

ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN DE LA MICROBIOTA EN EL REACTOR BIOLÓGICO DE UNA EDAR

Maria Masip Sanchis

TRABAJO FINAL DEL GRADO DE BIOTECNOLOGÍA



Tutoras académicas: Dra. Ana Fernández Bravo y Dra. Marta Sanchis Talón,
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

En cooperación con: Global Omnium Medioambiente S.L.

Supervisora: Angela Baeza Serrano, departamento de I+D+i área de residuales

Junio 2021

Yo, Maria Masip Sanchis, con DNI 20881822F, soy conocedora de la guía de prevención del plagio a la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagí en la docència: guia per a estudiants* (aprobada en julio 2017) <http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, 4 de junio de 2021

A handwritten signature in black ink, appearing to be the initials 'MS' or 'MASIP', written in a cursive style.

ÍNDICE

1. DATOS DEL CENTRO	2
2. RESUMEN	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. EDAR	3
3.2. Proceso biológico de la EDAR	5
3.3. Control de los reactores biológicos de la EDAR.....	11
3.4. Vertidos incontrolados	12
4. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	15
5. METODOLOGÍA	16
5.1. Activación del inóculo bacteriano	16
5.2. Adición inóculo y vertido a los reactores	17
5.3. Toma de muestras.....	17
5.4. Análisis de muestras.....	17
1) Viabilidad	18
2) Fijación y permeabilización	19
3) FISH	20
6. RESULTADOS.....	24
6.1. Activación inóculo.....	25
6.2. Adición inóculo y vertido a los reactores	26
1) Viabilidad	26
2) FISH	26
7. DISCUSIÓN	28
8. CONCLUSIÓN	33
9. BIBLIOGRAFÍA	34
10. AUTOEVALUACIÓN	38
11. ANEXOS	39

1. DATOS DEL CENTRO

Global Omnium es un grupo muy potente en el ámbito nacional formado por diversas empresas dedicadas a la gestión del ciclo integral del agua, entre ellas Global Omnium Medio Ambiente S.L. El trabajo de final de grado (TFG) que se presenta en el siguiente documento está basado en las prácticas realizadas en el departamento de I+D+i de áreas residuales de la EDAR Quart-Benager (Valencia). *Bactiwater* es el proyecto en el que se basa el TFG. Fue un proyecto financiado por la Unión Europea, que se inició en febrero de 2017 y finalizó en noviembre de 2020.

2. RESUMEN

Las EDAR permiten depurar el agua residual procedente de zonas urbanas y de industrias, permitiendo liberar de nuevo el agua al medio ambiente sin presencia de contaminantes. El agua es sometida a diversos tratamientos para ser descontaminada, de entre el que destaca el tratamiento biológico. Los microorganismos presentes en un reactor biológico son capaces de oxidar la materia orgánica presente en el agua residual a compuestos inocuos, y también permiten eliminar compuestos como el fósforo y nitrógeno, entre otros. Las condiciones del reactor han de estar muy controladas para garantizar la eliminación de todos los contaminantes, ya que cualquier alteración del sistema, como un mayor caudal de agua o cambio del pH, pueden influir negativamente sobre la microbiota presente en el reactor. Concretamente, los vertidos incontrolados desencadenados por la liberación de tóxicos o de un exceso de materia orgánica de manera accidental o intencionadamente pueden comprometer la eficacia del proceso de depuración del agua. Estos vertidos pueden provocar un tratamiento inadecuado del agua ya que la microbiota puede resultar dañada y no es capaz de eliminar toda la materia orgánica y nutrientes, lo que podría provocar que se libere agua contaminada al medio receptor. Las consecuencias sobre el medio ambiente son devastadoras, y pueden afectar también a la salud pública. En este estudio se presenta un ensayo para recuperar la microbiota que resulta dañada tras un vertido incontrolado que llega a la EDAR, permitiendo así reducir los costes económicos que supone recuperar la microbiota y evitar el impacto ambiental que implica la liberación de agua mal tratada.

Palabras clave: EDAR, vertido incontrolado, microbiota, bacterias nitrificantes, inóculo bacteriano.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. EDAR

El agua residual generada por la población y las industrias es tratada en Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) con la finalidad de eliminar los contaminantes presentes y poder devolverla a la naturaleza sin que suponga ningún riesgo. La composición del efluente de agua que se libera a aguas receptoras está regulada en Europa por la *Urban Waste Water Treatment Directive (91/271/EEC)* y la *Water Framework Directive (2000)*. Según el origen, el agua que se trata en las EDAR puede ser urbana o doméstica, industrial, agropecuaria, de origen incontrolado (vertidos ilegales) o pluvial.

La EDAR Quart-Benager se sitúa en Valencia, depura el agua procedente de 7 municipios y tiene una capacidad de tratamiento anual de 11.318.578 m³ de agua (1). El agua residual procedente de los diferentes municipios llega a la EDAR y es sometida a diversos tratamientos para ser depurada (Figura 1).

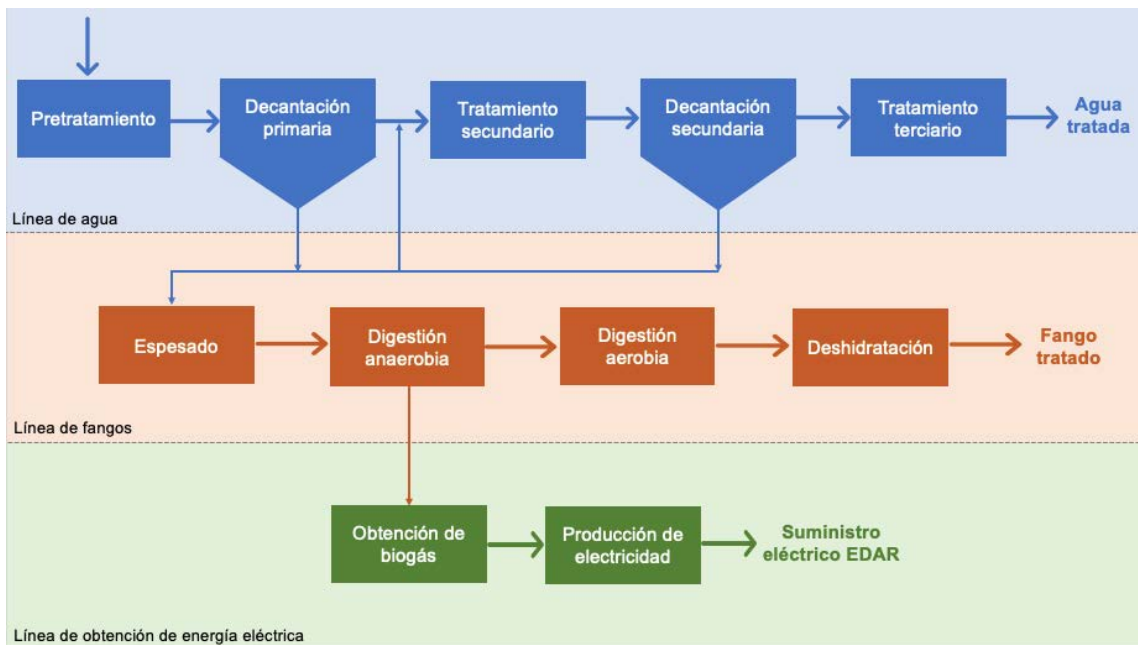


Figura 1. Esquema del proceso de depuración del agua en la EDAR Quart-Benager (Valencia).

Inicialmente, el agua residual se somete a un pretratamiento donde se retira la materia de mayor tamaño, como ramas, piedras, plásticos, etc., y también aceites, grasas y arenas. A continuación, el agua se somete a un tratamiento primario en un decantador donde se eliminan los sólidos sedimentables gracias a su sedimentación por gravedad. Este proceso se puede combinar con el uso de reactivos químicos para potenciar la

sedimentación. La siguiente etapa es el tratamiento secundario, el cual consiste en un proceso biológico donde la microbiota (conjunto de microorganismos que se localizan de manera normal en el agua) presente en reactores biológicos transforma la materia orgánica disuelta en el agua en sólidos fácilmente sedimentables, que serán eliminados en el posterior tratamiento. Asimismo, los microorganismos presentes también son capaces de eliminar nutrientes del agua, como el nitrógeno y el fósforo (2). Tras el proceso biológico, el agua es sometida a una decantación secundaria donde se separa el agua residual del fango generado en el proceso biológico mediante la sedimentación. Finalmente, el tratamiento terciario tiene la finalidad de cumplir con las exigencias de calidad del efluente más estrictas. Puede utilizarse para reducir la concentración de sólidos en suspensión o para eliminar posibles patógenos presentes en el agua mediante rayos ultravioleta, permitiendo así la desinfección del agua y su liberación al medio ambiente cumpliendo con los requisitos exigidos por la normativa vigente (Tabla 1) (3).

Tabla 1. Requisitos exigidos por el Real Decreto 509/1996 que deben cumplir las aguas depuradas para poder ser vertidas a cauces públicos. Extraído de BOE, Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo (4).

Parámetros	Valor límite
Sólidos en suspensión	35 mg/L
DBO ¹	25 mg/L O ₂
DQO ²	125 mg/L O ₂
Fósforo total	2 mg/L (<100.000 he) 1 mg/L (>100.000 he)
Nitrógeno total	15 mg/L (<100.000 he) 10 mg/L (>100.000 he)

¹Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), definida como la cantidad de oxígeno disuelto consumido por los microorganismos para oxidar la materia orgánica presente en las aguas residuales.

²Demanda Química de Oxígeno (DQO), definida como la cantidad de oxígeno disuelto consumido para la oxidación de la materia orgánica presente en las aguas residuales mediante compuestos químicos. Tanto la DBO como la DQO son parámetros indicadores de la calidad del agua.

Paralelamente a la depuración del agua, es necesario recircular parte del fango generado a la entrada del tratamiento biológico para mantener una concentración elevada de microorganismos y también es necesario retirar el exceso de fango para mantener controlado el proceso. Este exceso de fango puede ser reutilizado por la

agricultura como fertilizante, entre otros. No obstante, primero debe ser sometido a diversos tratamientos como espesamiento por gravedad y por flotación, digestión anaerobia y aerobia, y deshidratación, con la finalidad de eliminar los posibles patógenos presentes. Además, en la EDAR Quart-Benager (Figura 2) se consigue producir energía eléctrica a partir del biogás obtenido en el proceso de digestión anaerobia del fango y se utiliza esta energía como suministro eléctrico de la EDAR (5).

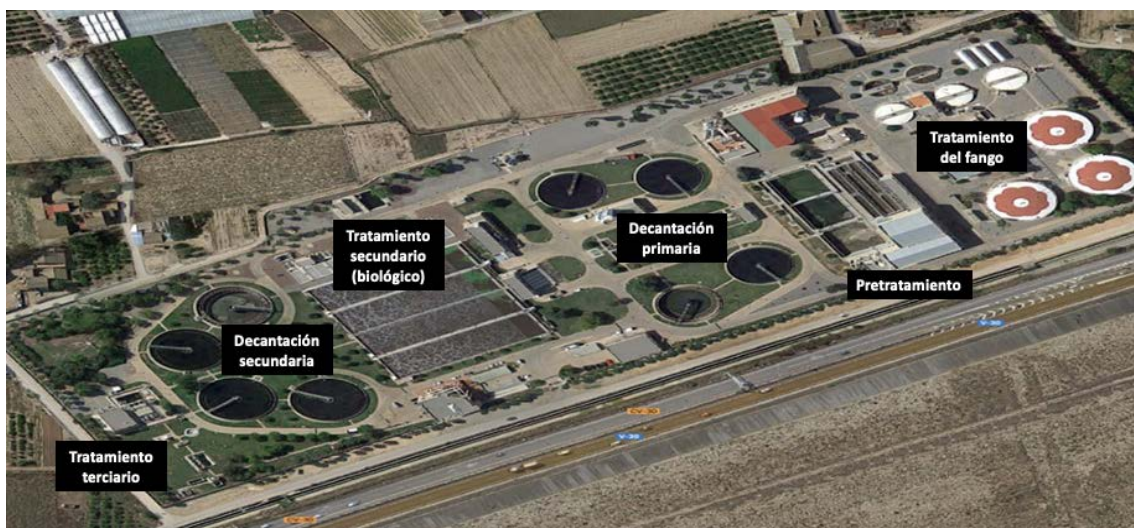


Figura 2. Vista aérea de la EDAR Quart-Benager (Valencia) con especificación de cada etapa del proceso de depuración del agua.

3.2. Proceso biológico de la EDAR

Los microorganismos capaces de degradar la materia orgánica se encuentran presentes de manera natural en las aguas residuales, por lo que el proceso de depuración del agua se produce espontáneamente en el medio ambiente. No obstante, debido a la gran cantidad de agua a tratar procedente de zonas urbanas e industriales, son necesarias las EDAR para acelerar el proceso de depuración. Los reactores biológicos de las EDAR mantienen las condiciones necesarias para una actividad microbiana óptima y así conseguir la degradación de la gran mayoría de la materia orgánica presente en las aguas residuales (6). Este proceso requiere un control extremo, ya que numerosas variables, como la temperatura, caudal del agua, pH, salinidad, alcalinidad, presencia de tóxicos o micronutrientes, pueden afectar al influente de agua que llega al reactor y como consecuencia alterar la microbiota (7). Todas estas características determinan la composición de la microbiota, por este motivo los reactores biológicos de cada EDAR presentan una microbiota característica (8).

Los microorganismos son capaces de utilizar la materia orgánica o inorgánica presente en el agua residual como sustrato, del que obtienen la fuente de carbono y/o energía, para generar biomasa y compuestos inocuos para el medio ambiente. Existen dos principales tipos de reactores biológicos, según si los microorganismos están fijados a una superficie (depuración mediante filtros percoladores) o si se encuentran libres (depuración por fangos activos). Los fangos activos es el sistema de depuración más utilizado. Se trata de un cultivo en suspensión que se mantiene agitado y aireado, donde los microorganismos pueden interactuar libremente con el agua residual. Este tipo de cultivo se caracteriza por la producción de flóculos (Figura 3). Los flóculos son agrupaciones de microorganismos y sustancias poliméricas extracelulares (*Extracellular Polymeric Substances*, EPS), como polisacáridos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, sustancias húmicas, cationes, etc., producidos por las bacterias o provenientes de restos de bacterias lisadas o de materia adsorbida de las aguas residuales. Las EPS además de cohesionar todos los componentes presentes en el flóculo, permite que las partículas suspendidas presentes en el agua residual sean adsorbidas al flóculo y puedan ser oxidadas por los microorganismos (9). Los flóculos pueden alcanzar tamaños entre 0,05 y 1,0 mm y son determinantes en el proceso de depuración del agua. Además, las características macroscópicas y microscópicas de los fangos son indicadores del proceso de depuración del agua (6). Los microorganismos dominantes en los fangos activos son las bacterias, mientras que los hongos, protozoos y metazoos tienen un papel secundario (7).

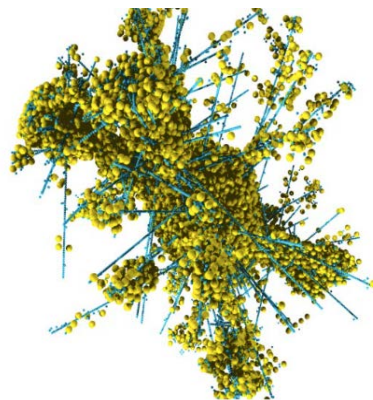


Figura 3. Estructura modelada de un flóculo formado por bacterias filamentosas y formadoras de flóculos. Extraído de Henze *et al.* (10).

1) Bacterias

Las bacterias son los microorganismos más abundantes en los fangos activos, llegando a constituir el 95% de la biomasa. Para garantizar una correcta depuración del agua, es necesaria la interacción entre las diferentes bacterias presentes en el reactor biológico.

Entre todas las bacterias presentes en los flóculos destacan las formadoras de flóculos por su capacidad para iniciar la agregación de los microorganismos (11). La mayoría de las bacterias presentes en los flóculos son heterótrofas, es decir, son capaces de utilizar la materia orgánica biodegradable presente en el agua residual como fuente de carbono, logrando su descomposición a dióxido de carbono y agua. Estas bacterias pueden ser aerobias estrictas o anaerobias facultativas, aunque la mayoría son anaerobias facultativas. Las bacterias anaerobias facultativas son aquellas que pueden desarrollarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, aunque es de vital importancia un aporte continuo de oxígeno para lograr la oxidación de la mayor cantidad de materia orgánica posible en las aguas residuales (6). En la EDAR Quart-Benager se utilizan domos cerámicos instalados en el fondo del reactor que aportan aire mediante burbujas.

Por otro lado, un factor limitante del sistema de fangos activos es la presencia de bacterias filamentosas, como el morfotipo *Nostocoida limicola* (12). Un crecimiento excesivo de bacterias filamentosas genera flóculos menos compactos y abiertos, y provoca que los filamentos de la superficie queden unidos débilmente a otros flóculos contiguos (Figura 4). Este proceso afecta a la posterior separación del agua del fango, ya que los flóculos menos compactos tienen peor capacidad de sedimentación. Aunque la presencia de un cierto número de filamentos en los flóculos es necesaria para su correcta formación y para proporcionar resistencia a la turbulencia causada por la agitación del reactor, es importante controlar la presencia de bacterias filamentosas para asegurar una correcta depuración del agua (13).

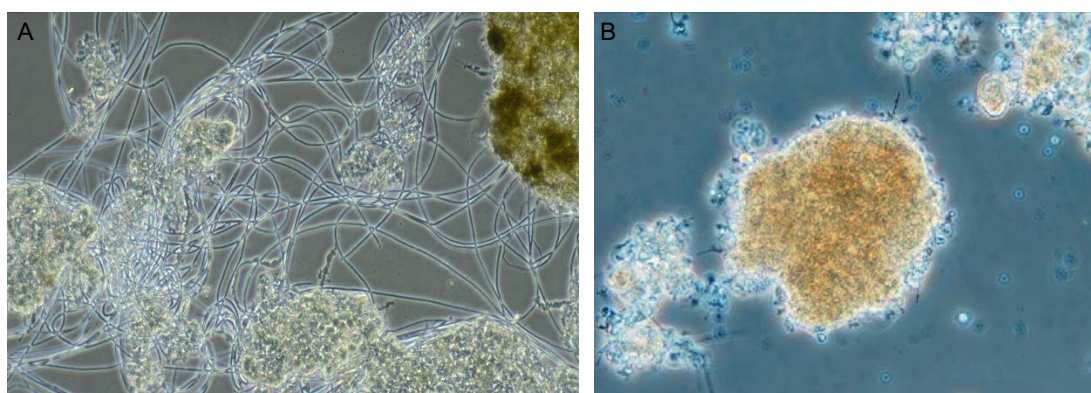


Figura 4. Imagen de un flóculo con elevada proporción de bacterias filamentosas (A) y con buenas propiedades de sedimentación (B). Extraídas de Henze *et al.* (10).

En los flóculos también existen bacterias capaces de eliminar nutrientes, como el nitrógeno. La presencia de compuestos nitrogenados en el agua desencadena problemas en el medio ambiente, como el crecimiento excesivo de plantas acuáticas y la consecuente eutrofización, toxicidad generada por los iones amonio, nitrito y nitrato, el agotamiento del oxígeno disuelto en el agua, etc. (14). La nitrificación, definida como el proceso de oxidación del ion amonio, es importante en la depuración del agua y es llevado a cabo por diferentes microorganismos, siendo los más relevantes las bacterias nitrificantes. El proceso de nitrificación es llevado a cabo en dos pasos, inicialmente el amonio es oxidado a nitrito por las bacterias amonio oxidantes (AOB) y, secuencialmente, el nitrito es oxidado a nitrato por las bacterias nitrito oxidantes (NOB) (Figura 5). Las AOB están representadas por el género *Nitrosomonas* y las NOB por el género *Nitrobacter*, aunque en el sistema de fangos activos es mayoritario el género *Nitrospira*. Ambas poblaciones bacterianas son microorganismos quimilitótrofos aerobios. Para realizar la nitrificación, las bacterias nitrificantes adhieren los iones amonio a la superficie de citomembranas (Figura 6) y las enzimas situadas en la superficie de estas citomembranas oxidan los iones. A continuación, liberan el producto al reactor (14).

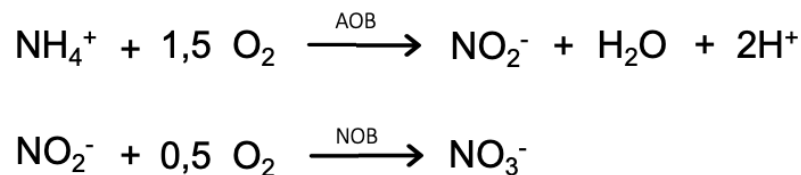


Figura 5. Esquema del proceso de nitrificación. Reacciones bioquímicas de oxidación del ion amonio a ion nitrito y, posteriormente, oxidación del ion nitrito a ion nitrato, por las AOB y NOB, respectivamente.



Figura 6. Citomembranas de bacterias nitrificantes en (a) *Nitrosomonas*, (b) *Nitrobacter*. Las citomembranas son extensiones de la membrana celular dispuestas alrededor del centro del citoplasma y alejadas de la pared celular. En estas citomembranas tiene lugar la nitrificación. Extraído de Gerardi (14).

Las bacterias nitrificantes se caracterizan por no poder iniciar la formación de los flóculos y necesitan disponer de oxígeno para realizar su actividad metabólica. Se encuentran en una gran variedad de hábitats y tienen una tasa de crecimiento relativamente baja, debido a que para asimilar una molécula de dióxido de carbono requieren oxidar 30 moléculas de ion amonio o 100 moléculas de ion nitrito, aproximadamente. Además, en el agua residual hay mayor presencia de residuos con carbono que con nitrógeno. Por ambos motivos, la biomasa de las bacterias nitrificantes presente en los flóculos de los fangos activos es menor que la de las bacterias heterótrofas, se encuentra entre el 3-10% (14). Por otra parte, las bacterias desnitrificantes oxidan el nitrato (liberado por las NOB) a nitrógeno molecular y, finalmente, este es liberado a la atmósfera. De esta manera se consigue la eliminación del nitrógeno del agua residual (14). Las bacterias desnitrificantes operan en condiciones anóxicas. Los reactores biológicos de la EDAR Quart-Benager alternan ciclos con aireación con ciclos sin aireación para permitir la actividad a las bacterias nitrificantes y desnitrificantes, respectivamente; y, por tanto, conseguir así la eliminación de los compuestos nitrogenados del agua residual. El factor crítico de este sistema alterno es encontrar la duración adecuada de cada ciclo (15). También destacan las bacterias acumuladoras de polifosfatos (PAOs) por su capacidad para acumular fósforo en el interior de la célula en forma de polifosfato, permitiendo la eliminación del fósforo del agua residual (16). Las bacterias heterótrofas y desnitrificantes se encuentran presentes en la mayoría de los reactores, mientras que las bacterias nitrificantes y PAO son más sensibles a cambios operacionales o del efluente y solo se encuentran presentes si las condiciones son las adecuadas (9).

2) Hongos

Los hongos son microorganismos que desempeñan importantes funciones de biorremediación. Son capaces de degradar compuestos orgánicos contaminantes presentes en el agua residual, como metales pesados, y también participan en la degradación de compuestos orgánicos complejos. Por ejemplo, los géneros *Giberella* y *Fusarium* producen enzimas capaces de degradar la celulosa y la lignina (17). Además, a niveles de pH bajos los hongos filamentosos son capaces de consumir la materia orgánica, mientras que el crecimiento bacteriano se encuentra inhibido. También participan en la estabilización de los flóculos, destacando su importancia en el sistema de fangos activos. No obstante, los hongos producen una mayor cantidad de biomasa por unidad de peso de sustrato utilizado que las bacterias heterótrofas (6). Una excesiva biomasa afecta negativamente al posterior proceso de sedimentación de los fangos, por lo que se debe controlar su presencia de igual modo que las bacterias filamentosas (18).

Los dos principales filos presentes en la mayoría de las EDAR son *Basidiomycota* y *Ascomycota* (19).

3) Protozoos

Los protozoos son organismos unicelulares que constituyen el 5% de la biomasa de los fangos activos, aproximadamente. Destacan los protozoos flagelados, las amebas, los ciliados nadadores y los ciliados fijos (Figura 7) (2). Su principal función en la EDAR es la clarificación del efluente, dado que la mayoría digieren poblaciones bacterianas dispersas y otras partículas suspendidas. También se ha demostrado que tienen un papel estimulador de la actividad bacteriana gracias a la secreción de compuestos que promueven su crecimiento. Debido a su sensibilidad a la presencia de tóxicos, son un indicador de toxicidad (20).

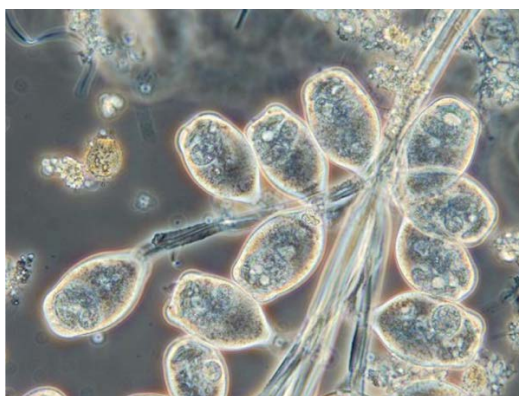


Figura 7. Colonia de protozoos en un sistema de fangos activos. Extraído de Henze *et al.* (10).

4) Metazoos

Los metazoos son organismos multicelulares de mayor tamaño que los protozoos. Su presencia en los reactores biológicos de las EDAR es menor que la presencia de protozoos. Los principales metazoos presentes en los reactores biológicos son los rotíferos y los nematodos (Figura 8). La presencia de metazoos también se asocia a la calidad del efluente, ya que digieren las bacterias dispersas presentes en el agua y también son capaces de digerir algas y protozoos. No obstante, su contribución al sistema de depuración por fangos activos es baja (2).

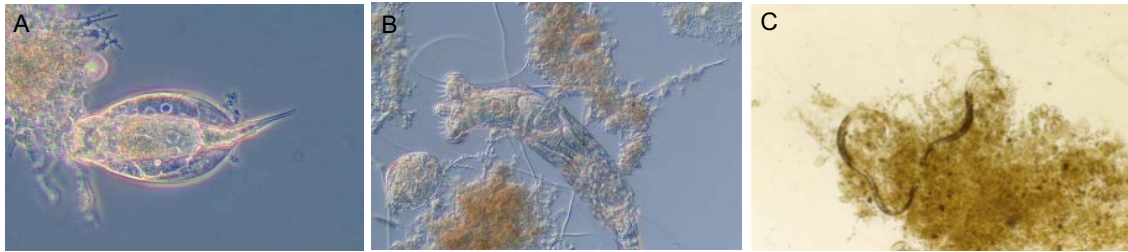


Figura 8. Imágenes de metazoos rotíferos (A y B) y nematodo (C). Extraído de la Jornada internacional de tratamiento y reutilización en aguas residuales. Papel de los protistas (21).

3.3. Control de los reactores biológicos de la EDAR

Para garantizar un proceso de depuración óptimo es necesario diseñar los parámetros operacionales de los reactores biológicos acorde a las condiciones de cada EDAR, así como un posterior control de estos (Tabla 2).

Tabla 2. Definición de los parámetros operacionales de los reactores biológicos que se deben tener en cuenta para el buen funcionamiento de una EDAR. Extraído de Marco Montolio (22) .

Concepto	Definición
Carga másica	Relación existente entre la carga de materia orgánica que entra al reactor biológico por unidad de tiempo y la masa de microorganismos presente en el reactor.
Edad del fango	Relación entre la masa de fango existente en el reactor y la masa en exceso que es purgada por unidad de tiempo.
Carga volumétrica	Relación entre la masa de materia orgánica que entra al reactor por unidad de tiempo y volumen del reactor.
Rendimiento	Relación entre la masa de materia orgánica eliminada y la masa del influente que entra al reactor biológico.
Tiempo de retención	Tiempo que permanece el caudal de agua del influente en el reactor biológico.
Índice volumétrico de fangos	Volumen en mL ocupado por un gramo de sólidos en suspensión del licor mezcla, tras una sedimentación de 30 minutos en una probeta de 1000mL y sirve para determinar si la etapa de sedimentación se produce correctamente.

Además del control de los parámetros operacionales del reactor biológico, es necesario realizar un análisis microbiológico de los reactores de la EDAR con la finalidad de determinar y cuantificar la población microbiana y cualquier alteración de esta que se pueda producir. Por ejemplo, es importante controlar la presencia de microorganismos filamentosos ya que puede dificultar el proceso de sedimentación, como ya se ha

comentado anteriormente. Además, conocer la población microbiana exacta permitirá optimizar el proceso de depuración del agua residual (8). No obstante, la mayoría de los microorganismos no se reproducen en un medio de cultivo, por lo que los métodos dependientes de cultivo presentan numerosas limitaciones en la cuantificación de microorganismos, así como una pérdida de información (8). Por ejemplo, las bacterias nitrificantes se pueden cultivar en un medio con agar, no obstante, su cultivo es complicado por su lenta tasa de generación (14). Como alternativa surgen técnicas de biología molecular como *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) o *quantitative PCR* (qPCR).

La técnica FISH permite identificar y cuantificar grupos bacterianos específicos, como bacterias nitrificantes, desnitrificantes, acumuladoras de fosfato y de glicógeno, filamentosas, entre otras. Esta técnica se basa en la utilización de sondas de oligonucleótidos marcadas con un fluorocromo que hibridan *in situ* con la secuencia de 16S rRNA de células previamente fijadas. Según el microorganismo que se quiera identificar se diseñan las sondas, que suelen ser de DNA y tienen una longitud de 15-25 nucleótidos. Las sondas hibridan en aquellas células que contengan la secuencia diana (*DNA-RNA matching*) y, debido a la gran cantidad de ribosomas activos presentes, las células quedan marcadas fluorescentemente, pudiendo ser identificadas mediante un microscopio de fluorescencia y cuantificadas por un *software* de análisis de imagen (8).

3.4. Vertidos incontrolados

El agua residual generada por la población y las industrias está compuesta por sólidos suspendidos, sólidos inorgánicos disueltos, materia orgánica biodegradable y no biodegradable, nutrientes, patógenos y metales. Estas sustancias contaminantes si no son eliminadas del agua pueden alterar los sistemas biológicos y generar efectos negativos sobre ellos (Tabla 3) (23). Además, el proceso de depuración también puede verse comprometido ya que los compuestos contaminantes pueden inhibir la actividad de los microorganismos presentes en el reactor biológico, provocando un inadecuado tratamiento de las aguas residuales, la posterior liberación de aguas contaminadas y el consiguiente daño al medio ambiente e incluso a la salud humana. Por ejemplo, los metales en concentraciones elevadas pueden inhibir la actividad metabólica de la población microbiana del reactor biológico, pudiendo llegar a ser letales (24). Por otro lado, un exceso de materia orgánica puede afectar al proceso de nitrificación ya que la mayoría de las bacterias nitrificantes son microorganismos autótrofos obligados y su

actividad metabólica se ve inhibida por la presencia de algunos compuestos orgánicos (14). Un exceso de nutrientes, como el nitrógeno, también genera un crecimiento masivo de algas lo que contribuye a la proliferación de microorganismos oportunistas que pueden dañar el sistema biológico (3,6). La directiva 91/271/CEE regula los requisitos que deben cumplir las aguas tratadas para poder ser liberadas al medio ambiente (25).

Tabla 3. Contaminantes presentes en aguas residuales y los efectos negativos que generan sobre el medio ambiente y los sistemas biológicos. Extraído de Sperling (23).

Contaminantes	Parámetros representativos	Efectos contaminantes
Sólidos suspendidos	Sólidos totales suspendidos	<ul style="list-style-type: none"> - Depósitos de fango - Adsorción de contaminantes - Protección de los patógenos
Sólidos inorgánicos disueltos	Sólidos totales disueltos, conductividad	<ul style="list-style-type: none"> - Excesiva salinidad que provoca daños en la vegetación - Toxicidad para la vegetación - Problemas en la permeabilidad del suelo
Materia orgánica biodegradable	Demanda bioquímica de oxígeno	<ul style="list-style-type: none"> - Disminución del oxígeno disuelto - Muerte de los peces - Condiciones sépticas
Materia orgánica no biodegradable	Pesticidas, detergentes, etc.	<ul style="list-style-type: none"> - Toxicidad - Generación de espuma (detergentes) - Reducción de la transferencia de oxígeno - Mal olor - No biodegradabilidad
Nutrientes	Nitrógeno, fósforo	<ul style="list-style-type: none"> - Crecimiento excesivo de algas - Toxicidad para los peces (amonio) - Enfermedad en recién nacidos (nitrato) - Contaminación del agua subterránea
Patógenos	<i>Escherichia coli</i> , Coliformes, <i>Salmonella</i> , Enterovirus, etc.	<ul style="list-style-type: none"> - Enfermedades transmitidas por el agua
Metales	As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn, etc.	<ul style="list-style-type: none"> - Toxicidad - Inhibición de los tratamientos biológicos de aguas residuales - Problemas en el uso agrícola de los fangos - Contaminación del agua subterránea

Otra problemática que genera un elevado riesgo de contaminación sobre el medio ambiente son los vertidos incontrolados. Algunas industrias liberan sustancias contaminantes al medio acuático de manera ilegal o accidental, incumpliendo las ordenanzas sobre vertidos donde se establecen los valores máximos permitidos. Estas aguas contaminantes se mezclan con las aguas urbanas, se recogen por la red de alcantarillado y llegan finalmente a las EDAR, donde pueden dañar la microbiota de los reactores biológicos (10). Los vertidos incontrolados pueden estar compuestos por tóxicos, como metales pesados, biocidas, detergentes, combustibles, compuestos farmacéuticos y otros químicos, o un exceso de carga orgánica, como los residuos de la producción del vino o del cultivo de cítricos. Ambos tipos de vertidos afectan al rendimiento de la depuración del agua ya que provocan una disminución en la eliminación de materia orgánica y de nutrientes en los reactores biológicos. Además, cuando esta disminución se hace evidente, la mayor parte de la microbiota del reactor biológico ya está afectada y el daño es irreversible. Las sustancias contaminantes pueden provocar la liberación al medio ambiente de agua tratada incorrectamente, incumpliendo los requisitos regulados por la Unión Europea, con la consiguiente contaminación del cauce receptor y un mayor coste económico. Para recuperar la microbiota de los reactores biológicos se requiere aumentar el suministro de aire de estos reactores y, teniendo en cuenta que la mayor parte del consumo de energía de una EDAR proviene de este suministro, supone un aumento considerable de los costes económicos (26).

Además de la afectación del proceso de depuración, el agua mal tratada tiene consecuencias graves sobre el medio ambiente y la salud pública. Por ejemplo, si el proceso de depuración no ha sido el adecuado, el efluente de agua puede contener patógenos como *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Clostridium perfringens*, los cuáles suponen una amenaza para la salud (27). Además, el agua residual depurada puede ser reutilizada para usos agrícolas y, si el efluente de agua está contaminado, se agrava el riesgo que supone. Por ejemplo, algunas especies bacterianas del género *Arcobacter* están consideradas como potenciales patógenos emergentes que se transmiten por los alimentos y el agua, como *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* y *Arcobacter skirrowii*, y son responsables de enfermedades en humanos y animales domésticos. En numerosos estudios se detectó su presencia en vegetales, como lechugas, acelgas y coles (28). Aunque los datos sobre el origen de la presencia de *Arcobacter* en los vegetales son escasos, numerosos estudios han determinado la contaminación de los vegetales tras el lavado de estos con agua (29),

así como la presencia de *Arcobacter* en muestras de aguas residuales y fangos activos (30).

Es evidente el riesgo que suponen los vertidos incontrolados. Numerosas legislaciones se han implantado para proteger el medio acuático y reducir los niveles de contaminantes presentes por el grave impacto ambiental que desencadenan, como la Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de 2000, y la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas 91/271/CE de 21 de mayo de 1991 (25,31). También es evidente la importancia de disponer en las EDAR de sistemas de detección temprana de la presencia de tóxicos o de un exceso de materia orgánica en el influente, así como de sistemas para recuperar la microbiota dañada tras el vertido (10).

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Tal y como se ha planteado, los vertidos incontrolados de sustancias contaminantes pueden alterar el proceso de depuración del agua mediante el sistema de fangos activos, desencadenando consecuencias muy graves sobre el medio ambiente. El presente trabajo hipotetiza que la adición de un inóculo bacteriano al reactor biológico de una EDAR, afectado por un vertido, favorece la recuperación de la microbiota presente en el reactor biológico, tras la toxicidad generada por el vertido incontrolado.

Para demostrar esta hipótesis se pretende analizar el impacto que tienen los vertidos incontrolados de sustancias contaminantes sobre la microbiota de los reactores biológicos de una EDAR y si la adición de un inóculo bacteriano (compuesto por bacterias heterótrofas facultativas) en los reactores biológicos tiene algún efecto sobre la microbiota dañada por el vertido.

5. METODOLOGÍA

El ensayo tiene una duración de 72 horas y consiste en dos reactores Batch (A y B) a escala de laboratorio. En ambos reactores se simula la llegada de un vertido incontrolado, pero solo en el reactor B se añade inóculo bacteriano (Figura 9). En este ensayo, el vertido incontrolado simulado es de vinaza (subproducto líquido de la destilación del mosto en la fermentación del etanol), lo que supone un exceso de materia orgánica y de sulfitos en el reactor. Inicialmente, cada reactor se llena con licor mezcla procedente de la EDAR de Requena (Valencia) en un volumen total de 5 litros y se programan ciclos de aireación interrumpidos por ciclos sin aireación a intervalos de tiempo constantes.

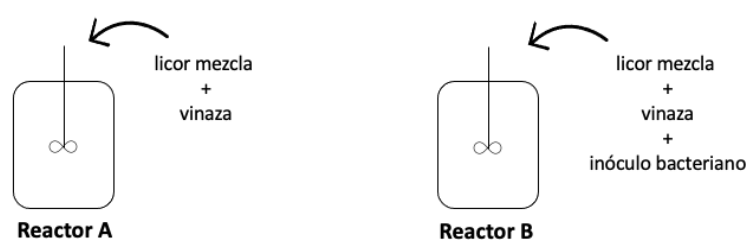


Figura 9. Esquemización del ensayo experimental con el contenido de cada reactor Batch. Creado mediante BioRender.

5.1. Activación del inóculo bacteriano

Previamente a iniciar el ensayo, es necesaria la activación del inóculo bacteriano para disminuir el tiempo de latencia de las bacterias en el reactor. El inóculo bacteriano se obtiene de la empresa Biopolis con sede en Paterna (Valencia), y está compuesto por un mix de bacterias heterótrofas facultativas.

Se evalúan diferentes diluciones del inóculo inicial en diferentes periodos de tiempo para estudiar cuál presenta mayor porcentaje de viabilidad y mayor consumo de oxígeno. Para ello, se prueban las concentraciones de inóculo 17 g/L (sin dilución), 8,5 g/L (dilución 1/2) y 3,4 g/L (dilución 1/5). Se prepara el inóculo bacteriano con agua tratada (efluente) según la concentración correspondiente, y se toman muestras al inicio, y a las 24 y 48 horas para estudiar la viabilidad celular.

Una vez obtenidos los resultados de viabilidad, se escoge la concentración y el tiempo con mayor porcentaje de células vivas y mayor consumo de oxígeno, y se prepara dicha concentración con agua tratada. A continuación, se estudia si la adición de micronutrientes afecta a la activación del inóculo bacteriano. Los micronutrientes añadidos a la preparación de inóculo bacteriano y la concentración correspondiente se

muestran en la tabla 4. Se estudia la viabilidad celular de dicha preparación inicialmente y a las 72 horas.

Tabla 4. Concentración de micronutrientes añadida a la preparación del inóculo bacteriano.

Micronutrientes	Concentración
EDTA	200,00 mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	20,00 mg/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	20,24 mg/L
Fe·SO ₄ ·7H ₂ O	19,96 mg/L
MoO ₃	0,51 mg/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	6,28 mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	3,27 mg/L
NiCl ₂ ·6H ₂ O	2,00 mg/L

5.2. Adición inóculo y vertido a los reactores

Se dispone de los dos reactores Batch, A y B, preparados como se detalla anteriormente. Tras la activación del inóculo bacteriano, se añaden 35,4 mL de inóculo bacteriano activado solo al reactor B y 32 mL de vinaza a ambos reactores. A las 24 horas, el agua decantada es sustituida por agua de entrada del reactor biológico de Requena, con la finalidad de simular el funcionamiento de un reactor biológico de una EDAR.

5.3. Toma de muestras

Se extraen muestras de cada reactor para poder estudiar la hipótesis planteada. Se extrae una muestra de 5 mL antes de la adición del inóculo bacteriano y del vertido (muestra inicial), tras 24 horas (muestra 24h), 48 horas (muestra 48h) y 72 horas (muestra 72h) en cada reactor. Tras la extracción de la muestra de cada reactor se sustituye el agua decantada por agua de entrada, tal y como se explica anteriormente, y este proceso se repite todos los días tras la extracción de las muestras.

5.4. Análisis de muestras

Las muestras extraídas de cada uno de los reactores (inicial, A-24h, B-24h, A-48h, B-48h, A-72h y B-72h) se someten a diferentes procedimientos: viabilidad, fijación y permeabilización, y FISH.

1) Viabilidad

Se utiliza el *LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit* (Invitrogen, Thermo Fisher) para determinar el porcentaje de viabilidad de las muestras extraída de los reactores (Figura 10). Todo el procedimiento detallado a continuación se realiza en la oscuridad debido a la sensibilidad de los reactivos a la luz, al tratarse de fluorocromos capaces de unirse a ácidos nucleicos. Tal y como se detalla en el kit, se añaden 0,5 μL de reactivo A (3,34 mM SYTO9) y 0,5 μL de reactivo B (20mM yoduro de propidio) en un eppendorf de 0,5 mL. En un nuevo eppendorf se añaden 0,75 μL de la mezcla de reactivo A y B, y 250 μL de la muestra extraída sin procesar. Este eppendorf se cubre con papel de aluminio asegurando una máxima protección de la luz, y se mantiene en agitación suave durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se depositan 10 μL sobre un portaobjetos y se añade un cubreobjetos grande de manera que toda la superficie quede cubierta. Finalmente, se visualiza la muestra procesada en el microscopio de epifluorescencia Leica DM2500 y se cuantifica el porcentaje de células viables y no viables mediante un *software* de análisis de imagen. Para ello, con la cámara digital acoplada al microscopio se realizan dos fotos por campo: un filtro para luz verde (SYTO9) y roja (yoduro de propidio) y un filtro solo para luz roja, a 40x aumentos. La cuantificación de la viabilidad celular mediante el *software* requiere un total de 40 fotos. Cuando se han tomado 20 fotos, se depositan 10 μL de la muestra en un portaobjetos nuevo y se capturan las 20 imágenes restantes, para asegurar que las imágenes tomadas representan la totalidad de la muestra.

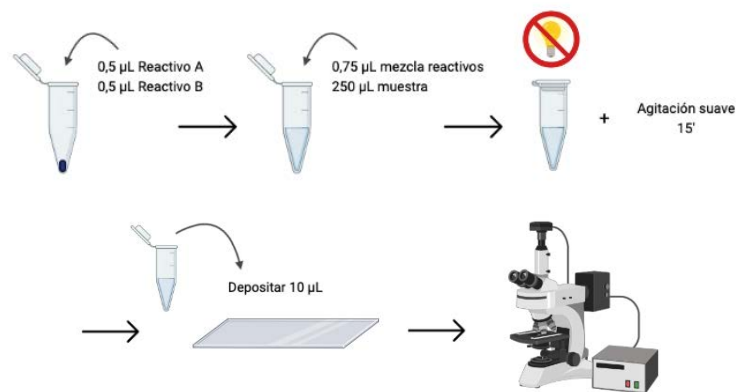
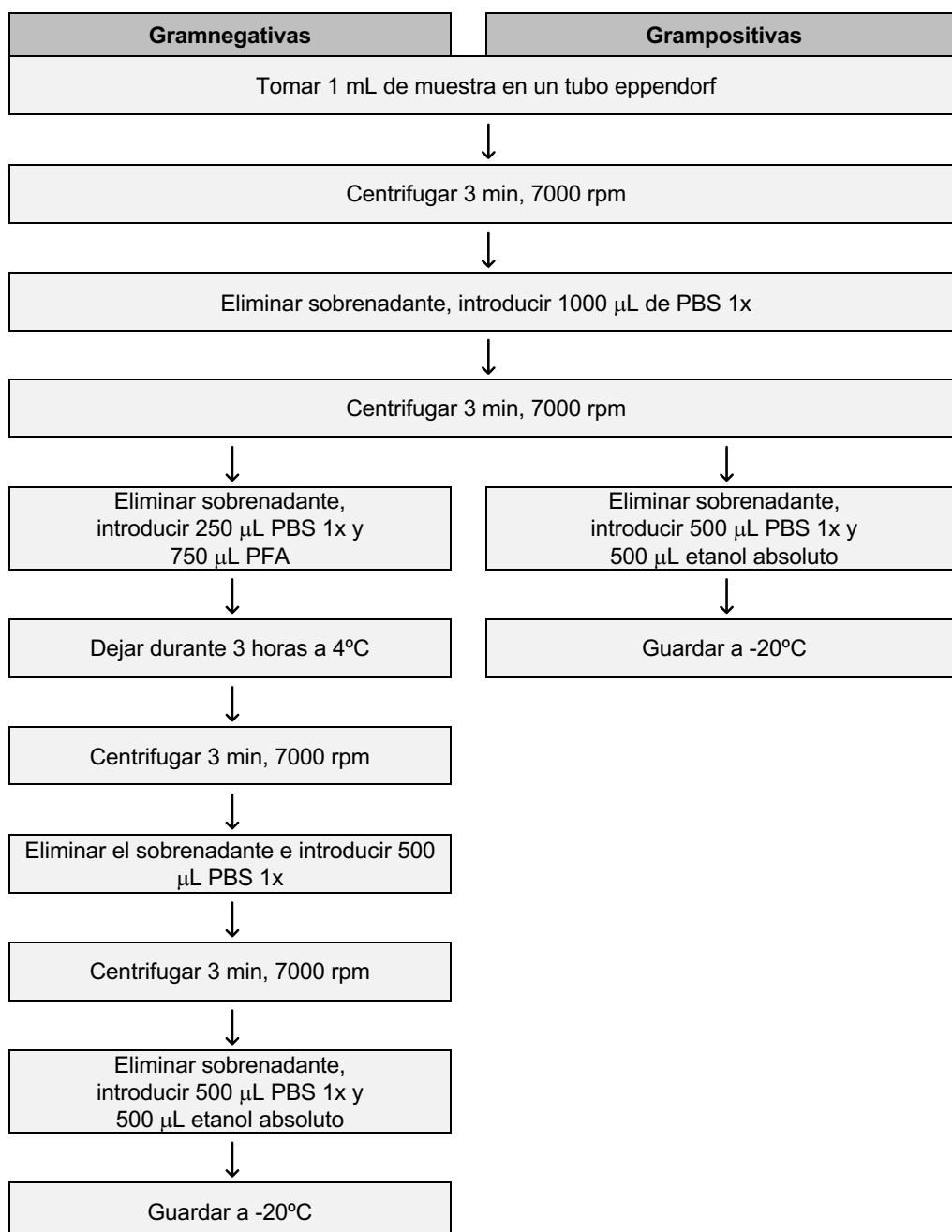


Figura 10. Procedimiento para estudiar la viabilidad celular mediante el *LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit* y la posterior observación de las muestras mediante un microscopio de epifluorescencia. Creado mediante BioRender.

2) Fijación y permeabilización

Para poder llevar a cabo la técnica FISH en las muestras es necesario un previo proceso de fijación y permeabilización de las células. De esta manera, la estructura celular de las bacterias queda rígida y inalterada y se permite la hibridación de las sondas de ácidos nucleicos con su diana. Se distinguen dos procedimientos de fijación según la naturaleza de la pared bacteriana. Para fijar las bacterias gramnegativas se utiliza paraformaldehído (PFA) como agente fijador, mientras que para fijar las bacterias grampositivas se utiliza etanol absoluto. Ambos procedimientos se detallan a continuación.



3) FISH

Se aplica la técnica FISH a las muestras fijadas siguiendo el protocolo de Pernthaler y Pernthaler (32). Es muy importante en esta técnica realizar un tratamiento previo de los portaobjetos con gelatina para crear una superficie hidrofílica, asegurando así la adhesión de las muestras y evitar la pérdida de células durante el procedimiento de hibridación y lavado. Los portaobjetos con 10 pocillos (Anexo 1) se enjuagan con etanol 70% y se dejan secar al aire en posición vertical. Se prepara una solución de gelatina calentando 100 mL de agua destilada hasta 70°C y añadiendo 100 mg de gelatina y 10 mg de sulfato potásico cromato. Los portaobjetos se sumergen en la solución de gelatina durante 5 minutos a 70°C. Y, por último, se dejan secar al aire en un ambiente libre de polvo y en posición vertical, consiguiendo así portaobjetos gelatinizados.

Para aplicar las muestras en los portaobjetos gelatinizados, se pipetea un volumen entre 3-5 μ L de la muestra fijada y se deposita en cada pocillo. Cada muestra se aplica por duplicado. Se deja secar al aire o, en caso de muestras con flóculos muy densos, se introduce en la estufa a 40°C durante 15-20 minutos. Con la finalidad de aumentar la resolución de las muestras durante la microscopía, se deshidrata el portaobjetos en etanol al 50% por inmersión durante 3 minutos, se repite el proceso en etanol al 80% y en etanol absoluto.

Finalmente, se realiza un proceso de hibridación *in situ* de las sondas de oligonucleótidos con las muestras depositadas en el portaobjetos y un posterior lavado de este. Para llevar a cabo el proceso de hibridación es necesaria la desnaturalización de las cadenas de DNA, que se consigue mediante el reactivo formamida. Según la sonda con la que se vayan a hibridar las muestras se prepara un tampón de hibridación con diferente porcentaje de formamida. Este compuesto es capaz de disminuir la temperatura de fusión de las sondas, debilitando así los enlaces por puentes de hidrógeno y permitiendo la unión de las sondas a los ácidos nucleicos de las muestras. En este ensayo se trabajó con sondas de oligonucleótidos de bacterias nitrificantes con especificidad a nivel de género. Según la especificidad de la sonda, se requiere un 35% o 40% de formamida (Tabla 4). Se preparan dos tampones de hibridación, uno con 35% de formamida y el otro con 40% en un volumen total de 2 mL (tabla 5).

Tabla 4. Sondas de oligonucleótidos diseñadas para hibridar con los ácidos nucleicos de bacterias nitrificantes de la clase *betaproteobacteriales*, y los géneros *Nitrospira* y *Nitrobacter*.

Sonda	Especificidad	Secuencia (5'-3')	Gram	% Formamida
Nso1225	Amonio-oxidantes <i>b-Proteobacteriales</i>	CGCCATTGTATTACGTGTGA	negativo	35
Ntspa662	Nitrificantes NOB género <i>Nitrospira</i>	GGAATTCCGCGCTCCTCT	negativo	35
Competidor Ntspa662	Competidor <i>Nitrospira</i>	GGAATTCCGCTCCTCT	negativo	35
NIT3	Nitrificantes NOB género <i>Nitrobacter</i>	CCTGTGCTCCATGCTCCG	negativo	40
Competidor NIT3	Competidor <i>Nitrobacter</i>	CCTGTGCTCCAGGCTCCG	negativo	40

Tabla 5. Volumen de cada reactivo utilizado para preparar la solución de hibridación, según el porcentaje de formamida requerido para la hibridación de las sondas.

Reactivos	35% formamida	40% formamida
NaCl 5M	360 μ L	360 μ L
HCl-Tris 1M	40 μ L	40 μ L
Formamida	700 μ L	800 μ L
H ₂ O MiliQ	898 μ L	798 μ L
SDS 10%	2 μ L	2 μ L

En el caso de las bacterias nitrificantes del género *Nitrospira* y *Nitrobacter* es necesario añadir en el proceso de hibridación una sonda (sin fluorocromo) que actúe como competidor. Todas las sondas descritas, a excepción de las que actúan como competidor, llevan unido en el extremo 5' de la cadena el fluorocromo TAMRA (5(6)-Carboxitetrametilrodamina). De manera que las muestras con sondas hibridadas emitirán fluorescencia de color rojo. En un eppendorf se añade 1 μ L de cada sonda que requiera el mismo porcentaje de formamida y la correspondiente solución de hibridación, hasta llegar a 10 μ L (Figura 11). El volumen total de sonda y de solución de hibridación se prepara según la cantidad de pocillos que se tenga que hibridar.

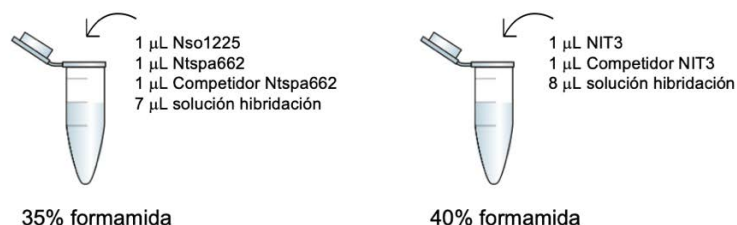


Figura 11. Esquema de la preparación de la solución de hibridación con las correspondientes sondas según el porcentaje de formamida. Creado con Biorender.

Se aplican 10 µL del eppendorf con la mezcla de sonda y solución de hibridación en cada pocillo del portaobjetos. Paralelamente, se envuelve un tubo falcon de 50 mL con papel de aluminio, se pone un trozo de papel de celulosa en el interior y sobre este se vierte la solución de hibridación correspondiente, previamente preparada, (sin sonda) hasta que quede empapado, con la finalidad de crear una atmosfera húmeda. Estos serán los tubos de hibridación. Se deposita el portaobjetos dentro del tubo falcon en posición horizontal, quedando el papel de celulosa por debajo del portaobjetos. Finalmente, el tubo falcon con el portaobjetos en el interior se introduce en la estufa a 46°C y se deja incubar durante 90 minutos, siempre manteniendo la posición horizontal.

Por otro lado, se prepara la solución de lavado en otro tubo falcon de 50mL envuelto con papel de aluminio con los reactivos detallados en la tabla 6, según el porcentaje de formamida utilizado en la solución de hibridación. Estos serán los tubos de lavado. Se preparan dos tubos falcon, uno para el portaobjetos hibridado con la solución con 35% de formamida y el otro con 40%. Los dos tubos se introducen en un baño de agua precalentado a 48°C, asegurando que el papel de aluminio cubre toda la superficie del tubo para garantizar la oscuridad en el proceso.

Tabla 6. Volumen cada reactivo utilizado para preparar la solución de lavado, según el porcentaje de formamida correspondiente.

Reactivos	35% formamida	40% formamida
NaCl 5M	700 µL	460 µL
EDTA 0,5M	500 µL	500 µL
HCl-Tris 1M	1000 µL	1000 µL
H ₂ O MiliQ	47,75 mL	47,06 mL
SDS 10%	50 µL	50 µL

Cuando el tiempo de incubación de los tubos de hibridación ha finalizado (90 minutos), se saca el portaobjetos de su interior, se lava rápidamente con agua destilada y se introduce en el interior del tubo de lavado correspondiente (presentes en el baño de agua a 48°C). Los tubos de lavado con el portaobjetos en el interior se introducen en el baño y se dejan incubar durante 15-20 minutos, para eliminar el exceso de sonda que no haya hibridado con las muestras. Una vez transcurrido el tiempo, se sacan los portaobjetos de los tubos de lavado, se lavan con agua destilada y se dejan secar al aire en la oscuridad.

Finalmente, para poder observar toda la muestra en el microscopio, tanto la hibridada como la no hibridada, es necesario teñirla. La tinción se realiza con el fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que tiñe todo el DNA presente en la muestra. Se prepara una solución con 1 mg de DAPI en 10 mL de agua destilada, y esta solución se diluye 1/100. Se depositan 20 μ L de la solución DAPI diluida en cada pocillo y se deja reaccionar 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavan los portaobjetos con agua destilada y se dejan secar al aire. Todo el proceso también se realiza en la oscuridad. Finalmente, se procede a observar los portaobjetos al microscopio o se pueden guardar a -20°C para posteriores observaciones. Previamente a la observación de la muestra al microscopio, se añaden unas gotas de *Vectashield* (Novus Biologicals) en el portaobjetos, con la finalidad de prolongar la fluorescencia de las muestras hibridadas. Cada uno de los pocillos de los portaobjetos es visualizado en el microscopio *Leica DM2500* y mediante la cámara acoplada al microscopio se capturan un total de 20 imágenes en cada pocillo, con 40x aumentos. En un mismo campo se realizan dos imágenes, una en el filtro azul (DAPI) donde se visualiza toda la muestra, y otra en el filtro rojo (TAMRA) donde solo se visualiza la muestra que haya hibridado con las sondas. De manera que por cada pocillo se obtienen 20 imágenes y por cada muestra un total de 40, cantidad necesaria para hacer la cuantificación de bacterias nitrificantes mediante el *software* de análisis de imagen. Es importante destacar que se debe evitar capturar imágenes de artefactos o de zonas con fluorescencia muy intensa, ya que podrían alterar los resultados.

6. RESULTADOS

La fase inicial del proyecto en el que se basa el presente trabajo, *Bactiwater*, consistió en un análisis de los vertidos producidos durante los 10 años anteriores, del 2007 hasta 2017 (esta fase del proyecto tuvo lugar de septiembre a octubre de 2017). El análisis se realizó en 218 EDAR de la Comunidad Valenciana clasificadas por capacidad de tratamiento de agua y según el proceso industrial o agrícola causante del vertido (textil, calzado, cítricos y vinícola). Este análisis de datos permitió determinar los tipos de vertidos contaminantes más frecuentes que se producen en la EDAR de Quart-Benager, siendo los tensioactivos, pesticidas, metales pesados y alta carga orgánica. Por tanto, los diferentes ensayos experimentales realizados consistieron en vertidos artificiales de los 4 tipos de contaminantes anteriores en la planta piloto creada para el proyecto de *Bactiwater* (Anexo 2 y 3). En este trabajo se presentan los resultados de un vertido de vinaza, siendo del tipo de vertido de alta carga orgánica. El análisis histórico de los vertidos permitió determinar que el 70% de los vertidos se producen por un exceso de materia orgánica y que las EDAR pequeñas-medianas (capaces de tratar ≤ 50000 habitantes equivalentes) son más sensibles ante los vertidos. Además, se observó que estos vertidos aumentan coincidiendo con la campaña vinícola y cítrica.

Por otro lado, también se hizo una recopilación de datos para determinar la población bacteriana predominante en el proceso de nitrificación y desnitrificación del reactor biológico de la EDAR Quart-Benager, teniendo en cuenta factores externos como el clima, estación del año, temperatura y situación geográfica. Este análisis fue necesario para determinar la composición del inóculo bacteriano más óptimo para la EDAR y permitió a la empresa Biopolis crear el inóculo bacteriano. En el ensayo que se presenta en este trabajo se añadió un inóculo compuesto únicamente por bacterias heterótrofas facultativas (por privacidad de la empresa no se especifica la composición del inóculo).

Las imágenes de las muestras obtenidas mediante la técnica FISH y el kit de viabilidad celular, tanto de la activación del inóculo como de los reactores, son analizadas mediante el *software* ImageCAI (herramienta de análisis de imagen capaz de cuantificar de forma automática diferentes características del fango activo). Este *software* procesa las imágenes para garantizar condiciones óptimas. Según el estudio de la muestra que se vaya a hacer, se aplican diferentes técnicas para mejorar las imágenes. Para estudiar la viabilidad celular, las imágenes son sometidas a separación por canales, deconvolución y filtro de ruido. Mientras que para la cuantificación bacteriana se aplica solo deconvolución y filtro de ruido (33). El *software* procesa las imágenes, las cuantifica

de manera automática y proporciona los resultados en una hoja de cálculo. Para poder hacer la cuantificación, el *software* somete a las imágenes a binarización, dando lugar a imágenes en blanco y negro donde diferencia píxeles blancos y negros, y cuantifica su área (un ejemplo de mejora de las imágenes se muestra en el anexo 4). El porcentaje finalmente proporcionado corresponde con la media de resultados obtenidos de cada una de las imágenes analizadas (33).

El ensayo que se presenta en este trabajo fue llevado a cabo en reactores Batch a escala de laboratorio. A continuación, se presentan los resultados de viabilidad celular y de presencia de bacterias nitrificantes en los reactores A (sin inóculo) y B (con inóculo).

6.1. Activación inóculo

Los resultados de viabilidad celular de la activación del inóculo de las muestras inicial, 24h y 48h se muestran en la tabla 7. Un ejemplar de imágenes de cada muestra se presenta en el anexo 5-7.

Tabla 7. Porcentaje de viabilidad (células viables/no viables por campo analizado \pm incertidumbre) de las muestras de inóculo inicial, 24h, 48h y 72h de cada una de las concentraciones analizadas.

Muestra inóculo	Concentración (g/L)	Células viables/no viables
Inicial	17	55/45 \pm 1
	8,5	55/45 \pm 1
	3,4	57/43 \pm 1
24h	17	52/48 \pm 3
	8,5	68/32 \pm 2
	3,4	74/26 \pm 2
48h	3,4 + 180 mL licor mezcla	53/47 \pm 1
	3,4 + 8,8 mL licor mezcla	55/45 \pm 2

A las 24 horas de activación del inóculo y en la concentración 3,4 g/L se observó un porcentaje de 74 ± 2 células viables por campo analizado, siendo el mayor porcentaje de células viables de todas las muestras de inóculo bacteriano analizadas.

Tras seleccionar la concentración de inóculo bacteriano de 3,4 g/L se estudió como afecta la adición de micronutrientes a la activación del inóculo (Tabla 8; imágenes en Anexo 8). Se observó que la adición de micronutrientes no tiene ningún efecto sobre la activación del inóculo, ya que el porcentaje de células viables no se ve alterado por los micronutrientes añadidos.

Tabla 8. Porcentaje de viabilidad (células viables/no viables por campo analizado \pm incertidumbre) de las muestras de inóculo de concentración 3,4 g/L inicial y 72h.

Muestra inóculo	Células viables/no viables
Inicial	72/28 \pm 2
72h	73/27 \pm 2

6.2. Adición inóculo y vertido a los reactores

1) Viabilidad

Los resultados de viabilidad de las muestras extraídas de cada reactor se evidencian en la tabla 9. Un ejemplar de imágenes de cada muestra de los reactores se presenta en el anexo 9 y 10. Es posible apreciar cómo el porcentaje de células viables en el reactor A aumenta y disminuye a lo largo de todo el ensayo. En cambio, en el reactor B el porcentaje de células viables se mantiene relativamente estable hasta las 48 horas y disminuye a las 72 horas.

Tabla 9. Porcentaje de viabilidad de las muestras extraídas del reactor A y B al inicio del ensayo, a las 24h, 48h y 72h. Los resultados se expresan en células viables/no viables por campo analizado \pm incertidumbre.

Muestra	Reactor A (sin inóculo)	Reactor B (con inóculo)
Inicial	55/45 \pm 1	55/45 \pm 1
24h	61/39 \pm 2	52/48 \pm 2
48h	49/51 \pm 2	54/46 \pm 3
72h	56/44 \pm 2	45/55 \pm 2

2) FISH

A continuación, se presentan los resultados de la cuantificación de bacterias de la clase amonioxidantes *Betaproteobacteriales* y de los géneros *Nitrospira* y *Nitrobacter* que se obtuvieron en los reactores A y B mediante el *software* ImageCAI (Tabla 9). Un ejemplar de imágenes de cada muestra se presenta en el Anexo 11 y 12.

Tabla 9. Porcentaje de bacterias nitrificantes de la clase amoniooxidantes *Betaproteobacterales* y de los géneros *Nitrospira* y *Nitrobacter* presentes en los reactores A y B al inicio del ensayo, a las 24h, 48h y 72h. Los resultados se presentan en células viables/no viables por campo analizado \pm incertidumbre.

*Los resultados de las muestras del reactor B a las 48h no son representativos.

Muestra	Población bacteriana	Reactor A	Reactor B
Inicial	<i>Betaproteobacterales</i> + <i>Nitrospira</i>	3 \pm 1	3 \pm 1
	<i>Nitrobacter</i>	2 \pm 1	2 \pm 1
24h	<i>Betaproteobacterales</i> + <i>Nitrospira</i>	4 \pm 1	4 \pm 1
	<i>Nitrobacter</i>	2 \pm 1	2 \pm 1
48h	<i>Betaproteobacterales</i> + <i>Nitrospira</i>	4 \pm 2	-
	<i>Nitrobacter</i>	2 \pm 1	-
72h	<i>Betaproteobacterales</i> + <i>Nitrospira</i>	3 \pm 1	3 \pm 1
	<i>Nitrobacter</i>	2 \pm 1	2 \pm 1

Se observa un comportamiento similar en ambos reactores, detectando un aumento a las 24h del porcentaje de bacterias de la clase amoniooxidantes *Betaproteobacterales* y del género *Nitrospira*, y una recuperación de los valores iniciales al final del experimento (72h). El género *Nitrobacter* se mantiene estable a lo largo de todo el experimento en ambos reactores. En este ensayo las sondas de oligonucleótidos específicas de la clase amoniooxidantes *Betaproteobacterales* y del género *Nitrospira* se hibridaron juntas, por lo que no se puede diferenciar la abundancia relativa de AOB y NOB en este estudio.

7. DISCUSIÓN

La mayoría de los vertidos incontrolados o accidentales que llegan a las EDAR se caracterizan por una elevada carga orgánica. Como consecuencia, el proceso de nitrificación suele verse afectado debido a que las bacterias nitrificantes son los microorganismos más sensibles en el tratamiento biológico de las depuradoras (34). El filum Proteobacteria, al que pertenecen las bacterias nitrificantes, es el más abundante en las EDAR municipales, supone entre el 30-60% de la población bacteriana presente en el reactor biológico, y la clase *Betaproteobacteriales* es la clase principal responsable de la oxidación de nitritos (35). Literatura previa muestra que el género *Nitrosomonas* es más susceptible a la inhibición de la nitrificación que el género *Nitrobacter*, obteniéndose como resultado a esta inhibición una acumulación de iones amonio (36). Es importante destacar que el factor causante de la inhibición es la concentración de los compuestos tóxicos presentes en el reactor, más que el propio compuesto y en algunos casos, si la concentración del tóxico es baja y la exposición al tóxico es larga, las bacterias pueden adquirir resistencia a dicho compuesto (37). En un estudio donde se comparaba la composición microbiana de EDAR municipales (solo reciben aguas de uso doméstico) e industriales (reciben aguas procedentes de industrias), se determinó que la eliminación de amonio y nitrato es más efectiva en EDAR municipales que en EDAR industriales textiles, debido a que la abundancia relativa de bacterias nitrificantes, así como de desnitrificantes, es mayor en las EDAR municipales donde hay menor presencia de tóxicos (38). Aunque la presencia de las bacterias nitrificantes depende de la cantidad de sustrato disponible (iones amonio y nitrito, respectivamente), su crecimiento y reproducción es muy sensible a cambios en la composición del influente de agua que llega al reactor y cualquier alteración, como la presencia de tóxicos o una elevada carga orgánica, afecta a su actividad (26). Este hecho podría explicarse en parte a que su tasa de crecimiento en condiciones normales es menor que en el caso de las bacterias heterótrofas, por lo que al obtener menor energía tras la oxidación del sustrato no pueden reparar sus sistemas enzimáticos (afectados por el vertido) tan rápidamente como las bacterias heterótrofas (14).

En este trabajo se analizaron los posibles cambios en las bacterias nitrificantes de la microbiota de dos reactores Batch a escala de laboratorio tras la adición de un vertido incontrolado (compuesto por un exceso de compuestos orgánicos) en ambos reactores, y un inóculo bacteriano (compuesto por un mix de bacterias heterótrofas) solo en uno de los reactores. Estos reactores simulaban reactores biológicos de una EDAR. Concretamente, en el ensayo de este trabajo se analizó el porcentaje de bacterias

nitrificantes presentes en los reactores y se observó un ligero aumento durante el transcurso del ensayo. Sin embargo, al finalizar el ensayo (72 horas) se observó que los porcentajes de bacterias nitrificantes correspondientes eran similares a los valores iniciales en ambos reactores, tanto el que incluía el inóculo bacteriano como el que no lo incluía. Estos datos podrían sugerir que realmente no se produce ningún cambio en la población bacteriana de la clase *Betaproteobacterales* y de los géneros *Nitrobacter* y *Nitrospira*. Además, estos resultados se encuentran en consonancia con un estudio previo donde se observó que no había cambios en la población bacteriana nitrificante a lo largo de 7 días tras añadir un vertido tóxico al reactor. No obstante, los autores de este estudio determinaron mediante la técnica de respirometría (técnica donde se mide la velocidad de consumo de oxígeno por parte de los microorganismos bajo condiciones definidas y controladas) que la actividad nitrificante se reducía en un 100% tras añadir el vertido tóxico al reactor (26). De este modo, las bacterias nitrificantes están presentes en los dos reactores, pero su actividad se encuentra inhibida y esta inhibición es causada por diferentes motivos.

En el caso del reactor sin inóculo bacteriano (reactor A), las bacterias presentes en el reactor se han enfrentado a una elevada carga orgánica tras la adición del vertido, que provoca la inhibición de su actividad nitrificante. Esta inhibición ya se había observado en estudios previos, donde se determinó que la presencia de determinados compuestos orgánicos sencillos en reactores biológicos, como alcoholes y ácidos, inhiben la nitrificación de manera significativa (14). Otros estudios también han reportado que compuestos como fenoles, hidrocarburos aromáticos y compuestos nitrogenados aromáticos pueden llegar a inhibir la nitrificación hasta en un 80% (14). Además, la toxicidad generada también la relacionaron con la concentración del compuesto inhibitorio, cuanto mayor es la cantidad de compuestos orgánicos, mayor es el efecto inhibitorio. Por otro lado, este estudio también determinó que las bacterias NOB (representadas por el género *Nitrobacter*) son más sensibles a estos compuestos que las AOB (representadas por el género *Nitrosomonas*) (14). No obstante, en este estudio no se pueden obtener conclusiones acerca de la abundancia relativa de AOB y NOB, ya que las sondas de oligonucleótidos específicas de estas dos poblaciones bacterianas se hibridaron conjuntamente. Los compuestos orgánicos presentes en exceso en el reactor pueden impedir el crecimiento de las bacterias nitrificantes a través de un mecanismo directo, por el cuál impiden la acción de las enzimas responsables de la oxidación del amoníaco y del nitrito (39). Sin embargo, al estudiar el porcentaje de células viables totales de este reactor, no solo de bacterias nitrificantes, se observó un aumento de este porcentaje a las 24 horas, una disminución a las 48 horas y un aumento

a las 72 horas. Estos resultados sugieren que los compuestos orgánicos presentes en exceso podrían producir un efecto dosis-dependiente en la inhibición de la población bacteriana nitrificante, de manera que según la dosis se observa un comportamiento bacteriano diferente. También se sugiere que la cantidad de vertido añadido no es suficiente para inhibir completamente la nitrificación, se necesitaría añadir una mayor cantidad de vertido para observar una disminución de la viabilidad a lo largo de todo el ensayo. Este efecto dosis-dependiente se ha podido observar en ensayos realizados sobre la evaluación de la eficacia de fármacos antimicrobianos contra un patógeno determinado (40).

Por otro lado, en el caso del reactor con inóculo (reactor B) hay un exceso de compuestos orgánicos por el vertido y una mayor cantidad de bacterias heterótrofas por el inóculo añadido. Por ello, la inhibición que causan los compuestos orgánicos sobre las bacterias nitrificantes es menor que en caso del reactor sin inóculo, ya que las bacterias heterótrofas procedentes del inóculo permiten eliminar una mayor cantidad de compuestos orgánicos. No obstante, existen numerosas publicaciones que demuestran un efecto antibacteriano de las bacterias heterótrofas sobre otras bacterias. Las bacterias heterótrofas son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas humanas, de peces y también ambientales, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Aliivibrio fischeri* y *Vibrio harveyi*, respectivamente (41). En bacterias heterótrofas aisladas de ríos y mares, como en el *Siak River Estuary* (Indonesia), también se ha demostrado el efecto antibacteriano y, además, se ha demostrado que el efecto es potente (42,43). Este antagonismo también se ha observado en agregaciones bacterianas presentes en océanos, donde un 53,3% de las bacterias que se aislaron (agrupadas en las clases α -*Proteobacteria* y *Bacteroidetes*, y los ordenes *Alteromonadales* y *Vibrionales*) mostraron propiedades antagónicas entre ellas, y se determinó que el antagonismo es una posible forma de regular las poblaciones bacterianas presentes (44). No obstante, existen publicaciones donde se ha demostrado que las bacterias heterótrofas pueden establecer sinergia con otros microorganismos, como las microalgas (45). Por este motivo, se quiso comprobar mediante este estudio si las bacterias heterótrofas podrían establecer también una relación de sinergia con las bacterias nitrificantes para degradar completamente todos los contaminantes presentes en el agua residual, ya que ambas bacterias desempeñan funciones de descontaminación ambiental. Además, se sabe que los productos liberados por las bacterias nitrificantes pueden ser utilizados por las bacterias heterótrofas como fuente de carbono y energía, así como los restos celulares tras la lisis celular, aunque esto solo tiene lugar si la concentración de nutrientes orgánicos es muy baja (46). Sin embargo, ni en nuestro estudio ni en publicaciones

anteriores hay constancia de que se establezca una relación de simbiosis entre estas dos poblaciones bacterianas en las aguas residuales y los resultados de este ensayo apuntan más hacia el antagonismo. Debido a las numerosas evidencias existentes que demuestran el antagonismo de las bacterias heterótrofas sobre otros grupos bacterianos, se sugiere que en el reactor con inóculo se establece una relación de antagonismo entre las bacterias heterótrofas y nitrificantes, provocando la inhibición del crecimiento de las bacterias nitrificantes. Existen diversos mecanismos por los que las bacterias heterótrofas pueden inhibir el crecimiento de las bacterias nitrificantes, como la producción de antibióticos (por ejemplo, estreptomina, tetraciclina o vancomina) o de metabolitos secundarios. Estos metabolitos son capaces de disminuir el pH del medio (como el ácido láctico), de cambiar la disponibilidad de nutrientes (por ejemplo, el sideróforo actúa como un compuesto quelante de hierro) e incluso de intervenir en las comunicaciones bacteria-bacteria, como el *quorum sensing*, provocando la inhibición de otras bacterias (44,47). Por otra parte, la inhibición de las bacterias nitrificantes a lo largo de todo el ensayo se relaciona con el porcentaje de células viables analizado en este reactor. Este porcentaje se mantuvo estable hasta las 48 horas, pero a las 72 horas se observó una disminución. Es evidente que, si las células se encuentran inhibidas y esta inhibición perdura en el tiempo, las células no pueden obtener energía para crecer ni reproducirse y empezarán a morir. El tiempo en que se observe una reducción significativa de la viabilidad o supervivencia celular depende del compuesto tóxico y del microorganismo, pudiendo ser a las 6 horas de la adición del tóxico (48) o a las 24 horas (49). En el caso del presente ensayo, la muerte celular se evidenció a las 72 horas, donde se observa una reducción de la viabilidad. Se plantea realizar futuros estudios con el fin de estudiar el porcentaje de células viables correspondientes a cada grupo bacteriano (bacterias heterótrofas y nitrificantes). De esta manera se intuye que se observaría una elevada viabilidad en el caso de las bacterias heterótrofas y una disminución considerable de la viabilidad de las bacterias nitrificantes a medida que avanza el ensayo, y permitiría obtener conclusiones más específicas y detalladas de los resultados.

En último lugar, la técnica FISH ha permitido determinar el porcentaje de bacterias nitrificantes en ambos reactores a lo largo del ensayo. Esta técnica permite identificar grupos microbianos específicos con elevada fiabilidad y posteriormente cuantificarlos mediante un *software* de análisis de imagen. No obstante, es importante destacar que esta técnica presenta ciertos inconvenientes en la identificación de microorganismos. Durante el desarrollo de la técnica hay que tener en cuenta ciertos aspectos que pueden afectar a la fiabilidad de los resultados. Algunos microorganismos, e incluso algún

material presente en su hábitat, tienen la capacidad de emitir fluorescencia y esta autofluorescencia podría enmascarar la señal producida por el fluorocromo de las sondas al hibridar con las muestras y, por tanto, proporcionar falsos positivos. Asimismo, un paso crítico de FISH es el diseño de las sondas de oligonucleótidos ya que deben ser lo suficientemente específicas para unirse únicamente al microorganismo de interés en presencia de una gran cantidad de microorganismos. También se debe tener en cuenta la dificultad del acceso de la sonda al sitio diana según el tipo de célula bacteriana, por lo que el proceso de permeabilización también es un paso crítico de la técnica, y también la estructura tridimensional que adquiere el rRNA (región diana donde se une la sonda) dificulta la unión de las sondas. Además, el contenido de ribosomas y de rRNA depende del estado fisiológico de cada célula, pudiendo variar ampliamente entre las células. Tanto una baja cantidad como una mala calidad del rRNA también afectan al proceso ya que se podrán unir menos sondas, la intensidad de la señal fluorescente será menor y, como consecuencia, se dificultará la identificación del microorganismo diana. Por otro lado, las muestras hibridadas con las sondas al ser excitadas por la luz van perdiendo fluorescencia de manera irreversible con el paso del tiempo. Por lo que el momento de la toma de las imágenes también influye en la fiabilidad de los resultados (50). También es necesario conocer la microbiota presente en el reactor o en el medio de estudio para poder diseñar sondas con mayor especificidad y poder detectar los microorganismos de interés. Por otro lado, la obtención de unas imágenes de calidad mediante el microscopio depende en gran medida de la densidad de la muestra, por lo que si los flóculos son muy densos la identificación de microorganismos resultará más complicada debido a la calidad de las imágenes. Todos estos factores pueden contribuir en la variabilidad de los resultados obtenidos. No obstante, la técnica FISH ha permitido obtener diferentes logros, como identificar las especies filamentosas presentes en las EDAR que dificultan el proceso de depuración, la diversidad de bacterias nitrificantes presentes, determinar la estabilidad de los flóculos, etc. (51). Por lo que FISH es una herramienta útil en la identificación de microorganismos presentes en los reactores biológicos de las EDAR. Y, aunque otras técnicas de biología molecular como la qPCR también permite identificar microorganismos de manera específica, no aporta datos sobre la morfología y la distribución espacial de los microorganismos, a diferencia de FISH (52).

8. CONCLUSIÓN

Las EDAR depuran el agua procedente de uso doméstico y de industrias, eliminando la materia orgánica, los nutrientes y posibles patógenos presentes, para cumplir con los valores legales permitidos y poder liberar el agua correctamente tratada al medio ambiente. No obstante, si se producen vertidos incontrolados compuestos por tóxicos o excesos de materia orgánica, la microbiota de las EDAR puede resultar dañada y no es capaz de ejercer su acción de forma correcta y descontaminar completamente el agua. El resultado puede ser la liberación de agua mal tratada al medio ambiente, generando una gran cantidad de problemas ambientales y de salud pública. Con la inoculación de una población bacteriana, previamente seleccionada acorde a un análisis histórico de la composición microbiana de cada EDAR, se puede revertir el daño generado en los reactores biológicos tras la llegada de un vertido incontrolado a la EDAR. Teniendo en cuenta que los vertidos incontrolados se suelen producir de manera estacional y coincidiendo con las campañas vinícolas y cítricas, esta inoculación bacteriana resulta en una solución efectiva a los daños producidos por los vertidos incontrolados. No obstante, es importante estudiar previamente que no se produzcan efectos de inhibición de las bacterias nitrificantes, dado que son los microorganismos más sensibles a cambios en el influente de agua y las condiciones del reactor.

Aunque la inoculación de una población bacteriana previamente diseñada es una solución efectiva para recuperar la microbiota de las EDAR, lo ideal sería evitar que la microbiota resulte dañada. Esto se podría conseguir mediante la creación de sistemas de detección de contaminantes o tóxicos en la entrada de las EDAR. De esta manera, se podría detectar la llegada de un vertido y actuar con antelación para que la microbiota no resulte dañada, evitando así los elevados costes que supone su recuperación y los problemas que se desencadenan por el tratamiento inadecuado de las aguas residuales.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Planta de Quart de Benáger. Global Omnium [Internet]. [cited 2021 Apr 11]. Available from: <https://www.globalomnium.com/Grupo/Nuestro-trabajo/Residuales/Plantas/>
2. Ferrer Polo J, Seco Torrecillas A, Robles Martínez Á. Tratamientos biológicos de aguas residuales. 3ª. València: Editorial Universitat Politècnica de València; 2018.
3. Gray NF. Biology of Wastewater Treatment. 2nd ed. Vol. 4. Dublin: Imperial College Press; 2004.
4. España. Ministerio de Obras Públicas; Transportes y Medio Ambiente. Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas. Boletín Oficial del Estado 1996 p. 12038–41.
5. Cogeneración. Global Omnium [Internet]. [cited 2021 Apr 11]. Available from: <https://www.globalomnium.com/Grupo/Nuestro-trabajo/Residuales/Cogeneración/>
6. Gray N. Biology of Wastewater Treatment. 2nd ed. University of Dublin, Ireland: Imperial College Press; 2004.
7. Spencer Davies P. The Biological Basis of Wastewater Treatment. 2005.
8. Nielsen PH, Daims H, Lemmer H. FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment: Identification and Quantification of Microorganisms in Activated Sludge and Biofilms by FISH. 2009. pp. 73–84.
9. Nielsen PH, Thomsen TR, Nielsen JL. Bacterial composition of activated sludge - Importance for floc and sludge properties. Vol. 49, Water Science and Technology. IWA Publishing; 2004. p. 51–8.
10. Henze M, van Loosdrecht MCM, Ekama GA, Brdjanovic D. Biological Wastewater Treatment: Principles, Modeling and Design. Biological Wastewater Treatment: Principles, Modeling and Design. London: IWA Publishing; 2008.
11. Wagner M, Loy A. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. Vol. 13, Current Opinion in Biotechnology. Elsevier Current Trends; 2002. p. 218–27.
12. Blackall LL, Seviour EM, Bradford D, Rossetti S, Tandoi V, Seviour RJ. “Candidatus Nostocoida limicola”, a filamentous bacterium from activated sludge. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2000;50(2):703–9.
13. Burger W, Krysiak-Baltyn K, Scales PJ, Martin GJO, Stickland AD, Gras SL. The influence of protruding filamentous bacteria on floc stability and solid-liquid separation in the activated sludge process. Water Research. 2017 Oct 15;123:578–85.
14. Gerardi MH. Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process. 1st ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2002.
15. Balku S. Comparison between alternating aerobic-anoxic and conventional activated sludge systems. Water Research. 2007 May 1;41(10):2220–8.

16. Seviour RJ, Mino T, Onuki M. The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. Vol. 27, FEMS Microbiology Reviews. Elsevier; 2003. p. 99–127.
17. Evans TN, Seviour RJ. Estimating Biodiversity of Fungi in Activated Sludge Communities Using Culture-Independent Methods. *Microbial Ecology*. 2012 May;63(4):773–86.
18. More TT, Yan S, Tyagi RD, Surampalli RY. Potential use of filamentous fungi for wastewater sludge treatment. Vol. 101, *Bioresource Technology*. Elsevier; 2010. p. 7691–700.
19. Assress HA, Selvarajan R, Nyoni H, Ntushelo K, Mamba BB, Msagati TAM. Diversity, Co-occurrence and Implications of Fungal Communities in Wastewater Treatment Plants. *Scientific Reports*. 2019 Dec 1;9(1):1–15.
20. Madoni P. Protozoa in wastewater treatment processes: A minireview. *Italian Journal of Zoology*. 2011 Mar 10;78(1):3–11.
21. Jornada internacional de tratamiento y reutilización en aguas residuales. Papel de los protistas [Internet]. Grupo Bioindicación Sevilla. 2008 [cited 2021 May 16]. Available from: <http://aulabioidicacion.com/2016/01/descarga-libre-documentacion-atlas-de-protistas-y-micrometazoos-presentes-en-fangos-activos/>
22. Marco Montolio C. “Estudio del estado del proceso de depuración de la EDAR de Cullera mediante técnicas de respirometría” Trabajo Final de Grado. Universitat Politècnica de València. 2010.
23. Sperling M von. *Wastewater Characteristics, Treatment and Disposal*. 1st ed. New York: IWA Publishing; 2007.
24. Mittal SK, Ratra RK. Toxic effect of metal ions on biochemical oxygen demand. *Water Research*. 2000 Jan 1;34(1):147–52.
25. Consejo de las Comunidades Europeas. Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de aguas residuales urbanas. *Diario Oficial nº L135 de 30.05.1991*. 21/05/1991 1991 p. 40–91.
26. Baeza Serrano Á, Tárrega MJ, Martínez Blanch JF, Rojas A, Tortajada M, Fayos G, et al. Microbiome analysis of the bacterial population in a bench-scale-activated sludge reactor exposed to an artificial insecticide spill. *WIT Transactions on Ecology and the Environment*. 2020;242:27–38.
27. Mosteo R, Ormad MP, Goñi P, Rodríguez-Chueca J, García A, Clavel A. Identification of pathogen bacteria and protozoa in treated urban wastewaters discharged in the Ebro River (Spain): Water reuse possibilities. *Water Science and Technology*. 2013;68(3):575–83.
28. González A, Bayas Morejón IF, Ferrús MA. Isolation, molecular identification and quinolone-susceptibility testing of *Arcobacter* spp. isolated from fresh vegetables in Spain. *Food Microbiology*. 2017 Aug 1;65:279–83.
29. Hausdorf L, Neumann M, Bergmann I, Sobiella K, Mundt K, Fröhling A, et al. Occurrence and genetic diversity of *Arcobacter* spp. in a spinach-processing plant and evaluation of two *Arcobacter*-specific quantitative PCR assays. *Systematic and Applied Microbiology*. 2013 Jun 1;36(4):235–43.
30. González A, Botella S, Montes RM, Moreno Y, Ferrús MA. Direct detection and identification of *Arcobacter* species by multiplex PCR in chicken and wastewater samples from Spain. *Journal of Food Protection*. 2007;70(2):341–7.

31. UE. Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial De Las Comunidades Europeas 2000 p. 1–73.
32. Pernthaler A, Pernthaler J. Fluorescence in situ hybridization for the identification of environmental microbes. *Methods in Molecular Biology*. 2007 Jan 11;353:153–64.
33. Golfe R, Baeza Á, Tárrega MJ, Fayos G, Fajardo V, Zorrila F. Software para la cuantificación microbiológica del fango activo a partir del análisis de imagen. *TecnoAqua*. 2014;8:64–71.
34. Nowak O, Schweighofer P, Svoldal K. Nitrification inhibition - A method for the estimation of actual maximum autotrophic growth rates in activated sludge systems. *Water Science and Technology*. 1994 Sep 1;30(6 pt 6):9–19.
35. Saunders AM, Albertsen M, Vollertsen J, Nielsen PH. The activated sludge ecosystem contains a core community of abundant organisms. *ISME Journal*. 2016 Jan 1;10(1):11–20.
36. Petlane M. Nitrification Inhibition Assessment of Industrial Effluents and Influent to Amanzimtoti Wastewater Treatment Plant. 2005.
37. Aspelin V, Ekholm J. Inhibition of Nitrification in Industrial Wastewater. 2017.
38. Meerbergen K, van Geel M, Waud M, Willems KA, Dewil R, van Impe J, et al. Assessing the composition of microbial communities in textile wastewater treatment plants in comparison with municipal wastewater treatment plants. *MicrobiologyOpen*. 2017 Feb 1;6(1):413.
39. Li HB, Cao HB, Li YP, Zhang Y, Liu HR. Effect of organic compounds on nitrite accumulation during the nitrification process for coking wastewater. *Water Science and Technology*. 2010 Nov 1;62(9):2096–105.
40. Sanchis M, Martin-Vicente A, Capilla J, Guarro J. Antifungal therapies in murine infections by *Candida kefyr*. *Mycoses*. 2016 Apr 1;59(4):253–8.
41. Graça AP, Bondoso J, Gaspar H, Xavier JR, Monteiro MC, de La Cruz M, et al. Antimicrobial activity of heterotrophic bacterial communities from the marine sponge *Erylus discophorus* (Astrophorida, Geodiidae). *PLoS ONE*. 2013 Nov 13;8(11):78992.
42. Feliatra F, Effendi I, Yanti SL. Characteristic genetics of heterotrophic bacteria in siak river estuary, riau province, Indonesia as prospective anti-pathogenic bacteria to fish and shrimps. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2018 Dec 1;12(4):1801–8.
43. Nursyirwani N, Feliatra F, Yoswaty D, Dinata RL. Activity of heterotrophic bacteria from marine area of Siak District against pathogenic bacteria. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci*. 2018;216:12047.
44. Long RA, Azam F. Antagonistic Interactions among Marine Pelagic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67(11):4975–83.
45. Abinandan S, Subashchandrabose SR, Venkateswarlu K, Megharaj M. Microalgae–bacteria biofilms: a sustainable synergistic approach in remediation of acid mine drainage. Vol. 102, *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer Verlag; 2018. p. 1131–44.
46. Dolinšek J, Lagkouvardos I, Wanek W, Wagner M, Daims H. Interactions of nitrifying bacteria and heterotrophs: Identification of a *Micavibrio*-like putative predator of *Nitrospira* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013;79(6):2027–37.

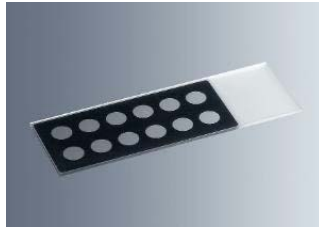
47. Feichtmayer J, Deng L, Griebler C. Antagonistic microbial interactions: Contributions and potential applications for controlling pathogens in the aquatic systems. Vol. 8, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2017. p. 2192.
48. Ponnusamy D, Kozlova E v., Sha J, Erova TE, Azar SR, Fitts EC, et al. Cross-talk among flesh-eating *Aeromonas hydrophila* strains in mixed infection leading to necrotizing fasciitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016 Jan 19;113(3):722–7.
49. Hegde S, Hegde S, Spargser J, Brunthaler R, Rosengarten R, Chopra-Dewasthaly R. In vitro and in vivo cell invasion and systemic spreading of *Mycoplasma agalactiae* in the sheep infection model. *International Journal of Medical Microbiology*. 2014 Nov 1;304(8):1024–31.
50. Rodríguez Martínez RR, Suescún Otero G. Aplicaciones e inconvenientes de la técnica Hibridación in situ Fluorescente (FISH) en la identificación de microorganismos. *Salud Uninorte*. 2013;29(2):327–40.
51. Mesquita DP, Amaral AL, Ferreira EC. Activated sludge characterization through microscopy: A review on quantitative image analysis and chemometric techniques. *Analytica Chimica Acta*. 2013 Nov 13;802:14–28.
52. Amann R, Fuchs BM, Behrens S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology*. 2001 Jun 1;12(3):231–6.

10. AUTOEVALUACIÓN

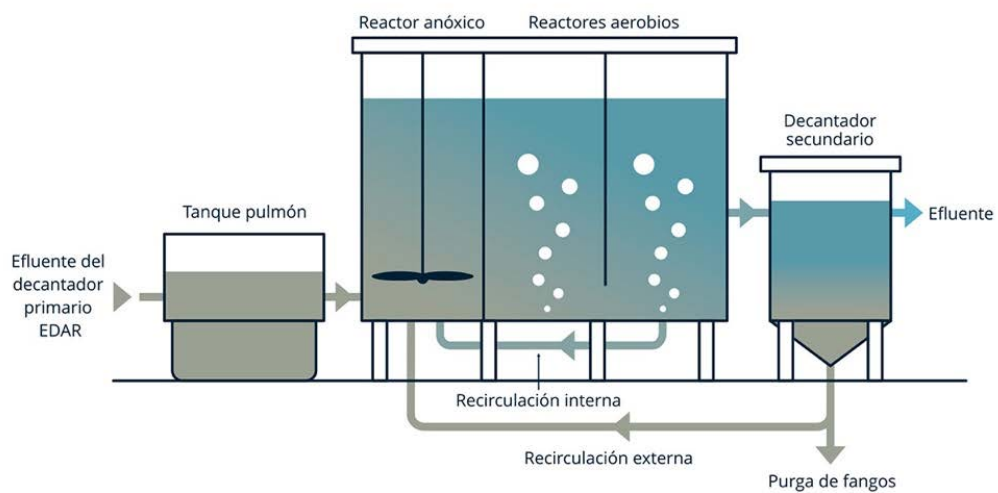
Las prácticas extracurriculares realizadas en la EDAR Quart-Benager me han permitido poner en práctica y ampliar los conocimientos teóricos y prácticos adquiridos durante los cinco años de estudios universitarios. He podido llevar a cabo técnicas de biología molecular como FISH, aprender a visualizar las muestras mediante un microscopio de epifluorescencia y capturar imágenes adecuadas mediante una cámara acoplada al microscopio, para poderlas cuantificar mediante un *software* de análisis de imagen. Mediante la realización de estas prácticas he adquirido mucha confianza para trabajar de forma autónoma en el laboratorio, así como he desarrollado mucha destreza en el trabajo del laboratorio, siempre guiada por los profesionales de la empresa. También he aprendido la importancia de seguir las metodologías de trabajo, de trabajar con precisión y con mucho cuidado, ya que en la técnica FISH las sondas de oligonucleótidos utilizadas son muy sensibles a la luz y requieren que se trabaje en la oscuridad. Además, en esta técnica se manejan volúmenes muy pequeños, por lo que hay que ser muy preciso. También he aprendido a analizar las imágenes procesadas por el *software* de análisis de imagen para identificar posibles resultados falsos positivos. Por otra parte, poder participar en un proyecto de investigación, como *Bactiwater*, me ha permitido conocer la dinámica que sigue un proyecto de investigación y las exigencias que conlleva. También he podido comprobar la importancia del departamento de I+D+i en las empresas que, en este caso, permite identificar y solucionar problemas reales relacionados con la depuración del agua.

Estoy muy agradecida por la oportunidad de realizar las prácticas la EDAR Quart-Benager y por toda la ayuda recibida por los profesionales de esta empresa. Valoro muy positivamente el poder haber participado de alguna manera en el proyecto de investigación de *Bactiwater* y poder utilizar la estancia de prácticas para la redacción de este trabajo de final de grado. Considero que esta estancia me ha enriquecido tanto a nivel profesional como personal y me ha permitido conocer la gran importancia de la microbiología en la depuración del agua.

11. ANEXOS



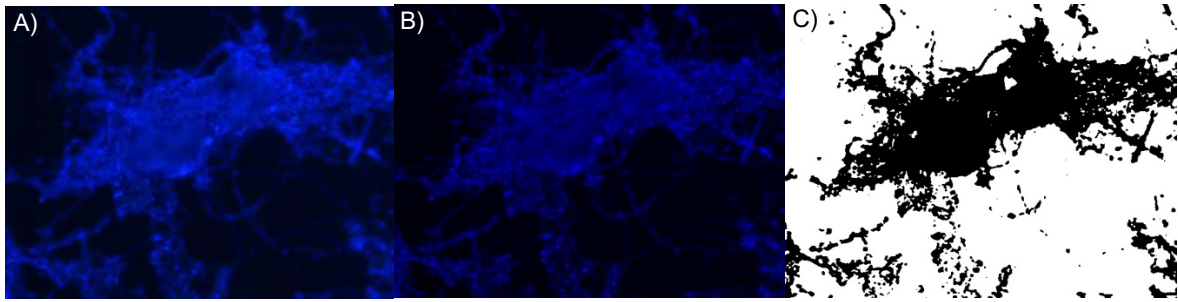
Anexo 1. Portaobjetos utilizado en la técnica FISH para la hibridación de las muestras con las sondas de ácidos nucleicos.



Anexo 2. Esquema de la planta piloto de la EDAR Quart-Benager (Valencia) creada para el proyecto *Bactiwater*.

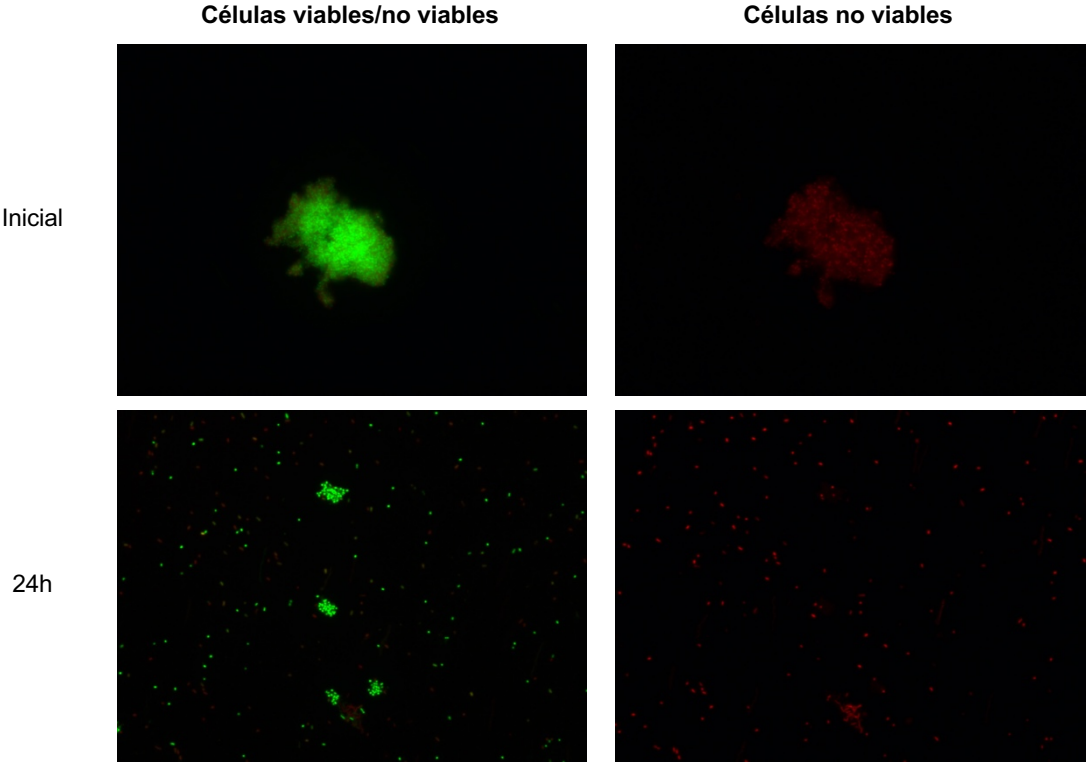


Anexo 3. Imagen real de la planta piloto de de la EDAR Quart-Benager (Valencia) construida para el proyecto *Bactiwater*.

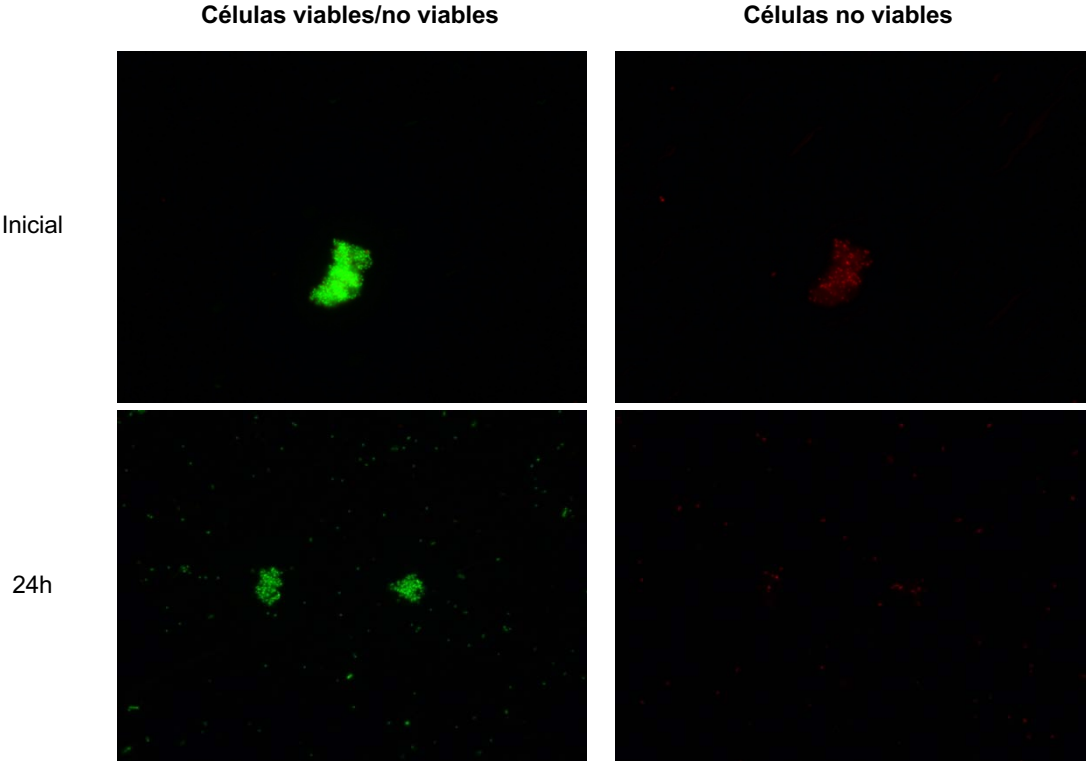


Anexo 4. Tratamiento automatizado mediante el *software* ImageCAI de las imágenes capturadas mediante la cámara acoplada al microscopio de epifluorescencia. A) imagen sin procesar, B) imagen deconvolucionada y C) imagen binarizada.

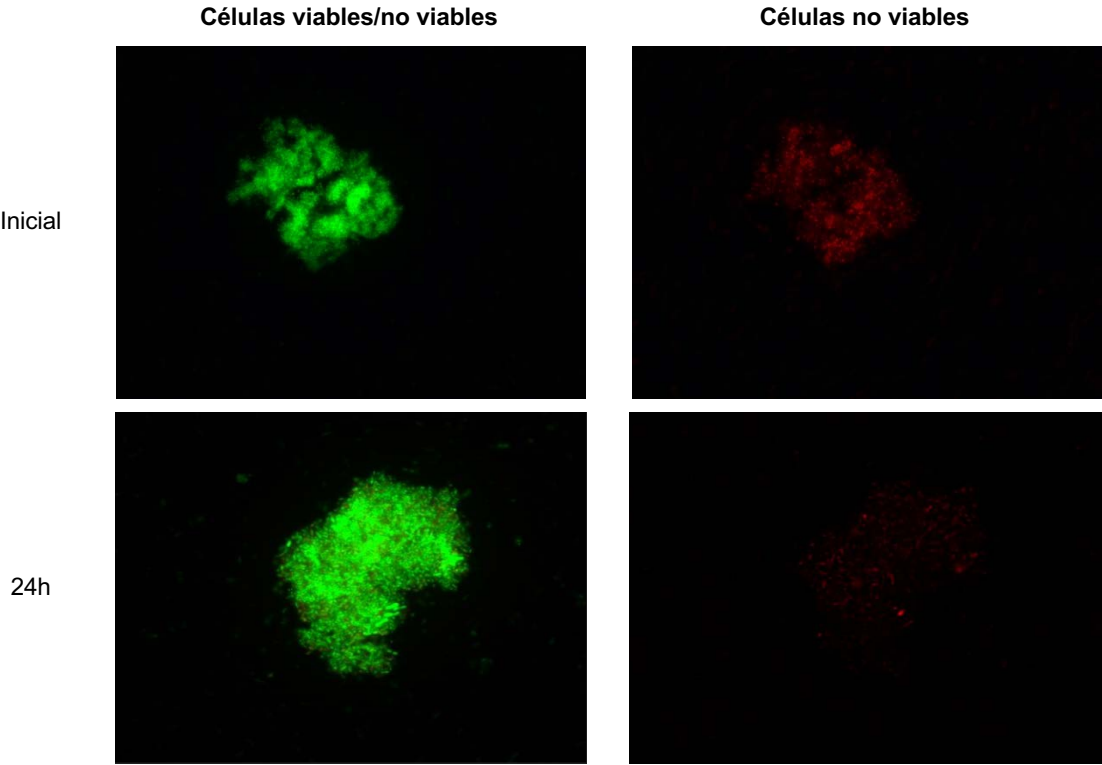
Anexo 5. Activación inóculo. Ejemplar de imágenes capturadas de la muestra de inóculo bacteriano de concentración 17 g/L donde se estudia la viabilidad celular.



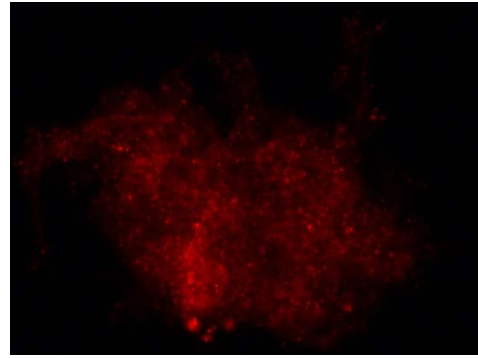
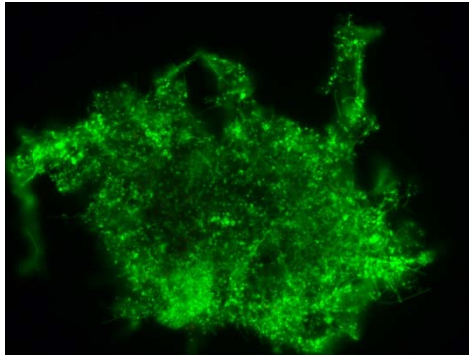
Anexo 6. Activación inóculo. Ejemplar de imágenes capturadas de la muestra de inóculo bacteriano de concentración 8,5 g/L donde se estudia la viabilidad celular.



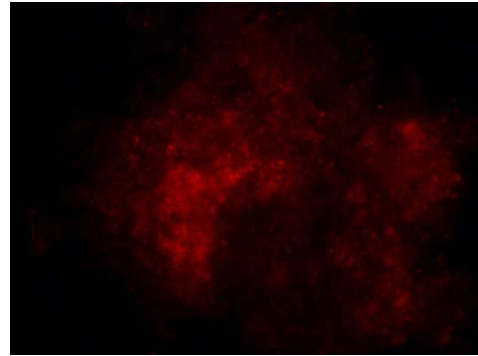
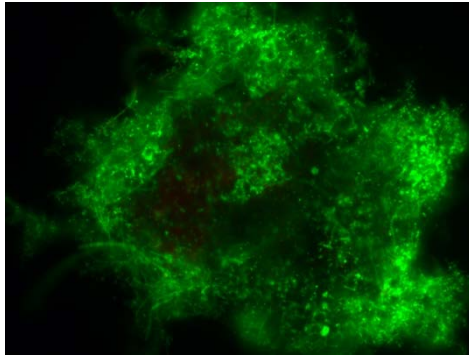
Anexo 7. Activación inóculo. Ejemplar de imágenes capturadas de la muestra de inóculo bacteriano de concentración 3,4 g/L donde se estudia la viabilidad celular.



48h.
8,8mL



48h.
180mL

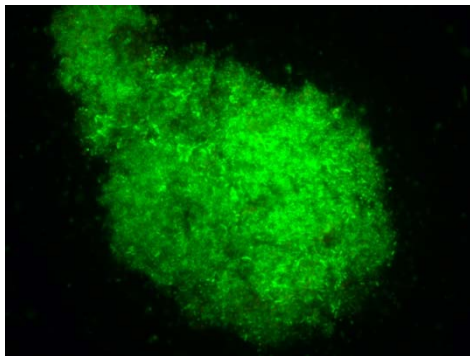


Anexo 8. Activación inóculo. Ejemplar de imágenes capturadas de la muestra de inóculo bacteriano de concentración 3,4 g/L más adición de micronutrientes donde se estudia la viabilidad celular.

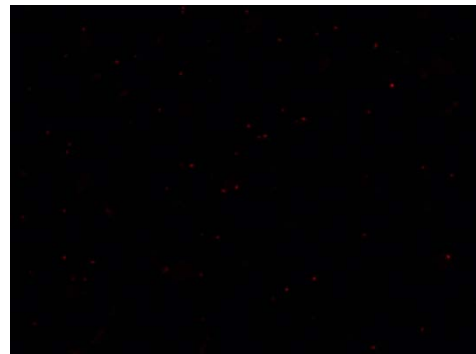
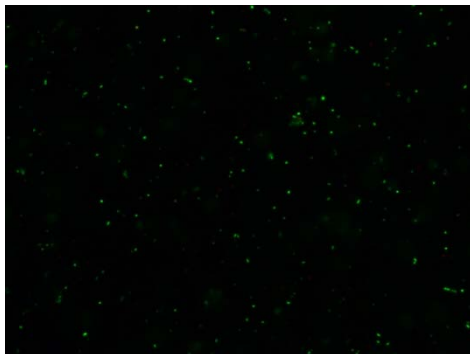
Células viables/no viables

Células no viables

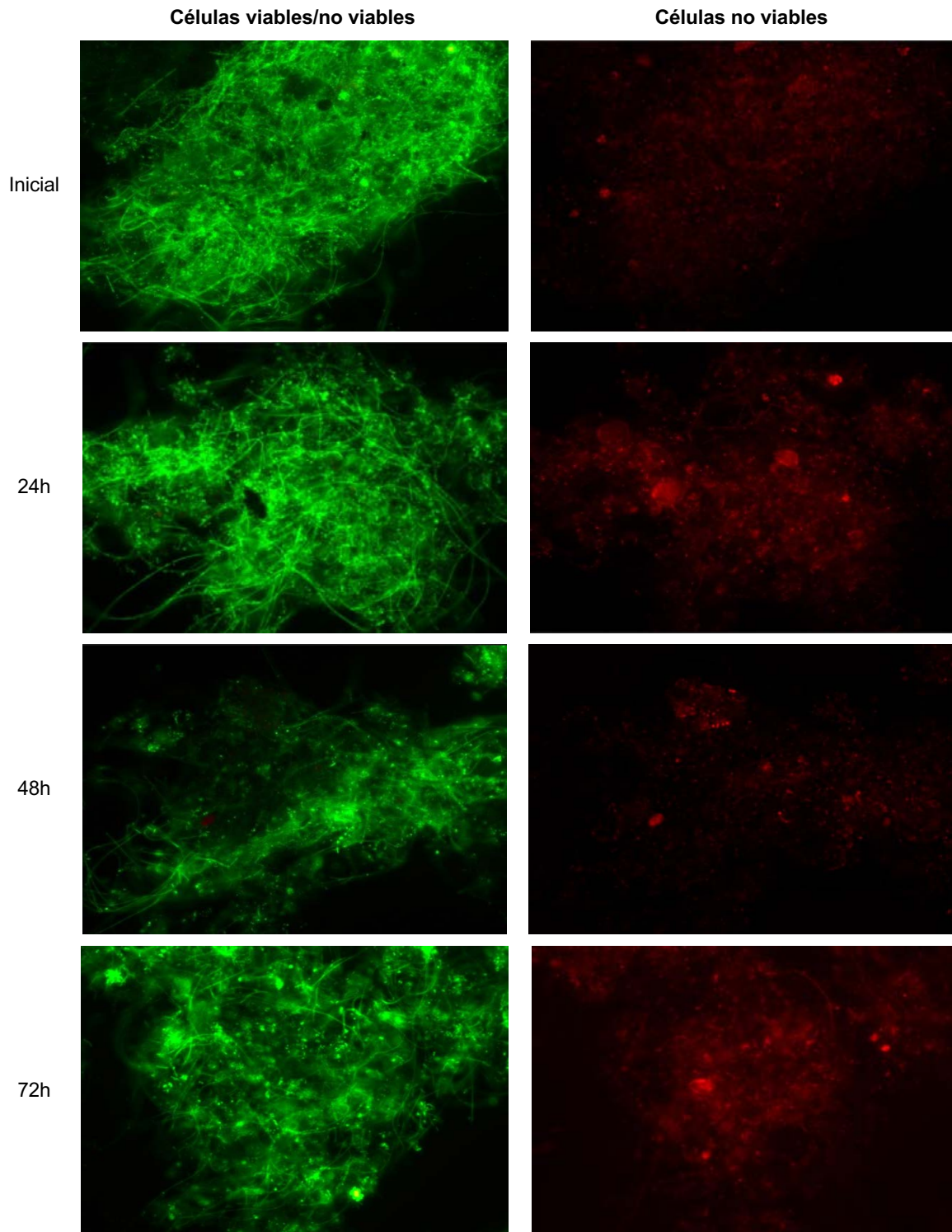
Inicial



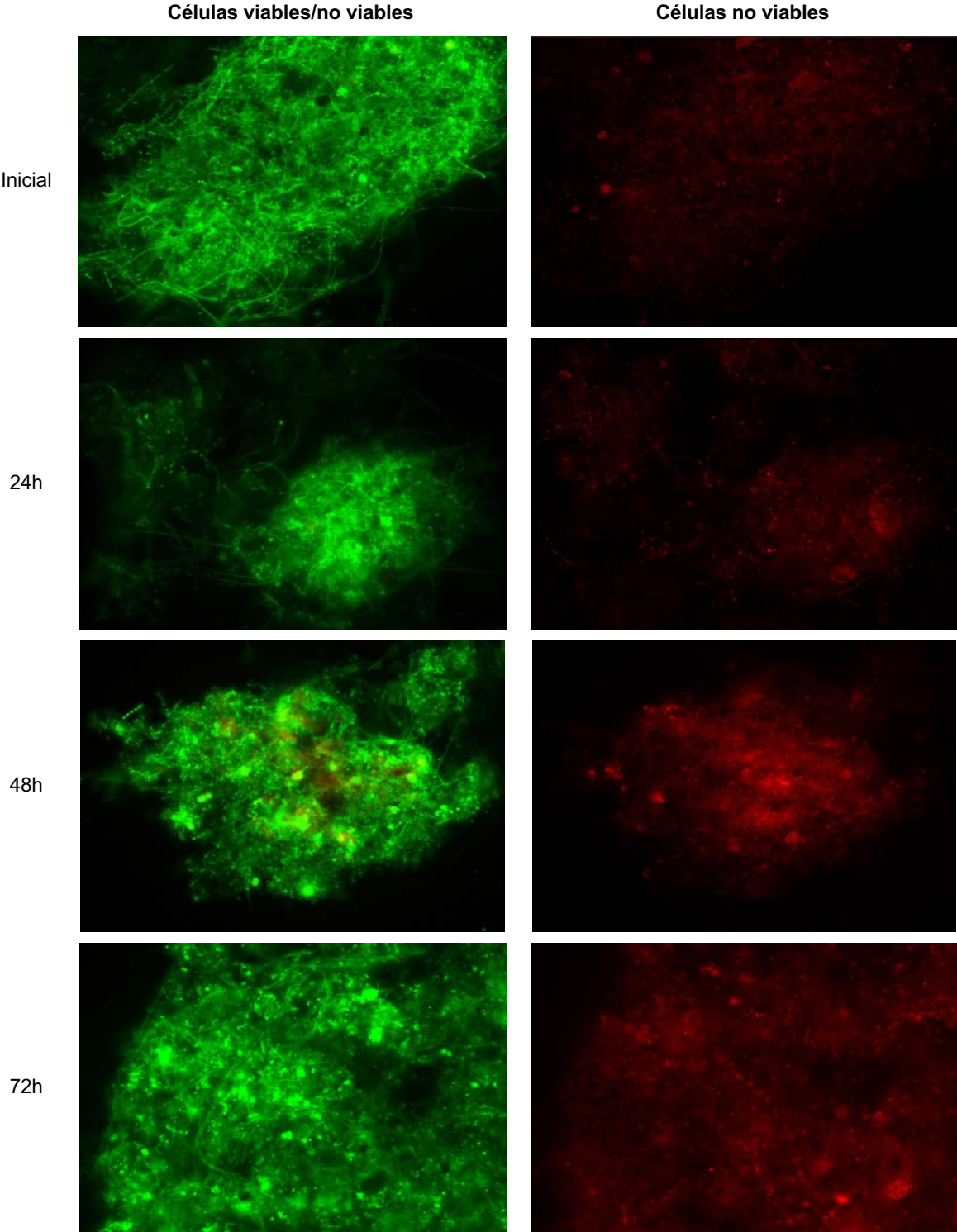
72h



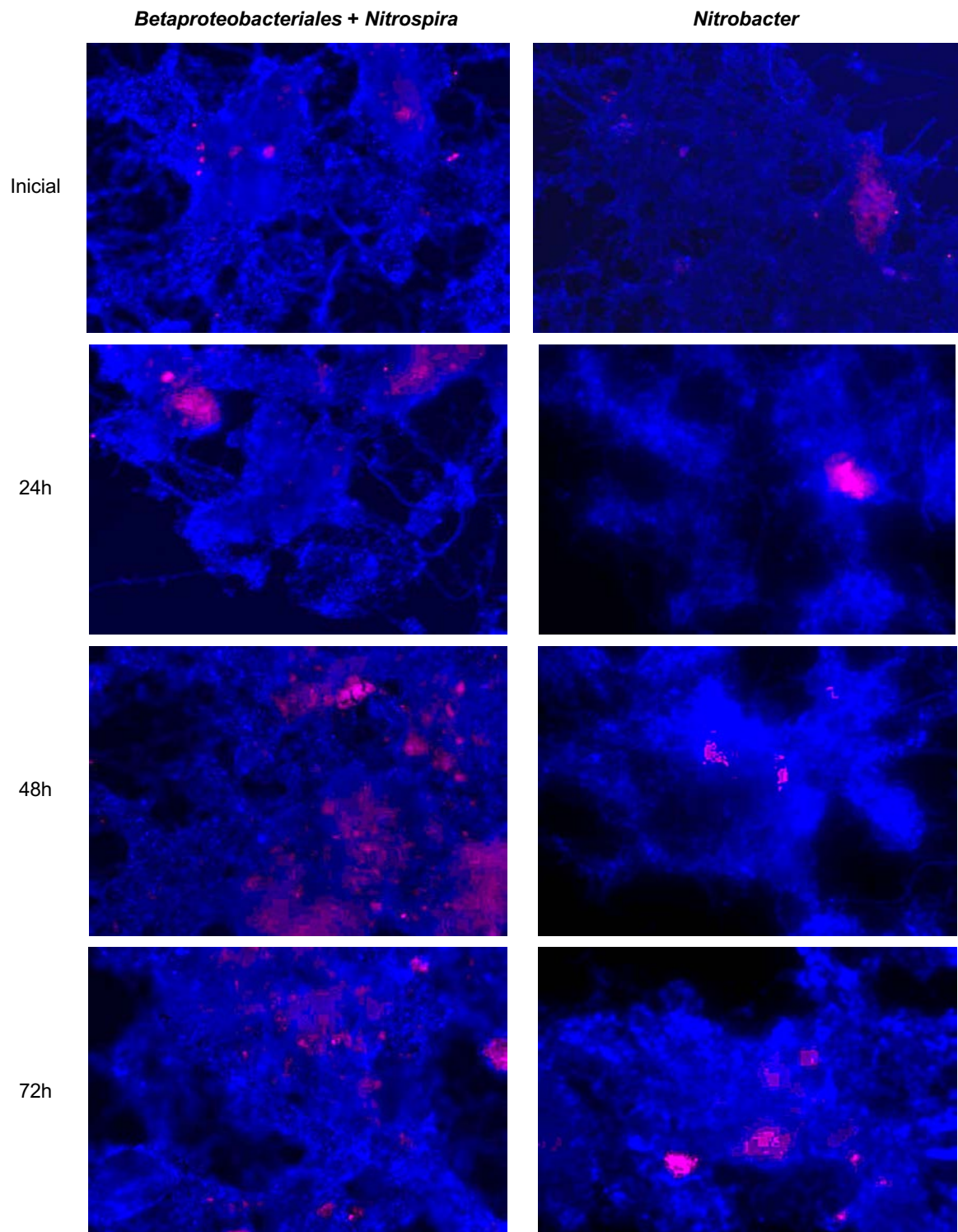
Anexo 9. Ejemplar de imágenes capturadas de la muestra de licor mezcla del reactor A inicial, a las 24h, 48h y 72h tras la adición del vertido, donde se estudia la viabilidad celular.



Anexo 10. Ejemplar de imágenes capturadas de la muestra de licor mezcla del reactor B inicial, a las 24h, 48h y 72h tras la adición del vertido y del inóculo bacteriano, donde se estudia la viabilidad celular.



Anexo 11. Ejemplar de imágenes capturadas de la muestra de licor mezcla del reactor A inicial, a las 24h, 48h y 72h donde se estudia la presencia de bacterias nitrificantes (clase *Betaproteobacteriales* y géneros *Nitrospira* y *Nitrobacter*).



Anexo 12. Ejemplar de imágenes capturadas de la muestra de licor mezcla del reactor B inicial, a las 24h, 48h y 72h donde se estudia la presencia de bacterias nitrificantes (clase *Betaproteobacteriales* y géneros *Nitrospira* y *Nitrobacter*).

