

## ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS PROCESOS DE DEPURACIÓN Y DE DESINFECCIÓN SOBRE LA MICROBIOTA EN LA EDAR DE ABANILLA, MEDIANTE TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS - NEXT GENERATION SEQUENCING).

**Pedro J. Simón Andreu**, Director técnico de la Entidad Regional de Saneamiento y Depuración de Aguas Residuales de Murcia (ESAMUR)

**Carlos Lardín Mifsut**, Técnico de Explotación de la Entidad Regional de Saneamiento y Depuración de Aguas Residuales de Murcia (ESAMUR)

**Antonio Camacho González**, Catedrático de Ecología, Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universitat de València

**Antonio Picazo Mozo**, Investigador, Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universitat de València

**Antonio V. Sánchez Betrán**, Director Técnico, RED CONTROL S.L.

**José Alfredo López**, Jefe planta EDAR Abanilla, RED CONTROL S.L.

### Resumen

Se ha estudiado la eficiencia de eliminación en los procesos de depuración de los géneros bacterianos potencialmente patógenos más relevantes en la EDAR de Abanilla (Murcia). La eficiencia en la eliminación de estos géneros potencialmente patógenos se ha estudiado mediante métodos de secuenciación masiva de nueva generación (NGS) de la región V4 del gen ribosómico (16S). Para el proceso global de depuración se observó una eficiencia muy alta en la reducción de géneros bacterianos que incluyen potenciales patógenos o indicadores bacterianos de contaminación fecal, tales como *Aeromonas*, *Arcobacter*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia/Shigella*, *Faecalibacterium*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Yersinia*, y diversos géneros de la familia Enterobacteriaceae y grupos de Clostridios. Aunque estos altos rendimientos de eliminación se lograron ya desde el decantador tras el tratamiento biológico, los posteriores procesos de desinfección (hipoclorito y ultravioleta) y el tiempo que el efluente permanece en una balsa de riego junto a la EDAR, también contribuyeron a que los rendimientos de eliminación de los microorganismos de los géneros con potenciales patógenos bacterianos lleguen a ser superiores al 99%.

### Abstract

The elimination efficiency in the purification processes of the most relevant potentially pathogenic bacterial genera has been studied in the EDAR of Abanilla (Murcia). The removal efficiency of these potentially pathogenic genera has been studied using New Generation Massive Sequencing (NGS) methods based on the V4 region of the ribosomal gene (16S). For the global purification process, a very high efficiency was observed in the reduction of bacterial genera that include potential pathogens or bacterial indicators of faecal contamination, such as *Aeromonas*, *Arcobacter*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia / Shigella*, *Faecalibacterium*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Yersinia*, and several genera of the Enterobacteriaceae family and groups of Clostridia. Although these high removal yields were already achieved from the sedimentation tank located after the biological treatment, the subsequent disinfection processes (hypochlorite and UV-radiation), together with the time that the effluent remains in an irrigation pond next to the WWTP, also contribute to the fact that the yields of elimination of microorganisms from genera with potential bacterial pathogens exceed 99%.

### INTRODUCCIÓN

El tratamiento de aguas residuales para su reutilización requiere la reducción de las bacterias, potencialmente patógenas o no, asociadas a este tipo de aguas. Esta reducción debe de llevarse a cabo hasta dejarlos en niveles de abundancia que no supongan un riesgo significativo para la salud humana.

Ya desde hace mucho tiempo (p.ej. Rudolfs et al., 1950), se han desarrollado tratamientos avanzados de aguas, incluyendo diferentes tipos de procesos de desinfección, para obtener reducciones de cargas bacterianas hasta niveles aceptables, plasmados a menudo en la legislación, para su reutilización, teniendo en cuenta los posibles usos del agua tratada.

Para evaluar el tratamiento de estas aguas residuales por parte de las EDARs es importante información sobre la evolución de la abundancia, total y relativa, de las bacterias presentes en las aguas residuales no tratadas, pudiendo determinarse el grado de eliminación de estos microorganismos en el tratamiento (Reinoso et al., 2008; Fu et al., 2010; Oluseyi Osunmakinde et al., 2018). Los microorganismos son los principales responsables de la conversión y la descomposición de los compuestos orgánicos y contaminantes en los sistemas de depuración diseñados para el tratamiento del agua residual. Estos microorganismos se organizan en comunidades complejas, con diferentes funciones metabólicas, y van reemplazando en el proceso de depuración a los microorganismos del agua residual influente, incluyendo aquellos potencialmente patógenos. La caracterización detallada de todas estas comunidades y su clasificación es de gran utilidad para vigilar la respuesta del sistema de depuración a los cambios operacionales, así como para el desarrollo y optimización de los parámetros para conseguir las condiciones más favorables. Hasta hace poco, sólo una fracción de la diversidad microbiana podía ser evaluada, limitada por la tecnología disponible, que no era la adecuada para una implementación de alto rendimiento. Con la introducción de la secuenciación masiva de nueva generación (NGS - Next Generation Sequencing) se ha producido un gran avance permitiendo a los investigadores generar grandes cantidades de datos filogenéticos en poco tiempo (Tan et al., 2015; Sanz & Köchling, 2019).

Utilizando las técnicas de secuenciación masiva es posible perfilar e investigar la evolución dentro de los sistemas de depuración de las comunidades microbianas, secuenciando un gen marcador de elección, siendo el más utilizado el que codifica para el ARNr 16S.

En estos estudios, el análisis metagenómico se realiza agrupando la asignación taxonómica en niveles taxonómicos con una equivalencia aproximada al nivel de especie (normalmente OTUs o ZOTUs), para así poder conocer en detalle los cambios en la estructura de las comunidades bacterianas (Zhang et al., 2012). Este tipo de enfoques moleculares para estudiar la diversidad bacteriana que no necesitan de técnicas de cultivo microbiológico han demostrado que la mayoría de los organismos modelo sugeridos históricamente son de menor importancia *"in situ"* respecto a lo que se podría esperar, y que otros microorganismos (Degnan & Ochman, 2012), a menudo aún no cultivables, son responsables de la mayoría de los procesos clave en las EDAR (Wagner & Loy, 2002).

La secuenciación de alto rendimiento dirigida a regiones conservadas en genomas microbianos se considera en la actualidad como el método más fiable y rentable de análisis de composición de especies de muestras ambientales (Vanwonterghem et al., 2014; Ju & Zhang et al., 2019).

La abundancia de microorganismos potencialmente patógenos en la entrada de las EDARs es relativamente grande. En principio, en los diferentes procesos de la depuración estos microorganismos deberían ir disminuyendo su relevancia, tanto en abundancia absoluta como en abundancia relativa, respecto al resto de la comunidad microbiana (Zhang et al., 2019). En el proceso de depuración gran parte de los microorganismos se retiran del agua en el proceso de tratamiento biológico, aunque son los procesos posteriores de desinfección los que tratan de reducir hasta niveles tolerables la abundancia de los microorganismos potencialmente patógenos (Gerardi & Zimmerman, 2005; Gerardi, 2006), incluidos los que causan diferentes tipos de enfermedades como el cólera, la poliomielitis, la fiebre tifoidea, la hepatitis y otras enfermedades bacterianas, virales y parasitarias (Argoti et al., 2016).

La desinfección es un proceso en el que un porcentaje significativo de organismos patógenos (y no patógenos) se destruyen o se inactivan (Kuo, 2017). Hay una serie de productos químicos y procesos que se utilizan habitualmente en estaciones de aguas residuales (EDARs) para la desinfección de estas aguas, pero ninguno es de aplicación universal. Los procesos de tratamiento aeróbico reducen la abundancia de patógenos, pero no lo suficiente como para calificarlos como procesos de desinfección. La cloración ha sido, históricamente, la tecnología de desinfección más utilizada. La ozonización y la luz ultravioleta (UV) son tecnologías que en las últimas décadas han ido tomando bastante protagonismo. El uso secuencial de la cloración y la radiación ultravioleta ha sido empleado comúnmente para conseguir mayores rendimientos en el proceso de desinfección (Wang et al., 2011).

Con el fin de estudiar la eficacia de los procesos de depuración y desinfección, en este estudio se describe la reducción de los géneros bacterianos potencialmente patógenos más relevantes en las aguas de entrada a la EDAR de Abanilla. La eficiencia en la eliminación de estos géneros potencialmente patógenos de la EDAR se ha realizado por secuenciación masiva de nueva generación (NGS) de la región V4 del gen ribosómico (16S) que ha demostrado ser una herramienta con un nivel de sensibilidad y resolución mayor que las técnicas clásicas en este tipo de estudios.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Área de estudio

La EDAR de Abanilla está situada en la provincia de Murcia, en el municipio que le da nombre (Figura 1). La EDAR, diseñada para una población de 6.651 habitantes, presenta un caudal de entrada de 571.080 m<sup>3</sup>/año, con una carga de diseño de 17.540 h.e. Se encuentra situada a aproximadamente un kilómetro de la población y dispone de un pretratamiento con desbaste mediante cuchara bivalva y reja automática, tamizado y desarenado-desengrasado, pero sin decantación primaria. El tratamiento biológico se realiza en un reactor tipo carrusel aireado con dos oxirrotres controlados de forma automática mediante el control del potencial redox. El agua allí tratada pasa a dos decantadores circulares troncocónicos, dotados de carro-puente móvil. El tratamiento terciario se realiza mediante dos filtros de arena abiertos, y la desinfección del efluente se realiza por dos sistemas el primero con hipoclorito y el segundo con radiación ultravioleta (Simón Andreu et al., 2015). Con posterioridad a la realización de este estudio, la desinfección del efluente se amplió instalando una planta de generación de ozono, la cual está operativa en este momento. El tratamiento de los lodos consiste en espesamiento y deshidratación mecánica mediante dos decantadores centrífugos. El efluente tratado es vertido a una balsa de acumulación para su posterior reutilización para riego agrícola.



**Figura-1:** Vista general de la EDAR Abanilla y de la balsa de acumulación de agua tratada para riego (derecha)

#### Toma, conservación, y transporte de muestras

Es necesario un cuidadoso protocolo para la toma, conservación y transporte de las muestras. Todo el instrumental que se utilizó en la toma de muestras fue previamente lavado, con ácido diluido y agua bidestilada, para evitar que pudiera alterar las muestras y las muestras se conservaron en contenedores isotermos refrigerados hasta llegar al laboratorio. Todas las muestras se tomaron por triplicado, parte de las muestras, las tomadas para determinados análisis físico-químicos, se filtraron o fijaron *in situ* y otras se procesaron nada más llegar al laboratorio. Los diversos protocolos utilizados para el muestreo se encuentran detallados en Andreu y Camacho (2002). Las muestras de agua que llegaban al laboratorio se procesaron y separaron, si era necesario, en submuestras. Los análisis que no fue necesario realizar inmediatamente se fijaron y conservaron en cámara refrigerada a 4° C, o bien, cuando procedía, las muestras se congelaron a -20°C o -80°C.

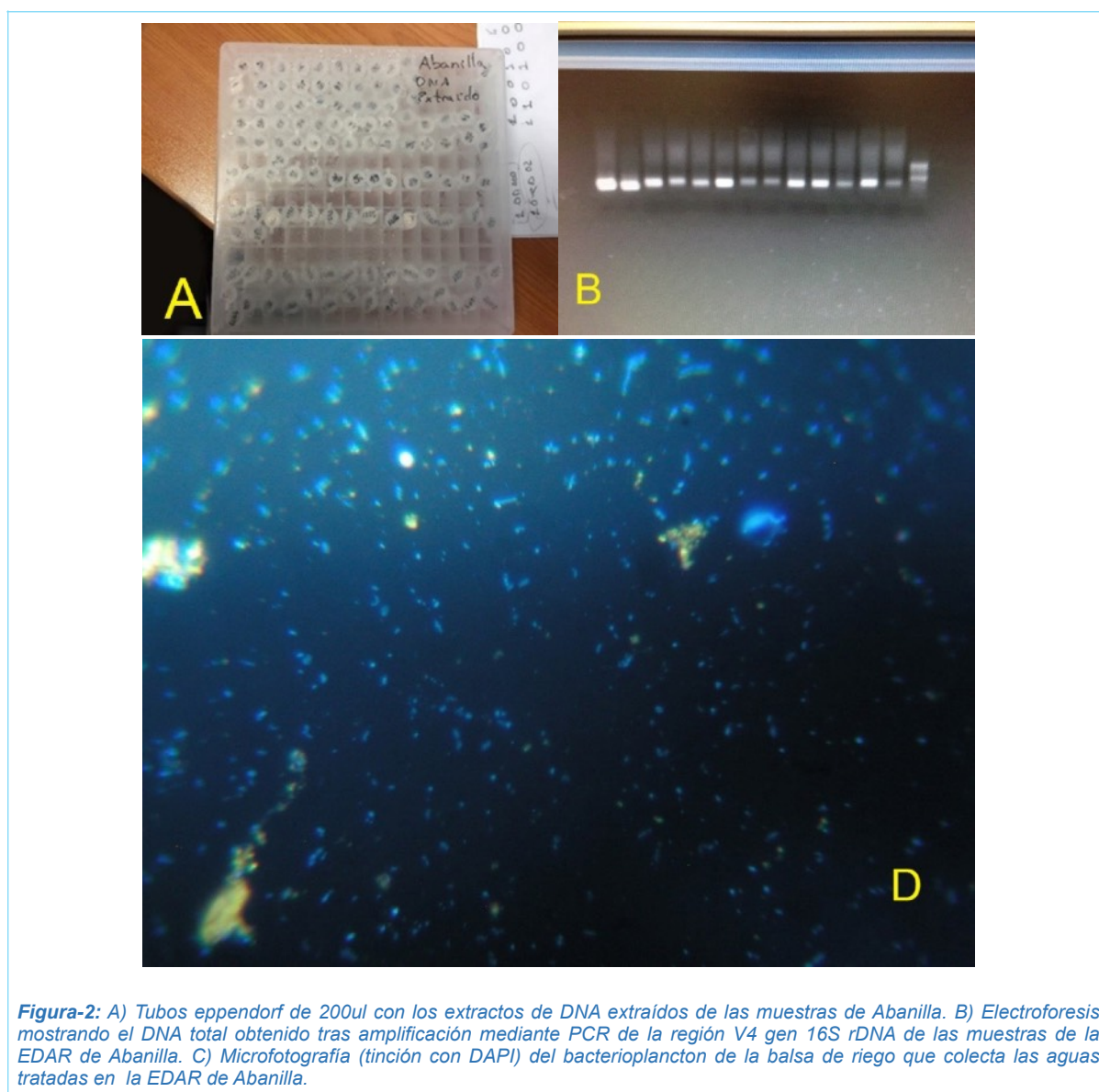
#### Cuantificación de la abundancia bacteriana y su actividad

La identificación por citometría de flujo de la abundancia de bacterias totales y de la actividad bacteriana se realizó sobre las muestras fijadas “*in situ*” con una solución de *paraformaldehído:glutaraldehído* a una concentración final en la muestra del 1%: 0,05% (p/v), respectivamente (Marie et al. 1997). Para el recuento de la abundancia bacteriana total se utilizó un citómetro de flujo Coulter Cytomics FC500 equipado con un láser de argón (excitación 488), un diodo de emisión rojo (excitación 635) y cinco filtros para emisión fluorescente (FL1-FL5). La enumeración de la abundancia de bacterias totales se realizó tras una 1 hora de tinción SybrGreen-I (1X) en oscuridad; la discriminación fue por fluorescencia en el canal FL1 (Veldhuis & Kraay, 2000). En el análisis de datos se discriminaron dos subgrupos de actividad del total de bacterias heterótrofas, uno con bajo contenido en DNA (LDNA) y otro con alto contenido en DNA (HDNA).

#### Estudio metagenómico de la comunidad bacteriana

Las muestras de agua para el estudio metagenómico por NGS se recogieron por triplicado en cada uno de los puntos de muestreo, utilizando envases estériles. Ya en el laboratorio fueron inmediatamente filtradas (entre 200 y 500 ml) a través de filtros de polycarbonato de 0,2 µm (Whatman PC 47 mm), recogiendo toda la fracción sestónica del agua. Una vez realizado el filtrado, los filtros se conservaron a una temperatura de -20°C hasta que se procedió a la extracción del ADN (Figura 2). La extracción del ADN de cada filtro se realizó siguiendo las instrucciones del kit comercial de extracción “Ezra Soil DNA isolation kit”. Brevemente, los filtros se sometieron a la acción de diferentes reactivos químicos y enzimáticos, con el objetivo de romper las células microbianas para liberar su ADN. Posteriormente el ADN fue purificado usando una matriz HiBind capaz de retener selectivamente ADN en mini columnas. Una vez extraído y purificado, el ADN se cuantificó y se secuenció la región V4 del gen que codifica para la subunidad 16S del RNA ribosómico (16SrDNA). La secuenciación se llevó a cabo mediante la plataforma NGS Illumina MiSeq 2x250 bp, lo que generó para cada uno de los extractos de ADN una secuencia directa y una inversa de la región V4 del citado gen 16S rDNA, presente en todas las bacterias y arqueas, y que es filogenéticamente informativo.





**Figura-2:** A) Tubos eppendorf de 200ul con los extractos de DNA extraídos de las muestras de Abanilla. B) Electroforesis mostrando el DNA total obtenido tras amplificación mediante PCR de la región V4 gen 16S rDNA de las muestras de la EDAR de Abanilla. C) Microfotografía (tinción con DAPI) del bacterioplancton de la balsa de riego que colecta las aguas tratadas en la EDAR de Abanilla.

## Análisis bioinformático

El análisis bioinformático de las secuencias recibidas se realizó mediante programas originales escritos en lenguaje Python o R. Con el programa UPARSE (usearch, Edgar, 2013), se unieron las secuencias directa e inversa, de cada uno de los extractos, en una única secuencia de 250 pb. Se filtraron por calidad, de forma que se eliminaron las secuencias que tenían errores de secuenciación o que se habían fusionado incorrectamente (quimeras), para finalmente agrupar las secuencias en unidades taxonómicas operativas ("Zero-radius Operational Taxonomic Units", ZOTUs), que son similares a las tradicionales "OTUs" pero con la restricción añadida de que las secuencias que forman parte de esa unidad taxonómica tienen que compartir el 100% de la identidad en su código, añadiendo un mayor robustez al análisis taxonómico posterior. Posteriormente, con el programa SINA (Pruesse et al., 2012), se alineó cada uno de estas ZOTUs con secuencias de la base de datos RDP (versión 11.5), de modo que se obtuvo la filogenia de cada uno de las ZOTUs a diferentes niveles taxonómicos (phylum, clase, orden, familia, y género). Una vez obtenidas las abundancias de cada ZOTU en cada punto de muestreo, y su filogenia, se procedió a la eliminación de los alineamientos con valores de coincidencia menores del 90% en la base de datos de RDP, y además se eliminaron las secuencias pertenecientes a mitocondrias y cloroplastos. A partir de la asignación taxonómica de cada muestra y con la base de datos de referencia PATRIC (Gillespie et al., 2011), se seleccionaron y cuantificaron las abundancias de los principales géneros con especies potencialmente patógenas para humanos presentes en cada muestra.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

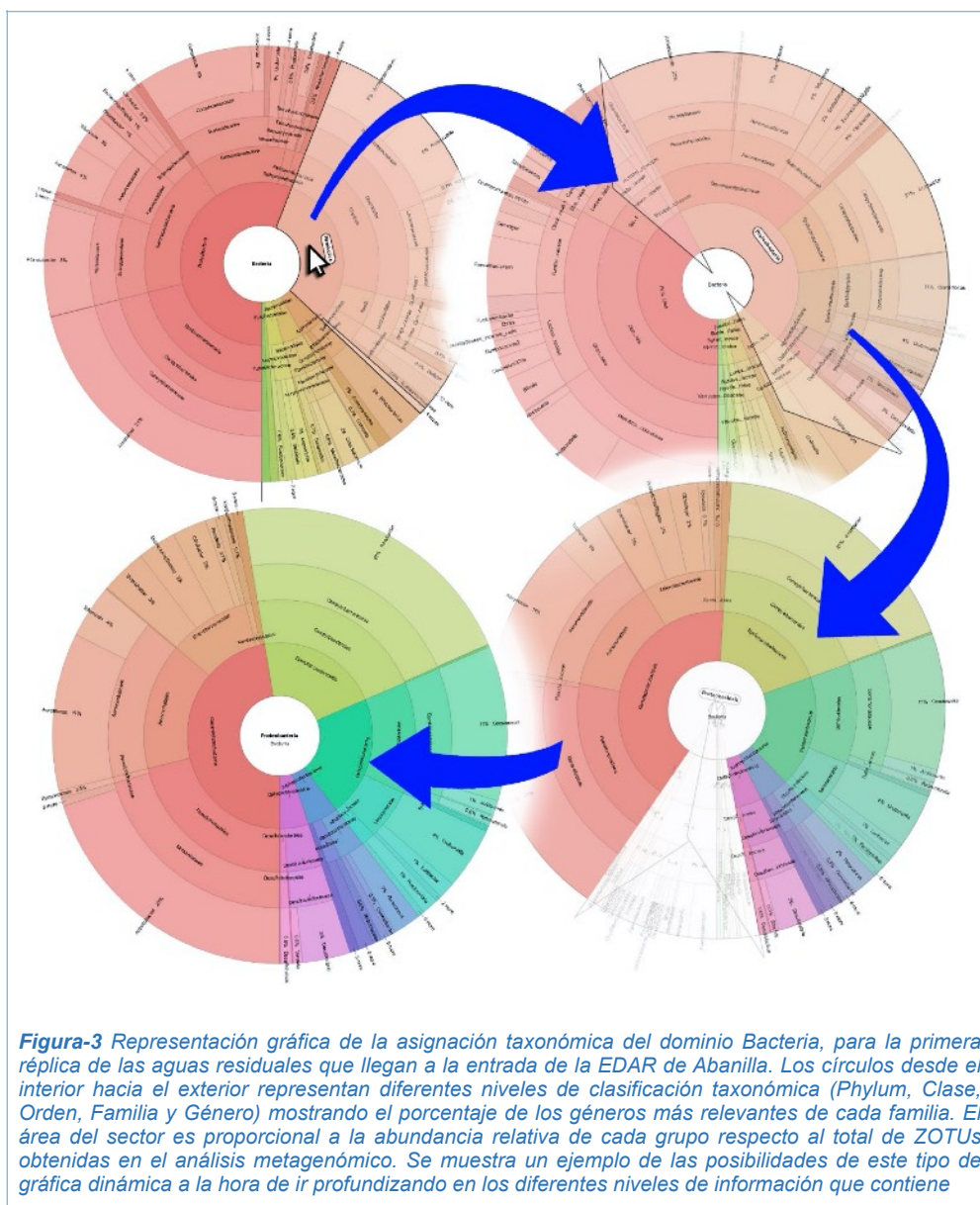
En este trabajo se han estudiado las eficiencias de reducción de diferentes géneros bacterianos con especies potencialmente patógenas para humanos en el proceso de depuración de la EDAR de Abanilla. Como el efluente se utiliza para riego, se ha estudiado, además, la comunidad microbiana en la balsa de acumulación para la posterior reutilización del agua depurada

para riego agrícola. Para este estudio se ha seleccionado la EDAR de Abanilla, por ser un ejemplo de EDAR en el ámbito mediterráneo con un buen funcionamiento y con vertidos principalmente urbanos.

Las principales características físico-químicas de las aguas tratadas en la EDAR de Abanilla se estabilizan a partir de la salida del decantador, siendo lo más relevante el incremento de oxígeno disuelto y potencial redox desde condiciones casi anaerobias y muy reductoras en la entrada del EDAR a condiciones aerobias y oxidantes en el resto de los puntos de muestreo estudiados. Además, desde un punto de vista de reducción de cargas (materia orgánica, nutrientes...) la EDAR es muy eficiente, con altas eficiencias de eliminación de estas cargas.

Teniendo en cuenta este buen funcionamiento global, es de gran interés adicional conocer la eficiencia de la EDAR en la reducción de la abundancia bacteriana.

Respecto a la abundancia y actividad de la comunidad bacteriana heterótrofa en la EDAR de Abanilla (Figura 4A), la EDAR presenta reducciones de un 77% en el total de la carga bacteriana respecto a su influente (teniendo en cuenta que algunos taxones son reemplazados en parte por otros generados dentro del propio proceso depurativo), siendo principalmente las bacterias más activas (HDNA) las que más eficientemente se eliminan en el proceso de depuración, con un 75 % de reducción en promedio. Sin embargo, en la balsa de riego la abundancia total de bacterias se incrementa hasta un 15% respecto a la salida de la EDAR, con un incremento asociado a abundancia de bacterias muy activas (11%), lo que indica que los procesos de desinfección que reducen estas poblaciones globales ya no están activos, lo que permite un desarrollo bacteriano de poblaciones "naturales" marcado por las condiciones ambientales y los recursos disponibles.



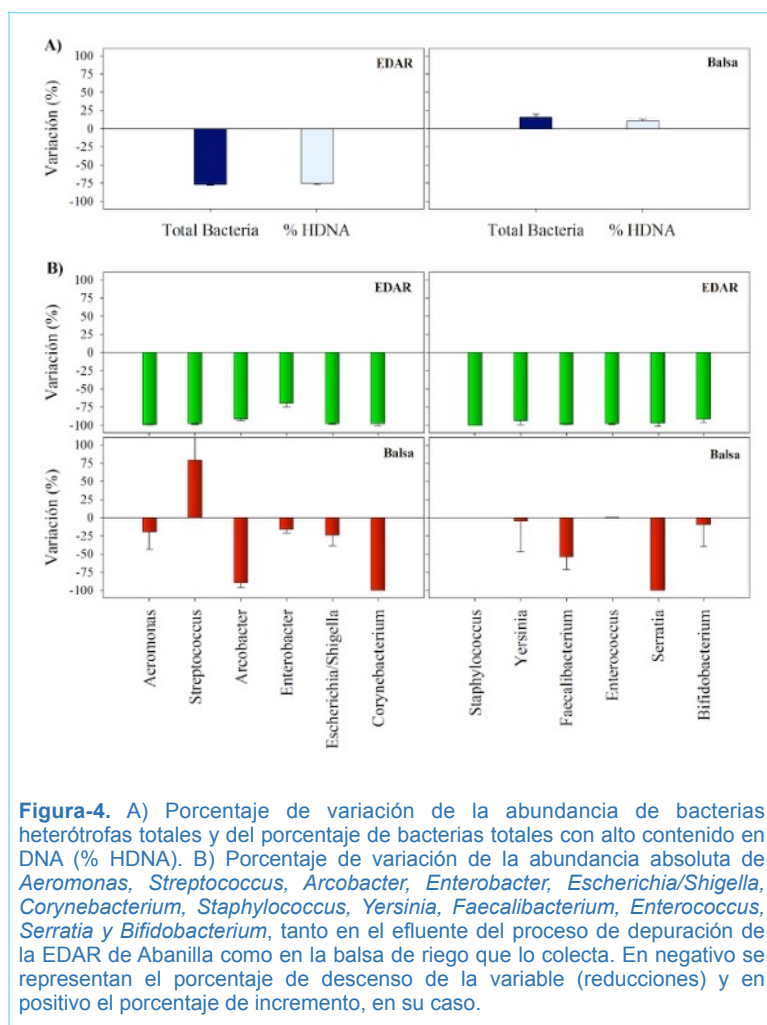
Respecto al análisis metagenómico, las muestras de la EDAR de Abanilla han proporcionado un promedio de 20.000 secuencias por muestra, con una riqueza promedio de unas 300 unidades taxonómicas (ZOTUs) significativas.

Para poder seguir la evolución de los géneros con especies potencialmente patógenas, se ha determinado la taxonomía de todas las muestras analizadas. En la figura 3 se puede observar un ejemplo correspondiente a primera réplica de las aguas residuales que llegan a la entrada de la EDAR de Abanilla. En esta figura se muestra como las 26620 secuencias génicas obtenidas se agrupan en los diferentes niveles taxonómicos en círculo concéntricos desde el centro, el centro indica que estamos en el Dominio Bacteria, el círculo más interior muestra la distribución porcentual a nivel de phylum, con Firmicutes y Proteobacteria como phyla dominantes; de esta manera, la información taxonómica se va ordenando en círculos concéntricos hacia el exterior, phylum, clase, orden familia y por último, en el círculo exterior, género, donde además se da el valor de porcentaje respecto al total de secuencias obtenidas para esa muestra.

El dominio Bacteria, al que pertenecen todos los organismos potencialmente patógenos estudiados, representa más del 99% de la abundancia relativa de procariotas en la EDAR de Abanilla. Se ha identificado la presencia de 31 Phyla diferentes, siendo cuatro de ellos los dominantes: Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria, resultados que coinciden con los habituales en estudios en sistemas de depuración (Oluseyi Osunmakinde et al., 2019; Zhang et al., 2019).

Además, se han identificado 66 Clases diferentes para el conjunto de sus muestras. Las Clases más abundantes en la entrada de la EDAR son Clostridia, Gammaproteobacteria y Epsilonproteobacteria; mientras que en la salida de la EDAR se observa una reducción importante de la clase Clostridia aumentando relativamente grupos como Betaproteobacteria y Epsilonproteobacteria.

Respecto al nivel taxonómico de género, en la EDAR de Abanilla se ha identificado la presencia de 658 géneros diferentes. La entrada de la EDAR se asocia a géneros típicos de aguas residuales sin tratar como *Faecalibacterium*, *Clostridium* o *Streptococcus*, mientras que en la salida de la EDAR los géneros dominantes son *Sphingomonas*, *Romboutsia*, *Bacteroides* y *Rheinheimera*. Asociados a la balsa, sin embargo, encontramos géneros como *Lactococcus*, *Blastomonas* o *Sphingonium*, más propios y comunes en aguas naturales.



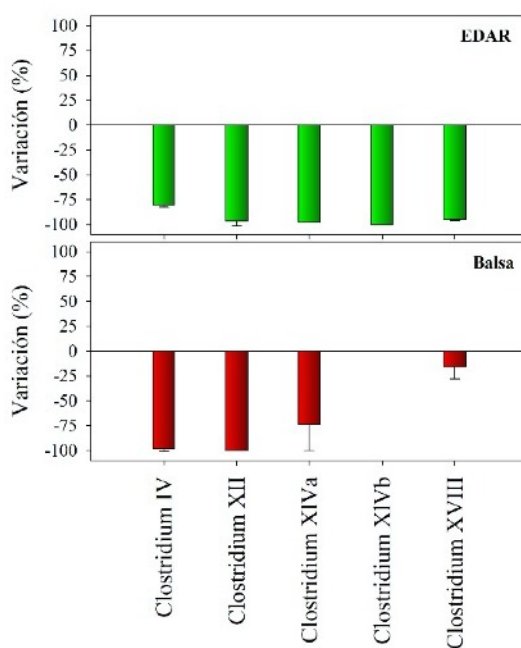
Los principales géneros con especies potencialmente patógenas presentes en la entrada de la EDAR de Abanilla y de los cuales se han estudiado su eficiencia de reducción son *Aeromonas*, *Arcobacter*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia/Shigella*, *Faecalibacterium*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y *Yersinia*, así como diversos géneros de la familia Enterobacteriaceae (Figura 4B). Mención aparte merece el género *Clostridium*, siendo este un grupo muy diverso y aun en revisión, donde los géneros más relevantes encontrados en la entrada de la EDAR fueron *Clostridium* IV, *Clostridium* XII, *Clostridium* XIVa, *Clostridium* XIVb, *Clostridium* XVIII (Figura 5).

Todos los géneros con especies potencialmente patógenas presentan un importante descenso de la abundancia absoluta en la salida de la EDAR, mientras que, en la balsa, por regla general continúan esos descensos, teniendo en cuenta que en la mayoría de los casos en la EDAR ya ha eliminado más del 90% de estos géneros (Figuras 4B y 5).

Sin embargo, es importante señalar que, respecto al total de la comunidad bacteriana, en la salida de la EDAR y en la balsa se observa un descenso muy significativo no solo de la abundancia absoluta, sino también de la abundancia relativa de todos los géneros encontrados, lo que indica que estos géneros se van sustituyendo en la comunidad microbiana por otros géneros no patógenos.

Las abundancias relativas de los géneros asociados a especies potencialmente patógenas tanto en el efluente como en la balsa se encuentran en un rango de abundancia relativa muy bajo, en muchos casos, muy por debajo del 1%, por lo que es la muy alta resolución del análisis metagenómico realizado la que nos permite seguir la evolución de estos géneros con abundancias relativas tan pequeñas, siendo en general los resultados similares a otros recientes estudios (Sanz et al., 2019).

Hay que destacar que la dominancia de géneros como *Arcobacter* es habitual en este tipo de sistemas de depuración (Shrestha et al., 2019), así como su prevalencia en el efluente, aunque hay que señalar que la eficiencia de eliminación de este género en la EDAR de Abanilla es de las más altas registradas en la bibliografía. *Arcobacter* presenta numerosas especies no patógenas que van sustituyendo a las patógenas en el proceso de depuración y que también se encuentran en ecosistemas naturales.



**Figura-5.** Porcentaje de variación de la abundancia absoluta de *Clostridium*, *Clostridium* IV, *Clostridium* XII, *Clostridium* XIVa, *Clostridium* XIVb, *Clostridium* XVIII, tanto en el efluente del proceso de depuración de la EDAR de Abanilla como en la balsa de riego que lo colecta. En negativo se representan el porcentaje de descenso de la variable (reducciones porcentuales).

En la EDAR de Abanilla (Figura 4A), los mayores porcentajes de reducción en todo el proceso de depuración completo respecto a la abundancia total de bacterias de cada uno de los géneros de taxones típicos de aguas residuales presentes en el influente a la EDAR, se observaron en los géneros *Staphylococcus* (100%), *Aeromonas* (99%), *Escherichia/Shigella* (98%), *Streptococcus* (98%), *Corynebacterium* (98%), *Enterococcus* (98%), *Faecalibacterium* (98%), *Serratia* (97%), *Yersinia* (94%), *Bifidobacterium* (92%), *Arcobacter* (91%) y, por último, *Enterobacter* (70%), siendo en general rendimientos muy altos y comparables a lo observado en la bibliografía (Reinoso et al., 2008; Fu et al., 2010).



Es importante resaltar que en el proceso de naturalización de las poblaciones microbianas observado en la balsa a la que se vierte el efluente de la EDAR de Abanilla, se refuerza el descenso o la sustitución de los géneros propios de las aguas residuales o depuradas, tanto de posibles patógenos como otros grupos indicadores de aguas residuales, por géneros más comunes en aguas naturales.

Los porcentajes de reducción más importantes de taxones con potenciales patógenos se consiguen ya tras la decantación secundaria. En general, tras este proceso se ha eliminado entre un 49-99% de la abundancia absoluta de los géneros con especies potencialmente patógenas. Entre los que más se reducen hay géneros como *Arcobacter*, *Clostridium XIVa*, *Escherichia/Shigella*, *Aeromonas* y *Enterobacter*, mientras que, para otros como *Staphylococcus*, es en los procesos de desinfección donde se completa su eliminación completa tras el tratamiento de desinfección con radiación ultravioleta. Tras la importante reducción que encontramos en el tratamiento biológico, la abundancia de géneros con especies potencialmente patógenas que llega a los tratamientos de desinfección es muy pequeña, y en general, ya no experimenta apenas variación en el tratamiento con hipoclorito, mientras que el tratamiento con ultravioleta aún se reducen más algunos géneros, como *Arcobacter*, *Clostridium XIVa* y *Aeromonas*. En este sentido debe resaltarse que este tipo de tratamientos no eliminan la biomasa de células muertas, por lo que, aunque estén presentes, las pocas bacterias de géneros potencialmente patógenos que aun superan los tratamientos de desinfección no tienen necesariamente que estar vivas, ya que el análisis de ADN denota su presencia, pero no necesariamente su supervivencia.

Respecto a los posibles patógenos, y en comparación con el efluente de la EDAR, las principales reducciones adicionales en la balsa se observan en los géneros *Corynebacterium* (100%), *Serratia* (100%), *Arcobacter* (90%), *Faecalibacterium* (54%), *Escherichia/Shigella* (24%), *Enterobacter* (16%), *Yersinia* (4%). En el resto de los géneros las reducciones en la balsa no son significativas o se producen pequeños incrementos como en el caso de *Streptococcus* (78%), aunque aún en este caso el incremento no es estadísticamente significativo dada la dispersión de las réplicas. Se observan, además, cambios importantes en la composición de ZOTUs en lo que es una sustitución de especies dentro del mismo género. Dado que la balsa almacena aguas tras un tiempo de contacto con el cloro, la reducción de la abundancia de los géneros más propios de la EDAR, así como la de posibles patógenos, puede en parte deberse a esa acción ya más prolongada del hipoclorito, y a la posterior recolonización por bacterias ambientales, esto último explicando el reemplazamiento de unos taxones por otros.

En cuanto a los géneros de *Clostridium*, este grupo de microorganismos es especialmente interesante en este tipo de sistemas de depuración, ya que son anaerobios estrictos que necesitan condiciones muy específicas para poder desarrollarse, pudiendo producir toxinas que pueden llegar a ser potencialmente peligrosas. Además, son bacterias esporuladas, por lo que en condiciones adversas, como las que se dan en los principales pasos del proceso de depuración, pueden formar esporas de resistencia. Este tipo de estrategia hace que sea muy difícil eliminarlas, por lo que la eficiencia de eliminación de este tipo de bacterias es un buen indicador de la eficiencia de una EDAR. En la EDAR de Abanilla, los porcentajes de reducción de los diferentes géneros de *Clostridium* observados a lo largo del proceso de depuración (Figura 5) fueron: *Clostridium IV* (81%), *Clostridium XII* (96%), *Clostridium XIVa* (98%), *Clostridium XIVb* (100%), y *Clostridium XVIII* (95%), todos con reducciones muy importantes. Estas reducciones continúan en la balsa, aunque ya partiendo de abundancias relativamente bajas dados los altos rendimientos del sistema de depuración de la EDAR, pero aun con reducciones porcentualmente significativas: *Clostridium IV* (98%), *Clostridium XII* (100%), *Clostridium XIVa* (74%), y *Clostridium XVIII* (16%). *Clostridium XIVb* fue totalmente eliminada previamente en la EDAR.

Hay que tener en cuenta que los porcentajes de reducción señalados están calculados respecto a la abundancia total de bacterias analizadas por citometría de flujo, por lo que cada grupo estaba presente en las aguas residuales que llegaban a la entrada de la EDAR con una abundancia distinta. En términos absolutos, los géneros bacterianos más abundantes en esas aguas residuales que entran en la EDAR fueron *Aeromonas*, *Streptococcus*, *Arcobacter*, *Faecalibacterium*, *Enterobacter*, *Bifidobacterium*, que se encontraron con abundancias que oscilaban entre  $1\text{-}10 \times 10^6$  células/ml, con algo menor abundancia *Escherichia/Shigella* y *Enterococcus*, entre  $7\text{-}9 \times 10^5$  células/ml, mientras que el resto de los géneros encontrados presentaban abundancias entre  $1\text{-}6 \times 10^4$  células/ml o inferiores. Dentro de *Clostridium*, los diferentes géneros estudiados presentaron una gran variabilidad en su abundancia total a la entrada de la EDAR, oscilando en hasta tres órdenes de magnitud ( $10^4\text{-}10^6$  células/ml).

## CONCLUSIONES

- Respecto al análisis molecular, el estudio realizado en la EDAR de Abanilla utilizando técnicas de secuenciación masiva (NGS, Next Generation Sequencing), ha mostrado una gran resolución con un promedio de 20.000 secuencias por muestra y con una riqueza promedio de unas 300 unidades taxonómicas (ZOTUs). En este contexto, se han estudiado las eficiencias de eliminación en la EDAR y en la balsa de riego asociada de los principales géneros con especies potencialmente patógenas presentes en la entrada de la EDAR de Abanilla, *Aeromonas*, *Arcobacter*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia/Shigella*, *Faecalibacterium*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Yersinia*, y diversos géneros la familia de la familia Enterobacteriaceae, además de grupos de Clostridios, como son *Clostridium IV*, *Clostridium XII*, *Clostridium XIVa*, *Clostridium XIVb*, *Clostridium XVIII*. Se han obtenido rendimientos de eliminación por encima del 90% en prácticamente todos estos géneros, y por encima del 98% para la mayoría de ellos.
- Se ha observado una eficiencia muy alta en la reducción de la biomasa bacteriana presente a la entrada de la EDAR, principalmente en el tratamiento biológico y posterior clarificación, destacando además la reducción de los grupos bacterianos más activos (HDNA)
- Respecto a la reducción de bacterias totales, la principal reducción se da en el propio proceso de depuración (82,9% de reducción) previo a los tratamientos de desinfección, reduciéndose principalmente las bacterias más activas (HDNA, 97,6%) y vivas (91,8%). En los procesos de desinfección las reducciones no son tan significativas, dados los altos niveles de eliminación de carga bacteriana que tienen lugar en etapas anteriores de la depuración.



- Desde el punto de vista de la eliminación de posibles patógenos bacterianos, tanto *Arcobacter*, como *Clostridium XIVa*, *Escherichia/Shigella*, *Aeromonas* y *Enterobacter* reducen en un promedio de un 99% su abundancia ya a la salida del decantador. La pequeña fracción de células de estos taxones que llega al tratamiento de desinfección ya no experimenta apenas variación en el tratamiento con hipoclorito, mientras que el tratamiento con ultravioleta reduce adicionalmente la abundancia de algunos géneros, como *Arcobacter*, *Clostridium XIVa* y *Aeromonas*. En este sentido debe resaltarse que, aunque estén presentes, las pocas bacterias de géneros potencialmente patógenos que aun superan los tratamientos de desinfección no tienen necesariamente que estar vivas, ya que el análisis de ADN denota su presencia, pero no necesariamente su supervivencia.
- En lo referente a la balsa de riego se detectan reducciones adicionales en las bacterias de los géneros *Arcobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia/Shigella*, *Mycobacterium* y *Campylobacter*, observándose también cambios importantes en la composición de ZOTUs en lo que es una sustitución de especies dentro del mismo género, muy probablemente hacia especies no patógenas de vida libre. Dado que la balsa almacena aguas tras un tiempo de contacto con el cloro, la reducción de la abundancia de los géneros más propios de la EDAR, así como la de posibles patógenos, puede en parte deberse a esa acción ya más prolongada del hipoclorito, y a la posterior recolonización por bacterias ambientales, esto último explicando el reemplazamiento de unos taxones por otros.
- Este estudio demuestra que se puede estimar la eficiencia de eliminación de los principales géneros bacterianos con especies potencialmente patógenas, y lo que es más relevante, que este seguimiento se hace en el contexto del resto de la comunidad bacteriana. En el caso de EDAR de Abanilla es por tanto posible no solo establecer los rendimientos de reducción en valores absolutos, tanto en el proceso de depuración como en la balsa asociada, sino además establecer si estas reducciones van asociadas a una reducción de la importancia relativa de estos grupos respecto a la comunidad en su conjunto.

## REFERENCIAS

- Andreu, E., & Camacho, A. (2002). Recomendaciones para la toma de muestras de agua, biota y sedimentos en humedales Ramsar. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid, 226 pp.
- Argoti, A., Maghirang, R. G., Barrios, A. F. G., Chou, S. T., & Fan, L. T. (2016). A generalized model for bacterial disinfection: Stochastic approach. *Biochemical Engineering Journal*, 114, 218-225.
- Degnan, P. H., & Ochman, H. (2012). Illumina-based analysis of microbial community diversity. *The ISME Journal*, 6(1), 183.
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10(10), 996.
- Fu, C. Y., Xie, X., Huang, J. J., Zhang, T., Wu, Q. Y., Chen, J. N., & Hu, H. Y. (2010). Monitoring and evaluation of removal of pathogens at municipal wastewater treatment plants. *Water Science and Technology*, 61(6), 1589-1599.
- Gerardi, M. H. (2006). *Wastewater bacteria* (Vol. 5). John Wiley & Sons.
- Gerardi, M. H., & Zimmerman, M. C. (2004). *Wastewater pathogens*. John Wiley & Sons.
- Gillespie, J. J., Wattam, A. R., Cammer, S. A., Gabbard, J. L., Shukla, M. P., Dalay, O., & Nordberg, E. K. (2011). PATRIC: the comprehensive bacterial bioinformatics resource with a focus on human pathogenic species. *Infection and Immunity*, 79(11), 4286-4298.
- Kuo, J. (2017). Disinfection Processes. *Water Environment Research*, 89(10), 1206-1244.
- Oluseyi Osunmakinde, C., Selvarajan, R., Mamba, B. B., & Msagati, T. A. (2019). Profiling Bacterial Diversity and Potential Pathogens in Wastewater Treatment Plants Using High-Throughput Sequencing Analysis. *Microorganisms*, 7(11), 506.
- Pruesse, E., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2012). SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*, 28(14), 1823-1829.
- Reinoso, R., Torres, L. A., & Bécares, E. (2008). Efficiency of natural systems for removal of bacteria and pathogenic parasites from wastewater. *Science of the Total Environment*, 395(2-3), 80-86.
- Rudolfs, W., Falk, L. L., & Ragotzkie, R. A. (1950). Literature review on the occurrence and survival of enteric, pathogenic, and relative organisms in soil, water, sewage, and sludges, and on vegetation: I. Bacterial and virus diseases. *Sewage and Industrial Wastes*, 1261-1281.

- Sanz, J. L., & Köchling, T. (2019). Next-generation sequencing and waste/wastewater treatment: a comprehensive overview. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 18, 635–680
- Simón Andreu, P. J., Lardín Mifsut, C., González Herrero, R., Sánchez Beltrán, A. V., & Vicente González, J. A. (2015). Estudio de la presencia de contaminantes emergentes en las distintas etapas de las depuradoras. *RETEMA*, 186, 84-91.
- Tan, B., Ng, C. M., Nshimiyimana, J. P., Loh, L. L., Gin, K. Y. H., & Thompson, J. R. (2015). Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1027.
- Vanwonterghem, I., Jensen, P. D., Ho, D. P., Batstone, D. J., & Tyson, G. W. (2014). Linking microbial community structure, interactions and function in anaerobic digesters using new molecular techniques. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 55-64.
- Veldhuis, M. J., & Kraay, G. W. (2000). Application of flow cytometry in marine phytoplankton research: current applications and future perspectives. *Scientia Marina*, 64(2), 121-134.
- Wagner, M., & Loy, A. (2002). Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 218-227.
- Wang, X., Hu, X., Hu, C., & Wei, D. (2011). Sequential use of ultraviolet light and chlorine for reclaimed water disinfection. *Journal of Environmental Sciences*, 23(10), 1605-1610.
- Zhang, L., Shen, Z., Fang, W., & Gao, G. (2019). Composition of bacterial communities in municipal wastewater treatment plant. *Science of the Total Environment*, 689, 1181-1191.
- Zhang, T., Shao, M. F., & Ye, L. (2012). 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *The ISME Journal*, 6(6), 1137.