



Estudio de las poblaciones bacterianas en biofilms de sistemas de distribución de agua potable mediante metagenómica

En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio del microbioma bacteriano de los biofilms presentes en las tuberías del sistema de distribución de agua potable de Valencia mediante la aplicación de metagenómica de secuenciación dirigida. Para ello, se tomaron 25 muestras de biofilms. Tras su secuenciación y posterior análisis bioinformático se determinó que los filos bacterianos más abundantes fueron Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria y Bacteroidetes. A nivel de género se observó que las muestras eran muy heterogéneas entre sí. Pese a esto, los géneros más abundantes en el promedio total de las muestras fueron *Bacillus*, *Ralstonia*, *Desulfovibrio* y *Methylocystis*. Además, se determinó la presencia de géneros bacterianos potencialmente patógenos, tales como *Helicobacter*, *Pseudomonas* o *Legionella*, y de bacterias con una posible implicación en los procesos de corrosión como *Sulfuricella*, *Hyphomicrobium* o *Methylobacterium*. En este estudio no se ha establecido una relación directa entre la microbiota y el material de las tuberías donde se encontraban estos biofilms, siendo necesario analizar un mayor número de muestras para establecer dicha relación.

Palabras clave

Microbioma, biofilm, bacterias, metagenómica, secuenciación, agua potable.

STUDY OF BACTERIAL POPULATIONS OF BIOFILMS FROM A DRINKING WATER DISTRIBUTION SYSTEM BY METAGENOMICS

In this work, a study of the bacterial microbiome of biofilms present in the drinking water distribution system pipes of Valencia has been carried out using amplicon-based metagenomics. To do this, 25 biofilm samples were processed. Once the sequencing process and the subsequent bioinformatics analysis were carried out, it was determined that the most abundant bacterial Phyla were Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria and Bacteroidetes. At the gender level, samples were found to be very heterogeneous. Despite this, the most abundant genera in the average of the samples were Bacillus, Ralstonia, Desulfovibrio and Methylocystis. Moreover, the presence of potentially pathogenic bacteria genera, such as Helicobacter, Pseudomonas or Legionella, and bacteria with possible involvement in corrosion processes such as Sulfuricella, Hyphomicrobium or Methylobacterium was found out. This study has not established a direct relationship between the microbiota and pipes' materials where these biofilms were found, making it necessary to analyze a greater number of samples to establish such a relationship.

Keywords

Microbiome, biofilm, bacteria, metagenomics, sequencing, drinking water.

Yolanda Moreno

doctora en Biología, 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 (UPV)

Laura Moreno-Mesonero

doctora en Biotecnología, 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 (UPV)

Adela Soriano Ponce

responsable del Departamento de calidad del agua distribuida de la Empresa Mixta Valenciana de Aguas S.A. (Emivasa) - Grupo Global Omnium

Javier Macián Cervera

doctor ingeniero de Caminos, Canales y Puertos, director de Operaciones de la Empresa Mixta Valenciana de Aguas S.A. (Emivasa) - Grupo Global Omnium, profesor Asociado del Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente de la Universitat Politècnica de València (UPV) y miembro del Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA) de la Universitat Politècnica de València (UPV)



1. INTRODUCCIÓN

La seguridad del agua potable está estrechamente relacionada con la salud humana. Los sistemas de distribución de agua potable están diseñados para proveer agua tratada segura para el consumo humano y cumplir con las regulaciones de calidad cada vez más estrictas. Sin embargo, el agua potable no es estéril. Se calcula que el rango de concentración celular en el agua potable podría ser de 10^3 a 10^5 células/mL (Proctor y Hammes, 2015). A menudo se observa el deterioro de la calidad del agua en estos sistemas. Incluso aunque haya cierto contenido de cloro residual en el agua, las bacterias heterótrofas podrían crecer más o menos rápido en las superficies de los sistemas de distribución, dependiendo de la presencia de cierta materia orgánica, pudiendo llegar a formar biofilms.

Los biofilms son poblaciones de microorganismos, inicialmente constituidas por bacterias, que se concentran típicamente en una interfaz sólido-líquida y están rodeadas de sustancias extracelulares poliméricas, constituidas básicamente por polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas (Flemming y Wingender, 2010). La presencia de estas sustancias extracelulares poliméricas protege a las bacterias, haciéndolas más resistentes a los químicos, tales como los desinfectantes.

De acuerdo con Flemming (2002) los biofilms son la forma de vida más exitosa en el planeta. Los biofilms, que representan más del 95% de la biomasa total en los sistemas de

distribución de agua potable, constituyen un ecosistema que puede influenciar la calidad 'estética' del agua, alterando el gusto, el color o el olor; y también la calidad microbiológica del agua, ya que se pueden producir desprendimientos bacterianos en el agua potable distribuida, principalmente de patógenos oportunistas, produciendo la contaminación de la misma. Además, los biofilms se han asociado con problemas en el sistema de distribución del agua potable, tales como la corrosión de ciertos tipos de tuberías. Algunos grupos bacterianos, como las bacterias sulfuro-reductoras y oxidadoras del azufre contribuyen de manera directa en estos procesos de corrosión, que además favorecen que otros organismos se adhieran a estas superficies afectadas.

Aunque se sabe que los biofilms tienen impacto en el agua potable, se conoce poco acerca de los mecanismos involucrados en los que participan los microorganismos en este ecosistema y los problemas pueden aparecer cuando estos biofilms no se controlan.

Menos del 1% de las bacterias presentes en agua potable se pueden cultivar en la actualidad, y, además, un elevado porcentaje de bacterias que se encuentran formando parte de los biofilms, se encuentran en estado viable no cultivable (VB-NC). En este estado las bacterias no son capaces de crecer en un medio sintético, pero si continúan siendo metabólicamente activas. Por tanto, se necesitan métodos independientes de cultivo para identificar la co-

munidad microbiana de estos ecosistemas. Los métodos de secuenciación de última generación, entre los cuales destaca la metagenómica de secuenciación dirigida, son métodos de alto rendimiento e independientes del cultivo que permiten la caracterización de toda la comunidad microbiana de una muestra en un único análisis.

En el caso de las bacterias y de las arqueas, los estudios de metagenómica de secuenciación dirigida se centran en el gen de la subunidad pequeña del ARN ribosómico (16S ADNr), el cual es un marcador informativo tanto taxonómico como filogenético. Está ampliamente aceptado que el gen 16S ADNr refleja la evolución bacteriana. Este gen contiene regiones altamente conservadas que son útiles para el diseño de los iniciadores y regiones hipervariables (V1-V9), las cuales permiten diferenciar los distintos microorganismos y clasificarlos taxonómicamente (Figura 1).

La metagenómica se basa en el estudio de los microorganismos presentes en una muestra, evitando cualquier tipo de cultivo. Debido a que aproximadamente sólo el 1% de los microorganismos es cultivable, el empleo de técnicas metagenómicas supondría una buena alternativa para estudiar las comunidades bacterianas presentes en prácticamente cualquier tipo de muestra, en este caso agua potable. Una de las aproximaciones ampliamente empleadas de esta técnica es la secuenciación dirigida a regiones concretas del genoma.

FIGURA 1. Esquema de las distintas zonas variables del gen 16S ribosómico de bacterias y arqueas (Singer *et al.*, 2006).

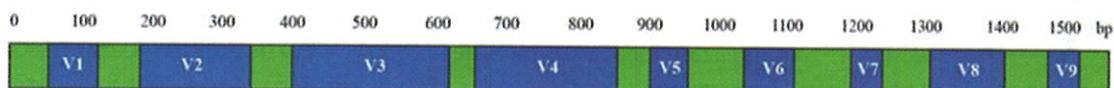
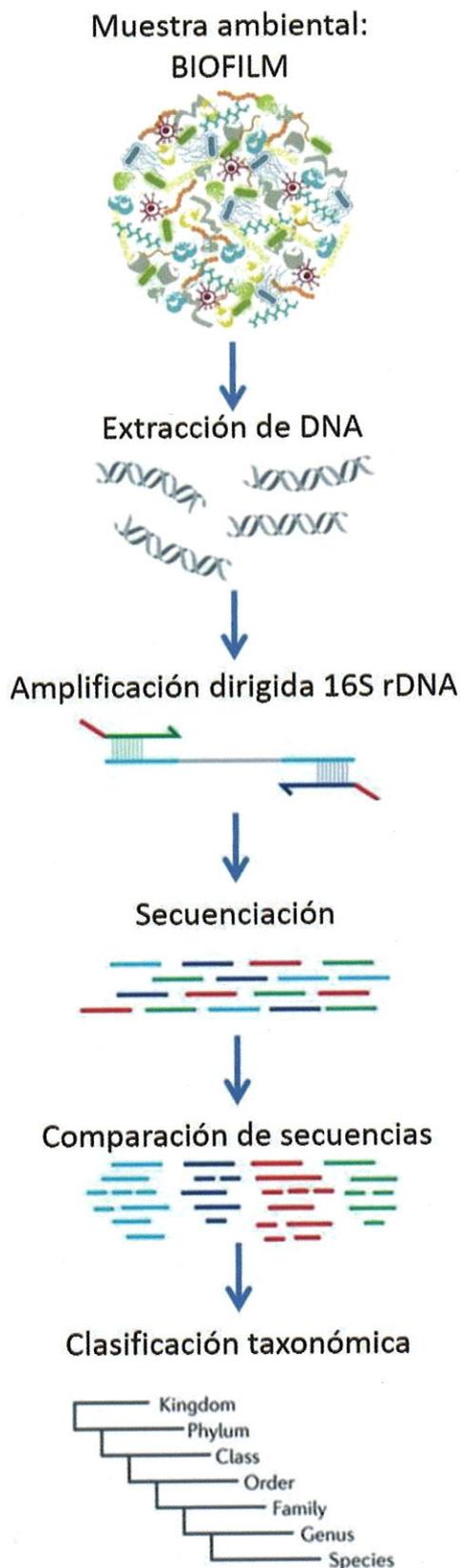


FIGURA 2. Esquema del proceso de metagenómica de secuenciación dirigida de bacterias (16S ADNr).



La capacidad de formación de biofilms, así como su composición bacteriana depende de muchos factores, tales como la presencia de nutrientes, la concentración de desinfectantes, la naturaleza del agua tratada o el material del que están hechos los sistemas de distribución. Por ello, resultaría de gran interés poder establecer una relación entre la presencia de ciertos tipos bacterianos con actividad patógena o con acción corrosiva y la naturaleza de los sistemas de distribución.

El objetivo principal del presente trabajo ha sido el desarrollo e implantación de un protocolo de caracterización del microbioma bacteriano en muestras de biofilms procedentes del sistema de distribución de agua potable de Valencia, aplicando metagenómica de secuenciación dirigida para poder adquirir mayor conocimiento sobre la presencia de ciertos grupos bacterianos y su posible relación con los materiales de las tuberías donde se han formado los mismos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. TOMA DE MUESTRAS

Durante los años 2017 y 2018 se tomaron un total de 25 muestras de biofilms procedentes del sistema de distribución de agua potable de la ciudad de Valencia. Para llevar a cabo los muestreos se aprovecharon aquellas intervenciones programadas y no programadas en las tuberías gestionadas por la Empresa Mixta Valenciana de Aguas (en adelante, Emivasa). Esto incluye:

- Tramos de tuberías arteriales, también llamada Red Arterial, que son el conjunto de tuberías y elementos de la red de distribución que enlazan distintos sectores de la zona abastecida.

- Tramos de la red de distribución o Red Secundaria, que son el conjunto de tuberías y elementos que conectan la Red Arterial con el suministro en los edificios y viviendas, bocas de riego y tomas contra incendios. En este grupo también entran las acometidas, que son las tuberías y elementos que unen la Red Secundaria con la instalación interior del inmueble al que se abastece.

La toma de muestras se realizó *in situ* y con la mayor asepsia posible a la hora del corte de la tubería para evitar contaminaciones cruzadas. Las muestras se tomaron empleando un martillo de punta estéril para arrastrar las incrustaciones duras y se depositaron en un tubo estéril de 50 mL.

2.2. PROCESADO DE LAS MUESTRAS

Las muestras se procesaron inmediatamente a su llegada al laboratorio (**Figura 2**). Para ello, los biofilms sólidos se homogeneizaron en tampón fosfato (PBS) y los viscosos se procesaron directamente. Se procedió a la extracción de ADN a partir de los tipos de biofilms empleando el kit FastDNA Spin kit for soil (MP Biomedicals, Estados Unidos) empleando la Lysing Matrix E para la ruptura física de las células. Se siguieron las especificaciones del fabricante y se eluyó el ADN en un volumen final de 50 µl del tampón de elución. Posteriormente, la calidad del ADN se determinó empleando el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, Estados Unidos) y su concentración se cuantificó usando Qubit dsDNA HS Assay kit (Invitrogen, CA, Estados Unidos) y el fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

La secuenciación de las muestras se realizó en la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq del servicio de secuenciación y bioinformática de la Fundación para el Fomento de la Investigación Biomédica (Fisabio), en Valencia. El proceso de construcción de las librerías de amplicones de ADN también fue llevado a cabo en Fisabio. Estas librerías se generaron empleando los iniciadores 341F y 802R, siguiendo las instrucciones descritas en la guía de preparación de las librerías de ADN para secuenciar mediante metagenómica en el secuenciador Illumina MiSeq (Amplicon P.C.R., 2013). La secuenciación se llevó a cabo siguiendo el protocolo *paired-end* (2 x 300 pb).

2.3. ANÁLISIS DEL MICROBIOMA BACTERIANO

Una vez obtenidas las secuencias brutas, estas se procesaron usando bioinformática mediante la plataforma de acceso libre QIIME 1.9.1 (Caporaso *et al.*, 2010) aplicando comandos adicionales disponibles en la máquina virtual Microbiome Helper (Comeau *et al.*, 2017). Las secuencias potencialmente quiméricas fueron eliminadas usando VSEARCH v1.11.1 (Rognes *et al.*, 2016).

Las secuencias restantes fueron procesadas mediante el comando *open reference* de QIIME, aplicando los métodos SortMeRNA v2.0 (Kopylova *et al.*, 2012) y SUMACLUSt v1.0.00 (Mercier *et al.*, 2013) para los pasos de agrupamiento en Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) basados en una referencia y de novo, respectivamente. Las OTUs se definieron al 97% de similitud de secuencia, empleando la base de datos SILVA r132 (Quast *et al.*, 2013). Para la predicción de la composición funcional de las muestras se empleó PICRUSt 1.0.0 (Langille *et al.*, 2013)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los biofilms, las bacterias se asocian irreversiblemente con la superficie, hallándose dentro de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que producen ellas mismas. Durante un largo tiempo, los biofilms se consideraban como un tema secundario y generaban poca expectativa, pese a que su presencia era generalizada y se observaban frecuen-

temente en diferentes ambientes. Sin embargo, su relevancia en las últimas décadas ha ido ganando atención, ya que se ha demostrado su implicación en procesos ambientales, en medicina y en la salud pública.

Dado que la composición química de los materiales de las tuberías es un factor determinante del desarrollo de los biofilms, pues los compuestos orgánicos liberados por dichos ma-

TABLA 1

ESPECIFICACIONES DE LAS TUBERÍAS DONDE SE TOMARON LAS MUESTRAS DE BIOFILMS.
Nota: FDG = fundición gris; PE = polietileno; FD = fundición dúctil; FC = fibrocemento; FG = fundición gris; HCC = hormigón con camisa de chapa; RD = red de distribución; A = tubería arterial.

Muestra	Material	Diámetro (mm)	Año de instalación	Tipo de red
1	FDG	150	1929	RD
2	PE	50	1985	RD
3	FD	60	1934	RD
4	FD	350	1931	RD
5	FC	200	1968	RD
6	H sin CC	600	2000	A
7	FG	350	1903	RD
8	FG	80	1973	RD
9	FG	60	1959	RD
10	PE	30	1979	RD
11	FD	150	1987	RD
12	FG	100	1967	RD
13	FG	60	1929	RD
14	HCC	600	1978	A
15	FD	100	1970	RD
16	PE	50	1977	RD
17	FD	300	1972	RD
18	Plomo	19	1971	RD
19	FDG	100	1963	RD
20	HCC	300	1934	A
21	FDG	60	1962	RD
22	FDG	600	1903	A
23	FD	100	2014	RD
24	FD	100	2012	RD
25	FDG	60	1933	RD

teriales favorecen el crecimiento de los microorganismos que lo integran, se tomaron muestras de todos los tipos de tuberías existentes en la red de distribución de agua potable de la ciudad de Valencia (**Tabla 1**). Los materiales de base orgánica (plásticos, PVC, poliamida) revelan un considerable crecimiento bacteriano. Por su parte, los inorgánicos (fibrocemento, hormigón, hierro, acero) producen nódulos de corrosión que reaccionan con los desinfectantes y favorecen el desarrollo microbiano al impedir la penetración de los mismos.

Durante los muestreos que se realizaron se observó que no siempre se apreciaba la existencia de los biofilms como películas mucosas adheridas a las paredes de las tuberías, y muchas veces se encontraron deposiciones calcáreas más o menos duras o bulbos ferrosos crecidos a lo largo del tiempo de vida de las instalaciones (**Figura 3**). Otros autores establecieron una relación directa entre la formación de biofilms y el estado de las tuberías, ya que las superficies metálicas corroídas facilitan la adherencia de las bacterias, y, por

FIGURA 3. Aspecto interno de algunas tuberías con presencia de biofilms.



tanto, la proliferación de los biofilms (Wang *et al.*, 2014). En el caso de los biofilms procesados en este trabajo se pudo observar que se encontraban principalmente en tuberías que presentaban corrosión.

Tras amplificar y secuenciar de forma masiva todas las secuencias del gen 16S ADNr presentes en las 25 muestras de biofilms se obtuvieron un total de 662.639 secuencias diferentes. Tras el análisis bioinformático de las mismas, limpiar las secuencias de baja calidad y eliminar las secuencias únicas y quiméricas, permanecieron un total de 611.032 secuen-

cias que se agruparon en 37.094 unidades taxonómicas distintas, a las cuales se les realizó la asignación taxonómica.

Las muestras que presentaron una mayor diversidad de especies bacterianas fueron las muestras número 2, 5 y 18. Las demás muestras presentaron una diversidad bacteriana considerablemente más baja. Sin embargo, no se pudo establecer una relación entre la diversidad bacteriana y el tipo de tubería, siendo esta independiente de cada muestra (**Figura 4**).

De forma global, los filos más abundantes en el promedio de las muestras fueron Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria y Bacteroidetes (**Figura 5**), los cuales representaban el 52,9%, 22,2%, 11,8% y 3,4% de las bacterias, respectivamente, y que constituían el 90,3% del total de la población microbiana del global de las muestras. Sin embargo, se observó una gran variabilidad en la abundancia relativa de cada filo en cada una de las muestras.

Las clases bacterianas más abundantes en el promedio de las muestras fueron Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Bacilli, Actinobacteria, Deltaproteobacteria y Bacteroidia, las cuales representaron el 84,3% del total de bacterias en el

FIGURA 4. Diversidad bacteriana de las muestras en función del número de secuencias.

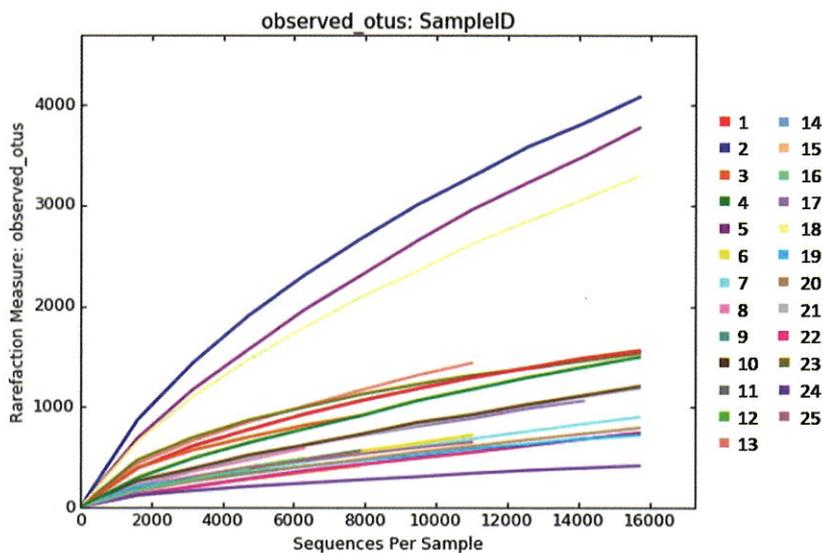




FIGURA 5. Distribución de los filos bacterianos más abundantes.

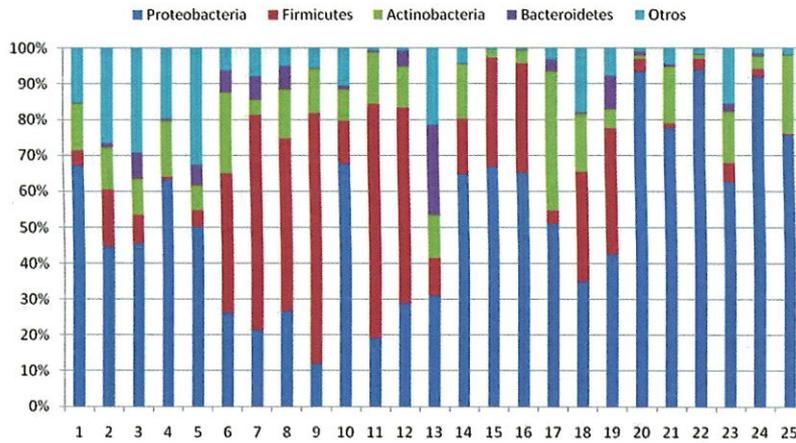


FIGURA 6. Distribución de las clases bacterianas más abundantes.

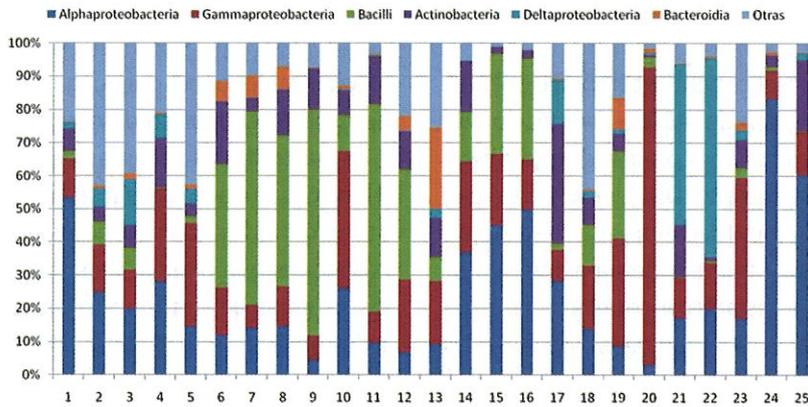
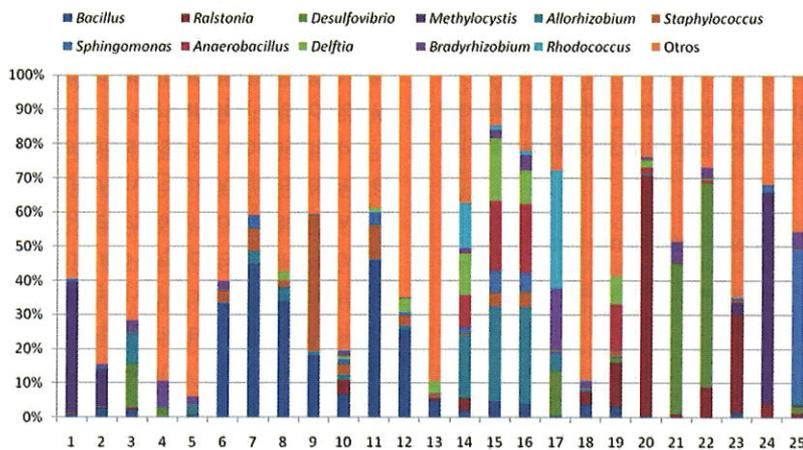


FIGURA 7. Distribución de los géneros bacterianos más abundantes.



promedio de las muestras. Aunque, como puede observarse en la **Figura 6**, la abundancia relativa de cada clase bacteriana varía de manera considerable en cada una de las muestras analizadas.

A nivel de género, se observó una importante heterogeneidad entre las muestras (**Figura 7**). Además, se comprobó que la aparición o nivel de abundancia de distintos géneros no sigue ningún patrón respecto al

material de la tubería donde se ha originado. Únicamente los géneros *Rhizobium*, *Sphingomonas* y *Pseudomonas* están presentes en todas las muestras. Entre los géneros más abundantes en el promedio total de las muestras, se encuentran *Bacillus*, *Ralstonia*, *Desulfovibrio* y *Methylocystis*, los cuales representan el 9,7%, 5,6%, 5,4% y 4,6% respectivamente, del promedio de la población bacteriana total.

Bacillus es un género bacteriano altamente resistente capaz de formar endosporas y resistir a tratamientos de desinfección. Este género bacteriano, junto con *Desulfovibrio* y *Methylocystis*, está relacionado directa o indirectamente con el proceso de corrosión. *Desulfovibrio spp.* juega un papel importante en los biofilms, ya que estas bacterias sulfato reductoras son unos de los mayores contribuidores al fenómeno de corrosión, debido a la combinación de dos procesos: la producción de sulfuro de hidrógeno corrosivo y la despolarización catódica (Clarck *et al.*, 2007). *Methylocystis* comprende un grupo de bacterias meta-nitrógenas capaces de fijar nitrógeno y comunes en estos ambientes y diferentes especies del género *Ralstonia* son promotoras de la formación de biofilms en gran cantidad de ambientes (Liu *et al.*, 2016).

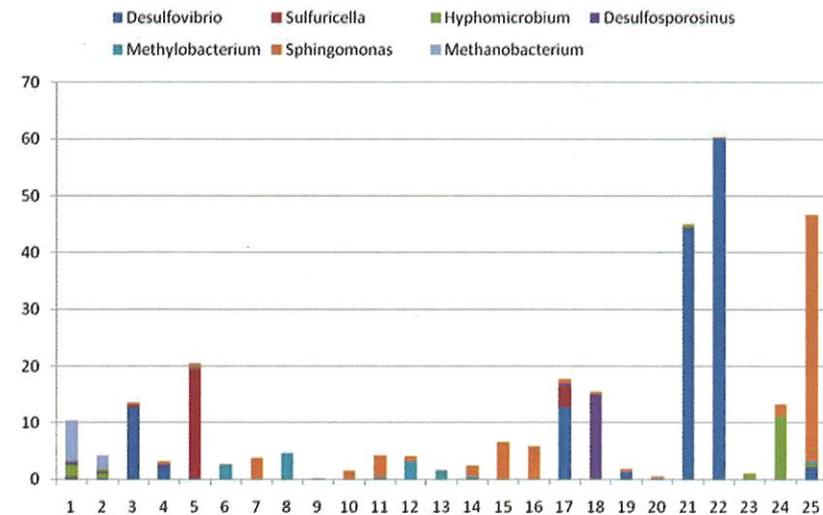
Otros géneros identificados en los biofilms que indican su posible participación en los procesos de corrosión son: *Sulfuricella* (bacterias sulfuro-oxidadoras); *Hyphomicrobium* (bacterias oxidadoras del hierro y manganeso); *Methylobacterium* (bacterias capaces de degradar sustancias tóxicas como los productos derivados de la desinfección (DBPS), particularmente el ácido dicloroacético (Zhang *et al.*, 2009); y *Methanobacterium* (bacterias impli-

cadadas en los procesos de corrosión mediante la producción de sulfuro de hidrógeno a partir de la reducción de sulfuro). Entre estas destaca particularmente *Methylobacterium*, ya que es uno de los géneros más abundantes en biofilms de sistemas de distribución de agua potable y juega un papel importante en los procesos de agregación (Simoes et al., 2010; Tsagkari et al., 2017).

La presencia de bacterias meta-nótrofas en los biofilms, tales como *Methylocystis* o *Methylosinus*, indican la presencia de capas anóxicas en el interior de los mismos. Las bacterias metanótrofas crecen utilizando metano como fuente de energía. Estos ambientes anóxicos propician la formación de metano por parte de organismos metanogénicos, el cual es consumido por los organismos metanótrofos del propio biofilm, que además son altamente resistentes a la desinfección mediante hipoclorito sódico (Vigneron et al., 2016).

La predicción de la composición funcional de las muestras mediante PICRUST reveló diversos grupos funcionales, que incluían, metabolismo de energía, sistemas de secreción, motilidad, transportadores y metabolismo del hierro, sistemas

FIGURA 8. Distribución de los géneros bacterianas relacionados con la degradación y corrosión.



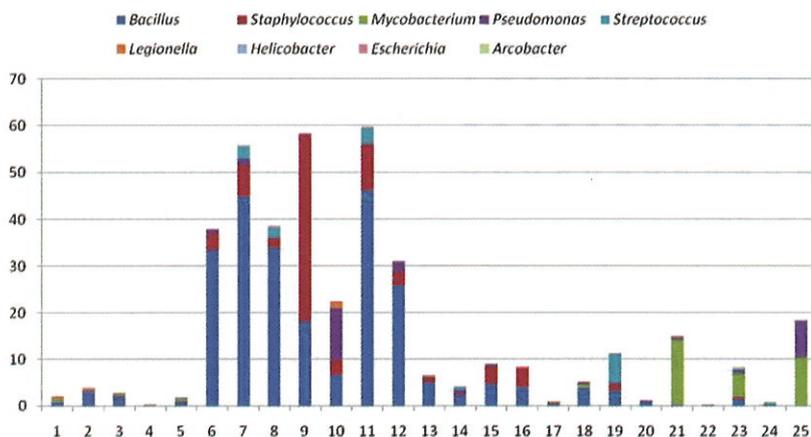
de replicación, recombinación y reparación del ADN o degradación de compuestos como el dicloro difenil tricloroetano (DDT), el benzoato o el tolueno. Mediante el análisis de un mayor número de muestras se podrían establecer correlaciones entre el tipo o la edad de las tuberías y las funciones de las bacterias presentes en los biofilms de las mismas.

La abundancia relativa de los géneros que pueden participar activamente en los procesos de degradación y corrosión de las tuberías no sigue ningún patrón determinado y depende de la muestra (Figura 8).

Además del papel que juegan los biofilms en el proceso de corrosión y desgaste de los sistemas de distribución, se ha de prestar especial atención a los microorganismos patógenos que puedan persistir en los sistemas de distribución protegidos en estos microhábitats. Entre las bacterias patógenas presentes en los biofilms analizados, se han identificado los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, *Escherichia coli* y *Legionella* (Figura 9).

La presencia de estos géneros en agua potable y en ETAP ya ha sido previamente documentada. *Pseudomonas* suele ser de los géneros más abundantes al inicio de la formación de los biofilms, ya que está implicada directamente en su formación, junto con los géneros *Acidovorax* o *Methylocystis*. Con el paso del tiempo, este género deja de ser tan abundante. *Mycobacterium* es de crecimiento lento, pero es más resistente que otros patógenos a los tratamientos de desinfección, mientras que *Legionella* parece ser más sensible a los mismos (Liu et al., 2014).

FIGURA 9. Distribución de los géneros bacterianas potencialmente patógenos.





El hecho de haber detectado estas bacterias en los biofilms del sistema de distribución de agua potable no implica necesariamente un riesgo para la salud humana, ya que puede tratarse de bacterias no viables o, en caso de ser viables, pueden estar en concentraciones que no supongan tal riesgo. Además, no todas las especies de estos géneros bacterianos son bacterias patógenas para ser humano.

Mediante la técnica de metagenómica de secuenciación dirigida, en este caso dirigida hacia el gen 16S ADNr, se puede identificar la presencia de patógenos incluso en su estado VBNC, que es la forma más habitual en la que se pueden encontrar embebidos en el biofilm, manteniendo su potencial virulencia a la espera de condiciones que les permitan proliferar. El principal problema derivado de la persistencia de estos patógenos en biofilms es que pueden sobrevivir a los procesos de desinfección y en un momento determinado, pueden ser liberados a la corriente de agua produciendo un problema de contaminación y, por tanto, un problema de salud pública.

Aunque algunos autores han encontrado diferencia entre las comunidades bacterianas en función del material de las tuberías donde se han formado los biofilms (Ren *et al.*, 2015), en este estudio no se ha establecido una relación directa, debido por una parte a la elevada heterogeneidad entre muestras procedentes del mismo tipo de tubería y por otra a la falta de homogeneidad en el número de muestras que se han analizado de cada tipo de tubería.

4. CONCLUSIONES

Este estudio demuestra que la metagenómica de secuenciación dirigida al gen 16S ADNr permite determinar

la microbiota bacteriana a partir de biofilms del sistema de distribución de agua potable.

Se ha demostrado que los biofilms estudiados, presentes en las tuberías del sistema de distribución de agua potable, albergan una gran diversidad de bacterias, cuya composición es heterogénea entre muestras. Se necesitaría analizar un mayor tipo de muestras para determinar si existe una microbiota común según las distintas características de las muestras. Sin embargo, la información obtenida en este trabajo es útil para conseguir un buen control de la gestión de calidad del agua.

5. AGRADECIMIENTOS

Gracias al Ajuntament de València por su colaboración y apoyo en todas las iniciativas tecnológicas de la empresa gestora del abastecimiento. Gracias a todas las compañeras y compañeros del equipo de Operaciones de Emivasa por su colaboración en este proyecto. Sin ellos no habría sido posible la extracción del biofilm.

Bibliografía

[1] Amplicon P.C.R. (2013). 16S metagenomic sequencing library preparation. Preparing 16S ribosomal RNA gene amplicons for the Illumina MiSeq system. https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf (consultado el 10/06/2019).

[2] 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., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*, 7: 335-336.

[3] Clark, M.E., Edlmann, R.E., Duley, M.L., Wall, J.D., Fields, M.W. (2007). Biofilm formation in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough is dependent upon protein filaments. *Environ Microbiol.* 9, 2.844-2.854

[4] Comeau, A.M., Douglas, G.M., Langille, M.G. (2017). Microbiome Helper: a custom and streamlined workflow for microbiome research. *mSystems*, 2: pii: e00127-16.

[5] Flemming, H.C. (2002). Biofouling in water systems- cases, causes and countermeasures. *Appl Microbiol Biotechnol*: 59: 629-640

[6] Flemming, H.C., Wingender, J. (2010). The biofilms matrix. *Nat Rev Microbiol*, 8: 623-633.

[7] Kopylova, E., Noé, L., Touzet, H. (2012). SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, 28: 3.211-3.217.

[8] Langille, M.G., Zaneveld, J., Caporaso, J.G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J.A., Clemente, J.C., Burkepile, D.E., Vega Thurber, R.L., Knight, R., Beiko, R.G., Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol*, 31: 814-821.

[9] Liu, N.T., Bauchan, G.R., Francoeur, C.B., Shelton, D.R., Lo, Y.M. (2016). *Ralstonia* insidiosa serves as bridges in biofilm formation by foodborne pathogens *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Enterohemorrhagic Escherichia coli*. *Food Control*, 65: 14-20.

[10] Liu, R., Zhu, J., Yu, Z., Joshi, D., Zhang, H., Lin, W., Yang, M. (2014). Molecular analysis of long-term biofilm formation on PVC and cast iron surfaces in drinking water distribution system. *J Environ Sci (China)*, 26: 865-874

[11] Mercier, C., Boyer, F., Bonin, A., Coissac, E. (2013). Sumatra and Sumacrust: Fast and exact comparison and clustering of sequences. <http://metabarcoding.org/sumatra/> (consultado el 10/06/2019).

[12] Proctor, C. R., Hammes, F. (2015). Drinking water microbiology-from measurement to management. *Curr Opin Biotechnol*, 33: 87-94

[13] Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*, 41 (Database issue): D590-D596.

[14] Ren, H., Wang, W., Liu, Y., Liu, S., Lou, L., Cheng, D., He, X., Zhou, X., Qiu, S., Fu, L., Liu, J., Hu, B. (2015). Pyrosequencing analysis of bacterial communities in biofilms from different pipe materials in a city drinking water distribution system of East China. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99: 10.713-10.724.

[15] Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4: e2584.

[16] Simoes, M., Simoes, L.C., Vieira, M.J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT Food Sci Technol*, 43: 573-583.

[17] Singer, E., Bushnell, B., Coleman-Derr, D., Bowman, B., Bowers, R.M., Levy, A., Gies, E.A., Cheng, J.F., Copeland, A., Klenk, H.P., Hallam, S.J., Hugenholtz, P., Tringe, S.G., Woyke, T. (2016). High-resolution phylogenetic microbial community profiling. *ISME J*, 10: 2.020-2.032

[18] Tsagkari, E., Keating, C., Couto, J.M., Sloan, W.T. (2017). A keystone *Methylobacterium* strain in biofilm formation in drinking water. *Water*, 9: 778.

[19] Vigneron, A., Alsop, E.B., Chambers, B., Lomans, B.P., Head, I.M., Tsesmetzis, N. (2016). Complementary microorganisms in highly corrosive biofilms from an offshore oil production facility. *Appl Environ Microbiol*, 82: 2.545-2.554.

[20] Wang, H., Masters, S., Edwards, M.A., Falkinham, J.O., Pruden, A. (2014). Effect of disinfectant, water age, and pipe materials on bacterial and eukaryotic community structure in drinking water biofilm. *Environ Sci Technol*, 48: 1.426-1.435.

[21] Zhang, P., Lapara, T.M., Goslan, E.H., Xie, Y.F., Parsons, S.A., Hozalski, R.M. (2009). Biodegradation of haloacetic acids by bacterial isolates and enrichment cultures from drinking water systems. *Environ Sci Technol*, 43: 3.169-3.175.