



# Microscopía convencional vs. FISH: identificación de bacterias filamentosas tipo 021N de Eikelboom y grupo *Thiothrix nivea* en fangos activos

El crecimiento excesivo de bacterias filamentosas en fangos activos origina problemas de explotación en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR). Por ello, su correcta identificación y cuantificación es primordial en el control del proceso de las EDAR. Algunas bacterias filamentosas que pertenecen a la clase *Gammaproteobacteria* son muy comunes y abundantes en las EDAR urbanas e industriales, como por ejemplo las bacterias pertenecientes al género *Thiothrix*. Debido a la escasa especificidad de la microscopía convencional, se pueden producir, en algunas ocasiones, errores en la identificación y cuantificación de las bacterias filamentosas. Por ello, el objetivo de este estudio fue comparar la abundancia de las bacterias pertenecientes al grupo *Thiothrix nivea* y tipo 021N de Eikelboom obtenida con la microscopía convencional y la técnica de hibridación *in situ* con sondas marcadas con fluoróforos (FISH) en muestras procedentes de cuatro EDAR. Los resultados obtenidos han permitido establecer que existen diferencias significativas al comparar los resultados de identificación y cuantificación entre ambas técnicas. Además, la técnica FISH reveló diferencias en la dinámica poblacional de *T. nivea* y *T. fructosivorans* al asociarse ambos microorganismos con diferentes variables ambientales.

### Palabras clave

EDAR, fangos activos, bacterias filamentosas, *Thiothrix*, tipo 021N, BIO-ENV.

### CONVENTIONAL MICROSCOPY VERSUS FISH: IDENTIFICATION OF FILAMENTOUS EIKELBOOM TYPE 021N BACTERIA AND THIOTHRIX NIVEA GROUP IN ACTIVATED SLUDGE

*Excessive growth of filamentous bacteria in activated sludge wastewater treatment plants (WWTP) causes serious operational problems. Therefore, their identification and quantification is essential in the process control. Some filamentous bacteria that belong to the class Gammaproteobacteria are very common and abundant in urban and industrial WWTP, as for example the filamentous bacteria belong to the genus Thiothrix. Due to the low specificity of conventional microscopy, occasionally may produce errors in the identification and quantification of filamentous bacteria. Therefore, the aim of this study was to compare the abundance of filamentous Eikelboom type 021N bacteria and Thiothrix nivea group obtained by conventional microscopy and fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides (FISH) in samples from four WWTP. The results have established that there are significant differences when comparing the results of identification and quantification between both techniques. Besides, the FISH technique revealed differences in the population dynamics of T. nivea and T. fructosivorans to correlate both microorganisms with different environmental variables.*

### Keywords

WWTP, activated sludge, filamentous bacteria, *Thiothrix*, type 021N, BIO-ENV.

### Andrés Zornoza

Universitat Politècnica de València, Instituto Universitario de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA)

### Verónica Romera

Universitat Politècnica de València, Instituto Universitario de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA)

### Marta Lledías

Universitat Politècnica de València, Instituto Universitario de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA)

### José Luis Alonso

Universitat Politècnica de València, Instituto Universitario de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA)



## 1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias filamentosas son microorganismos habituales, junto con protistas y metazoos, de la microbiota de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), relacionadas con la degradación de la materia orgánica y que desempeñan un papel esencial en la formación flocular (Madoni *et al.*, 2000). Una presencia moderada de filamentos contribuye a una buena formación del flóculo, así como a la captura y al atrapamiento de pequeñas partículas durante la sedimentación del fango activo, generando un efluente tratado de mayor calidad. La proliferación excesiva de bacterias filamentosas puede originar serios problemas de separación del fango activo en el clarificador secundario (Eikelboom, 2000; Jenkins *et al.*, 2004; Tandoi *et al.*, 2006). Estos problemas pueden ser clasificados en dos grandes grupos, que pueden aparecer de forma separada o conjunta: esponjamiento o *bulking* y espumación o *foaming* (Figura 1), siendo por ello esencial la correcta identificación de las bacterias filamentosas presentes en el fango activo.

El sistema de identificación convencional para los microorganismos filamentosos más frecuentes

en fangos activos fue publicado por Eikelboom en 1975. Posteriormente, Eikelboom y van Buijsen (1983) y Jenkins *et al.* (1993) desarrollaron unas claves de identificación dicotómicas a partir de una serie de características morfológicas y reactivas a las tinciones diferenciales clásicas, entre ellas Gram y Neisser. De esta forma, las bacterias filamentosas fueron agrupadas bajo características comunes, estableciéndose su denominación con un código de cuatro cifras precedido por la denominación 'tipo o morfotipo' y en algunos casos a nivel de género. Las versiones más actualizadas de Eikelboom (2000, 2006) y Jenkins *et al.* (2004) son una modificación de las claves de identificación propuestas por Eikelboom y van Buijsen (1983), donde se recogen las bacterias filamentosas más frecuentes en fangos activos. Sin embargo, debido a que una misma especie puede mostrar polimorfismo o diferentes especies parecer iguales morfológicamente, actualmente solo unos pocos microorganismos filamentosos pueden ser identificados de forma fiable a partir del sistema de identificación convencional, los cuales incluyen principalmente *Candidatus 'Microthrix parvicella'* y nocardioformes.

En este sentido, algunos estudios han demostrado las limitaciones de la técnica convencional en la identificación de los morfotipos filamentosos 0803, 0914 y 0092 (Andújar *et al.*, 2013) y bacterias *Nostocoida limicola* en fangos activos (Calvo *et al.*, 2016).

Con el desarrollo de métodos moleculares de cultivo independiente, el conocimiento sobre la dinámica poblacional de microorganismos filamentosos y otras poblaciones bacterianas características de fangos activos ha aumentado de forma considerable en la última década. Su aplicación, especialmente la técnica de hibridación *in situ* con sondas 16S/23S rDNA marcadas con fluoróforos (FISH), ha permitido esclarecer la posición taxonómica de numerosas bacterias del fango activo, que anteriormente se identificaban agrupándose en morfotipos a través del uso de la microscopía convencional, diseñándose sondas para muchas de estas bacterias (Kragelund *et al.*, 2009; Alonso *et al.*, 2009; Nielsen *et al.*, 2009). Tanto la técnica convencional como la técnica FISH presentan ventajas y limitaciones, las cuales se encuentran discutidas en algunos trabajos de investigación (Andújar *et al.*, 2013; Calvo *et al.*, 2016).

FIGURA 1. Problemas de separación del fango activo: episodio de *bulking* (izquierda) y episodio de *foaming* (derecha).



### 1.1. BACTERIAS FILAMENTOSAS DEL GRUPO *THIOTHRIX NIVEA* Y TIPO 021N EN FANGOS ACTIVOS

El género *Thiothrix* pertenece a la familia *Thiothrichaceae* dentro de la clase *Gammaproteobacteria* (Cole *et al.*, 2005), e incluye un grupo importante de bacterias que oxidan compuestos reducidos del azufre en fangos activos (Eikelboom y van Buijsen, 1983; Jenkins *et al.*, 1993). Las distintas especies del género *Thiothrix* han sido encontradas en innumerables hábitats, desde aguas naturales que contienen sulfuros (Jones *et al.*, 1982; McGlannan y Makemson, 1990; Brigmon *et al.*, 1994b), sistemas de irrigación (Ford y Tucker, 1975), hasta sistemas de fangos activos en plantas de tratamiento de aguas residuales, donde su presencia excesiva origina episodios de bulking (Eikelboom, 1975; Williams y Unz, 1985b, 1989; Brigmon *et al.*, 1994a; Tandoi *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994). La implicación del género *Thiothrix* en episodios de *bulking* ha dado lugar al estudio de su fisiología (Richard *et al.*, 1985; Williams y Unz, 1985a, b; Tandoi *et al.*, 1994), estructura (Williams *et al.*, 1987; Brigmon *et al.*, 1994b), crecimiento (Williams y Unz, 1989) y relación con metales pesados (Shuttleworth y Unz, 1991, 1993).

Desde la primera descripción de *Thiothrix sp.* por Winogradsky en 1888 (Larkin, 1989), han sido reconocidas siete especies y algunos estudios han centrado sus objetivos en resolver en detalle su filogenia (Howarth *et al.*, 1999; Kanagawa *et al.*, 2000; Aruga *et al.*, 2002). Según los datos filogenéticos, las especies de *Thiothrix* han sido divididas en dos grupos principales (Aruga *et al.*, 2002): el grupo *Thiothrix nivea* y el grupo tipo 021N de Eikelboom. El grupo *Thiothrix nivea*, el cual in-

cluye *T. nivea*, *T. unzii* y *T. fructosivorans*, muestra el 88,3-92,0% de similaridad de la secuencia del gen 16S rRNA con el grupo tipo 021N de Eikelboom, el cual incluye *T. disciformis*, *T. eikelboomii* y *T. flexilis*.

La especie *Thiothrix defluvii* se encuentra estrechamente relacionada a nivel filogenético con los aislados *T. flexilis* del grupo tipo 021N de Eikelboom, con un 96,8-97,1% de similaridad de la secuencia del gen 16S rRNA. Sin embargo, dicha especie no ha sido considerada miembro del grupo tipo 021N de Eikelboom (Aruga *et al.*, 2002). Los nombres 'Thiothrix ramosa' (perteneciente al grupo *Thiothrix nivea*) y 'Thiothrix arctophila' no han sido validados y el aislado CT3 no corresponde a una especie en concreto (Tandoi *et al.*, 1994), siendo todavía incierta su posición taxonómica (Unz y Head, 2005). Los últimos estudios sobre especies aisladas del género *Thiothrix*, en este caso a partir de manantiales de aguas sulfurosas, proponen como nuevas especies: *Thiothrix caldifontis sp. nov.* y *Thiothrix lacustris sp. nov.*, ambas estrechamente relacionadas con *Thiothrix fructosivorans* (Chernousova *et al.*, 2009).

Las dos sondas FISH originales diseñadas para identificar bacterias *Thiothrix* y tipo 021N han sido ahora suplementadas por otras para la detección de todas las bacterias 021N

y *Thiothrix*, así como las tres subdivisiones del grupo 021N representadas por *T. disciformis* (grupo I), *T. eikelboomii* (grupo II) y *T. flexilis* (grupo III) (Aruga *et al.*, 2002). Las características morfológicas empleadas para la identificación convencional de bacterias *Thiothrix* y tipo 021N en fangos activos han mostrado cierta confusión y escasa unificación en los últimos manuales publicados (Eikelboom, 2000, 2006; Jenkins *et al.*, 2004). Eikelboom (2000) propone la agrupación de *Thiothrix* I y II (Eikelboom y van Buijsen, 1983) como *Thiothrix* (0,5-1,5 µm de diámetro) (**Figura 2a**), mientras que Jenkins *et al.* (2004) describe a *Thiothrix* I (1,6-2,5 µm) y *Thiothrix* II (0,8-1,4 µm de diámetro). Eikelboom (2006) propone cinco morfotipos para las bacterias *Thiothrix*: *Thiothrix*-1 (incluye *Thiothrix*-3 y 5 de Eikelboom y Geurkink, 2002), *Thiothrix*-2, *Thiothrix*-4, *Thiothrix*-5 y *Thiothrix*-6. Contrariamente, las características morfológicas y respuesta a las tinciones diferenciales clásicas resumidas en los diferentes manuales para la identificación del morfotipo 021N (**Figura 2b**) son similares.

Los estudios de ecología en EDAR a escala real que relacionan las poblaciones de bacterias filamentosas con las variables operacionales y fisicoquímicas de explotación tienen especial interés para el avance en el control y

**FIGURA 2.** Bacterias *Thiothrix* y tipo 021N: (a) roseta de *Thiothrix*; contraste de fases, 400x; (b) Tipo 021N; contraste de fases, 1000x.

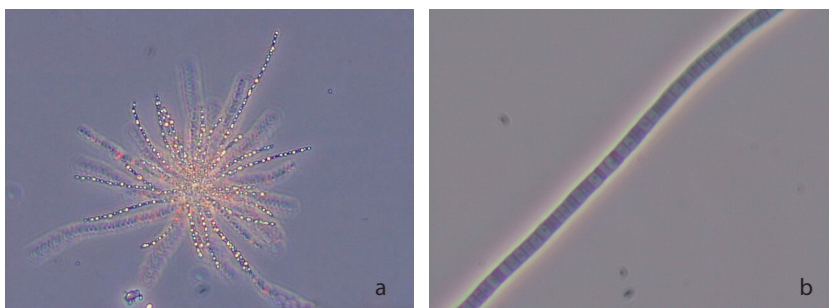




TABLA 2

**SONDAS EMPLEADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS THIOTHRIX Y 021N. Nota: <sup>1</sup> Concentración óptima de formamida; <sup>2</sup> Competidora para TNI (45% formamida) y TFR (35% formamida).**

Morfotipo	Sonda	Secuencia (5'-3')	% FA <sup>1</sup>	Especificidad	Referencia
<i>Thiothrix</i> y 021N	G123T	CCTTCCGATCTCTATGCA	40	<i>Thiothrix</i> spp.	Kanagawa <i>et al.</i> (2000)
<i>Thiothrix</i> y 021N	cG123T	CCTTCCGATCTTCTACGCA	40	Competidora G123T	Kanagawa <i>et al.</i> (2000)
021N	G1B	TGTGTTCGAGTTCCTTGC	30	<i>T. disciformis</i>	Kanagawa <i>et al.</i> (2000)
021N	G2M	GCACCACCGACCCCTTAG	35	<i>T. eikelboomii</i>	Kanagawa <i>et al.</i> (2000)
021N	G3M	CTCAGGGATTCTGCCAT	30	<i>T. flexilis</i>	Kanagawa <i>et al.</i> (2000)
<i>Thiothrix</i>	TNI	CTCCTCTCCCACATTCTA	45	<i>T. nivea</i> , <i>T. unzii</i>	Wagner <i>et al.</i> (1994)
<i>Thiothrix</i>	TFR	CTCCTCTCCCACACTCTA	35	<i>T. fructosivorans</i> , <i>T. ramosa</i>	Kim <i>et al.</i> (2002)
<i>Thiothrix</i>	cTNI y TFR	TCCCTCTCCCACATTCTA	45/35 <sup>2</sup>	Competidora TNI y TFR	Kim <i>et al.</i> (2002)

optimización de los procesos biológicos. La calidad de los resultados de estos estudios comienza indudablemente con una taxonomía firme basada en una elevada especificidad, como por ejemplo, la que ofrece actualmente la técnica FISH para la detección y posterior cuantificación de los microorganismos filamentosos. El uso de la técnica convencional se encuentra todavía muy extendido en el control rutinario de las EDAR, dando lugar a posibles errores en la identificación y cuantificación de dichos organismos debido a su escasa especificidad, y por tanto, generando confusión entre responsables de planta respecto a la bacteria de la cual se está discutiendo.

El objetivo del presente estudio fue comparar la abundancia de bacterias del grupo *Thiothrix nivea* y del tipo 021N de Eikelboom, utilizando ambas técnicas. Para ello, fueron analizadas muestras de fangos activos de cuatro EDAR durante un año, mientras que las relaciones entre variables de control del proceso y microorganismos filamentosos fueron exploradas a partir de rutinas estadísticas multivariantes.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. TOMA DE MUESTRAS

Las muestras de fango activo procesadas han sido tomadas en cuatro EDAR situadas en la Comunidad Valenciana (España): Cuenca del Carraixet (CX), Quart Benàger (QB), Denia-Ondara-Pedreguer (DE) y Castellón (CT), cuyas características se describen a continuación:

- EDAR Cuenca del Carraixet. Proceso Ludzack-Ettinger modificado de flujo en pistón con dos líneas de tratamiento en paralelo y sin recirculación interna. Caudal medio anual línea A+B: 15.784 m<sup>3</sup>/día. Caudal medio anual línea C+D: 23.677 m<sup>3</sup>/día. Población servida: 178.080 habitantes equivalentes.

- EDAR Quart Benàger. Proceso Ludzack-Ettinger modificado de mezcla completa con eliminación de nitrógeno mediante aireación intermitente y sin recirculación interna. Caudal medio anual: 35.023 m<sup>3</sup>/día. Población servida: 166.942 habitantes equivalentes.

- EDAR Dénia-Ondara-Pedreguer. Sistema de fangos activos en régi-

men de oxidación total con eliminación de nitrógeno mediante alternancia de zonas anóxicas y óxicas, así como control del sistema de aireación por lógica difusa. Caudal medio anual: 19.089 m<sup>3</sup>/día. Población servida: 45.152 habitantes equivalentes.

- EDAR Castellón. Proceso Ludzack-Ettinger modificado de flujo en pistón con dos líneas de tratamiento en paralelo y sin recirculación interna. Caudal medio anual línea 1: 21.837 m<sup>3</sup>/día. Caudal medio anual línea 2: 12.320 m<sup>3</sup>/día. Población servida: 193.773 habitantes equivalentes.

La frecuencia del muestreo fue quincenal, desde diciembre de 2008 hasta diciembre de 2009, procesando un total de 140 muestras de fango activo tomadas a la salida del reactor biológico. Todas las muestras recogidas se fijaron y permeabilizaron previamente con paraformaldehído (PFA) y etanol (EtOH) para la posterior identificación de bacterias Gram negativas del género *Thiothrix*, siguiendo el protocolo detallado por Alonso *et al.* (2009).

## 2.2. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS FILAMENTOSAS

En la **Tabla 1** se muestran las sondas 16S rDNA utilizadas en la técnica FISH para la identificación de las diferentes bacterias *Thiothrix* y tipo O21N. Todas las sondas se encuentran marcadas con el fluoróforo TAMRA en el extremo 5'. Para la identificación convencional de *Thiothrix* se han utilizado las claves propuestas por Eikelboom (2000), mientras que para el morfotipo O21N se han empleado las propuestas por Eikelboom (2000) y Jenkins *et al.* (2004).

Las muestras fijadas se inmovilizaron en portaobjetos de vidrio con máscara de teflón y se deshidrataron 3 minutos en soluciones seriadas de etanol al 50%, 80% y 100%, respectivamente. La hibridación se realizó durante 2 horas a 46 °C en el tampón de hibridación con la concentración de formamida correspondiente a cada sonda, según las referencias especificadas en la **Tabla 1**. Seguidamente se realizó un lavado a 48 °C durante 15 minutos en tampón de lavado con la concentración de cloruro sódico correspondiente a cada concentración de formamida.

Las muestras hibridadas se observaron con microscopía de epifluorescencia con un equipo Olympus BX 50. Una vez identificadas las bacterias a partir de la técnica convencional y FISH, se estimó la abundancia de cada una de ellas a partir del índice de filamentos (IF) propuesto por Eikelboom (2000).

## 2.3. VARIABLES DE CONTROL DEL PROCESO BIOLÓGICO

Las variables carga másica (CM), edad del fango (EF) y tiempo de retención hidráulico en el reactor (TRHr) y en el decantador secundario (TRHds) han sido determinadas a partir de Tchobanoglous *et al.* (2003), mientras que las variables sólidos en suspensión del licor mezcla (SSLM), índice volumétrico de fango (IVF) y temperatura en el reactor (T<sup>r</sup>) han sido facilitadas por las empresas de explotación (**Tabla 2**).

## 2.4. ANÁLISIS DE LOS DATOS

La clasificación de los microorganismos filamentosos y su relación con las variables ambientales se realizó a partir de las rutinas multivariantes disponibles en el paquete estadístico PRIMER v7 (Clarke y Gorley, 2015)

y PERMANOVA+ para PRIMER (Anderson *et al.*, 2008). La clasificación de los microorganismos filamentosos, así como el total de los muestreos a partir de sus abundancias, se exploró a partir de un análisis de agrupamiento (clúster), empleando el método de promedio no ponderado de pares de grupos (Field *et al.*, 1982) y gráfico de trazado sombreado (*shade plot*). Se aplicó la transformación raíz cuadrada de la matriz biótica con el fin de ponderar lo suficiente el efecto de los microorganismos muy abundantes respecto a los poco abundantes, así como el índice de Bray-Curtis para generar la matriz distancia (Bray y Curtis, 1957). Por último, el análisis BIO-ENV se aplicó para identificar las variables ambientales que más contribuyeron a las diferencias entre las comunidades de microorganismos filamentosos. La matriz de similitud de variables ambientales se obtuvo con distancia euclidiana normalizada y con estandarización.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las sondas moleculares utilizadas en la técnica FISH hibridaron positivamente con las siguientes bacterias

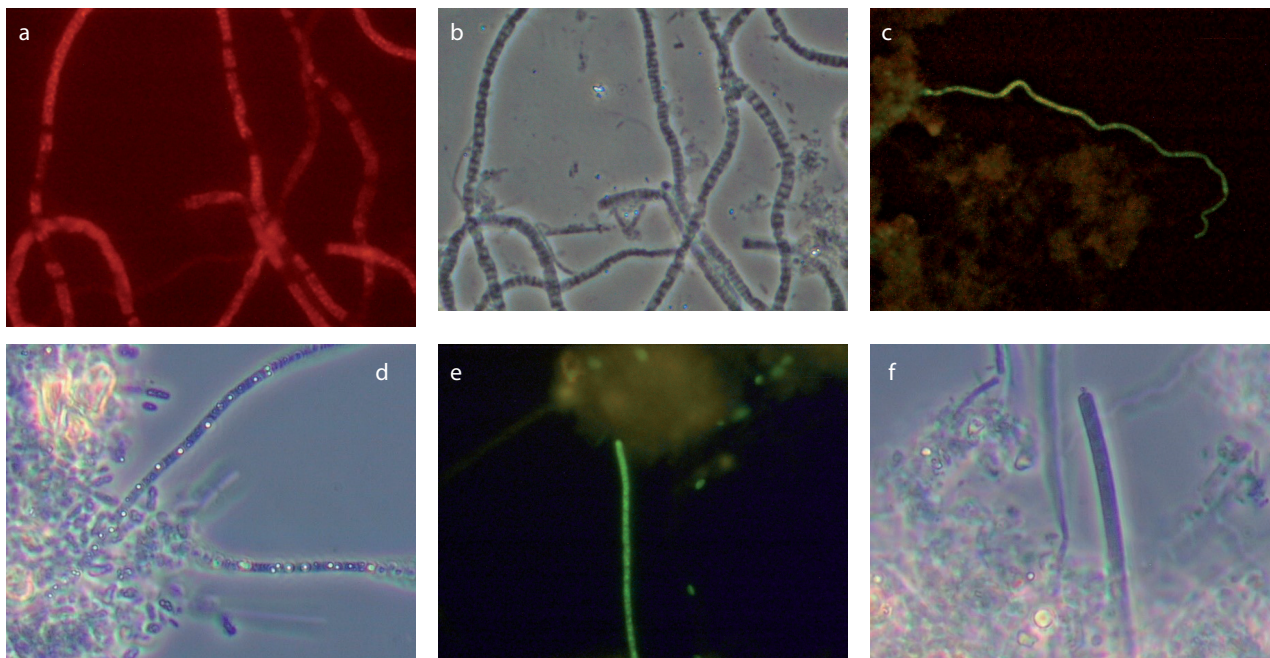
**TABLA 3**

### MEDIA, DESVIACIÓN ESTÁNDAR (DE) Y RANGO DE LAS VARIABLES DE CONTROL DEL PROCESO BIOLÓGICO

Parámetros	Unidades	EDAR QB		EDAR CX		EDAR DN		EDAR CT	
		Media +/- DE	Rango	Media +/- DE	Rango	Media +/- DE	Rango	Media +/- DE	Rango
CM	kg DBO <sub>5</sub> /kg SSLVM.d	0,20 +/- 0,09	0,08 - 0,47	0,29 +/- 0,10	0,12 - 0,43	0,09 +/- 0,02	0,03 - 0,12	0,28 +/- 0,11	0,13 - 0,62
TRHr	horas	17,0 +/- 2,0	14 - 22	6,4 +/- 0,4	5,3 - 6,9	14,9 +/- 1,9	12 - 19	5,5 +/- 0,5	4,7 - 6,3
TRHds	horas	5,8 +/- 1,5	3,8 - 8,4	9,2 +/- 0,6	7,3 - 9,9	6,5 +/- 1,0	5,1 - 8,2	4,9 +/- 0,5	4,2 - 6,3
EF	días	10,8 +/- 5,7	5,2 - 29	7,5 +/- 5,2	3,3 - 22	17,2 +/- 5,4	10 - 35	8,4 +/- 5,9	5,9 - 31
T <sup>r</sup>	°C	21,3 +/- 3,7	14 - 29	20,2 +/- 3,5	15 - 27	18,5 +/- 4,2	11 - 26	22,0 +/- 4,0	15 - 29
SSLM	mg/L	2.460 +/- 386	1.790 - 3.120	1.938 +/- 549	1.100 - 2.980	3.225 +/- 290	2.500 - 3.780	4.055 +/- 1.048	2.460 - 6.800
IVF	mL/g	119 +/- 27	59 - 167	131 +/- 60	76 - 286	109 +/- 15	85 - 140	109 +/- 29	64 - 160



**FIGURA 3.** Bacterias del género *Thiothrix* hibridando positivamente con sondas 16S rDNA: (a) señal positiva sonda G2M (*T. eikelboomii*), epifluorescencia, 1000x; (b) mismo campo imagen anterior, contraste de fases, 1000x; (c) señal positiva sonda TNI (*T. nivea*), epifluorescencia, 1000x.; (d) *T. nivea*, contraste de fases, 1000x.; (e) señal positiva sonda TFR (*T. fructosivorans*), epifluorescencia, 1000x.; y (f) *T. fructosivorans*, contraste de fases, 1000x.



pertenecientes al grupo *Thiothrix nivea*: *T. fructosivorans* (**Figuras 3e y f**) y *T. nivea* (**Figuras 3c y d**), mientras que aquellas pertenecientes al grupo tipo 021N de Eikelboom lo hicieron solo con *T. eikelboomii* (grupo II) (**Figura 3a y b**). *T. disciformis* (grupo I) y *T. flexilis* (grupo III) no se encontraron presentes en ninguna de las muestras procesadas. El diámetro celular observado en *T. fructosivorans* fue aproximadamente de 2,5  $\mu\text{m}$ , encontrándose dentro del intervalo 1,2-2,5  $\mu\text{m}$  documentado por algunos autores (Howarth *et al.*, 1999), mientras que los filamentos *T. nivea* y *T. eikelboomii* lo hicieron dentro del intervalo 1,0-1,5  $\mu\text{m}$  (Larkin y Shinabarger, 1983) y 1,0-3,0  $\mu\text{m}$  (Howarth *et al.*, 1999), respectivamente. La sonda G123T, específica del género *Thiothrix*, fue empleada para monitorizar todos los microorganismos filamentosos pertenecientes a dicho género.

Los resultados de la abundancia de microorganismos filamentosos pertenecientes a los grupos 021N y *Thiothrix nivea* mostraron en general bajos valores, siendo los mayores los observados en los biorreactores QB y DN, cuyas muestras presentaron los porcentajes más elevados de similitud en el análisis clúster (**Figura 4**). Los resultados indican que las poblaciones de *T. nivea* y *T. fructosivorans* no parecen mostrarse codominantes en las muestras de los biorreactores, siendo abundantes en QB y DN, respectivamente. Algunos autores señalan que *T. nivea* requiere para su crecimiento compuestos inorgánicos reducidos del azufre, mientras que *T. fructosivorans* no siempre los requiere (Larkin y Shinabarger, 1983; Williams y Unz, 1985a; Howarth *et al.*, 1999).

Durante la identificación convencional y valoración de la abundancia de los distintos microorganismos fi-

lamentosos se observaron abundantes gránulos de azufre *in situ* en los filamentos de *T. nivea* (**Figura 3d**), mientras que no fue así en el caso de *T. fructosivorans* (**Figura 3f**). Por todo ello, las observaciones parecen estar de acuerdo con los resultados obtenidos por los autores citados anteriormente. Así mismo, no constan trabajos anteriores que hayan documentado la presencia de *T. fructosivorans* en fangos activos procedentes de instalaciones a escala real, no siendo detectada de forma significativa en algunos estudios empleando sondas FISH para la detección de *Thiothrix sp.* (Kim *et al.*, 2002). Contrariamente, *T. eikelboomii* mostró una baja frecuencia de aparición y baja abundancia, siendo mayor en el caso del biorreactor QB.

El análisis clúster entre variables biológicas ha permitido explorar la similitud entre las distintas bacterias identificadas mediante la técnica

FISH y el método convencional (**Figura 4**). Los resultados indican que el mayor porcentaje de similitud se observó entre *T. nivea* y el morfotipo *Thiothrix* (68%), y no tanto con *T. fructosivorans*, lo cual indica que la identificación y cuantificación convencional en las muestras estudiadas parece no considerar parte de la abundancia de esta última. Ello podría ser debido a la posición preferentemente intraflocular de algunos filamentos de *T. fructosivorans* y respuesta negativa a las tinciones de Gram y Neisser, lo cual ha podido infravalorar su abundancia.

Los resultados del análisis clúster también han revelado la elevada disimilitud entre el morfotipo 021N y *T. eikelboomii*, lo cual indica que la identificación convencional no se corresponde con la obtenida a partir de la técnica FISH. Dicho desviación podría ser debida al número elevado de muestras con valores bajos del IF y al poliformismo que puede mostrar el morfotipo 021N (Eikelboom, 2000; Jenkins *et al.*, 2004), identificándose bacterias *Thiothrix* como tipo 021N, tal cual ha sido observado en experimentos realizados por algunos autores (Nielsen *et al.*, 1998).

La rutina multivariante BIO-ENV ha permitido establecer las semejanzas y diferencias entre microorganismos filamentosos a partir de su relación con algunas de las variables más utilizadas en el control de explotación de las EDAR (**Tabla 3**). Dicha tabla muestra las tres combinaciones de variables que mejor explicaron la dinámica poblacional de bacterias del grupo *T. nivea* y tipo 021N de Eikelboom. Los coeficientes de correlación de Spearman representados indican la variable ambiental que más se relaciona con cada uno de los distintos microorganismos.

**FIGURA 4.** Dendrograma ilustrando la abundancia (IF) de los microorganismos filamentosos y los resultados del análisis clúster cruzado mostrando la similitud entre variables biológicas y entre muestras, según el factor biorreactor.

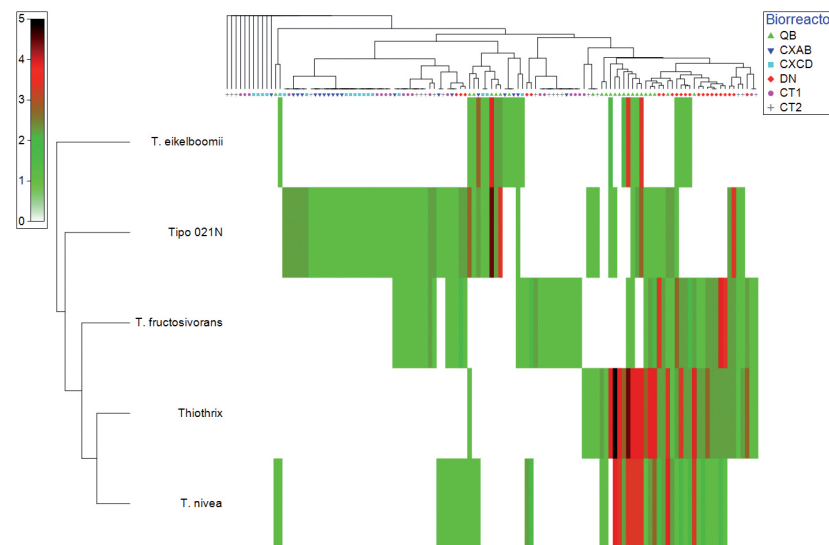


TABLA 4			
RESULTADOS DE LA RUTINA BIO-ENV. Nota: * Método convencional.			
B. Filamentosa	Nº Var.	Corr.	Selección
<i>Thiothrix</i>	1	0,24	TRHr
	2	0,28	TRHr, T <sup>ar</sup>
	3	0,30	TRHr, T <sup>ar</sup> , TRHds
Grupo <i>T. nivea</i>	1	0,13	CM
	2	0,12	SSLM, IVF
	3	0,13	TRHr, T <sup>ar</sup> , TRHds
<i>T. nivea</i>	1	0,29	TRHr
	2	0,31	TRHr, TRHds
	3	0,31	TRHds, CM, TRHr
<i>T. fructosivorans</i>	1	0,11	CM
	2	0,10	SSLM, IVF
	3	0,10	EF, SSLM, IVF
Tipo 021 N*	1	0,08	EF
	2	0,08	T <sup>ar</sup> , EF
	3	0,08	T <sup>ar</sup> , ED, TRHds
<i>T. eikelboomii</i>	1	0,12	SSLM
	2	0,12	SSLM, TRHr
	3	0,12	SSLM, TRHr, TRHds



Los resultados obtenidos a partir de dicha rutina corroboran las conclusiones alcanzadas en el análisis clúster. La identificación convencional de *Thiothrix* parece corresponderse más con *T. nivea*, puesto que ambas se relación con el TRHr.

En cambio, *T. fructosivorans* parece mostrar una influencia distinta a *T. nivea*, asociándose más con la CM. Por esta razón, el grupo *T. nivea*, que engloba a ambas especies, ha mostrado un coeficiente de correlación inferior. En el caso del morfotipo 021N, los resultados de la rutina BIO-ENV también corroboran las diferencias encontradas con *T. eikelboomii* en el análisis clúster, asociándose el primero con la EF y el segundo con la concentración de SSLM.

Según los resultados obtenidos, la identificación de bacterias *Thiothrix* y tipo 021N de Eikelboom mediante microscopía convencional durante episodios de *bulking* filamentoso podría mostrarse ambigua y confusa en el intercambio de experiencias entre responsables de planta, pudiendo conducir erróneamente a la toma decisiones para su control.

Sin embargo, la elevada especificidad que ofrece la identificación mediante la técnica FISH permitirá al responsable de planta conocer con una elevada especificidad el organismo causante del episodio, y por lo tanto, acceder a los últimos conocimientos sobre su ecofisiología *in situ* con el fin de tomar las decisiones más acertadas. Dicha forma de proceder ofrecerá mayores posibilidades de éxito en el control de los microorganismos filamentosos sin comprometer la sostenibilidad de la instalación y la eficiencia energética.

## 4. CONCLUSIONES

Las observaciones sobre la identificación y cuantificación de bacterias del grupo *Thiothrix nivea* y tipo 021N de Eikelboom indican que:

- La identificación de ambos grupos de bacterias filamentosas a partir del método convencional no es comparable con la obtenida a partir de la técnica FISH y, por lo tanto, el empleo exclusivo del primero ofrece resultados cuestionables respecto a la bacteria la cual se está discutiendo, así como su relación con las variables ambientales de las EDAR.

- La técnica FISH ha revelado diferencias en la dinámica poblacional de *T. nivea* y *T. fructosivorans* al asociarse ambos microorganismos con diferentes variables ambientales, siendo, por tanto, una técnica válida para la monitorización biológica ante episodios de *bulking* filamentoso.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Este estudio forma parte del proyecto de investigación 'Estudio integrado del proceso de fangos activos', financiado por la Entidad Pública de Saneamiento de Aguas Residuales de la Comunidad Valenciana (EP-SAR). Se agradece la colaboración de las empresas de explotación AVSA-EGEVASA, DAM, FACSA y OMS-SACEDE.

### Bibliografía

[1] Alonso, J.L., Cuesta, G., y Ramirez, G.W. (2009). Manual de Técnicas Avanzadas para la Identificación y Control de Bacterias Filamentosas. Valencia: EPSAR-Generalitat Valenciana.

[2] Anderson, M.J., Gorley, R.N., y Clarke, K.R. (2008) PERMANOVA+for PRIMER. Guide to software and statistical methods. PRIMER-E Ltd., Plymouth, UK.

[3] Andújar, A.B., Zornoza, A., Lledías, M., y Alonso, J.L. (2013). Microscopía convencional versus FISH en la identificación y abundancia de los morfotipos filamentosos 0803, 0914 y 0092 en fangos activos. *Tecnoaqua* 4: 60-79.

[4] Aruga, S., Kamagata, Y., Kohno, T., Hanada, S., Nakamura, K., y Kanagawa, T. (2002). Characterization of filamentous Eikelboom type 021N bacteria and description of *Thiothrix disciformis* sp. nov. and *Thiothrix flexilis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1.309-1.316

[5] Bray, J.R., y Curtis, J.T. (1957). Ordination of the upland forest community of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* 27: 325-349.

[6] Brigmon, R.L., Bitton, G., Zam, S.G., Martin, H.W., y O'Brien, B. (1994a). Identification, enrichment, and isolation of *Thiothrix* spp. from environmental samples. *Current Microbiology* 28: 243-246.

[7] Brigmon, R.L., Martin, H.W., Morris, T.L., Bitton, G., y Zam, S.G. (1994b). Biogeochemical ecology of *Thiothrix* spp. in underwater limestone caves. *Geomicrobiology Journal* 12(3):141-159.

[8] Calvo, S., Zornoza, A., y Alonso J.L. (2016) Limitación en la identificación convencional del morfotipo *Nostocoida limicola* II en fangos activos. *Tecnoaqua* 18: 40-49.

[9] Chernousova, E., Gridneva, E., Grabovich, M., Dubinina, G., Akimov, V., Rossetti, S., y Kuever, J. (2009). *Thiothrix caldifontis* sp.nov. and *Thiothrix lacustris* sp. nov., *gammaproteobacteria* isolated from sulfide springs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 3.128-3.125.

[10] Clarke, K.R., y Gorley, R.N. (2015). PRIMER v7: User Manual/Tutorial. PRIMER-E, Plymouth, 296 pp.

[11] Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., McGarrell, D.M., Garrity, G.M., y Tiedje, J.M. (2005). The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 33: D294-D296.

[12] Eikelboom, D.H. (1975). Filamentous organisms observed in activated sludge. *Water Research* 9: 365-388.

[13] Eikelboom, D.H., y van Buijsen, H.J.J. (1983). *Microscopic Sludge Investigation Manual*. Delft: TNO Research Institute of Environmental Hygiene.

[14] Eikelboom, D. (2000). *Process Control of Activated Sludge Plant by Microscopic Investigations*. London: IWA Publishing

[15] Eikelboom, D., y Geurkink, B. (2002). Filamentous microorganisms observed in industrial activated sludge plants. *Water Science and Technology* 46(1-2): 535-542.

[16] Eikelboom, D. (2006). *Identification and Control of Filamentous Microorganisms in Industrial Wastewater Treatment Plants* (CD). London: IWA Publishing.

[17] Field, J.G., Clarke, K.R., and Warwick, R.M. (1982). A practical strategy for analyzing multispecies distribution patterns. *Marine Ecology Progress Series* 8: 37-52.

[18] Ford, H.W., y Tucker, D.P.H. (1975). Blockage of drip irrigation filters and



» La identificación de bacterias *Thiothrix* y tipo 021N de Eikelboom mediante microscopía convencional durante episodios de *bulking* filamentoso podría mostrarse ambigua y confusa en el intercambio de experiencias entre responsables de planta, pudiendo conducir erróneamente a la toma de decisiones para su control. Sin embargo, la elevada especificidad que ofrece la identificación mediante la técnica FISH permitirá al responsable de planta conocer con una elevada especificidad el organismo causante del episodio y, por lo tanto, acceder a los últimos conocimientos sobre su ecofisiología *in situ* con el fin de tomar las decisiones más acertadas

emitters by iron-sulfur-bacterial products. *Scientia Horticulturae* 10: 62-64.

[19] Howarth, R., Unz, R.F., Seviour, E.M., Seviour, R.J., Blackall, L.L., Pickup, R.W., Jones, J.G., Yaguchi, J., y Head, I.M. (1999). Phylogenetic relationships of filamentous sulfur bacteria (*Thiothrix* spp. and Eikelboom type 021N bacteria) isolated from wastewater treatment plants and description of *Thiothrix eikelboomii* sp. nov., *Thiothrix unzii* sp. nov., *Thiothrix fructosivorans* sp. nov. and *Thiothrix defluvii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 1.817-1.827.

[20] Jones, G.B., Burdon-Jones, C., y Thomas, F.G. (1982). Influence of Trichodesmium red tides on trace metal cycling at a coastal in the Great Barrier Reef Lagoon. *Oceanologica Acta*, Special Publication, 319-326.

[21] Jenkins, D., Richard, M., y Daigger, G. (1993). *Manual on Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming*. Chelsea, Michigan: Lewis Publishers.

[22] Jenkins, D., Richard, M.G., y Daigger, G.T. (2004). *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking, Foaming, and other Solids Separation Problems*. London: IWA Publishing.

[23] Kanagawa, T., Kamagata, Y., Aruga, S., Kohno, T., Horn, M., y Wagner, M. (2000). Phylogenetic analysis of an oligonucleotide probe development for Eikelboom type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5.043-5.052.

[24] Kim, S.B., Goodfellow, M., Kelly, J., Saddler, G.S., y Ward, A.C. (2002). Application of oligonucleotide probes for the detection of *Thiothrix* spp. in activated

sludge plants treating paper and board mill wastes. *Water Science and Technology* 46(1-2): 559-564.

[25] Kragelund, C., Müller, E., Schade, M., Nguyen, H.T.T., Lemmer, H., Seviour, R.J., y Nielsen, P.H. (2009). Identification of filamentous bacteria by FISH en FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment. Nielsen, P.H., Daims, H., y Lemmer, H. (eds). UK: IWA Publishing.

[26] Larkin, J.M., y Shinabarger, D.L. (1983). Characterization of *Thiothrix nivea*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 33: 841-846.

[27] Larkin, J.M. (1989). Genus II. *Thiothrix* Winogradsky 1888 en *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Staley, J.P., Bryant, M.P., Pfennig, N., y Holt, J.G. (eds). Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 2.098-2.101.

[28] Madoni, P., Davoli, D. y Gibin, G. (2000). Survey of filamentous microorganisms from bulking and foaming activated-sludge plants in Italy. *Water Research* 34(6): 1.767-1.772

[29] Mcglannan, M.F., y Makemson, J.C. (1990). HCO(3) Fixation by Naturally Occurring Tufts and Pure Cultures of *Thiothrix nivea*. *Applied and Environmental Microbiology* 56(3): 730-8.

[30] Nielsen, P.H., Andreasen, K., Wagner, M., Blackall, L.L., Lemmer, H., y Seviour, R.J. (1998). Variability of type 021N in activated sludge as determined by *in situ* substrate uptake pattern and *in situ* hybridization with fluorescent rRNA targeted probes. *Water Science and Technology* 37(4-5): 423-430.

[31] Nielsen, P.H., Kragelund, C., Seviour, R.J., y Nielsen, J.L. (2009). Identity and ecophysiology of filamentous bacteria in activated sludge. *FEMS Microbiology Reviews* 33: 969-998.

[32] Richard, M. G., Shimizu, G. P., and Jenkins, D. (1985). The growth physiology of the filamentous organism type 021N and its significance to activated sludge bulking. *Journal of Water Pollution Control Federation* 57: 1.152-1.161.

[33] Shuttleworth, K.L., y Unz, R.F. (1991). Influence of metals and metal speciation on the growth of filamentous bacteria. *Water Research* 25: 1.177-1.186.

[34] Shuttleworth, K.L., y Unz, R.F. (1993). Sorption of heavy metals to the filamentous bacterium *Thiothrix* strains A1. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 1.274-1.282.

[35] Tandoi, V., Caravaglio, N., Di Dio Balsamo, D., Majone, M., and Tomei, M.C. (1994). Isolation and physiological characterization of *Thiothrix* sp. *Water Science and Technology* 29 (7): 261-269.

[36] Tandoi, V., Jenkins, D., y Wanner, J. (eds) (2006). *Activated Sludge Separation Problems*. London: IWA Publishing.

[37] Tchobanoglous, G., Burton, F.L., y Stensel, H.D. (2003). *Metcalf & Eddy, Inc.'s Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, and Reuse*, 4th Edition. New York: McGraw-Hill, Inc., 1819 pp.

[38] Unz, R.F., y Head, I.M. (2005). Genus I *Thiothrix* en *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2b. Brenner, D.J., Krieg, N.R., y Staley, J.T. (eds). Berlin: Springer, pp. 131-142.

[39] Wagner, M., Assmus, B., Hartmann, A., Hutzler, P., y Amann, R. (1994). *In situ* analysis of microbial consortia in activated sludge using fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal scanning laser microscopy. *Journal of Microscopy* 176: 181-187.

[40] Williams, T. M., y Unz, R.F. (1985a). Filamentous sulfur bacteria of activated sludge: Characterization of *Thiothrix*, *Beggiatoa*, and Eikelboom Type 021N Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 887-898.

[41] Williams, T. M., y Unz, R.F. (1985b). Isolation and characterization of filamentous bacteria present in bulking activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* 22: 273-282.

[42] Williams, T.M., Unz, R.F., y Doman, J.T. (1987). Ultrastructure of *Thiothrix* spp. and type 021N bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 1.560-1.570.

[43] Williams, T. M., y Unz, R.F. (1989). The nutrition of *Thiothrix* type 021N, *Beggiatoa* and *Leucothrix* strains. *Water Research* 23: 15-22.

[44] Winogradsky, S. (1888). *Beitrage zur Morphologie und Physiologie der Bakterien*, Heft I. Zur Morphologie und Physiologie der Schwefelbakterien. A. Felix, Leipzig. 