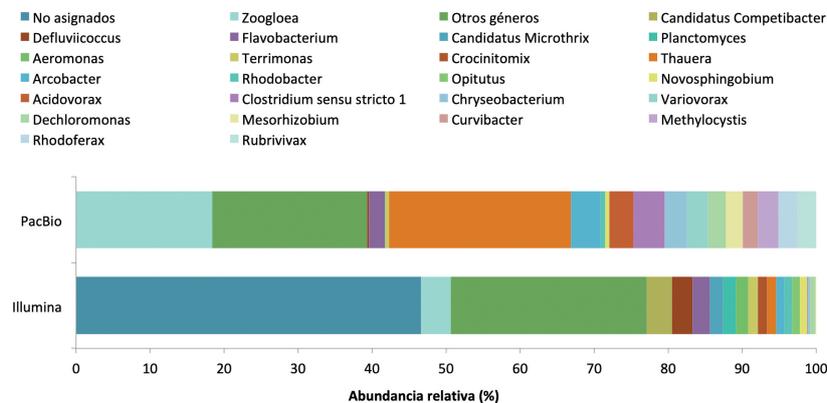
Tal y como se observa en la Figura 2, la secuenciación SMRT de PacBio determinó que *Proteobacteria* ha sido el filo más abundante (84,55%). Este también ha sido el filo más abundante según la plataforma Illumina. Sin embargo, su abundancia relativa era un 43% menor. Según Illumina el segundo filo en abundancia ha sido *Bacteroidetes*, mientras que con la secuenciación mediante PacBio este filo ocupó el cuarto lugar. Resultados similares se observan para el resto de filios detectados con ambas técnicas.

A nivel de género (Figura 3), las diferencias en la composición obtenida aumentan. PacBio ha determinado el género *Thauera* como el más abundante con una abundancia relativa del 24,59%, mientras que este género presentó una abundancia promedio del 1,22% según la plataforma Illumina. El género *Zoogloea* ha sido identificado como el segundo género más abundante mediante esta técnica (18,38%) y el primer género en abundancia según Illumina (4,00%).

Las diferencias observadas en los resultados de ambas plataformas de



FIGURA 3. Principales géneros detectados mediante secuenciación dirigida del gen 16S rRNA.



secuenciación son debidas a las características propias de cada una de las técnicas. La secuenciación PacBio tiene la capacidad de obtener lecturas de gran longitud que abarcan fragmentos genómicos de decenas de miles de pares de bases. Estas secuencias son muy útiles especialmente para el ensamblaje de novo (Mahmoud *et al.*, 2017). Sin embargo, reducen significativamente el rendimiento de la secuenciación.

Por tanto, mientras que la secuenciación Illumina produce un elevado número de secuencias cortas, en la secuenciación mediante PacBio se obtienen un menor número de lecturas de mayor longitud. Es por ello que los análisis realizados con PacBio mostraron una comunidad compuesta por una menor riqueza que los de Illumina y abundancias relativas mayores. Estos resultados también se reflejan en el porcentaje de secuencias no asignadas, que a nivel de género resultó del 46,63% para Illumina y del 0,6% en PacBio.

La secuenciación mediante la plataforma PacBio, coincidiendo con el resto de técnicas moleculares, detectó el género *Nitrosomonas* como el dominante en la oxidación del amonio. En este caso, su abundancia ha sido menor que la determinada

con las dos técnicas anteriores. Los resultados determinaron la presencia de los dos géneros importantes de NOB *Nitrotoga* y *Nitrospira*. En la **Figura 4** se observa la comparativa de los resultados a nivel de género obtenida con las diferentes técnicas aplicadas en este estudio.

A nivel de género, los resultados obtenidos mediante Illumina y FISH presentan un alto grado de similitud. El sesgo más importante se observa en la abundancia del género *Nitrospira* determinada con PacBio, la cual mostró una abundancia en torno al 1%, mientras que esta abundancia estuvo en torno al 0,2% según las otras técnicas.

La plataforma PacBio aportó datos acerca de la composición a nivel de

especie (**Tabla 2**). Las BOA identificadas, dentro del género *Nitrosomonas*, se asignaron a las especies *Nitrosomonas marina*, *Nitrosomonas sp.* y *Nitrosomonas aestuarii*. Esta técnica ha permitido confirmar que estas especies podrían ser las componentes del grupo de *Nitrosomonas* halotolerantes hibridadas mediante la sonda NEU.

Las especies identificadas dentro del género *Nitrospira* se correspondieron con *Candidatus Nitrospira defluvii*, perteneciente al linaje I de *Nitrospira*, y *Nitrospira cf. moscoviensis*, perteneciente al linaje II de *Nitrospira*, aunque ninguna de ellas presenta un metabolismo comammox (Wang *et al.*, 2018).

3.3. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA BIOMASA MEDIANTE LA CUANTIFICACIÓN DEL ATP

Las concentraciones de ATPt y ATPd han presentado valores de 5.390 y 2.210 ng/mL, respectivamente. La concentración de ATPc resultante ha sido de 3.180 ng/mL.

Las concentraciones de ATPc habituales para reactores aerobios con sistema de eliminación de nutrientes han sido determinadas en torno a los 2.096 ng/mL (Whalen *et al.*, 2006). Esta diferencia puede ser debida a que esta EDAR trabaja con

FIGURA 4. Abundancia de la población nitrificante según diferentes técnicas.

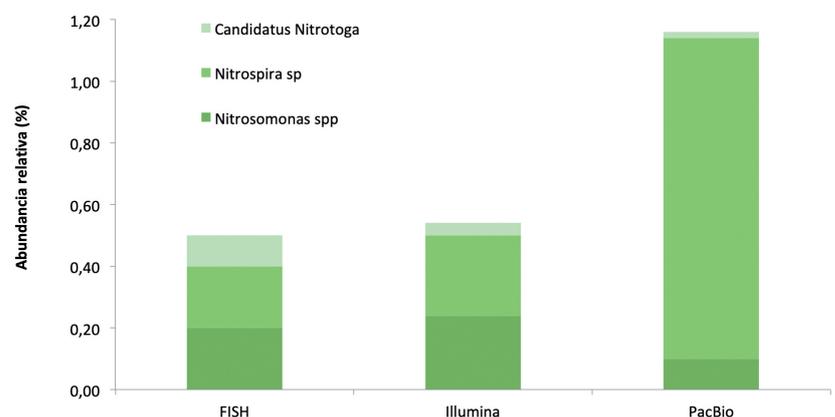


TABLA 2	
ABUNDANCIA RELATIVA DE LAS ESPECIES NITRIFICANTES DETERMINADA EN LA PLATAFORMA DE SECUENCIACIÓN PACBIO.	
Especies BN	Abundancia relativa (%)
<i>Nitrosomonas marina</i>	0,02
<i>Nitrosomonas sp.</i>	0,02
<i>Nitrosomonas aestuarii</i>	0,05
<i>Candidatus Nitrospira</i>	0,07
<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i>	0,14
<i>Nitrospira sp.</i>	0,68
<i>Nitrospira cf. moscoviensis</i>	0,07
<i>Candidatus Nitrotoga</i>	0,01

concentraciones de SSLM más elevadas que los sistemas convencionales de fangos activos (5.047 ± 770 mg/L) y a la evolución de las técnicas de cuantificación.

La concentración de SSVLM calculada a partir del ATPc resultó de 1.590 mg/L. Este valor representó un 42% de los SSVLM determinados según el procedimiento habitual (3.780 mg/L). Estos resultados son coherentes con la medidas esperadas, ya que la medida del ATPc hace referencia únicamente a la materia viva celular y el ensayo convencional del los SSVLM mide la cantidad de sólidos volátiles presente en los fangos activos. La materia volátil, además de biomasa celular, puede incluir: una fracción variable de materia orgánica no biodegradable, sustancias poliméricas extracelulares y material orgánico procedente de la lisis celular. Es por ello que la medida de los SSVLM puede proporcionar información poco precisa sobre la cantidad de biomasa viable en los sistemas biológicos. Estos datos ponen de manifiesto la importancia de utilizar técnicas más precisas, como el ATPc, para el control de esta variable.

A partir de los valores de ATP se calculó el IEB del sistema, que alcan-

zó el 41%. Este valor es un 27% superior a los valores registrados para esta EDAR, los cuales se sitúan en el 14% como promedio. El IEB registrado indica un elevado de estrés del sistema, el cual coincidió con el descenso de la actividad y biomasa nitrificante y el descenso en los rendimientos de eliminación del amonio.

Relaciones entre el IEB y el rendimiento del proceso han sido detectadas previamente. En el estudio de Lujan-Facundo *et al.* (2018) se observó una relación entre el aumento del IEB y el deterioro del rendimiento de eliminación de la DQO cuando aumentaron las conductividades del licor mezcla. Por tanto, esta medida podría ser un indicador útil en la monitorización del proceso biológico y concretamente del proceso de nitrificación.

4. CONCLUSIONES

La caracterización de una comunidad bacteriana es una tarea compleja que requiere de la combinación de diferentes aproximaciones moleculares. La elección de la técnica adecuada para el estudio de la ecología microbiana dependerá de los objetivos y el alcance del estudio. Por tanto, es necesario saber qué resultados se

pueden esperar de las diferentes tecnologías de secuenciación existentes en el mercado.

La técnica FISH, gracias a su precisión y fiabilidad, ha demostrado ser una herramienta interesante para el control rutinario y el seguimiento de poblaciones específicas en las EDAR. La secuenciación mediante la plataforma Illumina permitió obtener un mayor número de lecturas que la secuenciación SMRT de PacBio, aportando mayor información sobre la diversidad a nivel de género. Sin embargo, la mayor longitud de las lecturas obtenidas mediante PacBio permitió una mejor asignación taxonómica a nivel de especie. Se observó una correlación entre las muestras analizadas mediante FISH e Illumina, las cuales permitieron detectar los sobreestimaciones en la abundancia de ciertas especies determinada según la secuenciación PacBio.

La medición del ATP celular permitió calcular el índice de estrés del sistema y la concentración de sólidos suspendidos activos del licor mezcla. El índice de estrés se perfiló como un potencial indicador del estado del proceso biológico de depuración. Los valores de los SSVLM determinados realzan la importancia de utilizar técnicas más precisas para el control de los SSLM.

Los desafíos futuros requerirán comprender los factores que controlan la nitrificación, si se quiere gestionar de manera sostenible el ciclo del nitrógeno. En consecuencia, determinar los factores clave en la operación de estos sistemas a escala real resulta de gran importancia, no solo para la protección de los recursos hídricos, sino también para mejorar los rendimientos de planta y los costes de explotación.

La monitorización en el tiempo de las variaciones en los perfiles de la



comunidad nitrificante y su actividad es necesaria para encontrar la relación de estas variables con la estabilidad funcional del proceso y sus parámetros de operación.

5. AGRADECIMIENTOS

Este estudio forma parte del proyecto 'Influencia de las variables operacionales y fisicoquímicas en la dinámica y estructura de la población de bacterias nitrificantes', financiado la Entidad de Saneamiento y Depuración de la Región de Murcia (Esamur) y la empresa Depuración de Aguas del Mediterráneo (DAM). La autora Paula Barbarroja agradece el apoyo del Ministerio de Asuntos Económicos y Transformación Digital (Mineco) por la financiación PTA2014-09555-I. Los autores del trabajo agradecen el trabajo y la colaboración del personal de la EDAR Molina del Segura.

Bibliografía

- [1] Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, núm. 215, págs. 403-410.
- [2] Barbarroja, P.; Zornoza, A.; Aguado, D.; Borrás, L.; Alonso, J.L. (2019). A multivariate approach of changes in filamentous, nitrifying and protist communities and nitrogen removal efficiencies during ozone dosage in a full-scale wastewater treatment plant. *Environmental Pollution*, núm. 252, págs. 1.500-1.508.
- [3] Barbarroja Ortiz, P. (2019). Estudio de la dinámica poblacional y actividad de los organismos nitrificantes en sistemas de depuración de aguas residuales. Tesis Doctoral, Universitat Politècnica de València.
- [4] Borrás Falomir, L. (2008). Técnicas microbiológicas aplicadas a la identificación y cuantificación de organismos presentes en sistemas ebpr. Tesis Doctoral, Universitat Politècnica de València.
- [5] Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Costello, E.K.; Fierer, N.; Peña, A.G.; Goodrich, J.K.; Gordon, J.I.; Huttley, G.A.; Kelley, S.T.; Knights, D.; Koenig, J.E.; Ley, R.E.; Lozupone, C.A.; McDonald, D.; Muegge, B.D.; Pirrung, M.; Reeder, J.; Sevinsky, J.R.; Turnbaugh, P.J.; Walters, W.A.; Widmann, J.; Yatsunenkov, T.; Zaneveld, J.; Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, núm. 7, págs. 335-336.
- [6] Comeau, A.M.; Douglas, G.M.; Langille, M.G. (2017). Microbiome helper: a custom and streamlined workflow for microbiome research. *MSystems*, núm. 2(1).
- [7] Chiellini, C.; Munz, G.; Petroni, G.; Lubello, C.; Mori, G.; Verni, F.; Vannini, C. (2013). Characterization and comparison of bacterial communities selected in conventional activated sludge and membrane bioreactor pilot plants: a focus on *Nitrospira* and *Planctomycetes* bacterial phyla. *Current Microbiology*, núm. 67, págs. 77-90.
- [8] Claesson, M.J.; O'Sullivan, O.; Wang, Q.; Nikkilä, J.; Marchesi, J.R.; Smidt, H.; O'Toole, P.W. (2009). Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PLoS one*, 4, e6669
- [9] Cole, J.R.; Wang, Q.; Cardenas, E.; Fish, J.; Chai, B.; Farris, R.J. (2008). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*
- [10] Daims, H.; Lückner, S.; Wagner, M. (2016). A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria. *Trends in Microbiology*, núm. 24(9), págs. 699-712.
- [11] Daims, H.; Lebedeva, E.V.; Pjevac, P.; Han, P.; Herbold, C.; Alberssen, M.; Kirkegaard, R.H. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, núm. 528(7.583), pág. 504
- [12] Daims, H.; Stoecker, K.; Wagner, M. (2004). Fluorescence in situ hybridization for the detection of prokaryotes. In: *Molecular Microbial Ecology*, eds. M. Osborn & C. Smith. Taylor & Francis, Nueva York. págs. 208-228.
- [13] Edgar, R.C.; Haas, B.J.; Clemente, J.C.; Quince, C.; Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, núm. 27, págs. 2.194-2.200
- [14] Federhen, S. (2011). The NCBI taxonomy database. *Nucleic Acids Research*, núm. 40(D1), págs. 136-143.
- [15] Gordon, A. (2009). FASTX-Toolkit: FASTQ/A short-reads pre-processing tools. Cold spring harbor laboratory, cold spring harbor, NY. http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit.
- [16] Greenstein, K.E.; Wert, E.C. (2019). Using rapid quantification of adenosine triphosphate (ATP) as an indicator for early detection and treatment of cyanobacterial blooms. *Water Research*, núm. 154, págs. 171-179.
- [17] Herlemann, D.P.; Labrenz, M.; Jürgens, K.; Bertilsson, S.; Waniek, J.J.; Andersson, A.F. (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.*, núm. 5 (10), págs. 1.571-1.579
- [18] Kuypers, M.M.; Marchant, H.K.; Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, núm. 16(5), págs. 263-276.
- [19] Ma, Q.; Qu, Y.; Shen, W.; Zhang, Z.; Wang, J.; Liu, Z.; Zhou, J. (2015). Bacterial community compositions of coking wastewater treatment plants in steel industry revealed by Illumina high-throughput sequencing. *Bioresource Technology*, núm. 179, págs. 436-443.
- [20] Mahmoud, M.; Zywicki, M.; Twardowski, T.; Karłowski, W.M. (2017). Efficiency of PacBio long read correction by 2nd generation Illumina sequencing. *Genomics*, núm. 111, págs. 43-49
- [21] Martens-Habbena, W.; Berube, P.M.; Urakawa, H.; de la Torre, J.R.; Stahl, D.A. (2009). Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying archaea and bacteria. *Nature*, núm. 461, págs. 976-981
- [22] Mercier, C.; Boyer, F.; Bonin, A.; Coissac, E. (2013). SUMATRA and SUMACLUST: fast and exact comparison and clustering of sequences. In: *Programs and Abstracts of the SeqBio 2013 workshop*. Abstract, págs. 27-29.
- [23] Nowka, B.; Daims, H.; Spieck, E. (2015). Comparison of oxidation kinetics of nitrite-oxidizing. *Applied and Environmental Microbiology*, núm. 81, págs. 745-753.
- [24] Li, G.Q.; Yu, T.; Wu, Q.Y.; Lu, Y.; Hu, H.Y. (2017). Development of an ATP luminescence-based method for assimilable organic carbon determination in reclaimed water. *Water Research*, núm. 123, págs. 345-352.
- [25] Lückner, S.; Schwarz, J.; Gruber-Dorninger, C.; Spieck, E.; Wagner, M.; Daims, H. (2015). Nitrotoxa-like bacteria are previously unrecognized key nitrite oxidizers in full-scale wastewater treatment plants. *The ISME Journal*, núm. 9, pág. 708.
- [26] Luján Facundo, M.J.; Fernández Navarro, J.; Alonso Molina, J.L.; Amorós Muñoz, I.; Moreno, Y.; Mendoza Roca, J.A.; Pastor-Alcañiz, L. (2018). The role of salinity on the changes of the biomass characteristics and on the performance of an OMBR treating tannery wastewater. *Water Research*, núm. 142, págs. 129-137.
- [27] Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Glöckner, F.O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, núm. 41(D1), págs. 590-596.
- [28] Phan, H.V.; Hai, F.I.; Zhang, R.; Kang, J.; Price, W.E.; Nghiem, L.D. (2016). Bacterial community dynamics in an anoxic-aerobic membrane bioreactor—impact on nutrient and trace organic contaminant removal. *International Biodeterioration & Biodegradation*, núm. 109, págs. 61-72.
- [29] Rognes, T.; Flouri, T.; Nichols, B.; Quince, C.; Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584.
- [30] Tchobanoglous, G.; Burton, F.L.; Stensel, H.D. (2003). *Metcalf & Eddy, Inc.'s Wastewater Engineering: Treatment, disposal and reuse*, 4th Edition. New York: McGraw-Hill, págs. 1.819.
- [31] Van Kessel, M.A.; Speth, D.R.; Albertsen, M.; Nielsen, P.H.; den Camp, H.J.O.; Kartal, B.; Lückner, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, núm. 528(7.583), pág. 555.
- [31] Vang, Ó.K.; Corfittzen, C.B.; Smith, C.; Albrechtsen, H.J. (2014). Evaluation of ATP measurements to detect microbial ingress by wastewater and surface water in drinking water. *Water Research*, núm. 64, págs. 309-320.
- [32] Wang, M.; Huang, G.; Zhao, Z.; Dang, C.; Liu, W.; Zheng, M. (2018). Newly designed primer pair revealed dominant and diverse comammox amoA gene in full-scale wastewater treatment plants. *Bioresource Technology*, núm. 270, págs. 580-587.
- [33] Wells, G.F.; Park, H.D.; Yeung, C.H.; Eggleston, B.; Francis, C.A.; Criddle, C.S. (2009). Ammonia-oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge bioreactor: betaproteobacterial dynamics and low relative abundance of *Crenarchaea*. *Environmental Microbiology*, núm. 11, págs. 2.310-2.328.
- [34] Whalen, P.A.; Tracey, D.R.; Duguay, J. (2018). Adenosine Triphosphate (ATP) measurement technology. *Microbiological*. https://www.luminultra.com/wp-content/uploads/08_Skovhus_Ch08_R3.pdf (consultado 10/01/2018).
- [35] Whalen, P.A.; Whalen, P.J.; Tracey, D.R. (2006). Cellular ATP—a superior measure of active biomass for biological wastewater treatment processes. *Proceedings of the Water Environment Federation*, págs. 3.025-3.037.
- [36] Wylie, K.M.; Truty, R.M.; Sharpton, T.J.; Mihindukulasuriya, K.A.; Zhou, Y.; Gao, H.; Sodergren, E.; Weinstock, G.M.; Pollard, K.S. (2012). Novel bacterial taxa in the human microbiome. *PLoS One* 7: e35294.
- [37] Yarza, P.; Yilmaz, P.; Pruesse, E.; Glöckner, F.O.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H.; Whitman, W.B.; Euzéby, J.; Amann, R.; Rossello-Mora, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, núm. 12, págs. 635-645.
- [38] Xue, J.; Schmitz, B.W.; Caton, K.; Zhang, B.; Zabaleta, J.; Garai, J. (2019). Assessing the spatial and temporal variability of bacterial communities in two Bardenpho wastewater treatment systems via Illumina MiSeq sequencing. *Science of the Total Environment*, núm. 657, págs. 1.543-1.552.