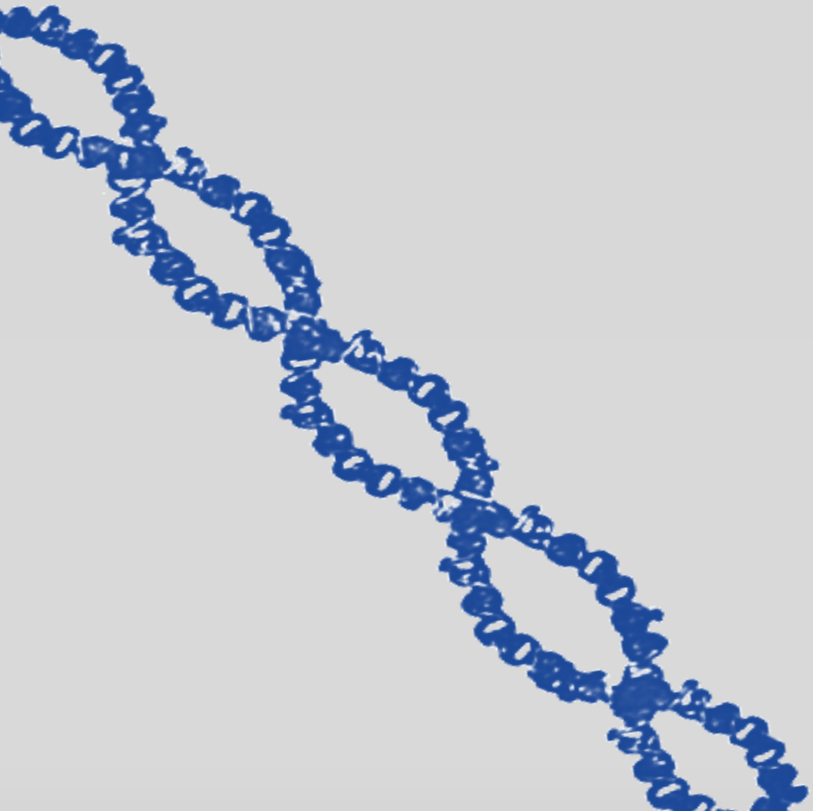
ULPGC
Universidad de
Las Palmas de
Gran Canaria

Programa de Doctorado de Calidad Ambiental y Recursos Naturales

TESIS DOCTORAL

Evaluación molecular de bioindicadores y patógenos procariotas. Usos y aplicaciones



Marina Carrasco Acosta

Las Palmas de Gran Canaria-2021

EVALUACIÓN MOLECULAR DE BIOINDICADORES Y PATÓGENOS PROCARIOTAS. USOS Y APLICACIONES

Memoria presentada para optar al título de Doctora en Calidad Ambiental y Recursos Naturales

Dirigida por la Dra.: Pilar García Jiménez

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

Instituto de Estudios Ambientales y Recursos Naturales (I-UNAT)

Grupo de Microbiología Ambiental

Facultad de Ciencias del Mar

Marina Carrasco Acosta

Las Palmas de Gran Canaria - 2021

Microbiología Ambiental

GI Biología Integrativa y Recursos Biológicos

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

D. PABLO MARTEL ESCOBAR COORDINADOR DEL PROGRAMA DE DOCTORADO DE CALIDAD AMBIENTAL Y RECURSOS NATURALES DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

INFORMA,

De que la Comisión Académica del Programa de Doctorado, en su sesión de fecha ..... tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada "Evaluación molecular de bioindicadores y patógenos procariotas. Usos y aplicaciones." presentada por la doctoranda Dª Marina Carrasco Acosta y dirigida por la Doctora Pilar García Jiménez.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 11 del Reglamento de Estudios de Doctorado (BOULPGC 04/03/2019) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a ... de..... de dos mil.....

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

ESCUELA DE DOCTORADO

Programa de doctorado de Calidad Ambiental y Recursos Naturales

Título de la Tesis

EVALUACIÓN MOLECULAR DE BIOINDICADORES Y PATÓGENOS PROCARIOTAS. USOS Y APLICACIONES.

Tesis Doctoral presentada por Dª Marina Carrasco Acosta

Dirigida por la Dra. Dª Pilar García Jiménez

Las Palmas de Gran Canaria, a 4 de junio de 2021

La Directora, La Doctoranda,

ULPGC
Universidad de
Las Palmas de
Gran Canaria

Marina Carrasco Acosta

Licenciada en Ciencias del Mar (ULPGC)

Máster Universitario en Gestión Costera (ULPGC)

Artículos relacionados con el trabajo de tesis

Herrera-Melián, J.A., González-Bordón, A., Martín-González, M.A., García-Jiménez, P., **Carrasco-Acosta, M.**, Araña, J., 2014. Palm tree mulch as substrate for primary treatment wetlands processing high strength urban wastewater. Journal of environmental management, 139, 22-31.

Carrasco-Acosta, M., Garcia-Jimenez, P., Melián, J. A.H., Peñate-Castellano, N., Rivero-Rosales, A. 2019. The Effect of Plants on Pollutant Removal, Clogging, and Bacterial Community Structure in Palm Mulch-Based Vertical Flow Constructed Wetlands. Sustainability, 11(3), 632.

Garcia-Jimenez, P., **Carrasco-Acosta, M.**, Payá, C.E., López, I.A., Rodríguez, J.R.B., Melián, J.A.H., 2019. Composition and Molecular Identification of Bacterial Community in Seawater Desalination Plants. Advances in Microbiology, 9(10), 863-876.

Garcia-Jimenez, P., **Carrasco-Acosta, M.**, Hettmann, S., 2020. *Halobacterium* identification in saltworks of Gran Canaria (Canary Islands, Spain). Journal of Fisheries Science, 2(1), 9-16.

Herrera-Melián, J.A., Mendoza-Aguiar, M., Alonso-Guedes, R., García-Jiménez, P., **Carrasco-Acosta, M.**, Ranieri, E., 2020. Multistage Horizontal Subsurface Flow vs. Hybrid Constructed Wetlands for the Treatment of Raw Urban Wastewater. Sustainability, 12(12), 5102.



En l'an 2000 (1899-1910)
Jean Marc Côte

Agradecimientos / Acknowledgements

Ya ha llegado este momento, momento ansiado, soñado y anhelado, el cual, ahora, enfrentándome a estas líneas, puedo decir que lo afronto, por raro que parezca, con melancolía. Melancolía por una etapa que se acaba. Melancolía por todo lo vivido, y sobre todo, por todo lo aprendido. Por todas aquellas personas que me han enseñado, de las cuales me he enriquecido tanto profesional como personalmente. Pero a la vez, me enfrento con ilusión, por vislumbrar otra etapa repleta de nuevas enseñanzas. Porque, cuán importante es aprender, cuán importante es observar y escuchar a aquellos que tienen algo que enseñar, así como compartir lo aprendido. En definitiva, cuán importante es el aprendizaje, ese aprendizaje lento, que percola en nosotros y que acaba por mantenerse en el tiempo. Esa carrera de fondo, suave, constante, que permite, parafraseando a la gran Margarita Salas «no tener arrugas en el cerebro», dado que aprender, como decía el pedagogo John Dewey, «no es prepararse para la vida, sino la vida misma». Y llegados a este punto, cuán importante es agradecer lo aprendido, casi más que todo lo anterior, y más aun, tener la oportunidad de poder expresar toda esa gratitud a las personas receptoras de todas esas «¡Gracias!» guardadas durante años.

Así que, este es mi momento, ese momento de poder daros las GRACIAS.

Empiezo por mi directora, la Dra. Pilar García Jiménez. Que decir después de tantos años, de tanto compartido, y de lo que queda por compartir. Pues decir, que gracias por enseñarme de forma constante e infatigable, así como por tus correcciones y consejos. Gracias por confiar en mí y abrirme la puerta a este maravilloso mundo de nuestros amigos los procariotas, que tantas alegrías y quebraderos de cabeza nos han regalado. Nada más me queda decirte, que lo que siempre te digo ¡Muchísimas gracias por todo Pili!

También quiero agradecer a los miembros que han estado y están en los grupos de investigación de Microbiología Ambiental y Fisiología y Biotecnología Vegetal Marina. Empezar por el Dr. Rafael Robaina Romero, porque por ahí empezó todo, por aquel instante en la puerta de tu despacho, tan aparentemente insignificante y a la vez tan significativo para mí, donde yo, sin saberlo previamente, fui consciente en ese preciso momento de las ganas que tenía de emprender este viaje de aprendizaje ¡Gracias Rafa! Y seguir por Diana, Olegario, Sara, Montse, Houda, Claudia, entre muchos otros con los que he coincidido en el tiempo, por lo aprendido y compartido ¡Gracias!

Agradecer al Dr. José Alberto Herrera Melían su disponibilidad y accesibilidad, así como por facilitar las muestras de aguas residuales analizadas a lo largo de esta tesis. Asimismo, quiero dar las gracias a la Dra. Nieves González Henríquez y a Dailos Hernández Reyes por los recursos del laboratorio BIOMOL prestados ¡Gracias a los tres!

También me gustaría extender mi agradecimiento a la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria por la beca concedida dentro del marco de «Ayudas a la Financiación de Contratos Predoctorales. Programa de Ayudas a la Investigación de la ULPGC», recibida para la realización de esta tesis, sin la cual, hubiera sido imposible llevarla a cabo. Asimismo, agradecer también a la ULPGC el «Plan de Formación del Personal Investigador», a través del cual, he recibido las diversas ayudas concedidas para la asistencia a congresos nacionales e internacionales. Además, quiero agradecer al programa Erasmus+ Prácticas por la ayuda otorgada para la realización de la estancia de doctorado en la *University of the Aegean* y la *National and Kapodistrian University of Athens*.

I will continue in English to thank Aristea Velegraki and Maria A. Esftratiou for hosting me at the National and Kapodistrian University of Athens and the University of the Aegean. Thank you for your continuous support before, during and after the stay and, of course, I would like to extend my thanks to Stravroula Kritikou and Afroditi Milioni for introducing me to the thrilling world of fungi and yeasts and teaching me everything that was possible during my stay and, also, for making me feel at home, like one more of you. I remember with great fondness all the breakfast that we shared drinking *expresso freddo* and eating chocolate *koulouri* while you taught me the greek language and several greek habits. *Efcharistó pára polý*!

Volviendo a mi isla adoptiva, agradecer a todos los compañeros de módulo, que muchos han sido con los que he compartido buenos momentos, pero sobre todo a Javi y Pris, por aquellos cafés de antaño, hablando sobre los cuidados de plantas variopintas, así como a Isa, por las conversaciones improvisadas ¡Gracias por esos fantásticos momentos de desconexión!

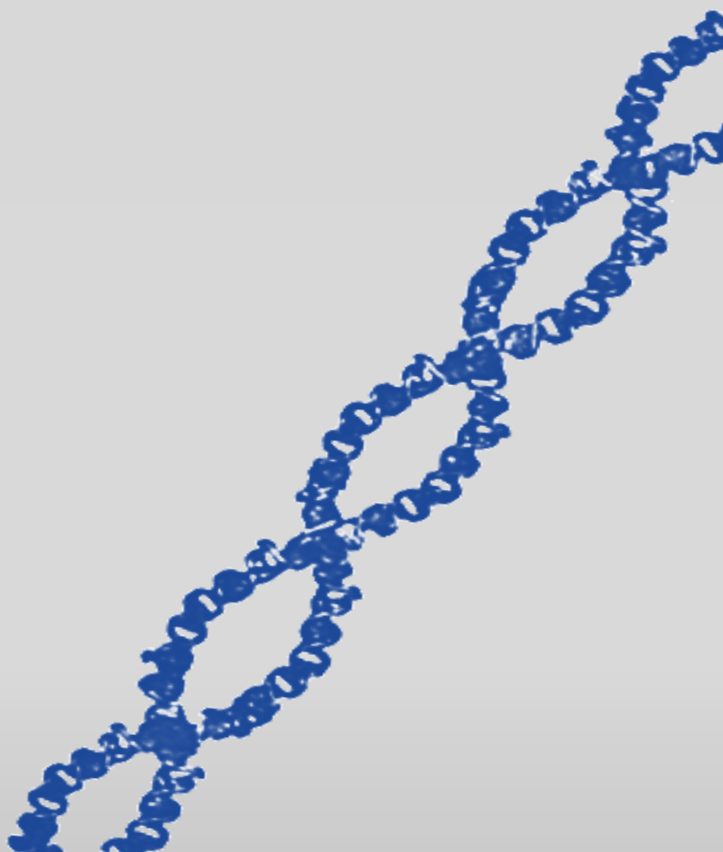
También agradecer a todos los que me habéis acompañado en mi periplo. Gracias a todos y cada uno de vosotros, que como vosotros ya sabéis, sabéis quienes sois, por esos momentos compartidos y disfrutados, que han sido muchos y que aún serán más.

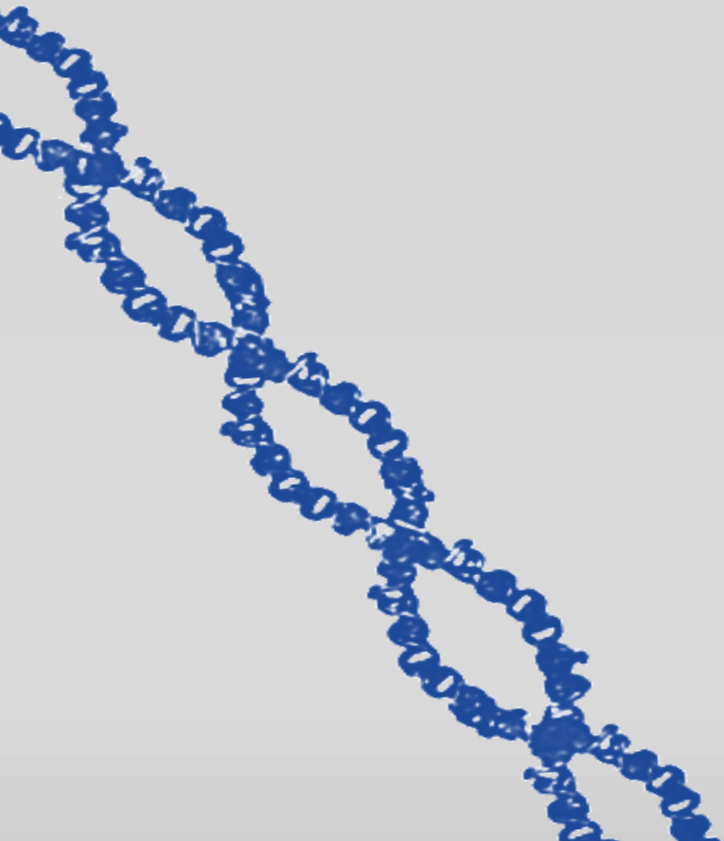
Y gracias a mi familia, a Egoitz, Saioa, Anabel, Aketza, Juana y Román, por ser tan maravillosos, por ayudarme de forma incasable, por sacarme una sonrisa siempre que os escucho, porque no puedo estar más orgullosa de vosotros. Y, en especial, agradecer de forma individual a mis padres su apoyo en todo aquello que me he propuesto, por ser un hombro en la lejanía tan cercana, por creer y confiar en mí, por darme todo lo que he necesitado en todo momento para poder crear mi «pequeño universo», por estar de forma perenne a mi lado, por enseñarme a ser ¡Gracias, gracias y gracias! Y, por último, gracias a Dani, por el camino de aprendizaje recorrido juntos, y por supuesto, por lo que nos queda por aprender.

Gràcies.

Marina
Mayo, 2021

Resumen
Abstract





Resumen

¿Cómo evaluamos el impacto de las actividades humanas en los ecosistemas? ¿Qué puede decirnos la microbiota sobre el medioambiente y su relación con la salud ambiental? ¿Puede la identificación y caracterización de las comunidades de procariotas ayudar a la resolución de problemas de carácter industrial y biotecnológico? Para dar respuesta a todas estas preguntas es necesario recurrir a la valoración de bioindicadores microbianos, tales como las bacterias y arqueas.

En esta tesis, se han diseñados cebadores y optimizado procedimientos para la valoración del gen *16S rRNA* tanto grupo- como especie-específicos para distintos bioindicadores tales como *Escherichia/Shigella*, *Enterococcus* spp, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium,* y para los patógenos *Salmonella* spp y *Legionella* spp. Estos diseños y procedimientos han sido implementados en dos sistemas bien diferenciados. Por un lado, las membranas de ósmosis inversa y por otro, las salinas costeras. En estas aplicaciones se han reportado a los géneros *Sphingomonas* y *Pseudomonas* en las membranas de ósmosis inversa como los grupos mayoritarios, mientras *Halobacterium*, *Halorubrum* y *Salinibacter* lo han sido en los ambientes extremófilos. Estos resultados abren un marco de trabajo interesante para el estudio de estos géneros de procariotas, tanto en la formación de biopelículas como en la síntesis de compuestos bioactivos de interés.

A continuación, a partir de los perfiles de restricción de los genes marcadores *16S rRNA* y *lacZ*, se han evaluado los cambios en las estructuras poblacionales bacterianas. La aplicación de este trabajo en humedales ha revelado estas modificaciones cuando se comparan los sistemas naturales de depuración con plantas y sin plantas, lo que nos ha permitido reconocer el sistema con el mejor rendimiento. Se propone gracias al desarrollo de este estudio el uso de reactores de depuración, basados en sustratos orgánicos y con plantas, por la capacidad de biorremediación que manifiestan.

Finalmente, la detección y cuantificación simultánea de bioindicadores de contaminación fecal mediante *multiplex* a tiempo real, usando genes codificantes como el *ybbW* y no codificantes como el *16S rRNA*, ha sido otro hito alcanzado en este trabajo. Así, el desarrollo e implementación de este método, en agua y sedimentos marinos, ha permitido la evaluación espacio-temporal de los bioindicadores valorados, evidenciándose que los sedimentos marinos son un reservorio importante para los bioindicadores fecales. A través de los resultados obtenidos en este trabajo, se propone la inclusión de los sedimentos marinos en las labores de monitorización de las zonas de baño para obtener un mayor conocimiento del estado de la calidad de sus aguas.

En resumen, la identificación y caracterización molecular de bioindicadores procariotas, en diferentes ambientes, ha permitido ahondar en el conocimiento de las bacterias y arqueas para el control y gestión de procesos de índole microbiológica que repercuten en el medioambiente y en nuestra sociedad.

Abstract

How do we evaluate the impact of human activities on ecosystems? What can the microbiota tell us about the environment and its relationship with environmental health? Could the identification and characterization of prokaryotic communities help to solve industrial and biotechnological issues? To answer all these questions, it is necessary to resort to the assessment of microbial bioindicators, such as bacteria and archaea.

In this thesis, on one hand, primers have been designed and procedures have been optimised for the assessment of the *16S rRNA* gene, both group- and species-specific for different bioindicators such as *Escherichia/Shigella*, *Enterococcus* spp, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium,* and for the pathogens *Salmonella* spp and *Legionella* spp. These designs and procedures have been implemented in two well-differentiated systems: the reverse osmosis membranes and the coastal saltworks. In these applications the genera *Sphingomonas* and *Pseudomonas* have been reported in the reverse osmosis membranes as the major group, while *Halobacterium*, *Halorubrum* and *Salinibacter* have been the major groups in the extremophilic environments. These results open an interesting framework for the study of these prokaryotic genera, both in the formation of biofilms and in the synthesis of bioactive compounds of interest.

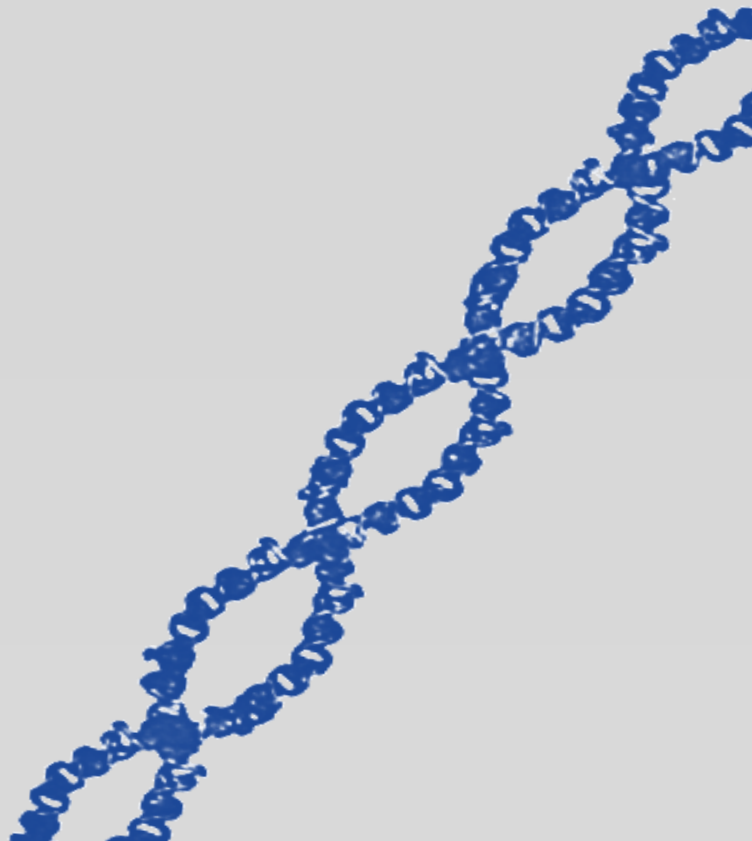
On the other hand, the restriction profiling of *16S rRNA* and *lacZ* marker genes has allowed us to evaluate changes in the bacterial population structures. The application of this work in wetlands has revealed these modifications when the plant and non-plant depuration systems are compared, which has allowed us to recognise the best performances of these systems. As a result of this study, the use of natural wetland treatment systems, based on organic substrates and plants, is proposed due to their bioremediation capacity.

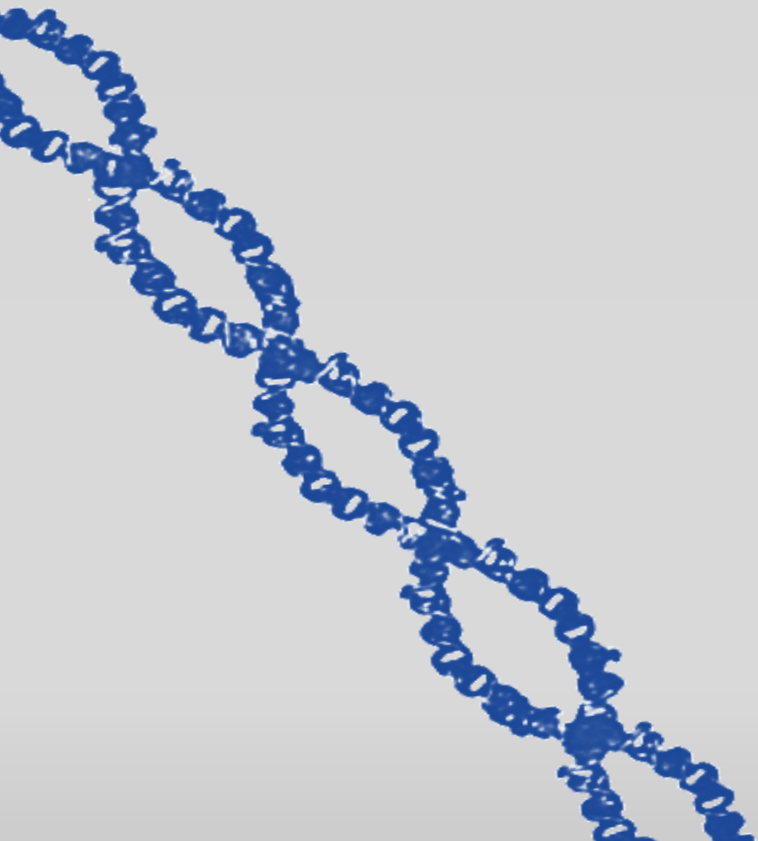
Finally, the simultaneous detection and quantification of bioindicators of faecal contamination by real-time multiplex, using encoding genes such as *ybbW*

and non-encoding genes such as *16S rRNA*, has been another milestone achieved in this work. Thus, the development and implementation of this method, in water and marine sediments, has allowed the spatio-temporal evaluation of the assessed bioindicators, showing that marine sediments are an important reservoir for faecal bioindicators. This work proposes the inclusion of the marine sediments in the monitoring of bathing areas to gain a better understanding of their water quality status.

In summary, the identification and molecular characterisation of prokaryotic bioindicators in different environments, has strengthened our knowledge about the bacteria and archaea in the control and management of microbiological processes that affects the environment and our society.

Índice





Índice

RESUMEN ..... **XXI**

ABSTRACT ..... **XXIII**

INTRODUCCIÓN GENERAL **7**

I.G.1 │ Microorganismos claves en aproximaciones a nivel ambiental y biotecnológico 10

I.G.2 │ Metodologías de valoración de procariotas 17

I.G.3 │ Marcadores moleculares de procariotas 19

Referencias **31**

CAPÍTULO I **41**

I.1 │ Introducción **43**

I.1.1 │ Normativa en materia de calidad de aguas 43

I.1.2 │ Bacterias indicadoras de contaminación fecal 50

I.1.2.1. Coliformes Totales y Fecales 50

I.1.2.2. *Escherichia coli* 51

I.1.2.3. *Salmonella* spp 52

I.1.2.4. *Enterococcus intestinalis* 53

I.1.2.5. *Clostridium perfringens* 54

I.1.3 │ Bacterias oportunistas capaces de desarrollarse en ambientes acuáticos 55

I.1.3.1. *Legionella* spp 56

I.1.4 │ Métodos convencionales de valoración de calidad de aguas 57

I.1.5 │ Avances en las metodologías de valoración de calidad de aguas 58

I.2 │ Material y Métodos **62**

I.2.1 │ Diseño de cebadores específicos para los bioindicadores y patógenos bacterianos utilizados en la valoración de calidad de aguas 62

I.2.1.1. Cepas de referencia y condiciones de cultivo 62

I.2.1.2. Aislamiento del ADN de las cepas puras 64

I.2.1.3. Valoración de la integridad y cuantificación del ADN 70

I.2.1.4. Diseño de juegos de cebadores del gen *16S rRNA* específicos de bioindicadores y patógenos bacterianos 71

I.2.2 │Validación de los cebadores diseñados en muestras de ADN ambiental 81

I.2.2.1. Muestreo y preparación de las muestras 81

I.2.2.2. Aislamiento del ADN ambiental 84

I.2.2.3. Amplificación con los juegos de cebadores específicos diseñados 88

I.2.2.4. Validación de los amplicones 89

I.2.3 │ Análisis filogenético 89

I.3 │Resultados 92

I.3.1 │ Diseño de cebadores específicos de los bioindicadores y patógenos bacterianos de valoración de calidad de aguas 92

I.3.2 │Validación de los cebadores diseñados en muestras de ADN ambiental 107

I.3.3 │ Análisis filogenético 116

I.4 │Discusión 121

Referencias 130

Capítulo I.1 141

I.1.1 │Introducción 143

I.1.2 │Material y Métodos 155

I.1.2.1. Muestreo y preparación de las muestras 155

I.1.2.2. Identificación bioquímica de las bacterias 157

I.1.2.3. Identificación molecular de las bacterias 158

I.1.3 │Resultados 170

I.1.3.1. Identificación bioquímica de las bacterias 170

I.1.3.2. Identificación molecular de las bacterias 172

I.1.4 │Artículo Científico «Garcia-Jimenez, P., Carrasco-Acosta, M., Payá, C.E., López, I.A., Rodríguez, J.R.B., Melián, J. A.H., 2019, Advances in Microbiology, 9(10), 863-876»**..... 179**

Referencias 195

Capítulo I.2 201

I.2.1 │Introducción 203

I.2.1.1. Salinas costeras 204

I.2.1.2. Comunidades microbianas de las salinas costeras 205

I.2.1.3. Arqueas *vs.* Bacterias en salinas costeras 208

I.2.1.4. Interés industrial y biotecnológico de los procariotas halófilos 211

I.2.2 │Material y métodos 215

I.2.2.1. Muestreo de las salinas y preparación de las muestras 215

I.2.2.2. Aislamiento del ADN 217

I.2.2.3. Amplificación del gen *16S rRNA* con cebadores específicos para los dominos Archaea y Bacteria 217

I.2.2.4 │Diseño de cebadores género y especie-específicos de procariotas halófilos 219

I.2.2.5 │Clonación de los insertos del gen *16S rRNA* 220

I.2.2.6 │ Análisis filogenético de los insertos 220

I.2.3 │Resultados 221

I.2.3.1. Amplificación del gen *16S rRNA* con cebadores específicos de los dominos Archaea y Bacteria 221

I.2.3.2. Validación de cebadores género- y especie-específicos de procariotas halófilos, y clonación de los fragmentos 222

I.2.4 │Artículo Científico «Garcia-Jimenez, P., Carrasco-Acosta, M., Hettmann, S., 2020, Journal of Fisheries Science, 2(1), 9-16». **..... 229**

Referencias 239

Anexo I.2 245

CAPÍTULO II 247

II.1 │Introducción 249

II.2 │Material y Métodos 262

II.2.1 │Localización y diseño del humedal artificial de base orgánica 262

II.2.2 │Muestreo del humedal artificial y preparación de las matrices 265

II.2.3 │Valoración de la estructura de las comunidades bacterianas. Diseño experimental 266

II.2.3.1. Aislamiento del ADN ambiental 266

II.2.3.2. Amplificación de los genes *16S rRNA* y *lacZ* 267

II.2.3.3. ARDRA 268
II.2.3.4. T-RFLP 270
II.2.3.5. Análisis T-RFLP 271

II.3 │Resultados 275

II.3.1 │ Valoración de la estructura de las comunidades bacterianas. ARDRA 279

II.3.2 │ Valoración de la estructura de las comunidades bacterianas. T-RFLP 281

II.4 │Discusión 287

II.5 │Artículo Científico « Herrera-Melián, J.A, González-Bordón, A., Martín-González, M.A., Garcia-Jimenez, P., Carrasco-Acosta, M., Araña, J., 2014, Journal of Environmental Management, 139(2014), 22-31». **..... 293**

II.6 │Artículo Científico «Carrasco-Acosta, M., Garcia-Jimenez, P., Melián, J. A.H., Peñate-Castellano, N., Rivero-Rosales, A. 2019, Sustainability, 11(3), 632». **..... 305**

II.7 │Artículo Científico «Herrera-Melián, J.A., Mendoza-Aguiar, M., Guedes-Alonso, R., Garcia-Jiménez, P., Carrasco-Acosta, M., Ranieri, E., 2020, Sustainability, 12(12), 5102». **..... 325**

Referencias 343

Anexo II 351

CAPÍTULO III 359

III.1 │Introducción 361

III.1.1 │Calidad de aguas de baño y parámetros microbiológicos 362
III.1.2 │Valoración de los parámetros microbiológicos 364
III.1.3 │Valoración de calidad de aguas. *Multiplex* RT qPCR 365
III.1.4 │Genes específicos utilizados para la detección y cuantificación de FIB 370

III.2 │Material y Métodos 376

III.2.1 │Diseño de *primers* y sondas de hidrólisis 376
III.2.1.1. Diseño *in silico* de cebadores y sondas de hidrólisis para la valoración grupo-específica 376
III.2.1.2. Diseño *in silico* de cebadores y sondas de hidrólisis para la valoración especie-específica 378

III.2.1.3. Análisis de las estructuras secundarias de los cebadores y sondas de hidrólisis diseñados *in silico* 381
III.2.1.4. Marcaje de las sondas de hidrólisis 382
III.2.1.5. Aproximación *in silico* a la especificidad de los taxones atendiendo a la filogenia 385
III.2.2 │Valoración de bioindicadores en aguas y sedimentos marinos de la Bahía del Confital 385
III.2.2.1. Muestreo 386
III.2.2.2. Preparación de las muestras 387
III.2.2.3. Aislamiento del ADN ambiental 388
III.2.3 │Valoración de bioindicadores de contaminación fecal en aguas y sedimentos marinos. Diseño experimental 389
III.2.4 │Cuantificación de los bioindicadores de contaminación fecal 391
III.2.5 │Análisis estadístico 394

III.3 │Resultados 396

III.3.1 │ Aproximación *in silico* a la especificidad de los taxones atendiendo a la filogenia 396
III.3.2 │Valoración de bioindicadores en aguas y sedimentos marinos 403
III.3.2.1. Número teórico de copias de los genes *16S rRNA* y *ybbW* 403
III.3.2.2. Rectas de regresión y parámetros 405
III.3.2.3. Cuantificación de los bioindicadores de contaminación fecal 409

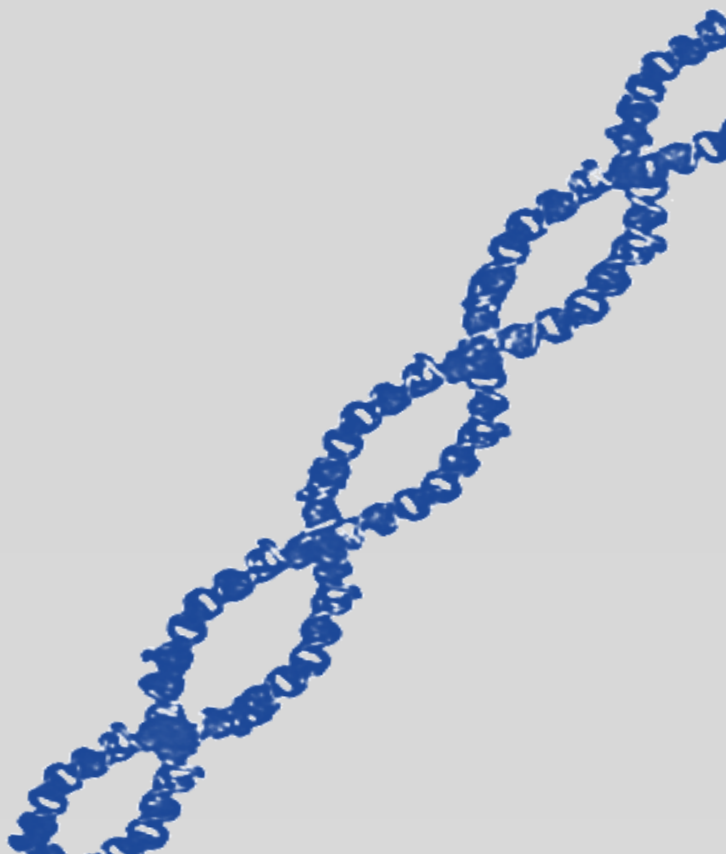
III.4 │Discusión 417

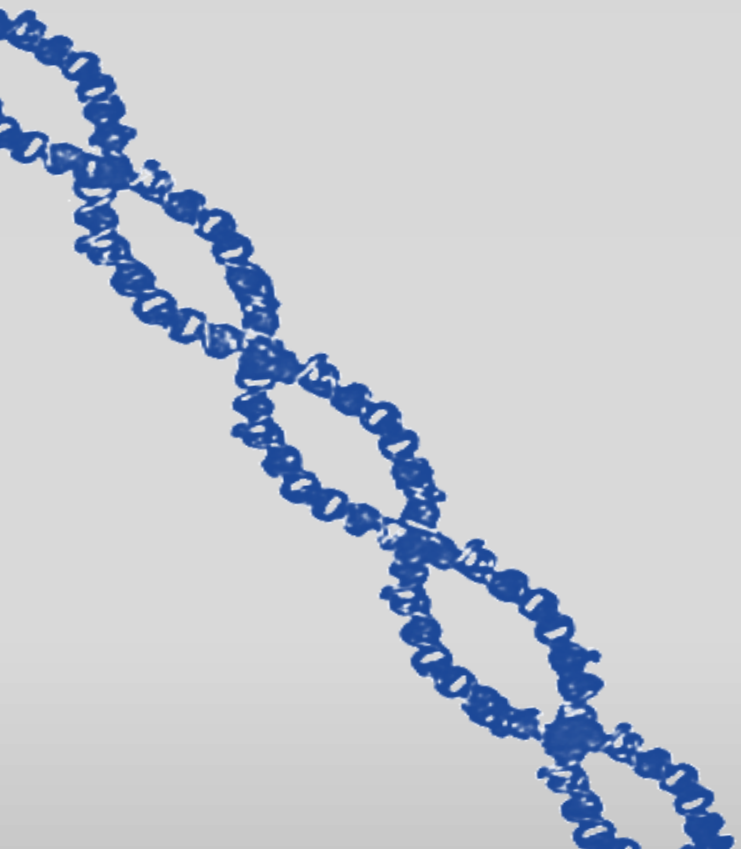
Referencias 438

Anexo III 451

CONCLUSIONES GENERALES 457
GENERAL CONCLUSIONS 459

Introducción General





Introducción General

A través de la historia de la microbiología, la comunidad científica se ha interesado en cuestiones relacionadas con la identificación, caracterización, abundancia, diversidad, distribución e interacción de los microorganismos, así como, la manera en que éstos se relacionan con el ecosistema. Desde la primera observación de estos organismos a través de un microscopio, realizada en el siglo XVII por Antonie van Leeuwenhoek, pasando por los métodos de cultivo a partir de los cuales Fleming descubrió la penicilina en el 1929, y las posteriores técnicas moleculares que han revolucionado todos los aspectos relacionados con la biología, más de tres siglos después, se dispone de un amplio conocimiento en torno a los microbios. No obstante, aún queda un extenso camino por recorrer para obtener un conocimiento profundo sobre muchos de ellos.

Los microorganismos están presentes en grandes cantidades en todo tipo de ambientes (Bloem & Breure, 2003). Hoy en día, el estudio y la valoración de estos organismos, en diferentes hábitats, permite desarrollar y gestionar los usos o problemas de índole microbiológica que afectan tanto positiva como negativamente al medioambiente y a nuestra sociedad. Por ello, dentro de las múltiples disciplinas que conforman la microbiología, aquellos aspectos relacionados con la microbiología ambiental tienen un impacto significativo tanto científico, como medioambiental y socioeconómico (Barton & McLean, 2019).

Por definición la microbiología ambiental es el estudio de los microorganismos en el ambiente, incluyendo la microbiología del aire, del suelo y del agua (Atlas & Bartha, 2005). Los microorganismos, a su vez, se definen como organismos solo visibles al microscopio, pudiendo encontrar entre ellos algas, protozoos,

nematodos, hongos y levaduras, y, arqueas y bacterias (Percival *et al.*, 2004; Atlas & Bartha, 2005). Asimismo, los virus, aun no considerándose microorganismos *sensu stricto*, se estudian a través de la microbiología por estar íntimamente conectados a la evolución histórica de los microbios (Cowan & Talaro, 2009).

I.G.1 | Microorganismos claves en aproximaciones a nivel ambiental y biotecnológico

La microbiología ambiental juega un papel esencial en aspectos cruciales que tiene que ver con la salud ambiental y pública. Dentro de la microbiología ambiental, significativa es la importancia que cobra la microbiología del agua. Al respecto, existe una amplia bibliografía donde se documentan varios grupos y especies de microorganismos claves en esta materia. El control de esos microorganismos se hace ineludible por su impacto en la salud, ya que, muchos de ellos son los principales agentes etiológicos de las enfermedades hídricas asociadas a su grupo microbiano.

Las enfermedades hídricas, entendidas como aquellas en las que el agua actúa como vehículo del agente infeccioso –el cual llega a la misma a través de contaminantes como excreciones fecales y urinarias de origen antropogénico y animal; aguas negras y efluentes del alcantarillado; escorrentías y entradas desde el sustrato circundante; o, por factores naturales–, tienen un impacto significativamente negativo, a nivel mundial, en la salud pública y ecológica (Percival *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2020).

Como se recoge en la Tabla I.G.1 son múltiples los patógenos y bacterias transmitidos a través del vector agua. A rasgos generales, dentro del extenso conjunto de agentes etiológicos de enfermedades hídricas podemos hablar de dos grandes grupos, aquellos de origen natural o de origen fecal. Dentro del primer grupo nos encontramos los afloramientos o *blooms* de cianobacterias, radicando su virulencia en la acción de las toxinas sintetizadas por parte de las mismas –p. ej. saxitoxina (*Trichodesmium sp.*) (Detoni *et al.*, 2016), o desbromoaplisiatoxina (*Lyngbya majuscula*) (Ottuso, 2013)–.

Tabla I.G.1. Agentes etiológicos principales en la microbiología de aguas, ámbitos de aplicación, relevancia de su estudio y control, y principales efectos sobre la salud.

Organismo	*Target*	Ámbito de aplicación	Relevancia	Efectos sobre la salud	Referencia
Cianobacterias (algas verde-azules)	*Trichodesmium sp.*	Salud pública y ambiental	Control de *blooms* en masas de agua marinas	S.P.: Afecciones neurológicas en humanos. S.A.: Puede provocar mortalidad en comunidades planctónicas (p. ej. en larvas del camarón *Lithopenaeus vannamei*).	Detoni *et al.*, 2016 Testai *et al*., 2016
	Lyngbya majuscula			S.P.: Dermatitis vesicular en humanos e irritaciones oculares. S.A.: Efectos adversos en la fauna marina (p. ej. fibropapillomatosis en *Chelonia mydas*).	Osborne *et al.*, 2001 Ottuso, 2013
	Microcystis sp.	Salud pública	Control de cultivos marinos (p. ej. *Mytilus* spp).	Afecciones hepáticas en humanos.	Williams *et al*., 1997 Rita *et al.*, 2014
	Planktothrix sp.	Salud pública y ambiental	Control de *blooms* en masas de agua dulce	S.P.: Irritaciones cutáneas, reacciones alérgicas, y síntomas gastrointestinales. S.A.: Disrupción endocrina en peces (p. ej. pez-arroz japonés, *Oryzias latipes*).	Mankiewicz-Boczek *et al*., 2008
Protozoos	*Naegleria fowleri*	Salud pública	Control en masas de agua dulce recreacionales y regeneradas	Meningoencefalitis amebiana.	Lee *et al.*, 2002
	Giardia sp.		Control de aguas de consumo, regeneradas y recreacionales	Síntomas gastrointestinales y fiebre.	Furness *et al*., 2000
	Cryptosporidium sp.			Síntomas gastrointestinales, fiebre y mialgia.	Tzipori & Griffiths, 1998
	Cyclospora sp.			Síntomas gastrointestinales, pérdida de peso y deshidratación.	Cloete *et al*., 2004 Temesgen *et al*., 2019
	Toxoplasma gondii			Mialgia, neuralgia, encefalitis y enfermedades congénitas.	Josephson, 1987 Cloete *et al*., 2004 Temesgen *et al*., 2019

S.P.: Salud Pública; S.A.: Salud Ambiental.

Tabla I.G.1 (continuación). Agentes etiológicos principales en la microbiología de aguas, ámbitos de aplicación, relevancia de su estudio y control, y principales efectos sobre la salud.

Organismo	***Target***	**Ámbito de aplicación**	**Relevancia**	**Efectos sobre la salud**	**Referencia**
Nematodos (huevos)	*Taenia saginata* *Taenia solium*	Salud pública	Control de aguas de consumo y regeneradas	Mialgias fuertes y síntomas neurológicos.	Sato *et al*., 2018 Prodjinotho *et al.*, 2020
	Ascaris lumbricoides			Síntomas gastrointestinales y neumonía por ascariasis.	Hussain *et al*., 2020
Hongos y levaduras	*Phialophora richardsiae*	Salud pública	Control de aguas de consumo, regeneradas y recreacionales	Afecciones respiratorias.	Hageskal *et al*., 2009 Elfadaly *et al.*, 2018
	Microsporum canis			Afecciones cutáneas.	Stewart *et al*., 2011
	Candida albicans			Infecciones del tracto urinario y afecciones cutáneas.	Gerba, 2009 Behzadi *et al*., 2015
	Cryptococcus neoformans	Salud pública y ambiental		S.P.: Infecciones diseminadas en tejidos, neumonía y meningoencefalitis. S.A.: Criptococosis en delfines mulares (*Tursiops truncatus*).	Miller *et al*., 2002 Cogliati *et al*., 2016 Elfadaly *et al.*, 2018
	Aspergillus fumigatus		Control de aguas de consumo, regeneradas, recreacionales y control de cultivos marinos (p. ej. *Mytilus* spp).	S.P.: Alergias y afecciones respiratorias. S.A.: Bioacumulación de gliotoxinas en mejillones (p. ej. *Mytilus edulis*).	Warris *et al.*, 2001 Denning *et al.*, 2006 Kerzaon *et al*., 2008
Arqueas*	*Methanobrevibacter sp.* *Methanosphaera sp.* *Methanomassiliicoccus sp.*	Salud pública	Control de aguas de consumo, regeneradas y recreativas	Sin evidencias. Utilizadas como trazadores de contaminación fecal humana.	Ufnar *et al*., 2006 Stewart *et al*., 2011 Nkamga *et al*., 2017

S.P.: Salud Pública; S.A.: Salud Ambiental.

*El dominio Archaea no se incluye como agente etiológico, sino como microorganismos con relevancia en el control de masas de agua.

Tabla I.G.1 (continuación). Agentes etiológicos principales en la microbiología de aguas, ámbitos de aplicación, relevancia de su estudio y control, y principales efectos sobre la salud.

Organismo	*Target*	Ámbito de aplicación	Relevancia	Efectos sobre la salud	Referencia
Bacterias	*Escherichia coli O157:H7*	Salud pública y ambiental	Control de aguas de consumo, regeneradas y recreacionales	Síntomas gastrointestinales severos.	Sharma *et al*., 2003
	Campylobacter jejuni			Síntomas gastrointestinales, fiebre y mialgia.	Friedman *et al*., 2002
	Helicobacter pylori			Síntomas gastrointestinales severos.	Hopkins *et al*., 1996 Cloete *et al.*, 2004
	Salmonella spp			Síntomas gastrointestinales, afecciones cutáneas y fiebre (fiebre tifoidea por *Salmonella typhi*).	Elfadaly *et al.*, 2018
	Shigella spp			Síntomas gastrointestinales y fiebre.	Alamanos *et al*., 2000
	Clostridium perfringens		Control de aguas de consumo y control de cultivos marinos (p. ej. *Mugil cephalus*).	Afecciones cutáneas y gastrointestinales.	Sabry *et al.*, 2016 Kiu & Hall, 2018
	Legionella spp		Control de aguas de consumo, regeneradas y recreacionales	Afecciones respiratorias, síntomas gastrointestinales, fiebre, mialgia y cefaleas.	Cloud *et al.*, 2000 Walker, 2018
	Vibrio chlorea		Aguas recreacionales	Síntomas gastrointestinales, fiebre y deshidratación.	Islam *et al*., 2020
	Aeromonas hydrophila *Aeromonas sobria*			Síntomas gastrointestinales.	Joseph, 1996
	Pseudomonas aeruginosa			Afecciones cutáneas.	Percival *et al.*, 2004
Virus	Astrovirus	Salud pública	Control de aguas de consumo, regeneradas y recreacionales	Síntomas gastrointestinales.	Magana-Arachchi & Wanigatunge, 2020
	Norovirus			Síntomas gastrointestinales y afecciones respiratorias.	Lopman *et al*., 2004
	Enterovirus			Úlceras gástricas, fiebre, encefalitis, meningitis, pericarditis y neumonía.	Cloete *et al.*, 2004
	Hepatitis A y E			Hepatitis aguda, ictericia y sistemas gastrointestinales.	Guerrero-Latorre *et al*., 2011

Similarmente, hongos como las especies *Aspergillus fumigatus* y *Phialophora richardsiae,* son ubicuos en la naturaleza y pueden generar reacciones alérgicas y afecciones respiratorias en humanos a partir de la acción de toxinas –p. ej. aflatoxinas y gliotoxinas de *A. fumigatus*– (Warris *et al*., 2001; Kerzaon *et al*., 2008). Como informan Denning y colaboradores (2006), estas afecciones son relevantes en personas inmunosuprimidas, cuando la vía de transmisión es a través del uso de aguas contaminadas –aguas de consumo y con fines de higiene personal–, cobrando especial significancia en ambientes hospitalarios. Asimismo, otros ejemplos de organismos de origen ambiental es la ameba *Naegleria fowleri,* cuyo reservorio son las aguas dulces templadas (lagos, ríos y aguas termales) (Lee *et al*., 2002), o de las bacterias *Vibrio chlorea*, *Aeromonas hydrophila y Aeromonas sobria,* siendo su hábitat las aguas marinas y salobres (Cloete *et al.*, 2004).

Dentro del segundo grupo, significativos son los agentes etiológicos de origen fecal por su mayor efecto en la salud. De las patologías derivadas de los mismos, merecen destacarse, por su importancia, las enfermedades gastrointestinales agudas, la fiebre tifoidea, la meningitis vírica, la meningoencefalitis por levaduras, y la hepatitis infecciosa, provocadas la gran mayoría por agentes protozoarios, helmínticos, fúngicos, bacterianos y víricos (Tabla I.G.1), siendo los más relevantes los patógenos protozoarios, bacterianos y víricos.

No obstante, hasta la fecha, no se han descrito características de relevancia clínica para arqueas, y su papel en el control de la calidad de las aguas se ciñe al empleo de estos organismos como marcadores de trazabilidad de contaminación fecal antropogénica, por ser uno de los procariotas más abundantes y específicos de la flora saprófita gastrointestinal humana (Ufnar *et al*., 2006; Stewart *et al*., 2011; Nkamga *et al*., 2017). Por consiguiente, la categorización de los patógenos según su origen (fecal o no fecal), así como de acuerdo a su impacto en la salud pública, facilita el control de este tipo de organismos, el cual es ineludible en materia de calidad de aguas.

Una evaluación adecuada de los riesgos para la salud pública derivados de la ingesta, el uso o la exposición a las aguas contaminadas, requiere una valoración rutinaria de la salubridad de las mismas. Sin embargo, actualmente no es práctico identificar y enumerar directamente los múltiples microorganismos patógenos que están presentes en estas aguas. Más aún, la demora en la obtención de diagnóstico de los análisis de referencia recogidos en la normativa pertinente a este ámbito es un obstáculo importante para el control rutinario de los agentes patógenos (Wade *et al.*, 2010).

Del diverso conjunto de microorganismos que condicionan la salubridad de los ambientes, los procariotas, y en especial las bacterias, son los bioindicadores por excelencia en materia de calidad de aguas, tanto por su relevancia, como por su abundancia en episodios de contaminación en ambientes acuáticos –de media ca. 10^6 células bacterianas L^{-1} frente a las ca. 10^4 células protozoarias L^{-1}– como por su relativo fácil manejo en comparación con la determinación de agentes víricos (Stewart *et al*., 2011). En particular, algunos grupos bacterianos se utilizan como indicadores de calidad ambiental, dado que se ha evidenciado que pueden predecir la posible presencia de patógenos en el ambiente, así como trazar el origen de la fuente de contaminación (Percival *et al*., 2004; Gerba, 2009; Stewart *et al*., 2011). La catalogación de grupos o especies bacterianas como bioindicadores, vendrá otorgada por el cumplimiento de una serie de criterios.

De manera específica, los criterios a cumplir, según describen Sumampouw & Risjani (2014), deben ser i) estar en el ambiente contaminado cuando se encuentre el origen de la contaminación por patógenos; ii) no reproducirse en el medio contaminado; iii) encontrarse en un número mayor que el microorganismo patógeno; iv) responder a las condiciones del medio natural y/o al proceso de tratamiento de descontaminación que se aplique para la eliminación de determinadas especies patógenas; v) ser fáciles de aislar, identificar y contar; vi) no convertirse en microorganismos patógenos; y vii) no conllevar un alto coste en la etapa de valoración, permitiendo de esta forma, el procesado de un gran número de muestras.

Entre una miríada de bacterias, algunos grupos bacterianos cumplen con los criterios mencionados para ser catalogados como bioindicadores de control de calidad de aguas en una multitud de escenarios (Riedel *et al*., 2015). De esta manera, dependiendo del tipo de ambiente a valorar y de la naturaleza de la contaminación a determinar, la elección de los bioindicadores bacterianos diferirá.

La microbiología ambiental también tiene un papel protagonista en la búsqueda de nuevos compuestos de alto valor biotecnológico, así como en la búsqueda de soluciones a ciertos problemas microbiológicos de la industria productiva.

Un ejemplo claro de este último supuesto, son los sistemas de desalación de osmosis inversa. Aun resultando sistemas altamente eficientes presentan problemas en su funcionamiento relacionados con la formación de biopelículas bacterianas en sus instalaciones, las cuales ralentizan o impiden el adecuado proceso de desalación. La identificación de las bacterias involucradas en la formación de estas biopelículas, así como de las sustancias que inducen la creación de estas bioincrustraciones, y los genes que las codifican, podrán dar una solución biotecnológica en un futuro.

Además, uno de los principales ejes de la microbiología ambiental es el estudio del rol de ciertos microorganismos extremófilos, siendo estos la opción más prometedora como fuentes de biomoléculas con capacidad biocatalizadora, resistentes a condiciones drásticas de procesos industriales y biotecnológicos, y cuyo uso comercial da un valor añadido a múltiples productos (p. ej. retinas artificiales, enzimas termoresistentes, etc.).

Como es bien sabido, dentro de los hábitats extremófilos, los organismos con mayor adaptabilidad a sus condiciones, y por ello, los más prevalentes en estos ambientes, son los procariotas, y en especial las arqueas, de ahí que, hayan sido propuestos como bioindicadores cuya presencia suscita la posible detección y aislamiento de productos de alto valor biotecnológico (Kassim *et al*., 2017). Los organismos pertenecientes al dominio Archaea presentan células provistas de

pared celular con lípidos de membrana diferentes a los de otras formas de vida, como son las bacterias o los eucariotas (Post & Collins, 1982; González, 2010). Además, su metabolismo, a través del uso de compuestos inorgánicos, les permite proliferar en este tipo de ambientes (DasSarma & Arora, 2001). Asimismo, mecanismos adaptativos como la fototaxis también facilitan significativamente su supervivencia (Spudich *et al.*, 1994). Todas estas características confieren a estos microorganismos de una elevada resistencia a condiciones extremas como serían altas temperaturas, contenidos en sal próximos a la saturación, altas radiaciones UV y bajas concentraciones de oxígeno, entre otras.

I.G.2 │ Metodologías de valoración de procariotas

Existen múltiples metodologías que identifican, caracterizan y/o cuantifican microorganismos procariotas. En concreto, los esquemas tradicionales de identificación fenotípica de procariotas se basan en las características «observables» de estos organismos, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas (Bou *et al.*, 2011). El cultivo, cuando es factible, continúa siendo el método estandarizado utilizado para los exámenes microbianos rutinarios, el cual permite el aislamiento y recuento de los mismos. Estos enfoques dependientes de cultivo –utilizados, aun hoy en día, por las normativas pertinentes a la calidad de aguas–, precisan de largos periodos de incubación, así como de técnicas bioquímicas de confirmación, que impiden un diagnóstico optimizado del estado de la calidad de las masas de agua (Acharya *et al*., 2019). De ahí que, la necesidad de cribados de procariotas más rápidos, sensibles y específicos, añadida a la interrupción de la biología molecular, hayan creado un afloramiento de metodologías basadas en ácidos nucleicos que permiten la obtención de valoraciones microbianas adecuadas.

La literatura científica recoge múltiples trabajos reportando resultados de metodologías tanto dependientes como independientes de cultivo de valoración cualitativa y/o cuantitativa de procariotas, así como, de análisis de la distribución espacio-temporal de las comunidades formadas por estos organismos. Como se

recoge en la Figura I.G.1, la elección de unas u otros metodologías –entre fenotípicas (algunas dependientes de cultivos) y genotípicas (independientes de cultivo)–, dependerá, a su vez, de la especificidad, acorde a la taxonomía, requerida en el estudio.

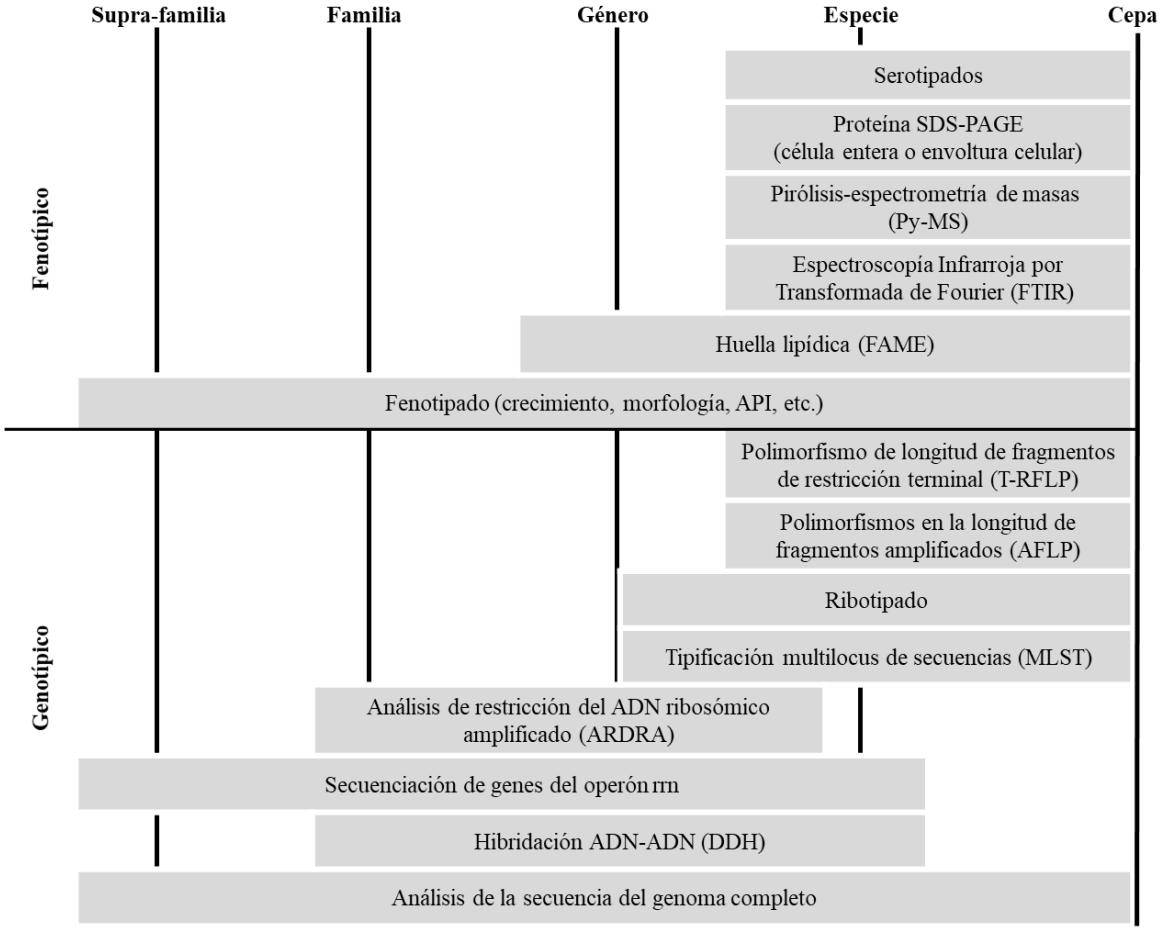


Figura I.G.1. Metodologías de caracterización de procariotas y los distintos niveles de resolución taxonómica (adaptada de Moore *et al*., 2010).

Dentro de las metodologías genotípicas podemos distinguir algunas empleadas para el estudio de las dinámicas de las comunidades de procariotas, destacando de entre ellas, el análisis de restricción del ADN ribosómico amplificado (ARDRA, *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), y el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP, *Terminal-Restriction Fragments Length Polymorphism*), y otras, como aquellas técnicas de identificación y caracterización de procariotas basadas en la secuenciación de genes del operón rrn (Figura I.G.1).

Otro de los aspectos claves de los métodos genotípicos es el empleo de marcadores moleculares específicos del taxón objetivo o *target*, de los cuales dependerá la adecuación de los resultados obtenidos.

Actualmente, la variedad de métodos moleculares desarrollados es un mundo ampliamente diverso, el cual ofrece numerosas posibilidades (Casamayor *et al.*, 2002). Dentro de este amplio abanico, la elección del método más adecuado dependerá de las preguntas a las que haya que dar respuesta y de la cantidad de muestras que haya que procesar en un periodo de tiempo razonable.

La amplia mayoría de estos métodos moleculares se basan en la reacción en cadena la polimerasa, comúnmente conocida como PCR (*Polymerase Chain Reaction*), y cuyo hallazgo en 1983, fue resultado de los estudios realizados por el químico estadounidense Kary B. Mullis (Mullis, 1990). Esta técnica molecular marcó un punto de inflexión en torno a la valoración e identificación de especies procariotas, siendo algunas de las técnicas derivadas de la PCR i) la *nested*-PCR (Arias *et al*., 1995); ii) la *multiplex* PCR (Bej *et al*., 1990); iii) el T-RFLP (Cui *et al*., 2018); iv) la PCR cuantitativa (qPCR) (Nappier *et al*., 2019); v) o las mejoras de las mismas, como sería el caso de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real y simultánea para varios genes (*multiplex* RT qPCR) (Shahraki *et al.*, 2019). Los resultados de estos trabajos, entre otros, fomentan el uso de estas técnicas tanto por su pronta diagnosis, como por su especificidad y sensibilidad en estudios de valoración de bioindicadores de calidad de aguas, y de procariotas de alto valor biotecnológico.

I.G.3 │ Marcadores moleculares de procariotas

Un marcador molecular, por definición, es un gen o secuencia de nucleótidos con una ubicación conocida en el genoma, el cual presenta, entre individuos, polimorfismos en su secuencia. La inserción, la deleción, las mutaciones puntuales, la duplicación y la translocación, son la base de estos polimorfismos (Nadeem *et al*., 2018). Así, el estudio de los polimorfismos, detecta la variabilidad

entre diferentes individuos, permitiendo caracterizar molecular y específicamente a estos microorganismos (Al-Samarai & Al-Kazaz, 2015; Khan, 2015).

Para ser propuestos como marcadores moleculares, estos genes o secuencias nucleotídicas deben i) estar distribuidos uniformemente por todo el genoma; ii) tener un grado elevado de conservación de su secuencia; iii) ser altamente reproducibles; y, iv) tener la capacidad de detectar los polimorfismos entre individuos (Schleifer, 2009; Nadeem *et al*., 2018).

Los marcadores moleculares, debido a su estabilidad y rentabilidad, son una herramienta ampliamente utilizada en diversas aplicaciones, como el mapeo genético, la valoración de la diversidad genética, o en estudios de filogenia y taxonomía (Clarridge, 2004; Adekambi *et al*., 2008; Slack *et al*., 2006; Srinivasan *et al.*, 2015). En el campo la microbiología ambiental, estos marcadores son utilizados por su capacidad de distinguir entre genotipos de diferentes taxones microbianos, a nivel de clase, familia, género, especie o cepa. Obviamente la elección del marcador dependerá del organismo *target* a identificar y caracterizar, así como de la especificidad y sensibilidad requerida en el estudio.

Entre los numerosos marcadores moleculares empleados en estudios de valoración de procariotas, nos podemos encontrar con genes conservados que participan en la traducción (p. ej. *tuf*) y la transcripción (p. ej. *rpoB*), genes codificantes de proteínas que intervienen en procesos metabólicos específicos de un tipo de taxón procarionte (p. ej. *uidA*, *lacZ* o *ybbW*), así como regiones altamente conservadas (p. ej. 16S rRNA o 23S rRNA).

En concreto, el gen *tuf*, codificante de la proteína de elongación Ef-Tu (*Elongation factor Thermo unstable*), es uno de los factores de elongación que forma parte del mecanismo de síntesis de nuevas proteínas en el ribosoma procariota (Baensch *et al*., 1998). Tanto la identidad de la secuencia de nucleótidos, como la localización genómica de este gen, están bien conservadas entre los taxones procariotas (Lathe & Bork, 2001), de ahí que, se propusiera como

un marcador universal de copia única de estos organismos (Maheux et al., 2011; Gotkowska-Płachta *et al*., 2021). Respecto al gen *rpoB*, correspondiente a la subunidad β de la ARN polimerasa (ARNp), la cual desempeña la mayor parte de la función catalítica de esta ARNp en el proceso de transcripción, tiene una distribución universal en procariotas y una extensa historia evolutiva, por ello, este marcador molecular se emplea de forma frecuente en estudios filogenéticos y taxonómicos a nivel de especie, subespecie y cepa de estos organismos (Rowland *et al*., 1993; Bocchetta *et al*., 2000; Case *et al.*, 2007; Adékambi *et al.*, 2008; Ogier *et al.*, 2019).

Un ejemplo de gen de una sola copia codificador de proteínas de procesos específicos de ciertos procariotas, es el gen *lacZ*, codificante de la enzima β-galactosidasa, la cual es responsable, en bacterias entéricas, de la escisión de la lactosa en monosacáridos (Watson *et al.*, 2006). En especial, este gen se utiliza de forma recurrente en la valoración molecular de *E. coli* a través del estudio del grupo coliformes, siendo esta especie el miembro mayoritario del mismo (Bej *et al.*, 1990; Ruqaya *et al*., 2018). Otro ejemplo, es el gen *uidA*, codificante de la enzima β-D-glucuronidasa, cuya actividad enzimática ha sido descrita específicamente para miembros de la familia Enterobacteriaceae, como *E. coli* y algunas especies del género *Shigella* (Martins *et al*., 1993; Monday *et al*., 2001; Lasalde *et al*., 2005). La especificidad de esta actividad enzimática ha promovido el uso de este gen como marcador molecular específico de *E. coli* (Martins *et al*., 1993; Silkie *et al*., 2008; Shakraki *et al*., 2019). Por último, otro gen de copia única, es el gen *ybbW*, codificador de la alantoína permeasa, descrito para *E. coli*. La alantoína es un compuesto químico utilizado por las bacterias a partir de su degradación a través de la ruta biosintética de las purinas (Cusa *et al*., 1999; Xi *et al.*, 2000; Switzer *et al*., 2020), variando su metabolismo según la especie bacteriana (Navone, 2014). Dada la especificidad de este gen, en varios trabajos se ha propuesto su uso como marcador molecular exclusivo de *E. coli* (Walker *et al*., 2017; Chevée *et al*., 2019; McQuillan & Wilson, 2019, 2021).

Aun habiéndose descrito múltiples marcadores moleculares específicos de procariotas, la mayoría de los métodos moleculares de valoración de estos organismos se basan en cebadores diseñados en los segmentos de ARNr del ribosoma procarionte, y en especial en la subunidad pequeña de este ribosoma, la región 16S rRNA.

En concreto, el ARN ribosómico (ARNr) 16S o 16S rRNA (*16S ribosomal RNA*) es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía de procariotas. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese a principios de la década de los 70.

De manera específica, el 16S rRNA se encuentra integrado en la subunidad pequeña del ribosoma procariota (dominio Archaea y Bacteria), el cual juega un papel crucial en la síntesis de proteínas (Rodicio & Mendoza, 2004). Todos los organismos vivos dependen de la misma maquinaria, lo que, desde una perspectiva evolutiva, se interpreta como un proceso y unas estructuras –responsables de dicho proceso– extremadamente conservadas (Ramazzotti & Bacci, 2018). Su propuesta como cronómetro molecular se fundamentó en estas estructuras y funciones conservadas, y, las evidencias en torno a los cambios evolutivos entre los diferentes taxones, dados entre sus secuencias de ácidos nucleicos y proteínas (Woese, 1982, 1987). De esta manera, las diferencias evolutivas entre estos nucleótidos o aminoácidos, se asumen considerándolas como cambios producidos al azar, los cuales aumentan con el tiempo de manera lineal. Por consiguiente, la comparación de las moléculas de ARNr aisladas de diferentes organismos sirve para determinar las relaciones evolutivas de todos los seres vivos (Woese *et al.*, 1990).

Las características que dieron pie a la proposición de la macromolécula 16S rRNA como cronómetro molecular definitivo (Woese, 1987), se desarrollan a continuación:

i) Se trata de una molécula con una larga historia evolutiva, presente en todas los procariotas actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación.

ii) Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.

iii) Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta como para aportar información acerca de todos los procariotas, y junto con las variaciones en las subunidades pequeñas del ribosoma de eucariotas –18S rRNA–, a lo largo de toda la escala evolutiva.

iv) Las regiones 16S rRNA contienen suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.

v) El tamaño relativamente grande del gen *16S rRNA* (1 500 pb) minimiza las fluctuaciones estadísticas.

Estructuralmente, el ribosoma procariota (Figura I.G.2A) tiene un coeficiente de sedimentación de 70S –expresado en unidades Svedberg–, y puede disociarse en dos subunidades, la subunidad grande (50S) y la subunidad pequeña (30S).

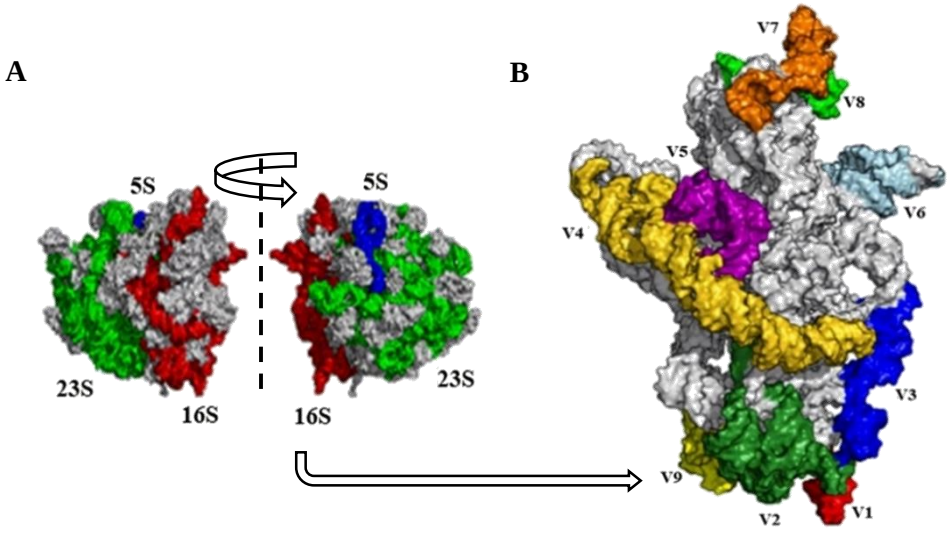


Figura I.G.2. A. Reconstrucción tridimensional del ribosoma procariota. Se muestran los lados opuestos de la estructura con sus respectivas regiones correspondientes a las dos subunidades ribosómicas: la subunidad grande 50S y la subunidad pequeña 30S. El 23S rRNA y el 5S rRNA integrados en la subunidad grande 50S, se muestran en color verde y azul, respectivamente, y la región 16S rRNA ubicada en la subunidad pequeña 30S, en color rojo; **B**. Localización de las nueve regiones hipervariables (V1-V9) en la estructura tridimensional de la región 16S rRNA. Las proteínas ribosómicas se muestran en blanco en ambos casos (adaptada de Ramazzotti & Bacci, 2018).

Cada subunidad es un complejo ribonucleoproteico constituido por proteínas ribosómicas y moléculas de ARNr específicas. En particular los ribosomas procariotas están compuestos por un 65% de ARNr y un 35% por proteínas ribosomales (Ramazzotti & Bacci, 2018). Como se muestra en la Figura I.G.2A, la subunidad 30S contiene la región 16S rRNA y 21 proteínas diferentes –S1-S21; donde S procede de *small*–, mientras que la subunidad 50S contiene las regiones 23S rRNA y 5S rRNA junto con 34 proteínas –L1-L34; L, *large*–.

La región 16S rRNA, se encuentra altamente conservada, presentando regiones comunes a todos los organismos, además, también muestra variaciones que se concentran en zonas específicas, llamadas regiones hipervariables (V1-V9) (Figuras I.G.3).

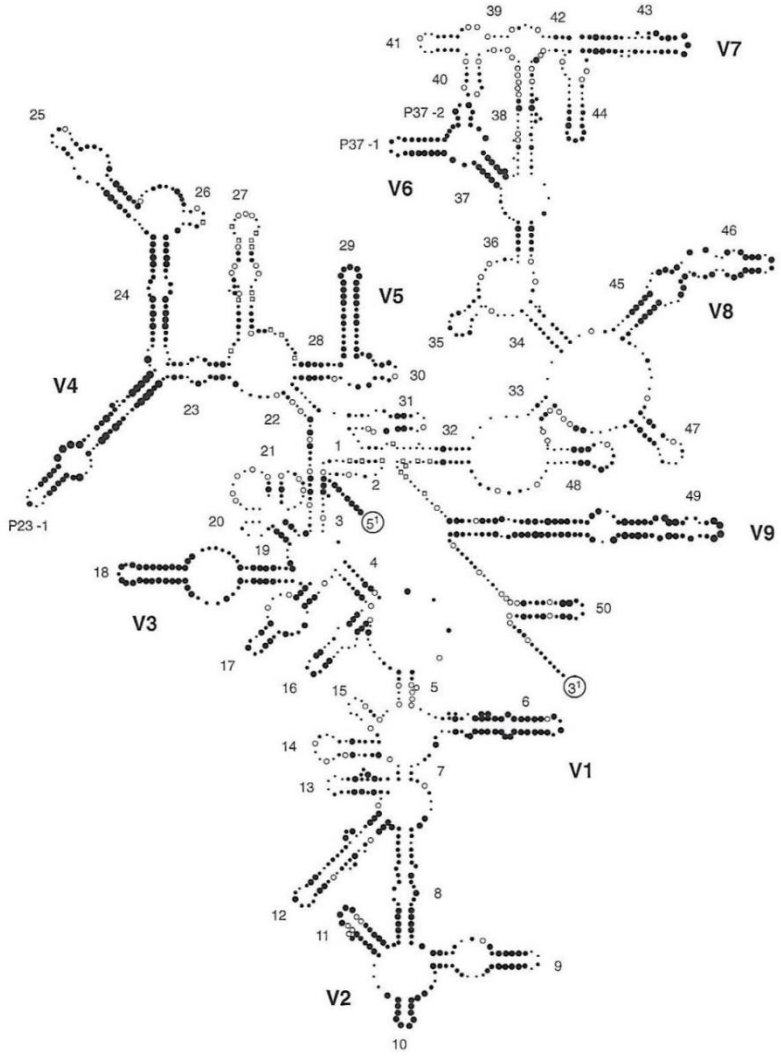


Figura I.G.3. Estructura secundaria del 16S rRNA, mostrando las nueve regiones hipervariables (V1-V9). Cada uno de los puntos representa un nucleótido y su variabilidad a través de las especies procariotas está indicada de acuerdo al incremento del tamaño del punto (se presentan 5 clases; mayor tamaño de punto, mayor variabilidad). Los sitios invariantes entre las secuencias conocidas se presentan con cuadros huecos (Neefs *et al.*, 1993).

La región 16S rRNA puede plegarse en una estructura secundaria compleja y estable, que consiste en bucles y estructuras lineales (Noller *et al*., 1985; Neefs *et al*., 1993) (Figura I.G.3). Las secuencias de algunos de los bucles están conservadas en casi todas las especies procariotas debido a las funciones esenciales que intervienen, mientras que las características de las estructuras lineales son en gran medida variables y específicas a una o más clases de procariotas (Wang & Qian, 2009). De ahí que, el estudio de esta región arroje información suficiente para poder realizar valoraciones moleculares específicas de estos organismos.

En particular, la región 16S rRNA es un polirribonucleótido de aproximadamente 1 500 nucleótidos (Figura I.G.3), cuyo gen no codificante es el gen *16S rRNA* (*16S ribosomal RNA*), también anotado como *rrs*. En los procariotas, los genes se organizan en operones, siendo estos, conjuntos de genes que se transcriben a partir de la misma región promotora (Acinas *et al*., 2004; Rodicio & Mendoza, 2004). Específicamente, el *16S rRNA* está integrado dentro del operón ribosómico rrn (Figura I.G.4), y está presente en una copia en el genoma o en múltiples –gen multicopia–, dependiendo del organismo y del estado metabólico de este –p. ej. el número medio de operones rrn de *Escherichia coli* es 7– (Klappenbach *et al*., 2000; Espejo & Plaza, 2018).

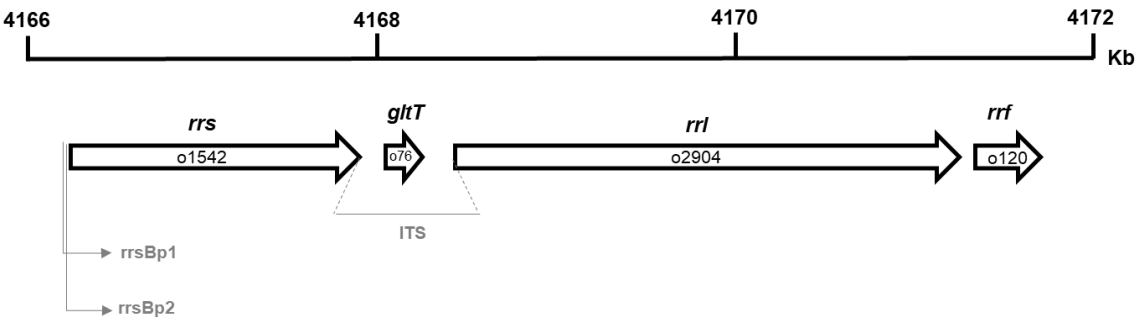


Figura I.G.4. Mapa esquemático de la organización de los genes del operón rrnB ***rrs***-*gltT*-*rrl*-*rrf* correspondiente a la cepa K-12 de *E. coli*. ITS hace referencia al espacio intergénico entre los genes no codificantes de la subunidad pequeña y grande del ribosoma (*rrs* y *rrl*, respectivamente); *gltT* o ARNt(*gltT*) es uno de los cuatro ARNt de glutamato (los ARNt son los adaptadores que permiten la síntesis de proteínas a partir de los ARNm). La línea gruesa representa el fragmento de la secuencia en el genoma. La dirección de lectura y extensión de los genes se representan por flechas abiertas y la enumeración en su interior (adaptada de la base de datos de la red reguladora de la expresión génica en la cepa K-12 de *Escherichia coli*, http://regulondb.ccg.unam.mx/; Brosius *et al.*, 1981; Takada *et al*., 2016).

Como se muestra en la Figura I.G.4 un operón rrn tipo se compone de los genes estructurales *23S rRNA* o *rrl*, *16S rRNA* o *rrs*, *5S rRNA* o *rrf*, separados por espacios intergénicos (ITS, *Internal Transcribed Spacer*), y por genes para uno o más ARN de transferencia (ARNt), además de dos promotores P1 y P2 (en la Figura I.G.4 rrsBp1 y rrsBp2, respectivamente), situados en la región anterior del gen *rrs*.

La universalidad de este gen modificó el enfoque de los estudios de determinación de procariotas. Como se evidencia en la Figura I.G.5, publicada por Valenzuela-González y colaboradores (2015), hubo un cambio en la tendencia en el depósito de secuencias del segmento *16S rRNA*, registrándose un crecimiento exponencial desde principios de la década de los 90.

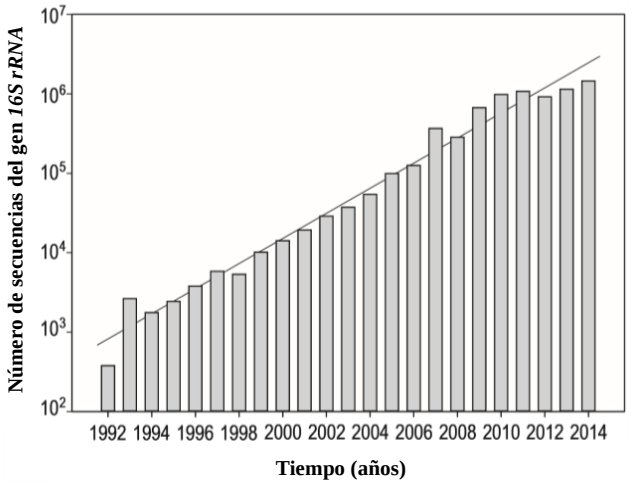


Figura I.G.5. Número de secuencias del gen registradas en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) respecto al tiempo (adaptada de Valenzuela-González *et al*., 2015).

El registro masivo de secuencias del *16S rRNA* en las bases de datos y la investigación exhaustiva que se ha llevado a cabo de este gen, y que continua en la actualidad, ha permitido obtener información conspicua de sus regiones hipervariables. Así, se ha evidenciado que la amplificación específica de unas regiones u otras permite obtener información precisa acorde al tipo de procariota estudiado, y en consecuencia al tipo de ambiente analizado, siendo unas regiones más adecuadas que otras para el estudio según la naturaleza del bioma. Un fiel

reflejo de ello es la revisión llevada a cabo por Ramazzotti & Bacci (2018), y cuyos resultados se presentan en la Figura I.G.6, donde se puede comprobar que de las nueve regiones de las que se compone el 16S rRNA, las regiones hipervariables V3 y V4 son las más extensamente utilizadas, destacando su uso en las muestras de origen fecal.

Nº Est.	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	Bioma
152	1051	1318	1331	1026	539	398	267	220	36	Suelo
37	207	245	1415	3906	169	44	20	13	15	Fecal
28	319	340	268	212	123	42	76	76	71	Agricultura
12	12	11	13	53	20	1	0	0	0	Áreas contaminadas
10	32	33	12	93	9	64	64	56	1	Pastizal
10	4	4	8	2	45	97	106	129	2	Rizosfera
10	143	143	172	1195	727	787	781	0	0	Sistema digestivo
7	12	16	12	4	1	14	14	13	0	Permafrost
7	145	244	77	40	0	0	0	0	0	Rumen
6	87	88	90	9	0	14	14	14	0	Desierto
6	1181	1614	1369	317	0	223	0	0	0	Vagina
4	5	3	2	1	0	0	0	0	0	Arena
3	35	35	21	0	0	1	1	0	0	Animales
3	0	0	0	22	4	0	0	0	0	Humedal
3	0	0	0	8	1	1	0	0	0	Taiga
3	30	28	25	4	0	0	0	0	0	Selva tropical
2	0	0	2	340	1	0	0	0	0	Agua residual
2	0	0	0	11	11	0	0	0	0	Biorreactor
2	575	575	0	2	0	0	0	0	0	Lodos activos
2	930	963	1083	13	0	0	0	0	1	Piel
2	1	1	16	45	0	0	0	0	0	Plantas
2	144	144	144	996	0	0	0	0	0	Cavidad bucal
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	Agua continental
1	0	0	0	19	0	0	0	0	0	Agua subterránea
1	31	29	7	0	0	0	0	0	0	Biorremediación
1	9	9	6	1	0	0	0	0	0	Costa
1	1	1	0	112	0	0	0	0	0	Cultivo *in vitro*
1	9	9	8	0	0	0	0	0	0	Limo
1	0	0	0	0	385	385	0	0	0	Llanura abisal
1	12	12	5	0	0	0	0	0	0	Marisma salina
1	4	4	3	0	0	0	0	0	0	Sedimento
1	0	0	2	2	0	0	0	0	0	Volcánico

Nº de Est.: Número de estudios

Figura I.G.6. Registro de número de secuencias depositadas en la base de datos *EBI Metagenomics* (https://www.ebi.ac.uk/metagenomics/), correspondientes a cada región hipervariable del gen *16S rRNA*, extraídas de estudios de valoración molecular de diversos biomas (secuencias publicadas hasta Septiembre 2016; adaptada de Ramazzotti & Bacci, 2018).

De este modo, los amplicones del gen *16S rRNA*, se han utilizado ampliamente en la identificación y clasificación de procariotas –tanto cultivables como no cultivables–, a nivel de clases, familias, géneros y hasta especies, de los dominios Archaea y Bacteria, a partir de la secuenciación selectiva de estas regiones hipervariables (Lane *et al.*, 1985; Jonasson *et al.*, 2002; Ramazzotti & Bacci, 2018).

La identificación molecular de la región completa del *16S rRNA*, así como de algunos de sus segmentos específicos acordes al dominio Archaea y Bacteria, se realiza en base a la selección de cebadores universales y específicos de dominio (Tabla I.G.2).

Tabla I.G.2. Cebadores universales y de dominio del gen *16S rRNA*.

	Target	***Primer***	**Secuencia** (5'→3')	**Referencia**	
Capítulo I	Universal	UF	GAGTTGGATCCTGGCTCAG	Cho *et al.*, 2003	
	Universal	UR	AAGGAGGGGATCCAGCC	Cho *et al.*, 2003	
	Universal	U10F	AGTTTGATCCTGGCTCAG	Heyndrickx *et al.*, 1996	
	Universal	U1507R	TACCTTGTTACGACTTCACCCCA	Heyndrickx *et al.*, 1996	
	Universal	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Bernbom *et al.*, 2011	Capítulo I.1
	Universal	1492R	TCAGGYTACCTTGTTACGACTT	Bernbom *et al.*, 2011	
Capítulo I	Dominio Bacteria	341F	CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer *et al.*, 1993	
	Dominio Bacteria	926R	CCGTCAATTCCTTTRAGTTT	Muyzer *et al.*, 1995	
	Dominio Bacteria	9F	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	Lee *et al.*, 2010	
	Dominio Bacteria	1512R	ACGGHTACCTTGTTACGACTT	Lee *et al.*, 2010	
	Dominio Bacteria	91F	TTCGGAATAACAGTTG	Lee *et al.*, 2010	
	Dominio Bacteria	1082R	CGGCTGGATCTAAGGA	Lee *et al.*, 2010	
	Dominio Bacteria	518F	CCAGCAGCGCTAATACG	Bernbom *et al.*, 2011	
	Dominio Bacteria	800R	TACCAGGGTATCTAATCC	Bernbom *et al.*, 2011	
Capítulo I.2	Dominio Bacteria	B27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Deng *et al.*, 2015	Capítulo I.1
	Dominio Bacteria	B1462R	TCCAGCCGCAGATTCCCCTAC	Deng *et al.*, 2015	
	Dominio Bacteria	B765R	CTGTTTGCTCCCCACGCTTTC	Ma *et al.*, 2004	
	Dominio Bacteria	B704F	GTAGCGGTGAAATGCGTAGA	Sy *et al.*, 2013	
	Dominio Archaea	B8F	TTGATCCTGCCGGAGGCCATTG	Deng *et al.*, 2015	
	Dominio Archaea	B22F	ATTCCGGTTGATCCTGC	Fukushima *et al.*, 2005	
	Dominio Archaea	B1521R	AGGAGGTGATCCAGCCGCAG	Fukushima *et al.*, 2005	

Esta tesis presentada bajo el título **«Evaluación molecular de bioindicadores y patógenos procariotas. Usos y aplicaciones**» está estructurada en tres capítulos, los cuales se organizan de la siguiente manera:

En el **Capítulo I,** titulado «Bioindicadores procariotas y aplicaciones», se han diseñado y validado marcadores moleculares de la región 16S rRNA grupo- y especie-específicos de procariotas de diferentes entornos y matrices. Asimismo, en este capítulo se presentan dos aplicaciones de marcadores moleculares de procariotas, reestructurándose este capítulo, en dos subcapítulos.

El **Capítulo I.1**, constituye un artículo de investigación «Garcia-Jimenez, P., Carrasco-Acosta, M., Payá, C.E., López, I.A., Rodríguez, J.R.B., Melián, J. A.H., 2019. *Composition and Molecular Identification of Bacterial Community in Seawater Desalination Plants.* Advances in Microbiology, 9(10), 863-876». Este artículo recoge el estudio de identificación de las comunidades bacterianas formadoras de biopelículas en las membranas de osmosis inversa de sistemas de desalación.

El **Capítulo I.2**, se corresponde con el trabajo «Garcia-Jimenez, P., Carrasco-Acosta, M., Hettmann, S., 2020. *Halobacterium identification in saltworks of Gran Canaria (Canary Islands, Spain).* Journal of Fisheries Science, 2(1), 9-16». Este estudio expone el primer acercamiento a la identificación de organismos procariotas predominantes en salinas costeras de Gran Canaria, caracterizados por sintetizar productos de alto valor biotecnológico.

El **Capítulo II,** se corresponde a la publicación «Carrasco-Acosta, M., Garcia-Jimenez, P., Melián, J. A.H., Peñate-Castellano, N., Rivero-Rosales, A., 2019. *The Effect of Plants on Pollutant Removal, Clogging, and Bacterial Community Structure in Palm Mulch-Based Vertical Flow Constructed Wetlands.* Sustainability, 11(3), 632», donde se expone un estudio práctico en el ámbito de calidad de aguas. En este trabajo se presenta la caracterización molecular de las poblaciones bacterianas indicadores de contaminación fecal (*Enterococcus* spp y *E. coli*) de los efluentes de los reactores de un humedal artificial de base orgánica

de tratamiento de aguas residuales domésticas, a partir de la valoración de los genes *16S rRNA* y *lacZ*, y a través de dos métodos de huella génica (ARDRA y T-RFLP), y cuyos resultados han permitido seleccionar el reactor que muestra la mayor eficiencia de retención de estos bioindicadores.

El último capítulo, **Capítulo III**, se ha desarrollado e implementado un método rápido y simultáneo de detección y quantificación de bacterias indicadoras de contaminación fecal (FIB), mediante la valoración de los genes *16S rRNA* y *ybbW*. Con este trabajo se ha logrado obtener un mayor conocimiento en torno a los episodios puntuales de contaminación por *Enterococcus* spp acontecidos, de forma intermitente, en la zona muestreada durante los últimos tres años. Este estudio ha permitido valorar el comportamiento de los dos bioindicadores por excelencia de las normativas de calidad de aguas (*Enterococcus* spp y *E. coli*). A partir de los resultados obtenidos se identifican a los sedimentos marinos como reservorio de los bioindicadores valorados. Asimismo, estos resultados ponen en valor esta metodología para el análisis rápido y sensible de FIB en aguas y sedimentos marinos. Además, la metodología desarrollada y validada fundamentará la base de trabajos futuros de trazabilidad de la contaminación por *Enterococcus* spp de origen desconocido. Los resultados más relevantes se recogen en el trabajo «Carrasco-Acosta, M., Garcia-Jimenez, P. *Detection and quantification of faecal bioindicators of marine waters and sediments from the Bay of Confital (Gran Canaria, Spain) using multiplex real-time quantitative PCR*», el cual actualmente está en proceso de redacción.

REFERENCIAS

Acharya, K., Khanal, S., Pantha, K., Amatya, N., Davenport, R. J., Werner, D., 2019. A comparative assessment of conventional and molecular methods, including MinION nanopore sequencing, for surveying water quality. Sci. Rep., 9(1), 1-11.

Acinas, S.G., Klepac-Ceraj, V., Hunt, D.E, Pharino, C., Ceraj, I., Distel, D. L., Polz., M. F., 2004. Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. Nature, 430(6999), 551-554.

Adékambi, T., Drancourt, M., Raoult, D., 2008. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. Trends Microbiol., 17(1), 37-45.

Alamanos, Y., Maipa, V., Levidiotou, S., Gessouli, E., 2000. A community waterborne outbreak of gastro-enteritis attributed to *Shigella sonnei*. Epidemiol. Infect., 125(3), 499-503.

Al-Samarai, F.R., Al-Kazaz, A.A., 2015. Molecular markers: An introduction and applications. Eur. J. Mol. Biotechnol., (3), 118-130.

Arias, C.R., Garay, E., Aznar, R., 1995. Nested PCR method for rapid and sensitive detection of *Vibrio vulnificus* in fish, sediments, and water. Appl. Environ. Microbiol., 61(9), 3476-3478.

Atlas, R.M., Bartha, R., 2005. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Pearson Education, S.A., Madrid, pp. 677.

Baensch, M., Frank, R., Köhl, J., 1998. Conservation of the amino-terminal epitope of elongation factor Tu in Eubacteria and Archaea. Microbiol., 144(8), 2241-2246.

Barton, L.L., McLean, R.J., 2019. Environmental Microbiology and Microbial Ecology. John Wiley & Sons, UK, pp. 445.

Behzadi, P., Behzadi, E., Ranjbar, R., 2015. Urinary tract infections and *Candida albicans*. Cent. European J. Urol., 68(1), 96.

Bej, A.K., Steffan, R.J., DiCesare, J., Haff, L., Atlas, R.M., 1990. Detection of Coliform Bacteria in Water by Polymoerase Chain Reaction and Gene Probes. Appl. Environ. Microbiol., 56(2), 307-314.

Bernbom, N., Ng, Y.Y., Kjelleberg, S., Harder, T., Gram, L., 2011. Marine Bacteria from Danish Coastal Waters Show Antifouling Activity against the Marine Fouling Bacterium *Pseudoalteromonas sp*. Strain S91 and Zoospores of the Green Alga *Ulva australis* Independent of Bacteriocidal Activity. Appl. Environ. Microbiol., 77(24), 8557-8567.

Bloem, J., Breure, A.M., 2003. Microbial indicator. En *Bioindicators and biomonitors*, Eds. Markert, B. A., Breure, A.M., Zechmeister, H.G. Elsevier, Ámsterdam, pp. 259-282.

Bocchetta, M., Gribaldo, S., Sanangelantoni, A., Cammarano, P., 2000. Phylogenetic depth of the bacterial genera *Aquifex* and *Thermotoga* inferred from analysis of ribosomal protein, elongation factor, and RNA polymerase subunit sequences. J. Mol. Evol., 50(4), 366-380.

Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J.A., Valdezate, S., 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin., 29(8), 601-608.

Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D., Noller, H.F., 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol., 148(2), 107-127.

Casamayor, E.O., Massana, R., Benlloch, S., Øvreås, L., Díez, B., Goddard, V.J., Gasol, J.M., Joint, I., Rodríguez-Valera, F., Pedrós-Alió, C., 2002. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. Environ. Microbiol., 4(6), 338-348.

Case, R.J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W.F., Kjelleberg, S., 2007. Use of *16S rRNA* and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. Appl. Environ. Microbiol., 73(1), 278-288.

Chevée, V., Sachar, U., Yadav, S., Heryanto, C., Eleftherianos, I., 2019. The peptidoglycan recognition protein PGRP-LE regulates the *Drosophila immune* response against the pathogen *Photorhabdus*. Microb. Pathog., 136, 103664.

Cho, H.B., Lee, J.K., Choi, Y.K., 2003. The Genetic Diversity Analysis of the Bacterial Community in Groundwater by Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). J. Microbiol., 41(4), 327-334.

Clarridge, J.E., 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Clin. Microbiol. Rev., 17(4), 840-62.

Cloete, T.E., Rose, J.B., Nel, L.H., Ford, T., 2004. Microbial waterborne pathogens. Eds., Iwa publishing, Londres, pp. 231.

Cloud, J.L., Carroll, K.C., Pixton, P., Erali, M., Hillyard, D.R., 2000. Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. J. Clin. Microbiol., 38(5), 1709-1712.

Cogliati, M., Zani, A., Rickerts, V., McCormick, I., Desnos-Ollivier, M., Velegraki, A., Escandon, P., Ichikawa, T., Ikeda, R., Bienvenu, A.L., Tintelnot, K., Tore, O., Akcaglar, S., Lockhart, S., Tortorano, A.M., Varma, A., 2016. Multilocus sequence typing analysis reveals that *Cryptococcus neoformans var. neoformans* is a recombinant population. Fungal Genet. Biol., 87, 22-29.

Cowan, M.J., Talaro, K.P., 2009. Microbiology: A Systems Approach. McGraw-Hill, NY, pp. 869.

Cui, B., Luo, J., Jin, D., Jin, B., Zhuang, X., Bai, Z., 2018. Investigating the bacterial community and amoebae population in rural domestic wastewater reclamation for irrigation. J. Environ. Sci., 70, 97-105.

Cusa, E., Obradors, N., Baldomà, L., Badía, J., Aguilar, J., 1999. Genetic analysis of a chromosomal region containing genes required for assimilation of allantoin nitrogen and linked glyoxylate metabolism in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 181(24), 7479-7484.

DasSarma, S., Arora, P., 2001. Halophiles. Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing Group, 1-9.

Deng, Y., Xu, G., Sui., L., 2015. Isolation and characterization of halophilic bacteria and archaea from salt ponds in Hangu Saltworks, Tianjin, China. Chin. J. Oceanol. Limn., 33(4). 862-868.

Denning, D.W., O'Driscoll, B.R., Hogaboam, C.M., Bowyer, P., Niven, R.M., 2006. The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence. Eur. Res. J., 27(3), 615-626.

Detoni, A.M.S., Costa, L.D.F., Pacheco, L.A., Yunes, J.S., 2016. Toxic *Trichodesmium* bloom occurrence in the southwestern South Atlantic Ocean. Toxicon, 110, 51-55.

Elfadaly, H.A., Hassanain, N.A., Hassanain, M.A., Barakat, A.M., Shaapan, R.M., 2018. Evaluation of primitive ground water supplies as a risk factor for the development of major waterborne zoonosis in Egyptian children living in rural areas. J. Infect. Pub. Health, 11(2), 203-208.

Espejo, R. T., Plaza, N., 2018. Multiple ribosomal RNA operons in bacteria; their concerted evolution and potential consequences on the rate of evolution of their 16S rRNA. Front. Microbiol., 9, 1232.

Friedman, M., Henika, P.R., Mandrell, R.E., 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. J. Food Prot., 65(10), 1545-1560.

Fukushima, T., Mizuki, T., Echigo, A., Inoue, A., Usami, R., 2005. Organic solvent tolerance of halophilic α-amylase from a Haloarchaeon, *Haloarcula sp*. strain S-1. Extremophiles, 9(1), 85-89.

Furness, B.W., Beach, M.J., Roberts, J.M., 2000. Giardiasis surveillance–United States, 1992–1997. MMWR CDC Surveill. Summ., 49(7), 1-13.

Gerba, C.P., 2009. Indicator microorganisms. En *Environmental microbiology*. Academic Press. pp. 485-499.

González, A., 2010. Lípidos polares de arqueas halófilas: elaboración y estudio de arqueosomas como sistema de vehiculización de antioxidantes naturales obtenidos de alpeorujo. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, pp. 212.

Gotkowska-Płachta, A., 2021. The Prevalence of Virulent and Multidrug-Resistant *Enterococci* in River Water and in Treated and Untreated Municipal and Hospital Wastewater. Int. J. Environ. Res. Pub. Health, 18(2), 563.

Guerrero-Latorre, L., Carratala, A., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., Hundesa, A., Girones, R., 2011. Occurrence of water-borne enteric viruses in two settlements based in Eastern Chad: analysis of hepatitis E virus, hepatitis A virus and human adenovirus in water sources. J. Water Health, 9(3), 515-524.

Hageskal, G., Lima, N., Skaar, I., 2009. The study of fungi in drinking water. Mycol. Res., 113(2), 165-172.

Heyndrickx, M., Vauterin, L., Vandamme, P., Kersters, K., De Vos, P., 1996. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. J. Microbiol. Methods, 26(3), 247-259.

Hopkins, R.S., Giradi, L.S., Turney, E.A., 1996. Relationship between *Helicobacter pylori* eradication and reduces duodenal and gastric ulcer recurrence: a review. Gastroenterol., 110(4), 1244-1252.

Hussain, T., Walizada, K., Khan, T., Khan, R., Mushtaq, Z., 2020. *Ascaris lumbricoides* Infestation as an Unexpected Cause of Acute Pancreatitis. Cureus, 12(12), e12103.

Islam, M.S., Hassan-uz-Zaman, M., Islam, M.S., Clemens, J.D., Ahmed, N., 2020. Emerging waterborne pathogens in the context of climate change: *Vibrio cholerae* as a case study. En *Waterborne Pathogens,* Butterworth-Heinemann, UK, pp. 1-14.

Jonasson, J., Olofsson, M., Monstein, H.J., 2002. Classification, identification and subtyping of bacteria based on pyrosequencing and signature matching of 16S rDNA fragments. Apmis, 110(3), 263-272.

Joseph, S.W., 1996. *Aeromonas* gastrointestinal disease: a case study in causation? En *The Genus Aeromonas,* Eds., Austin, B., Wiley, Londres, pp. 311-335.

Josephon, S.L., 1987. Toxoplasmosis. Clin. Microb. News, 9(21), 165-168.

Kassim, M.A., Hashim, N.H.F., Yusof, N.A., 2017. Archaea Domain as Biocatalyst in Environmental Biotechnology and Industrial Applications: A Review. J. Adv. Microbiol., 5(2), 1-21.

Kerzaon, I., Grovel, O., Du Pont, T.R., Le Pape, P., Pouchus, Y.F., 2008. Effects of seawater on growth and gliotoxin excretion of marine strains of *Aspergillus fumigatus* Fres. Toxicon, 51(3), 398-405.

Khan, F., 2015. Molecular markers: an excellent tool for genetic analysis. J. Mol. Biomark. Diagn., 6(03), 233.

Kiu, R., Hall, L.J., 2018. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. Emerg. Microbes Infect., 7(1), 1-15.

Klappenbach, J.A., Dunbar, J.M., Schmidt, T.M., 2000. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 66(4), 1328-1333.

Lai, H., Hales, S., Woodward, A., Walker, C., Marks, E., Pillai, A., Chen, R.X., Morton, S.M., 2020. Effects of heavy rainfall on waterborne disease hospitalizations among young children in wet and dry areas of New Zealand. Environ. Int., 145, 106136.

Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R., 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc. Natl. Acad. Sci., 82(20), 6955-6959.

Lasalde, C., Rodriguez, R., Toranzos, G.A., Smith, H.H., 2005. Heterogeneity of *uidA* gene in environmental *Escherichia coli* populations. J. Water Health, 3(3), 297-304.

Lathe, W.C., Bork, P., 2001. Evolution of tuf genes: ancient duplication, differential loss and gene conversion. FEBS Lett., 502(3), 113-116.

Layton, B.A., Walters, S.P., Lam, L.H., Boehm, A.B., 2010. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. J. Appl. Microbiol., 109(2), 539-547.

Lee, J.W., Ren, X., Yu, H.W., Kim, S.J., Kim, I.S., 2010. Membrane biofouling of seawater reverse osmosis initiated by sporogenic *Bacillus* strain. Environ. Engin. Res., 15(3), 141-147.

Lee, S.H., Levy, D.A., Craun, G.F., Beach, M.J., Calderon, R.L., 2002. Surveillance for waterborne-disease outbreaks-United States, 1999-2000. Morb. Mortal. Wkly. Rep., 51(8), 1-47.

Lopman, B., Vennema, H., Kohli, E., Pothier, P., Sanchez, A., Negredo, A., Buesa, J., Scheier, E., Gray, J., Gallimore, C., Bottiger, B., Hedlund, K.O., Torvén, M., Bonsdorff, C.H., Manuala, L., Kjell-Olof, M.D., Poljsak-Prijatelj, M., Zimsek, J., Reuter, G., Szüsc, G., Melegh, B., Svennson, L., Duijnhoven, Y., Koopmans, M., Reacher, M., Brown, D., Iturriza, M., 2004. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. The Lancet, 363(9410), 682-688.

Ma, Y., Zhang, W., Xue, Y., Zhou, P., Ventosa, A., Grant, W.D., 2004. Bacterial diversity of the Inner Mongolian Baer Soda Lake as revealed by 16S rRNA gene sequence analyses. Extremophiles, 8(1), 45-51.

Magana-Arachchi, D.N., Wanigatunge, R.P., 2020. Ubiquitous waterborne pathogens. En *Waterborne Pathogens*, Eds., Narasimha, M., Prasa, P., Butterworth-Heinemann, UK, pp. 15-42.

Maheux, A.F., Bissonnette, L., Boissinot, M., Bernier, J.L.T., Huppé, V., Picard, F.J., Bérubé, E., Bergeron, M.G, 2011. Rapid concentration and molecular enrichment approach for sensitive detection of *Escherichia coli* and *Shigella* species in potable water samples. Appl. Environ. Microbiol., 77(17), 6199-6207.

Mankiewicz-Boczek, J., Nałęcz-Jawecki, G., Drobniewska, A., Kaza, M., Sumorok, B., Izydorczyk, K., Zalewski, M., Sawicki, J., 2008. Application of a microbiotests battery for complete toxicity assessment of rivers. Ecotoxicol. Environ. Saf., 71(3), 830-836.

Martins, M.T., Rivera, I.G., Clark, D.L., Stewart, M.H., Wolfe, R.L., Olson, B.H., 1993. Distribution of *uidA* gene sequences in *Escherichia coli* isolates in water sources and comparison with the expression of b-glucuronidase activity in 4-methylumbelliferyl-b-D-glucuronide media. Appl. Environ. Microbiol. 59(7), 2271-2276.

McQuillan, J.S., Wilson, M.W., 2019. 'Ready Mixed', improved nucleic acid amplification assays for the detection of *Escherichia coli* DNA and RNA. J. Microbiol. Methods, 165, 105721.

McQuillan, J.S., Wilson, M.W., 2021. Recombinase polymerase amplification for fast, selective, DNA-based detection of faecal indicator *Escherichia coli*. Lett. Appl. Microbiol., 72(4), 382-389.

Miller, W.G., Padhye, A.A., van Bonn, W., Jensen, E., Brandt, M.E., Ridgway, S.H., 2002. Cryptococcosis in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J. Clin. Microbiol., 40(2), 721-724.

Monday, S.R., Whittam, T.S., Feng, P.C.H., 2001. Genetic and evolutionary analysis of mutations in the *gusA* gene that cause the absence of b-Glucuronidase activity in *Escherichia coli* O157:H7. J. Infect. Dis., 184(7), 918-921.

Moore, E.R., Mihaylova, S.A., Vandamme, P., Krichevsky, M.I., Dijkshoorn, L., 2010. Microbial systematics and taxonomy: Relevance for a microbial commons. Res. Microbiol. 161(6), 430-438.

Mullis, K.B., 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci. Am., 262(4), 56-65.

Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. App. Environ. Microbiol., 59(3), 695-700.

Muyzer, G., Teske, A., Wirsen, C.O., Jannasch, H.W., 1995. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. Arch. Microbiol., 164(3), 165-172.

Nadeem, M.A., Nawaz, M.A., Shahid, M.Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Comertpay, G., Yildiz, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Özkan, H., Chung, G., Baloch, F.S., 2018. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. Biotechnol. Biotechnol. Equip., 32(2), 261-285.

Nappier, S.P., Ichida, A., Jaglo, K., Haugland, R., Jones, K.R., 2019. Advancements in mitigating interference in quantitative polymerase chain reaction (qPCR) for microbial water quality monitoring. Sci. Total Environ., 671, 732-740.

Navone, L., 2014. Metabolismo de alantoína en *Streptomyces coelicolor*: relación entre metabolismo primario y secundario. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, pp. 173.

Neefs, J.M., Van der Peer, Y., De Rijk, P., Chapelle, S., de Wachter, R., 1993. Compilation of small ribosomal subunit RNA structure. Nucleic Acid. Res., 21(13), 3025-3049.

Nkamga, V.D., Henrissat, B., Drancourt, M., 2017. Archaea: essential inhabitants of the human digestive microbiota. Hum. Microbiome J., 3, 1-8.

Noller, H.F., Stolk, B.J.V., Moazed, D., Douthwaite, S., Gutell, R.R., 1985. Studies on the structure and function of 16S ribosomal RNA using structure-specific chemical probes. J. Biosci., 8(3), 747–755.

Ogier, J. C., Pagès, S., Galan, M., Barret, M., & Gaudriault, S., 2019. *rpoB*, a promising marker for analyzing the diversity of bacterial communities by amplicon sequencing. BMC Microbiol., 19(1), 1-16.

Osborne, N.J., Webb, P.M., Shaw, G.R., 2001. The toxins of *Lyngbya majuscula* and their human and ecological health effects. Environ. Int., 27(5), 381-392.

Ottuso, P., 2013. Aquatic dermatology: encounters with the denizens of the deep (and not so deep)–a review. Part II: the vertebrates, single-celled organisms, and aquatic biotoxins. Int. J. Dermatol., 52(3), 268-278.

Percival, S.L., Chalmers, R., Embrey, M., Hunter, P.R., Sellwood, J., Wyn-Jones, P., 2004. Microbiology of waterborne diseases. Elsevier Academic Press, Londres, pp. 480.

Post, F.J., Collins, N.F., 1982. A preliminary investigation of the membrane lipid of *Halobacterium halobium* as a food additive. J. Food Biochem., 6(1), 25-38.

Prodjinotho, U.F., Lema, J., Lacorcia, M., Schmidt, V., Vejzagic, N., Sikasunge, C., Ngowi, B., Winkler, A.S., Prazeres da Costa, C., 2020. Host immune responses during *Taenia solium* Neurocysticercosis infection and treatment. PLoS Negl. Trop. Dis., 14(4), e0008005.

Ramazzotti, M., Bacci, G., 2018. 16S rRNA-Based taxonomy profiling in the metagenomics era. En *Metagenomics. Perpectives, methods and applications.* Ed. Nagarajan, M. Academic Press, Paises Bajos, Ámsterdam, pp. 103-119.

Riedel, T.M., Thulsiraj, V., Zimmer-Faust, A.G., Dagit, R., Krug, J., Hanley, K.T., Adamek, K., Ebentier, D.L., Torres, R., Cobian, U., Peterson, S., Jay, G.A., 2015. Long-term monitoring of molecular markers can distinguish different seasonal patterns of fecal indicating bacteria sources. Water Res., 71, 227-243.

Rita, D.P., Valeria, V., Silvia, B.M., Pasquale, G., Milena, B., 2014. Microcystin contamination in sea mussel farms from the italian southern adriatic coast following cyanobacterial blooms in an artificial reservoir. J. Ecosystems, 2014, 1-12.

Rodicio, M.R., Mendoza, M.C., 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin., 22(4), 238-245.

Rowland, G.C., Aboshkiwa, M., Coleman, G., 1993. Comparative sequence analysis and predicted phylogeny of the DNA-dependent RNA polymerase beta subunits of *Staphylococcus aureus* and other eubacteria. Biochem. Soc. Trans. 21, 40S.

Ruqaya, M.A., Al-Mawla, Y.H., Jebor, M.A., 2018. Molecular differentiation between *Shigella* and *Escherichia coli* using PCR Technique. Int. J. Pharm. Sci. Res., 10(2), 276-277.

Sabry, M., Abd El-Moein, K., Hamza, E., Abdel Kader, F., 2016. Occurrence of *Clostridium perfringens* types A, E, and C in fresh fish and its public health significance. J. Food Prot., 79(6), 994-1000.

Sato, M.O., Sato, M., Yanagida, T., Waikagul, J., Pongvongsa, T., Sako, Y., Sanguankiat, S., Yoonuan, Kounnavang, S., Kawai, A., Ito, A., Okamoto, M., Moji, K., 2018. *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Taenia asiatica*, their hybrids and other helminthic infections occurring in a neglected tropical diseases' highly endemic area in Lao PDR. PLoS Negl. Trop. Dis., 12(2), e0006260.

Schleifer, K.H., 2009. Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. Syst. Appl. Microbiol., 32(8), 533-542.

Shahraki, A.H., Heath, D., Chaganti, S.R., 2019. Recreational water monitoring: Nanofluidic qRT-PCR chip for assessing beach water safety. Environ. DNA, 1(4), 305-315.

Sharma, S., Sachdeva, P., Virdi, J.S., 2003. Emerging water-borne pathogens. Appl. Microbiol. Biotechnol., 61(5), 424-428.

Silkie, S.S., Tolcher, M.P., Nelson, K.L., 2008. Reagent decontamination to eliminate false-positives in *Escherichia coli* qPCR. *J. Microbiol. Methods*, *72*(3), 275-282.

Slack, A.T., Symonds, M.L., Dohnt, M.F., Smythe, L.D., 2006. Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. BMC Microbiol. 6(1), 1-10.

Spudich, J.L., 1994. Protein-protein interaction converts a proton pump into a sensory receptor. Cell, 79(5), 747-750.

Srinivasan, R., Karaoz, U., Volegova, M., MacKichan, J., Kato-Maeda, M., Miller, S., Nadarajan, R., Brodie, E.L., Lynch, S.V., 2015. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. PloS ONE, 10(2), e0117617.

Stewart, J.R., Fleming, L.E., Fleisher, J.M., Abdelzaher, A.M., Lyons, M.M., 2011. Waterborne pathogens. En *Marine Pollution and Human Health*. Ed. Hester, R.E., Royal Society of Chemistry, Londres, pp. 25-67.

Sumampouw, O.J., Risjani, Y., 2014. Bacteria as indicators of environmental pollution: Review. J. Ecosystem, 4(6), 251-258.

Switzer, A., Burchell, L., McQuail, J., Wigneshweraraj, S., 2020. The adaptive response to long-term nitrogen starvation in *Escherichia coli* requires the breakdown of allantoin. J. Bacteriol., 202(17), e00172-20.

Sy, J., Kumar, A., Shouche, Y.S., Sulochana, M.B., 2013. Culturable diversity of extremely halophilic bacteria from west coast of karnataka, india jayachandra sy, anil kumar s, shouche ys 2 and sulochana mb. Int. J. Biol. Pharm. Allied Sci., 2(2), 391-405.

Takada, H., Shimada, T., Dey, D., Quyyum, M.Z., Nakano, M., Ishiguro, A., Yoshida, H., Tamamoto, K., Sen, R., Ishihama, A., 2016. Differential Regulation of rRNA and tRNA Transcription from the rRNA-tRNA Composite Operon in *Escherichia coli*. PloS ONE, 11(12), e0163057.

Temesgen, T.T., Robertson, L.J., Tysnes, K.R., 2019. A novel multiplex real-time PCR for the detection of *Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii*, and *Cyclospora cayetanensis* on berries. Food Res. Int., 125, 108636.

Testai, E., Scardala, S., Vichi, S., Buratti, F. M., Funari, E., 2016. Risk to human health associated with the environmental occurrence of cyanobacterial neurotoxic alkaloids anatoxins and saxitoxins. Crit. Rev. Toxicol., 46(5), 385-419.

Tzipori, S., Griffiths, J.K., 1998. Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. Adv. Parasitol., 40, 5-36.

Ufnar, J.A., Wang, S.Y., Christiansen, J.M., Yampara-Iquise, H., Carson, C A., Ellender, R.D., 2006. Detection of the nifH gene of *Methanobrevibacter smithii*: a potential tool to identify sewage pollution in recreational waters. J. Appl. Microbiol., 101(1), 44-52.

Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., Vargas-Albores, F., 2015. The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. Cien. Mar., 41(4), 297-313.

Wade, T.J., Sams, E., Brenner, K.P., Haugland, R., Chern, E., Beach, Wymer, L., Rankin, C.C., Love, D., Qualin, L., Noble, R., Dufour, A., 2010. Rapidly measured indicators of recreational water quality and swimming-associated illness at marine beaches: a prospective cohort study. Environ. Health, 9(1), 66.

Walker, D.I., McQuillan, J., Taiwo, M., Parks, R., Stenton, C. A., Morgan, H., Lees, D. N., 2017. A highly specific *Escherichia coli* qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters. Water Res., 126, 101-110.

Walker, J.T., 2018. The influence of climate change on waterborne disease and *Legionella*: a review. Perspect. Public Health, 138(5), 282-286.

Wang, Y., Qian, P.Y., 2009. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. PloS ONE, 4(10).

Warris, A., Gaustad, P., Meis, J.F.G.M., Voss, A., Verweij, P.E., Abrahamsen, T.G., 2001. Recovery of filamentous fungi from water in a paediatric bone marrow transplantation unit. J. Hosp. Infect. 47(2), 143-148.

Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., Losick, R., 2006. Biología molecular del gen. Médica Panamericana, Madrid, pp.742.

Williams, D.E., Dawe, S.C., Kent, M.L., Andersen, R.J., Craig, M., Holmes, C.F., 1997. Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus edulis*, and *in vivo* evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues. Toxicon, 35(11), 1617-1625.

Woese, C.R., 1982. Archaebacteria and cellular origins: an overview. Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie, 3(1), 1-17.

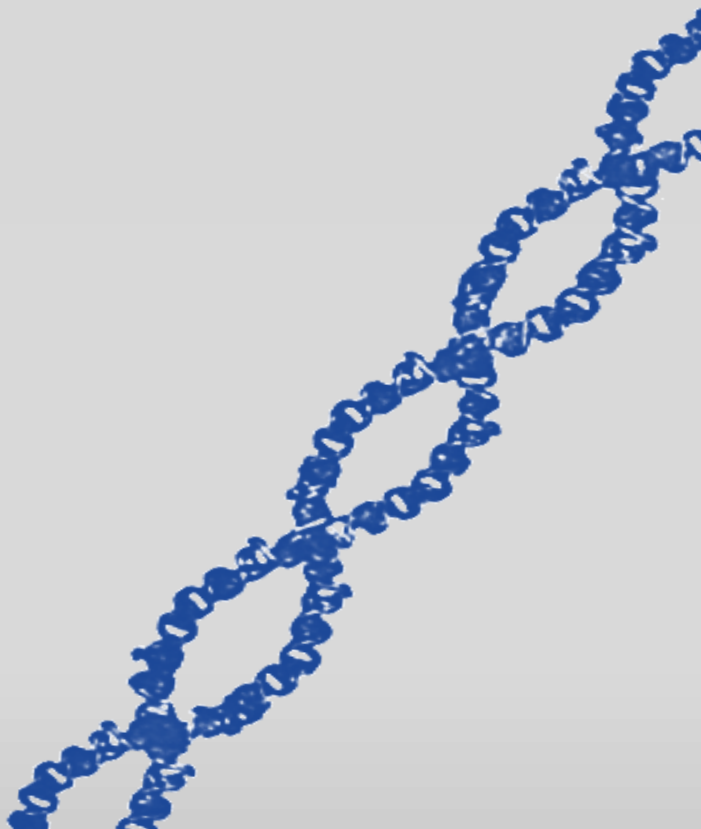
Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev., 51(2), 221–271.

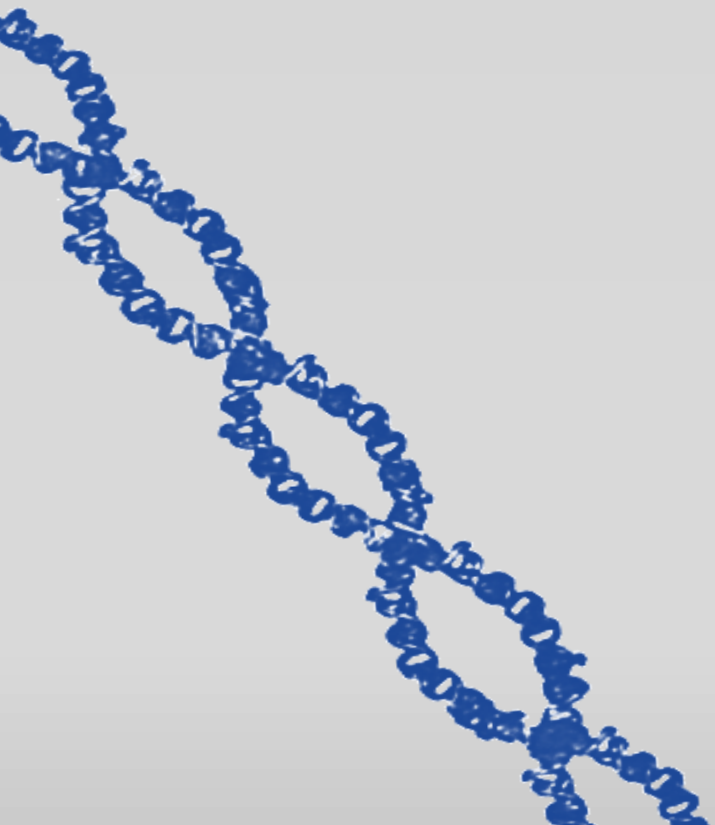
Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. PNAS, 87(12), 4576-4579.

Xi, H., Schneider, B.L., Reitzer, L., 2000. Purine catabolism in *Escherichia coli* and function of xanthine dehydrogenase in purine salvage. J. Bacteriol., 182(19),5332-5341.

CAPÍTULO I

Bioindicadores procariotas y aplicaciones





Capítulo I

Bioindicadores procariotas y aplicaciones

I.1 │ INTRODUCCIÓN

La literatura en torno a la calidad de las aguas es amplia y abarca una multitud de ámbitos de aplicación que van desde las aguas de consumo (Rusiñol *et al.*, 2020), al tratamiento y regeneración de las aguas residuales (Costán-Longares *et al*., 2008), o al estudio de la calidad de las aguas recreacionales continentales (Crosby *et al*., 2019) y marinas (Sagarduy *et al*., 2019).

Particularmente, los bioindicadores y patógenos bacterianos utilizados en la determinación de la calidad de las masas de agua de diversa naturaleza, se clasifican en dos amplios grupos catalogados según el origen de la contaminación a valorar: bacterias bioindicadoras de contaminación fecal y bacterias oportunistas capaces de desarrollarse en ambientes acuáticos.

I.1.1 │ Normativa en materia de calidad de aguas

La valoración de la calidad de las aguas, mediante el uso de bioindicadores y patógenos bacterianos de origen fecal u oportunistas, ha ido evolucionado acorde a las evidencias científicas aportadas a lo largo del tiempo.

A nivel mundial, desde la década de los 50, numerosos estudios han examinado la relación entre la calidad de las aguas y los diagnósticos clínicos de los usuarios de las mismas. Muchos de estos estudios evidenciaron un aumento del riesgo de contraer enfermedades hídricas por parte de los usuarios de aguas contaminadas, cuyo deterioro en la salubridad de estas aguas, en gran medida, venía derivado de la presencia de agentes bacterianos (Wade *et al.*, 2003).

La utilización de unos bioindicadores u otros se ha ido modificando acorde a la información epidemiológica disponible, así como a los avances en las técnicas de valoración de estos microorganismos indicadores.

En un principio, a través de la información epidemiológica recopilada durante años, se seleccionaron los diferentes bioindicadores incluidos en las normativas pertinentes a la gestión de la calidad de las aguas de los países desarrollados.

Cronológicamente, y desde una perspectiva mundial, a partir del 1976, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA o US EPA, *United States Environmental Protection Agency*), mediante la normativa llamada «Ley de agua limpia» (CWA, *Clean Water Act*), ha utilizado las bacterias indicadoras de materia fecal para detectar la contaminación por aguas residuales en masas de aguas recreativas y de consumo, a fin de proteger al público de los patógenos transmitidos por el agua (EPA, 1976; NRC, 2004; EPA, 2015).

Por otro lado, a nivel comunitario, la Unión Europea legisló varias directivas relativas a la calidad de aguas, definidas a partir de la década de los 70. Estas son: la Directiva 76/160/CE del Consejo de las Comunidades Europeas, del 8 de diciembre de 1975, relativa a la calidad de las aguas de baño; la Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas; o, la Directiva 2006/7/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea, de 15 de febrero de 2006, relativa a la gestión de la calidad de las aguas de baño, y, por la que se deroga la Directiva 76/160/CEE.

Respecto a los principales parámetros microbiológicos, los primeros incluidos en la Directiva 76/160/CEE, relativa a la calidad de las aguas de baño, eran los organismos indicadores: coliformes totales y los coliformes fecales. Con las evidencias aportadas, en el transcurso de los años, por investigaciones internacionales, los parámetros utilizados para establecer estas normas se revisaron y racionalizaron, centrándose en los indicadores microbiológicos más robustos, en lo que respecta a la protección de la salud pública.

Esta revisión exhaustiva de la nueva directiva sobre la gestión de las aguas de baño (2006/7/CE), actualmente en vigor, basada en las pruebas científicas disponibles –reportadas por estudios epidemiológicos realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en colaboración con institutos de salud de Alemania, Francia y los Países Bajos (EEA, 2005)–, modificó tanto los parámetros microbiológicos recogidos en la misma, como sus estándares –rangos guía y de obligado cumplimiento de concentración de los bioindicadores–.

Así, se eliminaron parámetros microbiológicos como los coliformes totales y los enterovirus, acorde a las evidencias aportadas por esas pruebas científicas, donde se determinó su no adecuación para la valoración de calidad de aguas de baño. Específicamente, la Directiva 2006/7/CE reduce el número de parámetros microbiológicos de la anterior –de 5 a 2 parámetros microbiológicos fundamentales (*Escherichia coli* y *Enterococos intestinales*) (Tabla I.1)–, y además, requiere de una inspección visual de la floración de algas.

Esta decisión se tomó en base a estudios como el realizado por Kay y colaboradores (1994), los cuales a partir de trabajos epidemiológicos llevados a cabo con usuarios de aguas recreacionales infirieron que, el grupo *Streptococcus faecalis*, actuales *Enterococcus intestinales*, no causaban síntomas gastrointestinales en bañistas, y que podían considerarse como bioindicadores más adecuados en materia de la calidad de aguas que los tradicionales recuentos de coliformes. Además, en este trabajo los autores ya sugerían que las normas relativas a la calidad de las aguas de baño debían revisarse teniendo en cuenta estas conclusiones.

En la línea de los resultados de Kay y colaboradores, trabajos como el de Prüss (1998), cuyo objetivo se centró en una revisión de los datos epidemiológicos asociados al uso de las aguas de baño, concluyó que el grupo bacteriano de *Streptococcus faecalis* era el bioindicador más apropiado para determinar el riesgo para la salud derivado de la exposición a masas de aguas de origen marino y aguas continentales de recreo. Además, en este trabajo también se aportó información relativa a la especie bacteriana entérica *Escherichia coli*, determinándose que su

utilización como indicador podía predecir la incidencia de enfermedades hídricas derivadas de la exposición a aguas recreativas.

Todos estos estudios también suscitaron cambios en las normativas norteamericanas. La EPA en 2012, tal y como señala Miller-Perce & Rhoads (2019), recomendó el uso de los *Enterococcus* spp como indicadores de presencia de patógenos, dado que coexisten con una multitud de patógenos humanos conocidos, siendo, por ende, microorganismos que indican el potencial de la ocurrencia de enfermedades infecciosas humanas.

Tabla I.1. Requisitos de calidad de las aguas de baño recogidos en el Anexo de la Directiva 76/160/CEE relativa a la calidad de las aguas de baño.

Parámetro microbiológico	**G**[a]	**I**[b]	**Método de análisis o de inspección**
Coliformes totales (CT) $100mL^{-1}$	500	10 000	Fermentación en tubos múltiples. Inoculación de los tubos positivos a medio de confirmación. Recuento con arreglo al número más probable (NMP)
Coliformes fecales (CF) $100mL^{-1}$	100	2 000	Filtración en membrana y cultivo en un medio apropiado (p. ej., gelosa lacteosada con tergitol, gelosa de Endo o caldo con teepol 0,4%), traspaso e identificación de las colonias sospechosas. Para CT y CF, las temperaturas de incubación son variables, según se busquen los CT o los CF.
Streptococcus faecalis $100mL^{-1}$ [c]	100	-	Método de Litsky Recuento con arreglo al número más probable (NMP) Filtración en membrana. Cultivo en un medio apropiado
Salmonella spp $1L^{-1}$	-	0	Concentración por filtración en membrana. Inoculación en medio tipo. Enriquecimiento, traspaso a gelosa de aislamiento e identificación.
Enterovirus PFU $10mL^{-1}$	-	0	Concentración por filtración, por floculación o por centrifugación y confirmación.

[a] Estándar guía (UFC)
[b] Estándar de cumplimiento obligatorio (UFC)
[c] Actualmente clasificados taxonómicamente como *Enterococcus intestinales*

Con lo expuesto, se entiende que los resultados, aportados durante la década de los 90, incentivaron los cambios relacionados con los parámetros microbiológicos a valorar en el ámbito de calidad de aguas. Todo ello representó un esfuerzo de diseño de nuevas normativas, dirigido por la OMS, y, con la participación de científicos gubernamentales y académicos de varias nacionalidades.

De ahí que, a nivel comunitario, los nuevos bioindicadores bacterianos a valorar, a partir de la implementación de la Directiva 2006/7/CE fueron: *Escherichia coli* para sustituir el parámetro de coliformes fecales, y, *Enterococcus intestinales* para suplir al grupo *Streptococcus faecalis*. De manera específica, y debido a esta modificación, la Directiva 2006/7/CE, sólo utiliza dos parámetros bacteriológicos, pero establece una norma sanitaria más elevada, basada en estándares más restrictivos que la Directiva 76/160/CE.

A nivel estatal la transposición de las Directivas 2000/60/CE y 2006/7/CE, entre otras, definió las diversas normativas españolas en materia de calidad de aguas, recogiéndose las mismas en el Código de Aguas. Dentro de este código se encuentran normativas pertinentes a i) el dominio público hidráulico; ii) las demarcaciones y planificación hidrográfica; así como, iii) la calidad de las aguas.

Dentro del ámbito de aplicación de calidad de aguas se encuentran tres Reales Decretos claves en materia de regulación de las mismas. En concreto, las normativas: Real Decreto 1341/2007, de 11 de octubre, sobre la gestión de la calidad de las aguas de baño; Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano; y, el Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas, vertebran la legislación pertinente a la gestión de masas de agua cuya calidad debe de ser monitorizada con el objetivo de velar por la salud pública. Dicha monitorización conlleva la valoración, y obligado cumplimiento de los estándares, de cada uno los parámetros microbiológicos definidos en las normativas mencionadas, siendo los mismos los recogidos en las Tabla I.2 y I.3.

Tabla I.2. Parámetros microbiológicos (bacterias coliformes y *Escherichia coli*) recogidos en los Reales Decretos pertinentes al ámbito de calidad de aguas RD 1341/2007, RD 140/2003, y RD 1620/2007.

Normativa / **Parámetro microbiológico**	**RD 1341/2007**[a] Estándar (UFC o NMP 100 mL^{-1})	**RD 140/2007**[b] Estándar (UFC o NMP 100 mL^{-1})	**RD 1620/2007**[c] Estándar (UFC o NMP 100 mL^{-1})	**Método de análisis de referencia**
Bacterias coliformes (Coliformes totales)	-	0	-	· UNE-EN ISO 9308-1. Recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes. Parte 1: Método de filtración por membrana para aguas con bajo contenido de microbiota. · UNE-EN ISO 9308-2. Recuento de *Escherichia coli* y bacterias coliformes. Parte 2: Método del número más probable. · Métodos alternativos contemplados en la Orden SCO/778/2009. Empleo de medios cromogénicos.
Escherichia coli	Aguas continentales Calidad suficiente[**]: 900 Calidad buena[*]: 1.000 Calidad excelente[*]: 500 Aguas costeras y de transición Calidad suficiente[**]: 500 Calidad buena[*]: 500 Calidad excelente[*]: 250	0	0-10 000[***]	· UNE-EN ISO 9308-1 Recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes. Parte 1: Método de filtración por membrana para aguas con bajo contenido de microbiota. · UNE-EN ISO 9308-2. Recuento de *Escherichia coli* y bacterias coliformes. Parte 2: Método del número más probable. · UNE-EN ISO 9308-3. Detección y recuento de *Escherichia coli* y bacterias coliformes. Parte 3: Método miniaturizado (NMP) para la detección y recuento de *E. coli* en aguas superficiales y aguas residuales. · Métodos alternativos contemplados en la Orden SCO/778/2009. Empleo de medios cromogénicos. · Recuento de *Escherichia Coli* mediante β–glucuronidasa positiva.

- No se contempla en la normativa
[a] Real Decreto sobre la gestión de la calidad de las aguas de baño
[b] Real Decreto por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano
[c] Real Decreto por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas
[*] Con arreglo a la evaluación del percentil 95 recogida en el Anexo II del RD 1341/2007
[**] Con arreglo a la evaluación del percentil 90 recogida en el Anexo II del RD 1341/2007
[***] Rango de concentraciones donde se contemplan los doce usos del agua previstos en esta normativa

Tabla I.3. Parámetros microbiológicos (*Enterococcus intestinales, Clostridium perfringens, Legionella* spp, y, *Salmonella* spp) recogidos en los Reales Decretos pertinentes al ámbito de calidad de aguas RD 1341/2007, RD 140/2003, y RD 1620/2007.

Normativa / **Parámetro microbiológico**	**RD 1341/2007**[a] Estándar (UFC o NMP/100 mL)	**RD 140/2007**[b] Estándar (UFC o NMP/100 mL)	**RD 1620/2007**[c] Estándar (UFC o NMP/1 L^{-1})	**Método de análisis de referencia**
Enterococcus intestinales	Aguas continentales Calidad suficiente**: 330 Calidad buena*: 400 Calidad excelente*: 200 Aguas costeras y de transición Calidad suficiente**: 185 Calidad buena*: 200 Calidad excelente*: 100	0	-	· UNE-EN ISO 7899-1. Detección y recuento de *Enterococos intestinales*. Número más probable. · UNE-EN ISO 7899-2. Detección y recuento de *Enterococos intestinales*. Por filtración de membrana
Clostridium perfringens (incluidas las esporas)	-	0	-	· UNE-EN ISO 14189. Recuento de *Clostridium perfringens*. Método de filtración en membrana.
***Legionella* spp**	-	-	0-1 000***	· UNE-EN ISO 11731 parte 1: 1998 Calidad del Agua. Detección y enumeración de *Legionella.*
***Salmonella* spp**	-	-	0	· No especificado

- No se contempla en la normativa
[a] Real Decreto sobre la gestión de la calidad de las aguas de baño
[b] Real Decreto por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano
[c] Real Decreto por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas
* Con arreglo a la evaluación del percentil 95 recogida en el Anexo II del RD 1341/2007
** Con arreglo a la evaluación del percentil 90 recogida en el Anexo II del RD 1341/2007
*** Rango de concentraciones donde se contemplan los doce usos del agua previstos en esta normativa

I.1.2 │ Bacterias indicadoras de contaminación fecal

El primer gran grupo, bacterias indicadoras de contaminación fecal (FIB, *Faecal Indicator Bacteria*), está constituido por las denominadas bacterias entéricas.

La etimología de «enterobacterias», o bacterias entéricas, tiene su origen en el término griego enter(o)- ἔντερον, cuyo significado es «intestino», y, el término de mismo origen baktēr-i(o)- βακτήρ-ιον, cuyo significado es «bastoncito». En concreto, la etimología describe el origen de este grupo bacteriano, dado que son bacterias típicas de la flora intestinal de los animales. Fundamentalmente, el grupo de bacterias entéricas se constituye por especies de la familia Enterobacteriaceae.

Los bioindicadores bacterianos por antonomasia dentro de la familia Enterobaceriaceae son aquellas especies incluidas en el grupo de coliformes totales, coliformes fecales, y, concretamente, la especie representativa de ambos grupos, *Escherichia coli*, considerada la especie bacteriana bioindicadora diana, por su versatilidad, y por su amplia empleabilidad en una gran variedad de ámbitos de uso.

Genéricamente, esta amplia familia de bacilos gram negativos, anaerobios o aerobios facultativos, incluye numerosas especies, algunas de ellas –*Shigella* spp, varios serotipos del género *Salmonella*, y, algunas especies integrantes del género *Yersinia*– se consideran patógenos primarios del ser humano. Otras como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Citrobacter* spp, *Enterobacter* spp, etc., forman parte de la microbiota normal, comportándose en ocasiones como patógenos oportunistas (Fariñas & Martínez-Martínez, 2013).

I.1.2.1 Coliformes Totales y Fecales

Los coliformes totales (CT) comprenden varios géneros de la familia Enterobacteriaceae, siendo los mismos: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia* y *Klebsiella.* Comúnmente se encuentran en plantas y suelos, así como en el tracto intestinal de una amplia gama de especies animales, incluyendo los humanos. La presencia de bacterias coliformes totales es un indicio de

contaminación microbiana reciente provocada por aguas negras u otro tipo de desechos en descomposición. Generalmente, las bacterias CT se encuentran en mayor abundancia en la capa superficial del agua o en los sedimentos del fondo (Munn, 2004).

Cabe aclarar que los coliformes totales no son específicos de contaminación fecal *sensu stricto*, excepto el género *Escherichia*, siendo este el mayor representante del grupo CT.

Uno de los aspectos restrictivos del uso del grupo de CT, como bioindicador, radica en la capacidad, de ciertas especies integrantes del mismo, de multiplicarse en ambientes acuáticos (Madigan *et al.*, 1997). Como consecuencia, en la literatura científica y en las herramientas reguladoras, no se encuentra el grupo coliformes como bioindicador, sino el grupo bacteriano de coliformes fecales (CF). Las CF están presentes, casi exclusivamente, en las heces de animales de sangre caliente y se considera que reflejan mejor la presencia de contaminación fecal. Se ha reportado que, aproximadamente el 95% del grupo de los coliformes fecales, está formado por *E. coli* y ciertas especies de *Klebsiella*, así como, del género *Citrobacter*, en menor medida (Percival *et al.*, 2004).

I.1.2.2. Escherichia coli

La especie bacteriana *Escherichia coli* fue descrita por el bacteriólogo alemán Theodor Escherich, a partir del aislamiento de esta bacteria de morfología bacilar en muestras clínicas infantiles de origen fecal.

Estos bacilos son fermentadores de glucosa y lactosa, con producción de ácido y gas, móviles, gram negativos, y su tamaño está comprendido entre 2-6 µm de largo, por 1,1-1,5 µm de ancho (Percival *et al.*, 2004). Además, toleran temperaturas altas, característica que les permite diferenciarlas de otros coliformes (Cloete *et al*., 2004).

La distribución de estos bacilos en el ambiente está determinada por ser saprófitos y anaerobios facultativos típicos de la flora gastrointestinal de animales,

incluyendo al ser humano. Por ser un habitante regular del tracto intestinal de animales, se usa, desde hace un siglo, como el indicador por excelencia de contaminación reciente con materia fecal de los ambientes (Chevremont *et al*., 2012).

De manera específica, en materia de calidad de aguas, *E. coli* se encuentra comúnmente en las aguas residuales y otras fuentes de contaminación fecal (Gerba, 2000). En definitiva, esta bacteria entérica es considerada un bioindicador cuya presencia en ambientes acuáticos puede determinar una contaminación microbiana de origen fecal.

I.1.2.3. Salmonella spp

Como se ha señalado anteriormente, el género *Salmonella,* integrante de la familia Enterobacteriaceae, se considera patógeno primario del ser humano, es decir, es capaz de vencer los mecanismos de defensa de un hospedador sano e iniciar una patología. Debido a su impacto en la salud pública, son varias las normativas que legislan el uso de esta bacteria entérica como bioindicadora de calidad de ciertas masas de agua.

De manera general, las especies de *Salmonella* son bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, provistos de flagelos perítricos. La mayoría de las especies integrantes son bacterias móviles productoras de ácido sulfhídrico. Los tamaños que presentan en promedio son 2-5 µm de largo por 0,8-1,5 µm de ancho (Percival *et al*., 2004).

Este género, concretamente la especie *Salmonella choleraesuis*, se aisló por primera vez de un espécimen porcino, por Theoblad Smith y Daniel Elmer Salmon, patólogo cuyo apellido dio nombre al género (Cloete *et al*., 2004). Estas especies bacilares provocan patologías zoonóticas. La trasmisión se da entre animales y humanos, haciendo que los humanos infectados desechen a estos patógenos a través de las excreciones fecales (Chiang *et al*., 2006). Su importancia en materia

de calidad de aguas radica en la capacidad de estas bacterias en adherirse a superficies y formar biopelículas (Yang *et al.,* 2017).

I.1.2.4. Enterococcus intestinales

Otro integrante de las FIB es el grupo de *Enterococcus intestinales*. Este grupo se considera en realidad un conjunto de especies del género *Enterococcus* de origen fecal. La etimología del género *Enterococcus*, compuesta por el término griego enter(o)- ἔντερον «intestino», y el término del mismo origen kokk(o)- κόκκος «grano», describe la morfología de estas bacterias «bacteria redondeada», así como su naturaleza.

Estas bacterias gram positivas pertenecientes a la familia Enterococcaceae son anaerobias facultativas y pueden encontrarse aisladas, en parejas o en cadenas cortas, estando su tamaño comprendido entre 0,5-1 μm de diámetro.

Este grupo habita en el tracto gastrointestinal humano y de animales en general. *Enterococcus intestinalis* se encuentra en altas concentraciones en las heces humanas, generalmente entre 10^4 y 10^6 células bacterianas g^{-1} peso húmedo de materia fecal (Slanetz & Bartley, 1957; Zubrzycki & Spaulding, 1962; Layton *et al*., 2010). No obstante, este grupo bacteriano suele representar menos del 1% de la flora intestinal (Tendolkar *et al*., 2003), encontrándose presente en el consorcio fecal, y siendo superado en número por otras tipologías bacterianas, incluida la especie *Escherichia coli* (Zubrzycki & Spaulding, 1962). En concreto, la concentración de *Enterococcus intestinales* en las heces humanas es, generalmente, alrededor de un orden de magnitud menor que del bioindicador *E. coli* (Layton *et al*., 2010).

Las especies de este grupo son relativamente tolerantes al cloruro sódico y al pH alcalino, siendo resistentes a la desecación y a la cloración (Percival *et al*., 2004). Por ende, presentan importantes ventajas respecto al uso de coliformes totales y fecales, así como de *E. coli*, por su mayor supervivencia en el ambiente, y en especial, en ambientes marinos (Rodrigues & Cunha, 2017).

Cabe destacar que, no hay un consenso unánime por parte de la comunidad científica en cuanto a la definición de los límites para el grupo bacteriano *Enterococcus intestinalis* de naturaleza antropogénica. Según Leclerc y colaboradores (1996), esto es consecuencia de la falta de información relativa al hospedador de cada una de las especies integrantes de este grupo. A pesar de ello, la investigación en torno a esta cuestión está ayudando a definir algunas de las verdaderas especies fecales del género *Enterococcus* (Leclerc *et al*., 1996; Boehm & Sassoubre, 2014; Tedim *et al*., 2015; Erdem *et al.*, 2019). Por ejemplo, dos de las especies del género *Enterococcus*, sí han sido ampliamente descritas en la bibliografía como predominantes del tracto gastrointestinal humano: *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* (Nallapareddy *et al.*, 2005; Galloway-Peña *et al*., 2012; Palmer *et al*., 2012; Qin *et al*., 2012). En concreto, se ha resportado que *Enterococcus faecalis* es la especie que mejor representa este grupo bioindicador (Converse *et al.*, 2009; Erdem *et al.*, 2019).

I.1.2.5. Clostridium perfringens

Clostridium perfringens, anteriormente conocida como *Bacillus welchi* (Hassan *et al*., 2015), en honor al patólogo y bacteriólogo William Henry Welch, es una bacteria bacilar de la familia Clostridiaceae. Se caracterizada por ser gram positiva y anaeróbica estricta. Esta especie bacteriana fue aislada por primera vez en el año 1891, y se identificó como el agente etiológico causal de la gangrena gaseosa.

Este bacilo presenta unas medidas aproximadas de 3-8 µm de largo por 0,4-1,2 µm de ancho, y se puede encontrar de forma individual, en cadenas o en pequeñas agrupaciones.

Se localiza en el tracto gastrointestinal de animales homeotermos, incluido el ser humano (Sathish & Swaminathan, 2008). En el tracto gastrointestinal puede comportarse como un agente patógeno induciendo enfermedades entéricas y sistemáticas en el hospedador infectado, a partir de la producción de toxinas (Kiu & Hall, 2018).

Además, esta especie bacteriana es capaz de formar esporas extremadamente resilientes a los químicos tóxicos y a los estresores medioambientales, como la radiación ultravioleta (UV) y las altas temperaturas (Petit *et al.*, 1999; Paredes-Sabja *et al.*, 2008; Hassan *et al.*, 2015). Como resultado, *Clostridium perfringens* se encuentra en diversos ambientes, incluyendo suelos, masas de aguas continentales y marinas, así como aguas residuales, indicando su presencia una contaminación fecal remanente. Estas características permiten la monitorización de esta especie bacteriana y proveen a los órganos gestores de una excelente herramienta para el control y vigilancia de las masas de agua (Garrido-Pérez *et al.*, 2008).

Por consiguiente, *Clostridium perfringens* se incluye en el grupo de bacterias de control de calidad de aguas para la vigilancia de la contaminación fecal, en especial de aguas de consumo, dado que su monitorización es de suma importancia por ser uno de los principales patógenos transmitidos por las aguas (McClane, 2003).

I.1.3 | Bacterias oportunistas capaces de desarrollarse en ambientes acuáticos

Ciertas bacterias oportunistas pueden tener acceso al medio acuático, y en ocasiones, sobrevivir en estos ambientes. Incluso estos grupos bacterianos pueden ser capaces de multiplicarse en aguas con bajos niveles de nutrientes orgánicos (Cloete *et al*., 2004). Otras bacterias típicas de hábitats acuáticos pueden ser patógenos oportunistas para los seres humanos, siendo los más importantes entre ellas, los grupos bacterianos *Legionella* spp, *Aeromonas* spp y la especie *Pseudomonas aeruginosa*. A continuación, se presenta el género bacteriano integrante de este grupo con mayor impacto en la salud pública reportado hasta la actualidad: *Legionella* spp. De manera específica, el género *Legionella* incluye especies que comprometen la salubridad de algunos tipos de masas de agua. En consecuencia, dicho género está recogido en las regulaciones pertinentes a calidad de aguas, a diferencia de las otras dos tipologías bacterianas mencionados: *Aeromonas* y *Pseudomonas aeruginosa*.

I.1.3.1. Legionella spp

Las especies bacterianas pertenecientes al género *Legionella* son gram negativas, catalasa positiva y no reducen nitrato. Están caracterizadas por poseer forma de vara, así como, por no formar esporas. Las células de *Legionella* spp, en formas libres, presentan medidas aproximadas de 0,3-0,9 µm de largo por 1-3 µm de ancho (Rodgers *et al.*, 1978).

El género *Legionella*, y concretamente la especie *Legionella pneumophila*, se descubrió en 1976 a raíz de un brote epidémico de neumonía detectado durante la 58º Convención de la Legión Americana en Filadelfia (EE. UU.), de ahí el nombre otorgado al género (*Legionella*). A lo largo de los siguientes años, *L. pneumophila* fue identificada como el agente etiológico de varios brotes epidémicos de patologías similares (Schlenk *et al*., 1993; Percival *et al*., 2004).

La especie *Legionella pneumophila*, y otras especies afines, son habitantes comunes de los ambientes acuáticos naturales y de los suministros de agua (States *et al.*, 1990), y normalmente están presentes en bajas concentraciones. Suelen encontrarse, por lo general, en lagos, ríos, arroyos, aguas termales y otros sistemas hídricos, siendo a nivel mundial, uno de los agentes etiológicos más comunes de enfermedades hídricas (Cloud *et al.*, 2000).

La recurrencia de los brotes epidemiológicos provocados por *Legionella* spp viene dada por sus vías de trasmisión, siendo la más remarcable, la transmisión por aerosoles que contienen estos microorganismos. En consecuencia, *Legionella* spp es uno de los bioindicadores incluidos en las normativas pertinentes a la gestión de la calidad de ciertas masas de agua, como son las aguas depuradas reutilizadas.

I.1.4 │ Métodos convencionales de valoración de calidad de aguas

Los métodos convencionales aprobados para la detección de los microorganismos bioindicadores consisten en técnicas de fermentación multi-tubo (MTF), filtración por membrana (MF), y técnicas que utilizan medios y condiciones de incubación específicas (Tabla I.2 y I.3). Estos métodos presentan limitaciones, tales como la

duración de la incubación, la interferencia de organismos que actúan antagónicamente, la escasez de especificidad, la mala detección de organismos de crecimiento lento o la no detección de microorganismos viables pero no cultivables (VBNC) (Rompré *et al*., 2002).

Las técnicas convencionales validan la determinación de microorganismos por análisis de replicados o análisis de muestras mediante diluciones seriadas a partir de una suspensión stock o cultivo primario del organismo problema. La valoración se resuelve contando colonias (UFC, Unidades Formadoras de Colonias) en medios de cultivo generalistas (24 horas), para posteriormente ser confirmados en medios específicos atendiendo al tipo de microorganismos que crece (otras 24 horas) (Dufour *et al*., 1977; Cabelli *et al*., 1982, 1983; Cheung *et al*., 1990).

Debe tenerse en cuenta que los dos bioindicadores por excelencia en materia de calidad de aguas, *E. coli* y *Enterococcus intestinalis*, una vez introducidos en el medio acuático pueden entrar en un estado latente, es decir, mantienen cierta actividad metabólica, capacidad infecciosa y potencial de patogenicidad, pero no son cultivables (Kapuscinski & Mitchell, 1981). De esta manera, según Rozen & Belkin (2001), la capacidad de formar colonias en un medio sólido es la primera capacidad que pierden estos dos bioindicadores en el agua de mar.

Para reducir estos tiempos de cultivo se ha integrado a nivel europeo, la utilización de medios cromogénicos (Tabla I.2 y I.3), los cuales introducen la ventaja de utilizar un solo medio de cultivo para la identificación de un organismo en concreto. No obstante, los cromogénicos tienen la desventaja de ser costosos y de no reducir el tiempo de diagnóstico de manera significativa (arrojan resultados en tiempos comprendidos entre 24-48 horas). Ahora bien, no todos los diagnósticos se pueden proporcionar a las 24-48 horas, debido a que no todos los géneros de bacterias presentan ritmos rápidos de crecimiento o simplemente su cultivo se hace imposible bajo condiciones estándar.

Esta limitación metodológica se contrapone a la adecuada praxis a la hora de valorar y controlar la calidad de las aguas. Una adecuada práctica requiere un

diagnóstico rápido y activo del estado de salubridad de las masas de agua para gestionar, informar y actuar de forma óptima. De ahí, que los nuevos estudios se estén traduciendo a nivel europeo en la búsqueda de nuevas metodologías de diagnóstico adecuadas para su implementación en las normativas pertinentes a este ámbito.

Cabe recalcar que, en el mencionado Real Decreto 1341/2007, se incluyen especificaciones de carácter científico-técnico, siendo destacable, desde este punto de vista, la disposición final segunda que «faculta a los Ministerios de Sanidad y Consumo y de Medio Ambiente para modificar los anexos de este real decreto según los avances de los conocimientos científicos y técnicos, y adaptarlos a las modificaciones introducidas por la normativa comunitaria». Esta disposición se entiende como una invitación a la búsqueda y optimización de metodologías más eficientes, las cuales permitan desarrollar sistemas de alerta temprana de diagnóstico rápido. Dicha búsqueda se basa en la limitación metodológica que compromete el *savoir faire* en materia de calidad de aguas, considerándose la principal desventaja el tiempo de diagnóstico de los análisis de referencia recogidos en las normativas actuales. Este hecho ha impulsado que muchos autores señalen la necesidad de mejora de las metodologías empleadas en la valoración de calidad de aguas (Garrido-Pérez *et al*., 2008; Layton *et al*., 2010; Bramburger *et al*, 2015; Sagarduy *et al*., 2019; Shahraki *et al.*, 2019; Rusiñol *et al*., 2020).

I.1.5 | Avances en las metodologías de valoración de calidad de aguas

Los avances biotecnológicos ofrecen nuevas oportunidades para valorar la contaminación fecal del agua de manera más rápida (Haugland *et al.*, 2005; Crosby *et al*., 2019; Sagarduy *et al*., 2019; Rusiñol *et al*., 2020). A diferencia de los métodos utilizados actualmente, basados en el crecimiento bacteriano y la actividad metabólica, estas nuevas metodologías miden directamente los ácidos nucleicos –ácido desoxirribonucleico, ADN, o ácido ribonucleico, ARN– de los microorganismos problema, en un corto periodo de tiempo.

La reducción del tiempo de diagnóstico es tal, que la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) recomendó el uso de los métodos moleculares para la valoración y control de FIB en sus playas (Verhougstraete *et al*., 2015). Concretamente, la EPA ha desarrollado un nuevo método molecular estándar, *Method 1611: Enterococci in Water by TaqMan® Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) Assay*. Este método describe una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR, *quantitative Polymerase Chain Reaction*), a través de la cual se detecta el ADN procedente de bacterias del género *Enterococcus* en matrices de ambiente marino. Este método se basa en la amplificación y detección específica de los *Enterococci* a partir de la región grande del ribosoma procariota (23s rRNA). El ensayo TaqMan® específico para *Enterococcus* spp, recogido en el método 1611, está constituido por un *primer* con orientación *forward* y otro con orientación *reverse*, más una sonda de hidrólisis formato TaqMan® (Tabla I.4).

La EPA destaca la ventaja de este método frente a las metodologías de cultivo aceptadas y recogidas en las normativas pertinentes, haciendo especial hincapié en la rapidez con la cual se diagnostica el estado de la calidad de la masa de agua, obteniéndose resultados a las 3-4 h, frente a las 24-48 h mencionadas para los métodos convencionales.

Tabla I.4. Ensayo TaqMan® específico de *Enterococcus* spp (juego de *primers* y sonda de hidrólisis de la región 23S rRNA utilizados en el Método 1611 (*Method 1611*, EPA, 2012).

Primer	**Secuencia** (5'→3')	**Referencia**
F[a]	GAGAAATTCCAAACGAACTTG	Ludwig & Heinz, 2000
R[b]	CAGTGCTCTACCTCCATCATT	
Sonda TaqMan®	[6-FAM]-TGGTTCTCTCCGAAATAGCTTTAGGGCTA-TAMRA	

[a] *primer* con orientación *forward;* [b] *primer* con orientación *reverse*

La implantación de las técnicas moleculares es una alternativa excelente en los estudios de determinación microbiológica. Por un lado, favorece una alta especificidad para identificar de manera precisa a un tipo de organismo o cepa, dado que, se identifica una parte de su genoma. Por otro lado, aporta sensibilidad

debido a que se pueden detectar niveles de organismos insignificantes en un periodo de tiempo muy corto, y así predecir su efecto sobre la salud ambiental y/o pública. Es evidente que todo ello permite pronosticar una hipotética situación de alerta y señalar fehacientemente los límites de detección de estos microorganismos, en vez de esperar por un dudoso o tardío diagnóstico.

Por consiguiente, la implementación de técnicas moleculares en materia de la calidad de aguas, por una parte, permitirá la mejora de las tecnologías de vigilancia y de la regulación de las aguas, y, por otra parte, junto con los esfuerzos de remediación de las masas aguas residuales, guiados por métodos adecuados de seguimiento de las fuentes de contaminación, mejorará la salud ambiental y pública, así como las oportunidades de recreación y el bienestar económico (Shahraki *et al*., 2019).

Actualmente, la variedad de los métodos moleculares desarrollados para la detección, tanto específica como sensible, de organismos procariotas es un mundo ampliamente diverso, el cual ofrece numerosas posibilidades en materia de calidad de aguas. No obstante, aunque su implementación es prometedora, la convalidación entre las unidades de medida utilizadas en los métodos convencionales –UFC 100 mL^{-1} de muestra, en métodos de cultivo–, normalizadas en los laboratorios acreditados, y las proporcionadas por los resultados derivados de metodologías moleculares –copias del gen diana o ng de ADN 100 mL^{-1}, en métodos moleculares de cuantificación como la qPCR–, entraña ciertas barreras en su implementación. Por ello, los esfuerzos actuales de la comunidad científica se centran en métodos moleculares de cuantificación de diagnóstico rápido, con unidades de medidas estandarizadas y fáciles de manejar.

Como ya hemos avanzado, la mayoría de los métodos moleculares dirigidos a la caracterización de organismos procariotas se basan en la subunidad pequeña del ribosoma de procariotas (16S rRNA). Esta región del 16S rRNA está ampliamente conservada y contiene nueve regiones hipervariables (V1-V9), cuyo estudio comparativo permite la identificación diferencial de procariotas de interés. La secuenciación selectiva de las regiones hipervariables de los segmentos del 16S

rRNA se ha utilizado para la identificación diferencial de clases, familias, géneros y hasta especies de los dominios Archaea y Bacteria (Lane *et al*., 1985; Jonasson *et al*., 2002; Bartlett & Stirling, 2003; Huse *et al*., 2008). De ahí, que sea crítico el uso de cebadores apropiados de cada región para llevar a cabo la amplificación, dado que de lo contrario se darían amplificaciones inespecíficas (Wang & Qian, 2009; Guo *et al*., 2013; Ramazzotti & Bacci, 2018). Varios autores recomendaron la validación de todos los cebadores utilizados de forma generalizada, ya que pueden no ser idóneos para la valoración molecular de un pequeño grupo de bacterias (Baker *et al.* 2003; Huws *et al*., 2007; Teske & Sorensen, 2007; Wang & Qian, 2009).

La hipótesis de este trabajo es que el diseño y desarrollo de juegos de *primers* del gen *16S rRNA* específicos de bioindicadores y patógenos bacterianos de interés en materia de calidad de aguas, facilita una herramienta ágil y sensible para la pronta y sensible identificación de estos microorganismos.

El objetivo principal de este capítulo se centra en el diseño y validación de cebadores específicos para los bioindicadores y patógenos de interés en materia de calidad de aguas de baño (*Escherichia coli* y *Enterococcus intestinalis*) y gestión de aguas residuales reutilizables (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp y *Legionella* spp) mediante el uso del marcador molecular *16S rRNA* y procedimientos de biología molecular.

I.2 │MATERIAL Y MÉTODOS

I.2.1│ Diseño de cebadores específicos para los bioindicadores y patógenos bacterianos utilizados en la valoración de calidad de aguas

La valoración molecular de los indicadores bacterianos de contaminación fecal (FIB) en muestras ambientales, *E. coli* y *Enterococcus intestinalis*, así como, de las bacterias patógenas pertinentes a las normativas de calidad de aguas, *Salmonella* spp y *Legionella* spp, requirió del diseño de cebadores específicos. El diseño se llevó a cabo mediante la consecución de los siguientes pasos i) cultivo de las cepas puras de referencia; ii) aislamiento del ADN de las cepas puras; iii) valoración de la integridad y cuantificación del ADN; y, iv) diseño de juegos de cebadores del gen *16S rRNA* específicos de los bioindicadores y patógenos bacterianos mediante herramientas bioinformáticas.

I.2.1.1. Cepas de referencia y condiciones de cultivo

Para este estudio se seleccionaron cepas puras de la especie *E. coli* (WDCM 00012 *Escherichia coli*), del grupo bacteriano *Enterococcus intestinalis* (WDCM 00009 *Enterococcus faecalis*), del género *Legionella* (WDCM 00205 *Legionella pneumophila subsp. pneumophila*), y, del género *Salmonella* (WDCM 00030 *Salmonella enterica subsp. enterica*). Las cepas fueron suministradas por la Colección Española de Cultivo Tipo de la Universidad de Valencia (CECT). Todas ellas están catalogadas como cepas de referencia a utilizar en controles de calidad regulados por diferentes normas ISO (Tabla I.5).

Para la realización de los cultivos de las distintas cepas se llevó a cabo una dilución de las mismas con un factor $1/10^3$, empleando agua doblemente destilada (H_2O_{dd}) y esterilizada en autoclave (RAYPA, Barcelona, España), durante 20 minutos a 121 ºC. Un volumen de 50 µL de la dilución se inoculó en medio específico correspondiente a cada tipo bacteriano, siendo las condiciones de cultivo llevadas a cabo las especificadas en la Tabla I.5.

Tabla I.5. Cepas bacterianas, normativas, medios y condiciones de cultivo utilizados en este estudio.

WDCM Nº	CECT Nº	Cepa	Medio de cultivo	Condiciones de cultivo
WDCM 00012[a]	CECT 516	*Escherichia coli*	Chromocult® Coliform Agar	Incubación a 37ºC Lectura a las 24-48 horas
WDCM 00009[b]	CECT 481	*Enterococcus faecalis*	Slanetz Bartley Agar (medio detección) Bilis esculina azida Agar (medio confirmativo)	Incubación a 37ºC Lectura 48 horas transferido Incubación a 44ºC Lectura 2 horas
WDCM 00205[c]	CECT 8734	*Legionella pneumophila subsp. pneumophila*	Legionella GVPC Agar (medio detección) Legionella BCYE Agar (medio confirmativo) Legionella BCYE sin cisteína Agar (medio confirmativo)	Incubación a 37ºC Lectura 10 días Incubación a 37ºC Lectura 2 días transferido Incubación a 37ºC Lectura 2 días
WDCM 00030[d]	CECT 4300	*Salmonella enterica subsp. enterica*	Salmonella Shigella Agar	Incubación a 37ºC Lectura a las 24-48 horas

WDCM: Código de la cepa de la *World Data Centre for Microorganisms;* CECT: Código de la cepa de la Colección Española de Cultivo Tipo de Universidad de Valencia
[a] UNE-EN ISO 9308-1:2014/A1:2017: Calidad del agua. Recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes. Parte 1: Método de filtración por membrana para aguas con bajo contenido de microbiota.
[b] UNE-EN ISO 7899-2:2001: Calidad del agua. Detección y recuento de *Enterococos intestinales*. Parte 2: Método de filtración de membrana.
[c] UNE-EN ISO 11731:2017: Calidad del agua. Recuento de *Legionella*.
[d] UNE-EN ISO 19250:2013: Calidad del agua. Detección de *Salmonella* spp.

Tras la incubación se aislaron individualmente 1, 3, 5, 7, 9 y 11 UFC de cada tipo bacteriano y se dispusieron en microtubos separados. Los microtubos se almacenaron a -20ºC hasta proceder al aislamiento del ADN. Los cultivos y los aislamientos de las UFC se realizaron por triplicados.

I.2.1.2. Aislamiento del ADN de las cepas puras

El aislamiento de ADN requirió de la optimización de varios procedimientos. Para ello, cuatro tipos de protocolos de aislamiento de ADN se pusieron a punto con el objetivo de definir el más óptimo en cuanto a calidad y cantidad de ADN aislado.

El primero de ellos se llevó a cabo a partir del kit de extracción *peqGOLD Bacterial DNA Mini* (VWR International Eurolab, Barcelona, España), el segundo se realizó con el kit de aislamiento *GenElute Plant Genomic DNA Miniprep* (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.), y un tercero con el kit *REDExtract-N-AmpTM Plant PCR* (Sigma-Aldrich). El cuarto consistió en el protocolo definido previamente por los autores Lõoke y colaboradores (2011), basado en la acción conjunta de la sal acetato de litio (LiOAc) y el detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS).

i) peqGOLD Bacterial DNA Mini Kit (VWR International Eurolab)

El protocolo se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante realizando modificaciones en la preparación de la muestra, las cuales se especifican a continuación:

Preparación de la muestra

A diferencia del protocolo descrito por la casa comercial, la preparación de las muestras consistió en la resuspensión de las UFC aisladas en un volumen de 100 μL de tampón o *buffer* Tris-EDTA (TE, Tabla I.6), y la posterior agitación de las muestras mediante vórtex.

Tabla I.6. Composición del tampón TE (cantidades y volúmenes de reactivos para 100 mL de solución en agua doblemente destilada (H_2O_{dd}))[a].

Reactivos	**Concentración final** (mM)	**Cantidad** (mL)
TRIS a 1 M (pH 8.0)	10	1
EDTA a 0,5 M (pH 8.0)	0,5	0,2

[a] El tampón TE se esterilizó mediante autoclave con un programa a 121 ºC durante 1 h (2x).

Extracción

- Se añaden 10 µL de lisozima resuspendida con *Elution Buffer*. Se incuban las colonias a 37 ºC durante 10 min.
- Se adicionan 100 µL de *TL Buffer* y 20 µL de *Proteinase K Solution*. Se mezclan mediante vórtex. A continuación, se incuban las colonias a 55 ºC en una placa calefactora con agitación a 300 rpm, durante 1 h.
- Se añaden 5 µL de *RNase A*. La mezcla se realiza mediante inversiones repetidas de los tubos. Posteriormente, se dejan incubar las muestras a temperatura ambiente durante 5 min.
- Se centrifugan a 10 000 *x g* durante 2 min con el objetivo de precipitar cualquier material no digerido. Se transfiere el sobrenadante, evitando tocar el precipitado o *pellet*, a un nuevo microtubo de capacidad 1,5 mL.
- Se añaden 220 µL de *BL Buffer*. Las muestras se agitan mediante vórtex. A continuación, se incuban los tubos a 65 ºC durante 10 min.

Limpieza

- Se adicionan 220 µL de etanol absoluto grado molecular y se agitan las muestras mediante vórtex durante 20 s.
- Se inserta una *peqGOLD DNA Mini Column* dentro de un *Collection Tube* de capacidad de 2 mL. Se transfieren las muestras al *peqGOLD DNA Mini Column*, incluyendo cualquier precipitado que se hubiera originado.
- Se centrifugan los tubos a 10 000 *x g* durante 1 min. A continuación, se descarta el *Collection Tube* con el filtrado recogido en el mismo.
- Se vuelve a transferir la *peqGOLD DNA Mini Column* a un nuevo *Collection Tube* de capacidad de 2 mL.

- Se añaden 500 µL *HBC Buffer*, previamente diluido con isopropanol. Se centrifugan las muestras a 10 000 *x g* durante 1 min. Se descarta el *Collection Tube* con el filtrado recogido en el mismo.
- Se vuelve a transferir la *peqGOLD DNA Mini Column* a un nuevo *Collection Tube* de capacidad de 2 mL.
- Se adicionan 700 µL *DNA Wash Buffer*, diluido previamente con etanol absoluto grado molecular, y se centrifuga a 10 000 *x g* durante 1 min. Se descarta el *Collection Tube* con el filtrado recogido en el mismo.
- Se repite el paso anterior para realizar una segunda limpieza con el *DNA Wash Buffer*.
- Se centrifuga la *peqGOLD DNA Mini Column* vacía a 17 000 *x g* durante 2 min con el objetivo de secar la columna. Este paso es crítico, ya que mediante el mismo se eliminan las trazas de etanol residual que pueden interferir en las aplicaciones posterior.
- Se inserta la *peqGOLD DNA Mini Column* en un microtubo de capacidad de 1,5 mL.
- Se añaden 50 µL de *Elution Buffer*, previamente calentado a 65 ºC. Las muestras se incuban a 65ºC durante 4 min.
- Se centrifugan las muestras a 10 000 *x g* durante 1 min con el objetivo de eluir el ADN.
- Se repite el paso anterior para realiza una segunda elución en un nuevo microtubo.
- Finalmente, las muestras de ADN extraídas se almacenan a 4 ºC hasta su posterior uso.

ii) GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit (SIGMA)

Este protocolo se realizó según las instrucciones del fabricante, las cuales consistieron en:

Extracción

- Se agregan 350 µL de *Lysis Solution [Part A]* y 50 µl *Lysis Solution [Part B]* a las UFC aisladas, y se mezclan cada una de las muestras por inversión.
- A continuación, se añaden 130 µL de *Precipitation Solution* mezclando de nuevo por inversión, y seguidamente se dejan los microtubos 5 min sobre hielo.
- Se centrifugan a 22 000 *x g* durante 5 min y se recoge el sobrenadante, llevándolo a una *GenElute filtration column* y se centrifugan de nuevo a 22 000 *x g* durante 1 min.
- Se descarta la *GenElute filtration column* y se añade al *Collection Tube* 700 µL de *Binding Solution*, mezclando de nuevo por inversión.

Activación de la columna de extracción

- Se utiliza una GenElute Miniprep Binding Column y se le agregan 500 µL de *Column Preparation Solution*. Seguidamente se centrifugan las columnas a 12 000 *x g* durante 1 min.
- A continuación, se añaden 700 µL a la muestra obtenida en el paso previo de extracción, y se centrifuga a 22 000 *x g* durante 1 min.

Limpieza

- Se introduce la columna en uno nuevo microtubo de 2 mL de capacidad y se adicionan 500 µL *Wash Solution* previamente diluido con etanol absoluto grado molecular. Se centrifugan de nuevo a 22 000 *x g* durante 1 min y se descarta el filtrado.
- Se añaden 500 µL *Wash Solution* y se centrifugan a 22 000 *x g* durante 3 min. La columna se dispone en un nuevo *Collection tube* de 1,5 mL de capacidad y se adicionan 100 µL de *Elution Solution* previamente precalentado a 65 ºC durante 5 min.
- Se centrifugan las columnas a 22 000 *x g* durante 1 min, de la cual se obtiene la primera elución de la muestra. Se repite la elución obteniendo de la misma una segunda elución del ADN aislado.

iii) Protocolo modificado del kit de aislamiento de ADN REDExtract-N-Amp™ Plant PCR (Sigma-Aldrich)

El procedimiento se diseñó en base a las instrucciones proporcionados por la casa comercial incluyendo un paso previo para favorecer la lisis celular mediante un choque térmico (*Freezing-Thawing*). El kit consta de dos soluciones para llevar a cabo el aislamiento del ADN, las cuales son *Extraction Solution* y *Dilution Solution*.

El protocolo diseñado conllevaba la ejecución de los siguientes pasos:

- Se resuspenden las UFC aisladas de cada una de las cepas, por separado, en 100 µL de *Extraction Solution* y se agitan brevemente mediante vórtex. A continuación, se lleva a cabo el proceso *Freezing-Thawing*, que consta de tres ciclos de dos pasos, cada uno de ellos a dos temperaturas, donde la temperatura inicial es de 65 ºC y la final de -20 ºC (Figura I.1). Entre paso y paso se agitan las muestras mediante vórtex (Figura I.1).

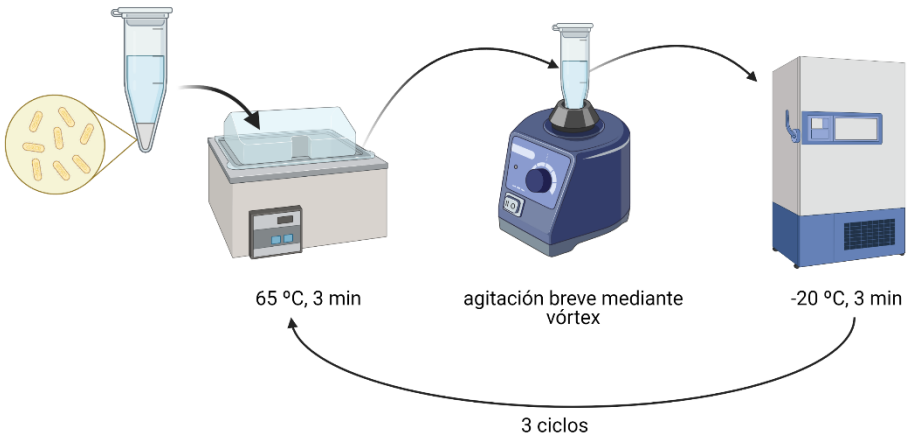


Figura I.1. Esquema del proceso *Freezing-Thawing.*

- Finalizado el proceso de *Freezing-Thawing*, se procede según el protocolo descrito por el fabricante, y se incuban las muestras a 95 ºC en un bloque térmico o *heatblock* (VWR International Eurolab) durante 10 min.
- Seguidamente se añaden 100 µL de *Dilution Solution*, finalizando la extracción con un breve vórtex. Por último, se almacenan las muestras a 4 ºC hasta su posterior utilización.

iv) Protocolo de extracción de ADN de Lõoke y colaboradores (2011)

El protocolo de extracción de ADN descrito por Lõoke y colaboradores (2011) se basa en la acción conjunta de la sal cristalina de acetato de litio (LiOAc) y el detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS) (Tabla I.7). La presencia de LiOAc en la solución de extracción favorece el debilitamiento de las paredes celulares bacterianas, mientras que el SDS ayuda a la solubilización de las proteínas y lípidos presentes en las membranas.

Tabla I.7. Composición de la solución de extracción de ADN descrita por Lõoke y colaboradores (2011)[a].

Reactivos	Concentración final	Cantidades
LiOAc	200mM	0,13 g
SDS (10%)	1%	1 mL

[a] Las cantidades y volúmenes de reactivos corresponden a un volumen final de solución de 10 mL en H_2O_{dd}. La solución de extracción se esterilizó mediante autoclave con un programa a 121 ºC durante 20 min. Para evitar la generación de un exceso de espuma durante el esterilizado, la solución stock de SDS 10% (v/v), se realizó con H_2O doblemente destilada y libre de ARNasas, y se añadió el volumen correspondiente a la solución de extracción una vez esterilizada la misma.

Este protocolo de aislamiento de ADN conllevó siete pasos, que incluían el aislamiento y la limpieza del ADN extraído, los cuales se describen a continuación:

<u>Extracción</u>

- Se resuspenden las UFC aisladas en 100 µL de solución de extracción.
- Se incuban a 70 ºC durante 15 min.

<u>Limpieza</u>

- Se añaden 300 µL de etanol al 80% (v/v) y se agitan mediante vórtex.
- El ADN se precipita a partir de la centrifugación de las muestras a 22 000 *x g* durante 3 min. Se descarta el sobrenadante y se disponen los tubos invertidos sobre papel de filtro con el fin de facilitar la evaporación del etanol residual.
- El precipitado se resuspende en 100 µL de tampón TE.
- Los restos celulares se precipitan mediante centrifugación a 10 000 *x g* durante 1 min.

- Por último, se almacenan las muestras de ADN a 4 ºC hasta su posterior uso.

Todos los protocolos de aislamiento de ADN llevados a cabo se realizaron por duplicado.

I.2.1.3. Valoración de la integridad y cuantificación del ADN

La valoración de la calidad del ADN se determinó mediante la evaluación de su integridad. Para determinar la integridad del ADN aislado se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (m/v), con solución amortiguadora o *buffer* Tris-Acetato-EDTA al 1X (TAE, Tabla I.8), y con bromuro de etidio (0,875 mg L^{-1}). Las muestras de ADN se cargaron con un volumen de tampón de carga o *loading buffer* en una ratio 1 tampón carga : 5 ADN (v/v) (Tabla I.9). La migración del ácido desoxirribonucleico se realizó a 75 V durante 20 minutos en *Mini-Sub® Cell GT System* y una fuente de alimentación, ambos de la marca BioRad (California, EE. UU.). Para visualizar el ADN se utilizó un sistema de fotodocumentación con transiluminador de luz UV (VWR International Eurolab).

Mediante la visualización del ADN se valoró la integridad del mismo a través de la observación de una banda única en ausencia de material fragmentado o *smear*.

Tabla I.8. Composición del *buffer* TAE al 50X.

Reactivos	**Cantidades**
TRIS	242 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA a 0,5 M (pH= 8)	100 mL

Cantidades y volúmenes de reactivos para 1 L de solución en H_2O_{dd}.

Tabla I.9. Composición del tampón de carga de azul de bromofenol al 6X.

Reactivos	**Cantidades**
Azul de Bromofenol	25 mg
Glicerol	3 mL

Cantidades y volúmenes de reactivos para 10 mL de solución en H_2O_{dd}.

La determinación de la concentración y pureza del ADN se realizó por espectrofotometría UV con un espectrofotómetro *Beckman Coulter DU 530* (California, EE. UU.), midiendo 2 µL del ADN a 260 nm (máximo de absorción de los ácidos nucleicos). Para calcular la pureza del mismo se realizó la medida a 280 nm, y se utilizó la ratio 260nm/280 nm para su determinación. Las muestras cuya concentración de ADN fuera inferior a 20 ng μL^{-1} (Meijering *et al.*, 2007), y/o en ellas se visualizara *smear*, se descartaron.

I.2.1.4. Diseño de juegos de cebadores del gen 16S rRNA específicos de bioindicadores y patógenos bacterianos

Para el diseño de los juegos de cebadores específicos se acometieron dos aproximaciones atendiendo a la especificidad de los pares de oligos utilizados para la obtención de la secuencia molde a emplear en el diseño *in silico* de los *primers*. Ambas aproximaciones utilizaron juegos de oligos del fragmento *16S rRNA* seleccionados de la bibliografía, y descritos previamente en la introducción general (apartado I.G.3, Tabla I.G.2).

Específicamente, la primera de las aproximaciones se basó en la utilización de juegos de *primers* a partir de la secuencia completa del gen *16S rRNA* para la determinación de las especies legisladas. La segunda aproximación se realizó a través de una *nested*-PCR tomando como *template* el amplicón *16S rRNA* obtenido en la aproximación 1, amplificando regiones del dominio Bacteria mediante los cebadores específicos de este dominio, y finalmente, diseñando nuevos cebadores para los grupos bacterianos legislados (Figura I.2).

Las dos aproximaciones de los diseños de cebadores propios específicos incluyeron en sus procedimientos la realización de una *nested-PCR*. La *nested-PCR*, o también conocida como PCR anidada, es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa convencional, la cual consta de dos reacciones en cadena de la polimerasa sucesivas con dos juegos de cebadores. En la primera PCR o ronda, se utilizan los llamados *primers* externos, los cuales amplificarán una región amplia conteniendo en ella el segmento diana.

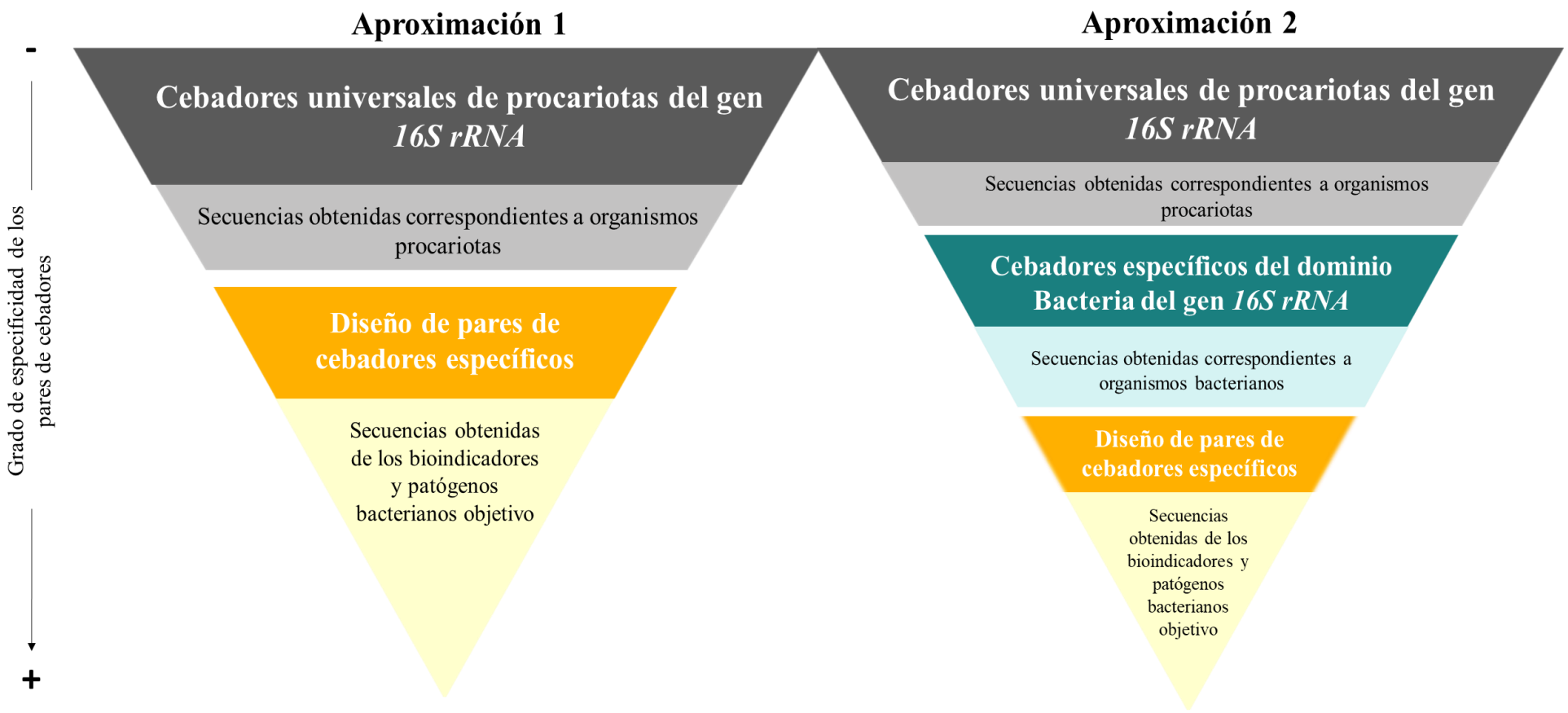


Figura I.2. Especificidad de los juegos de cebadores utilizados y de las secuencias molde obtenidas a partir de las cuales se construyeron las dos aproximaciones del diseño de juegos de oligos específicos para los bioindicadores y patógenos bacterianos utilizados en materia de calidad de aguas (*Escherichia coli*; *Enterococcus intestinalis*; *Salmonella* spp; y, *Legionella* spp).

En la segunda ronda, el producto de amplificación de la primera PCR, se utilizará como *template* o cadena molde de la segunda PCR, donde se amplificará la región diana con un juego de cebadores interno (Figura I.3).

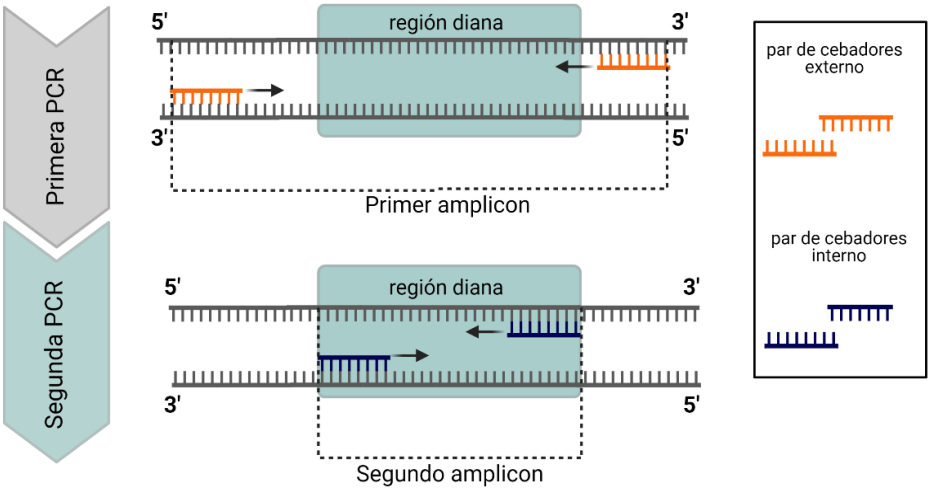


Figura I.3. Esquema de la técnica *nested-PCR*.

Los procedimientos experimentales de los diseños de pares de oligos específicos llevados a cabo en este estudio se presentan en la Figura I.4 y se describen detalladamente en los subsiguientes apartados.

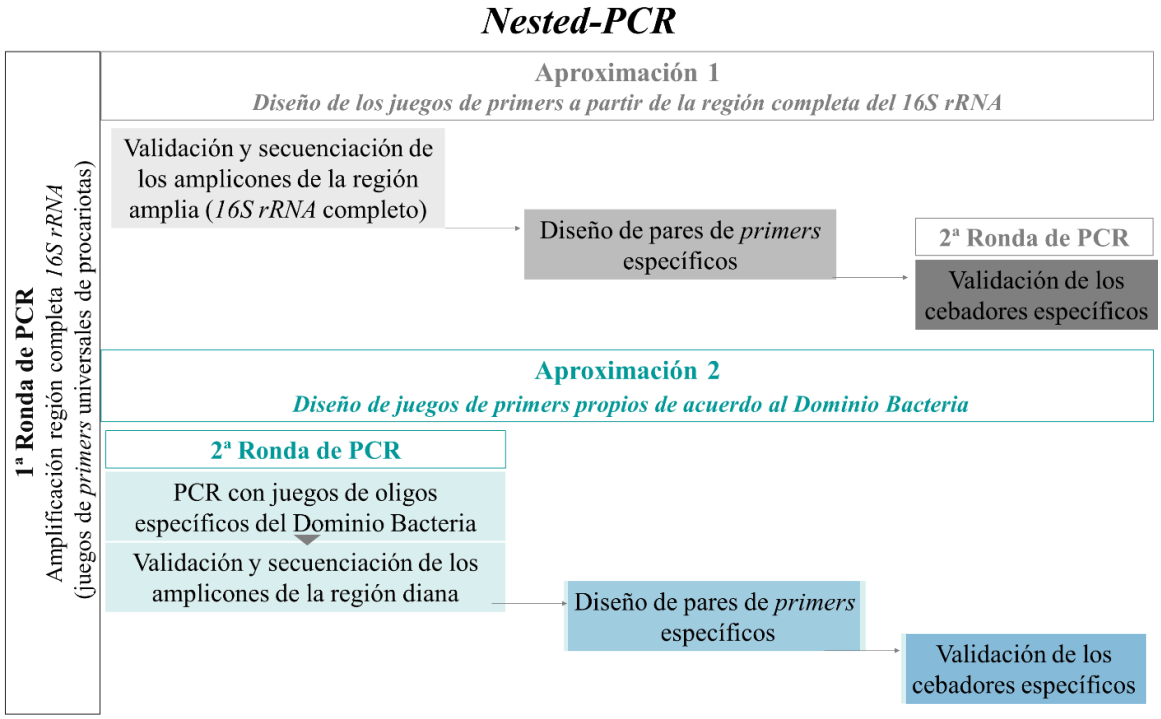


Figura I.4. Esquema de los procedimientos de las dos aproximaciones llevadas a cabo en el presente estudio para el diseño de *primers* específicos

Aproximación 1: Diseño de los juegos de *primers* específicos a partir de la región completa del *16S rRNA*

El primer paso acometido en la Aproximación 1 consistió en la amplificación de la región completa del gen *16S rRNA*, como se describe en el procedimiento experimental (Figura I.4).

i) Amplificación de la región completa del gen 16S rRNA

La amplificación de la región completa del *16S rRNA* mediante la reacción en cadena de la polimerasa, se llevó a cabo con los dos juegos de cebadores descritos en la Tabla I.10, y la cadena molde o ADN *template* aislado de cada una de las cepas puras (30–50 ng) con el *kit REDExtract-N-Amp™ Plant PCR* (Sigma-Aldrich).

Tabla I.10. Juegos de cebadores universales de procariotas de la región *16S rRNA* utilizados en este estudio.

Primer	**Secuencia** (5'→3')	**Referencia**
UF[a]	GAGTTGGATCCTGGCTCAG	Cho *et al*., 2003
UR[b]	AAGGAGGGGATCCAGCC	
U10F[a]	AGTTTGATCCTGGCTCAG	Heyndrickx *et al*.,
U1507R[b]	TACCTTGTTACGACTTCACCCCA	1996

[a] cebador con orientación *forward*
[b] cebador con orientación *reverse*

Las reacciones de amplificación se realizaron según el procedimiento experimental recogido en la Tabla I.11.

Tabla I.11. Reactivos empleados en la reacción de amplificación del gen *16S rRNA* con los pares de *primers* universales de procariotas y el ADN aislado con el kit *REDExtract-N-Amp™ Plant PCR KIT* (Sigma-Aldrich).

Reactivos	**Volumen para una muestra** (µL)
2X REDExtact-N-Amp PCR ReadyMix (Sigma-Aldrich)	10
ADN *template*	4
Cebador *Forward* (10 µM)	2
Cebador *Reverse* (10 µM)	2
Volumen final de la mezcla de amplificación[a]	20

[a] Volumen completado con agua libre de ARNasas

La mezcla de reacción utilizada (Tabla I.11) incluía el tampón de reacción *REDExtact-N-Amp PCR ReadyMix*. Este tampón de reacción al 2X es parte del kit *REDExtract-N-Amp™ Plant PCR* (Sigma-Aldrich), y su utilización es necesaria para minimizar la posible inhibición de la amplificación dada por ciertos componentes que integran tanto la solución de extracción como la solución de dilución. Específicamente, este tampón de reacción, entre otros reactivos, contiene los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) y la Taq polimerasa, así como las sales específicas del tipo de enzima polimerasa utilizada.

En todas las amplificaciones llevadas a cabo se incluyó un control negativo (sustitución del ADN *template* por H_2O_{dd} libre de ARNasas). Asimismo, todas las muestras se hicieron por duplicado. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador *MyCycler™* (Biorad, California, EE. UU.). En la Tabla I.12 se recoge el protocolo de amplificación llevado a cabo en este estudio.

Tabla I.12. Protocolos de amplificación realizados en este estudio con los juegos de *primers* universales de procariotas del gen *16S rRNA* (UF-UR y U10F-U1507R).

	Desnaturalización inicial	**Desnaturalización**	**Hibridación**	**Elongación**	**Elongación final**
Ciclos	1	35			1
Protocolo[a]	94 ºC; 3 min	94 ºC; 60 s	45 ºC; 60 s	72 ºC; 5 min	72 ºC, 10 min

[a] Protocolo de amplificación llevado a cabo con las muestras de ADN aislado con el kit REDExtract-N-AmpTM Plant PCR (Sigma-Aldrich).

ii) Validación y secuenciación de los amplicones de la región 16S rRNA (región completa)

Una vez obtenidos los productos de amplificación, 5 µL de cada uno de ellos se visualizaron en gel de agarosa al 0,8% (m/v). En el mismo se incluyeron 5 µL del marcador de peso molecular *200 bp DNA ladder* de la casa comercial Omega Bio-Tek Inc. (Georgia, EE. UU.), con el fin de corroborar el tamaño de las bandas obtenidas. En concreto, el marcador utilizado constaba de once fragmentos que

variaban en tamaño desde 200 pb hasta 2 000 pb, en incrementos de 200 pb, incluyendo también un fragmento de 3 000 pb.

Las amplificaciones de ambos juegos de oligos resultaron en amplicones de ca. 1 500 pb. Hasta su posterior uso, el volumen restante de los productos de amplificación se almacenó a -20 ºC. Tras la validación de los amplicones obtenidos, se purificaron los mismos mediante el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up* (Promega, Wisconsin, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante, para obtener un producto de amplificación purificado en un volumen de elución final de 30 µL, para cada una de las muestras.

El protocolo de purificación precisó del uso de las soluciones *Membrana Binding Solution* y *Membrana Wash Solution*, y de los componentes *Minicolumn* y *Collection Tube*, y conllevó la consecución de los pasos descritos a continuación:

- En primer lugar, se calcula el volumen total del producto de amplificación a purificar y se añade en una ratio 1:1 la *Membrana Binding Solution* (producto de amplificación:*Membrana Binding Solution).*
- Se inserta la *Minicolumn*, o columna, en un *Collection Tube* y se transfiere la mezcla a la misma dejando incubar la muestra durante 1 min a temperatura ambiente.
- Se centrifuga durante 1 min a 16 000 *x g* y se descarta el líquido filtrado recogido por el *Collection Tube*.
- Se lava la columna con 700 µL de *Membrana Wash Solution* y se centrifuga durante 1 min a 16 000 *x g*, descartando el líquido al final.
- Se lava la columna de nuevo con 500 µL de *Membrana Wash Solution* y se centrifuga durante 5 min a 16 000 *x g*.
- Se centrifuga nuevamente durante 1 min a 16 000 *x g*, para ayudar a la evaporación del etanol residual.
- Se coloca la *Minicolumn* en un microtubo de capacidad 1,5 mL.
- Se eluye con 30 µL de H_2O_{dd} libre de ARNasas y se incuban las muestras durante 1 min a temperatura ambiente.

- Se centrifugan los tubos 1 min a 16 000 *x g*.
- Por último, se extrae la columna y se almacena el producto de amplificación purificado a -20ºC hasta su posterior uso.

Una vez, obtenidos los productos de amplificación purificados, estos se validaron a partir de la visualización de 5 µL de los mismos en un gel de agarosa al 0,8% (m/v). Con el fin de determinar el tamaño de las bandas obtenidas se incluyeron 5 µL del marcador de peso molecular *200 bp DNA ladder* (Omega Bio-Tek Inc).

Seguidamente, las bandas purificadas se prepararon para su envió a Sistema Genómicos (Valencia, España), donde se llevó a cabo la secuenciación de las mismas mediante un secuenciador *ABI-310 DNA automated sequencer* (Applied Biosystems, California, EE. UU.), empleando el kit de secuenciación *BigDye Terminator v3.1* (Thermofisher Scientific, Massachussets, EE. UU.). Las secuencias obtenidas se alinearon con las secuencias depositadas en las bases de datos mediante la herramienta bioinformática BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), ubicada en la base de datos *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Con esta herramienta se identificaron los valores de similitud entre las secuencias de nucleótidos problema comparadas con las depositadas en la base de datos.

iii) Diseño de los juegos de cebadores específicos

Tras la validación de las secuencias obtenidas del gen *16S rRNA* de cada una de las cepas puras de referencia con los juegos de *primers* universales de procariotas, se abordó el diseño de los juegos de cebadores específicos para los bioindicadores y patógenos bacterianos objetivo (*E. coli*, *Enterococcus intestinalis*, *Salmonella* spp y *Legionella* spp), según el procedimiento experimental descrito en la Figura I.4. Para el diseño de los oligos se utilizó el programa bioinformático *Primer3Plus* (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi), empleando los parámetros por defecto.

Aproximación 2: Diseño de los juegos de *primers* específicos a partir del domino Bacteria

A partir de la secuencia completa del gen *16S rRNA*, se diseñaron cebadores propios atendiendo al dominio específico de los bioindicadores y patógenos de interés (dominio Bacteria), lo que requirió de la optimización de un nuevo procedimiento a partir de una *nested*-PCR, como se describe en las siguientes secciones.

i) Amplificación con juegos de oligos dominio-específicos de bacterias

La *nested*-PCR se realizó con los juegos de oligos recogidos en la Tabla I.13, y descritos previamente en la introducción general (apartado I.G.3, Tabla I.G.2). Para llevar a cabo la *nested*-PCR se utilizó como *template* el producto de amplificación de la región completa del *16S rRNA*, obtenido en la aproximación 1.

Tabla I.13. Juego de oligos específicos del dominio Bacteria utilizados en la aproximación 2 desarrollada en este trabajo.

Primer	**Secuencia** (5'→3')	**Longitud amplicón**[a] (pb)	**Referencia**
9F	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	917	Lee *et al*., 2010
926R	CCGTCAATTCCTTTRAGTTT		Muyzer *et al.*, 1995
341F	CCTACGGGAGGCAGCAG	585	Muyzer *et al*., 1993
926R	CCGTCAATTCCTTTRAGTTT		Muyzer *et al.*, 1995

Respecto a las reacciones de amplificación, estas se realizaron en 50 µL de volumen de reacción atendiendo al procedimiento descrito en la Tabla I.14. En la aproximación 2, se requirió de la puesta a punto del protocolo de amplificación llevado a cabo con los juegos de *primers* internos (específicos para el dominio Bacteria). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador *MyCycler™* (BioRad), y específicamente, el protocolo de amplificación optimizado constaba de una desnaturalización inicial a 94 ºC durante 3 min, seguido de 40 ciclos a 94 ºC durante 30 s, 55 ºC durante 45 s, y 72 ºC durante 2 min. La elongación final se llevó a cabo con un único ciclo a 72 ºC durante 10 min.

Tabla I.14. Reactivos empleados en las amplificaciones *nested*-PCR realizadas en este estudio.

Reactivo	**Volumen para una muestra** (µL)	**Concentración final en la reacción de amplificación**
Buffer 5X PrimerSTAR™ (TaKaRa Shuzo Co., Shiga, Japan)	10	1X
dNTPs mix (2,5 mM c/u) (TaKaRa Shuzo Co., Shiga, Japan)	4	0,2 mM c/u
PrimerSTAR™ HS DNA Polymerase (2,5 U μL^{-1}) (TaKaRa Shuzo Co., Shiga, Japan)	0,5	1,25 U
ADN *template*	5	-
Primer Forward (10 µM)	2	0,4 µM
Primer Reverse (10 µM)	2	0,4 µM
Volumen final de la mezcla de amplificación[a]	50 µL	

[a] Volumen completado con agua libre de ARNasas

ii) Validación y secuenciación de las regiones diana

Tras las amplificaciones, se realizó la validación de los productos de amplificación mediante la visualización de los mismos en gel de agarosa al 2% (m/v). En el gel se incluyeron 5 µL del marcador de peso molecular *100 bp DNA ladder* (Omega Bio-Tek Inc.). Este marcador constaba de diez fragmentos que variaban en tamaño desde 100 pb hasta 1 000 pb en incrementos de 100 pb.

Para la óptima secuenciación de las bandas obtenidas, y, validadas mediante electroforesis, se precisó de la purificación de las mismas. Para ello, se utilizó el kit *Quantum Prep™ Freese 'N DNA Gel Extraction Spin Columns* (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit se utiliza exclusivamente para la purificación de bandas o fragmentos de ADN.

Este protocolo de purificación se basa en la utilización de una columna filtrante provista de una membrana de acetato de celulosa de tamaño de poro de 45 µm, introducida en un microtubo con base tipo «delfín» o *dolphin tube*. Particularmente, el *dolphin tube* facilita la recogida de los fragmentos purificados

debido a la forma de su base, la cual evita el contacto de los volúmenes filtrados con la base de la membrana filtrante donde se retiene el ADN hasta su elución.

Los pasos seguidos en el protocolo de purificación de bandas utilizado se describen a continuación:

- Primero se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 2% (m/v) teñida con bromuro de etidio.
- Una vez visualizadas las bandas en el transiluminador de luz UV se utiliza un bisturí para cortar el fragmento eliminando todo el exceso de gel de agarosa.
- A continuación, las bandas son cortadas en pequeñas porciones y se introducen en la columna filtrante previamente insertada en el microtubo tipo delfín o *dolphin tube*.
- Se incuban las muestras dentro del filtro durante 5 min a -20 ºC.
- Transcurrida la incubación, se centrifugan las muestras a 13 000 *x g* durante 3 min a temperatura ambiente.
- Finalmente, se retira la columna filtrante del *dolphin tube* y se almacenan las bandas purificadas a -20ºC hasta su utilización.

La valoración de la integridad y la cuantificación de los productos de amplificación purificados se realizó a través de una electroforesis de chequeo con 5 µL del producto de amplificación. Para tal fin, la electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa al 2% (m/v) incluyendo en uno de los pocillos del gel 5 µL del marcador de peso molecular *100 bp DNA ladder* (Omega Bio-Tek Inc.). Validados los productos de amplificación purificados, estos se prepararon para ser enviados a Sistema Genómicos (Valencia, España). Asimismo, las secuencias obtenidas se validaron mediante la herramienta bioinformática BLAST, según lo descrito con anterioridad en la primera aproximación.

iii) Diseño de los juegos de cebadores específicos

Una vez obtenidas y validadas las secuencias se procedió al diseño de los pares de oligos específicos para los bioindicadores y patógenos bacterianos objetivo. El procedimiento llevado a cabo para el diseño de los cebadores se desarrolló acorde a lo descrito anteriormente para la aproximación 1.

I.2.2 │Validación de los cebadores diseñados en muestras de ADN ambiental

Los juegos de cebadores específicos para los bioindicadores y patógenos bacterianos diseñados a través de las dos aproximaciones llevadas a cabo en este estudio, se validaron en muestras de ADN ambiental obtenidas de tres tipos de matrices: agua de mar, agua residual urbana y agua residual urbana regenerada.

La validación precisó del acometimiento de cuatro pasos i) muestreo y preparación de las matrices; ii) aislamiento del ADN ambiental; iii) amplificación con los juegos de *primers* específicos diseñados; y, iv) secuenciación y validación de los amplicones obtenidos.

I.2.2.1. Muestreo y preparación de las muestras

Las muestras de agua de mar se recogieron en base a la metodología de toma de muestras recopilada en el Anexo V del Real Decreto 1341/2007, sobre la gestión de la calidad de las aguas de baño. Esta metodología estandariza el protocolo de toma de muestras, el cual consiste en recoger un volumen mínimo de 250 mL de agua de mar, por muestra, a 30 cm por debajo de la superficie y en aguas cuya profundidad no sea inferior a un metro. El muestreo se realizó en Playa del Águila ubicada en el sudeste de la isla de Gran Canaria, concretamente en el municipio de San Bartolomé de Tirajana. Las muestras se almacenaron en botellas de polietileno de 2 L de capacidad pre-esterilizadas, en autoclave (RAYPA) durante 20 min a 121 ºC.

Las muestras de agua residual urbana se recogieron del humedal artificial de tratamiento de aguas residuales urbanas, situado en el Campus Universitario de Tafira de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (Gran Canaria, España). En concreto, de este humedal, se obtuvieron dos de las matrices con las que trabajar en este ensayo: influente y efluente del humedal. El influente correspondió al agua residual urbana (ARU) sin depurar, y, el efluente al agua residual urbana regenerada (ARUr). Para la recolección de las muestras se usaron botellas de 1 L de capacidad de vidrio borosilicato, previamente esterilizados en autoclave a 121 ºC durante 20 min.

Todas las muestras se transportaron hasta el laboratorio en hielo y protegidas de la exposición a la luz. Una vez en el laboratorio se mantuvieron a 4 ºC y en oscuridad. Las muestras se procesaron en un intervalo de tiempo no superior a 24 h.

Previo al aislamiento del ADN ambiental de cada una de las muestras de agua o matrices, se precisó del concentrado de las muestras recogidas. Las matrices requirieron de la puesta a punto de diferentes procedimientos de preparación de las muestras (Figura I.5).

i) Agua de mar

Para el agua de mar, 500 mL se filtraron a través de filtros de mezcla de ésteres de celulosa con tamaño de poro 0,45 µm y 47 mm Ø (HAWP04700, Millipore, Massachusetts, EE. UU.). La filtración se llevó a cabo en una rampa de filtrado de tres posiciones (Millipore). A continuación, los filtros se homogeneizaron en nitrógeno líquido utilizando morteros de porcelana, y se dispusieron separadamente, en microtubos de capacidad 2 mL (Figura I.5A). Con el fin de eliminar los restos del filtro del homogeneizado obtenido, previamente al procedimiento de extracción de ADN, se acometieron los pasos descritos a continuación:

- Se añaden 500 µL de H_2O_{dd} libre de ARNasas a cada una de las muestras homogeneizadas, y se agitaron mediante vórtex.
- Se centrifugan los microtubos a 3 000 rpm durante 5 min.
- Se traspasa el sobrenadante a un nuevo microtubo de 1,5 mL de capacidad, se descarta el precipitado con los restos de filtro y se centrifugan de nuevo las muestras a 22 000 *x g* durante 10 min.
- A continuación, se descarta el sobrenadante y se almacenan los microtubos con el precipitado obtenido a -20 ºC hasta su posterior utilización.

ii) Agua residual urbana y regenerada

Para la preparación de las muestras de agua residual urbana sin depurar (ARU) y regenerada (ARUr), se dispensaron 100 mL de cada una de ellas (separados en dos tubos de capacidad de 50 mL) y se centrifugaron a 25 000 rpm durante 10 min en una centrifuga *Beckman Avanti™ J-25* (Beckman Coulter® Life Sciences, California, EE. UU.).

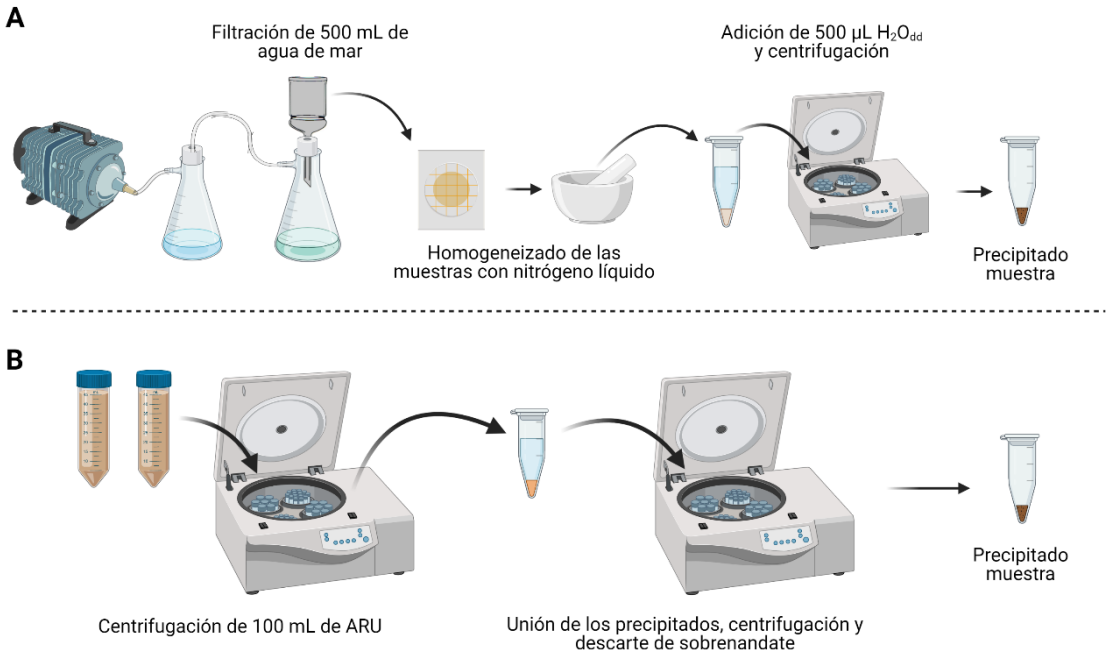


Figura I.5. Esquemas de la preparación de las muestras según su origen. **A.** Procedimiento llevado a cabo con la matriz de agua de mar; **B.** Procedimiento realizado con las muestras correspondientes a las matrices de agua residual urbana y aguas residuales urbanas regeneradas.

Seguidamente, se descartaron los sobrenadantes y se reunieron los precipitados, o *pellets*, de cada uno de los tipos de matrices en un microtubo de capacidad 2 mL. Estos se centrifugaron de nuevo a 22 000 *x g* durante 5 min en una centrífuga *VWR Micro Star 17R* (VWR International Eurolab, Barcelona, España), y se descartaron los sobrenadantes, obteniendo un *pellet* final de cada una de las muestras (Figura I.5B). Por último, los *pellets* se almacenaron a -20 ºC hasta el aislamiento del ADN ambiental.

I.2.2.2. Aislamiento del ADN ambiental

Debido a las diversas características que presentaban las matrices muestreadas (alta concentración en sales o ácidos húmicos, ambos inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa), se precisó de la puesta a punto de varios protocolos de aislamiento de ADN, distintos a los descritos con anterioridad para las cepas puras bacterianas.

Los protocolos de aislamiento diseñados para la extracción de ADN ambiental consistieron en el kit *REDExtract-N-Amp™ Plant PCR (Sigma-Aldrich),* previamente utilizado para la extracción de ADN de las cepas puras, y en dos protocolos manuales. El protocolo llevado a cabo con el kit *REDExtract-N-Amp™ Plant PCR (Sigma-Aldrich),* se desarrolló siguiendo lo descrito con anterioridad para el aislamiento de ADN de cepas puras, solo haciéndose una modificación en los tiempos del procedimiento *Freezing-Thawing,* los cuales se ampliaron a 10 min en cada ronda.

Los protocolos manuales usados fueron aquellos descritos previamente por Murray y Thompson, (1980) y modificado por García-Jiménez y colaboradores (2009), basado en la acción de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y, el protocolo descrito por Lõoke y colaboradores (2011), también con modificaciones. En este último, entre las modificaciones se incluyó la adición del NaCl, el cual actuó conjuntamente con la sal cristalina de acetato de litio (LiOAc) y el detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS). La alta concentración en la que se añade el NaCl (2 M) favorece la estabilidad del ADN, por contrarrestar las cargas negativas de los grupos fosfatos que configuran las moléculas de ADN, con los cationes de

Na^+ de la sal, ayudando, a su vez, al agrupamiento y precipitación del ácido desoxirribonucleico. Efecto que se suma a la acción conjunta del LiOAc y el SDS, la cual favorece la lisis de las paredes y membranas bacterianas.

Todos los métodos de aislamiento de ADN ambiental partieron de los precipitados obtenidos de las muestras filtradas y homogeneizadas (Figura I.5).

Los dos protocolos manuales de aislamiento, incluyendo las modificaciones realizadas, se detallan a continuación:

i) Protocolo modificado LiOAc de extracción de ADN

El aislamiento de ADN ambiental de las matrices objetivo mediante el protocolo de extracción de ADN descrito por Lõoke y colaboradores (2011), precisó incluir varias modificaciones tanto en la solución de extracción como en el procedimiento experimental, con respecto al optimizado para las cepas bacterianas. En la Tabla I.15, se presentan ambos protocolos y las modificaciones llevadas a cabo en este estudio.

Este procedimiento consistió en:

- Se resuspende, en 800 μL de solución de extracción, el *pellet* completo de la muestra obtenida según el procedimiento descrito en la Figura I.5.
- Se incuban a 65 ºC durante 1 h. Se homogenizan las muestras cada 20 min mediante vórtex.
- La primera etapa de la limpieza y purificación se realiza añadiendo 2/3 de ácido isopropílico (v/v) y centrifugando las muestras durante 30 min a 22 000 *x g*.
- Se retira con cuidado el sobrenadante y se lava el precipitado con 200 μL de etanol al 80% (v/v), centrifugando las muestras durante 10 min a 22 000 *x g*.
- Se repite la limpieza con etanol al 80% (v/v) por segunda vez.
- Se retira el sobrenadante y se disponen los tubos invertidos sobre papel de filtro a efectos de facilitar la evaporación del etanol residual.

- El precipitado se resuspende en 100 µL de H_2O_{dd} libre de RNasas.

Los restos celulares se precipitan por centrifugación a 15 000 *x g*, durante 1 min, lo que permite que el ADN ambiental se mantenga en la fase acuosa hasta su posterior uso. Por último, se almacenan las muestras a 4 ºC.

Tabla I.15. Comparación entre el protocolo de aislamiento de ADN basado en LiOAc descrito por Lõoke y colaboradores (2011), y las modificaciones del mismo realizadas en este trabajo.

	Protocolo Lõoke y colaboradores (2011)	**Protocolo modificado en este estudio**
Composición de la solución de extracción	500mM LiOAc 1% SDS	500mM LiOAc 1% SDS 2M NaCl
Cantidad de muestra extraída	8 UFC	*Pellet* obtenido de 500 mL de agua de mar / *Pellet* obtenido de 100 mL de ARU y ARUr
Volumen solución de extracción	100 µL	800 µL
Incubación	70 °C; 15 min	65 °C; 60 min
Limpieza y purificación	300 µL etanol al 96% Centrifugar a 15 000 *x g*; 3 min Retirar sobrenadante y secar *pellet* 5 min	2/3 isopropílico Centrifugar a 22.000 *x g*; 30 min Retirar sobrenadante 200 µL etanol al 80% } x2 Centrifugar a 22 000 *x g*; 10 min Retirar sobrenadante y secar *pellet* 5 min
Almacenaje del ADN	Resuspender *pellet* en 100 µL de TE Eliminación desechos celulares Centrifugar a 15 000 *x g*; 1min Mantenimiento a 4 °C	Resuspender *pellet* en 100 µL H_2O_{dd} libre de ARNasas Eliminación desechos celulares Centrifugar a 15 000 *x g*; 1min Mantenimiento a 4 °C

ARU: Agua residual urbana; ARUr: Agua residual urbana regenerada

ii) Protocolo modificado CTAB de aislamiento de ADN

Este método de aislamiento de ADN basado en el detergente de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) fue inicialmente descrito por Murray y Thompson (1980), y en este ensayo se llevó a cabo según las modificaciones realizadas por García-Jiménez y cobaloradores (2009).

Este protocolo se basa en la acción conjunta de los diferentes reactivos que componen la solución de extracción (Tabla I.16), los cuales facilitan la lisis celular,

formando un complejo insoluble de proteínas y polisacáridos, y a su vez, evitan la co-precipitación del ADN con estos compuestos, manteniéndolos en una fase orgánica. De ahí que, a través de sucesivos lavados con reactivos orgánicos los desechos celulares sean eliminados, para posteriormente precipitar el ADN y así proceder a su resuspensión y mantenimiento hasta su utilización.

Una vez preparada la solución de extracción, se esterilizó mediante autoclave durante 20 min a 121 °C. Tras la esterilización se añadió β-mercaptoetanol al 2% (v/v) (Tabla I.16), evitando, de esta manera, la desnaturalización de este antioxidante. Para los tres tipos de matrices, los aislamientos de ADN ambiental se realizaron por triplicado. El procedimiento del protocolo CTAB conlleva los pasos descritos a continuación:

- Se añaden 800 µL de solución de extracción a cada uno de los *pellets* de las muestras, y se incuban en el baño a 65 ºC durante 1 hora. Se agitan las muestras por inversión cada 20 minutos.
- Para iniciar la fase de limpieza se añade un volumen de CIA (cloroformo : alcohol isoamílico, 24:1) y se centrifuga a 3 000 rpm durante 20 min. Tras este paso, se forman dos fases diferenciadas: una fase orgánica (parte superior) y una fase acuosa (parte inferior) separadas por una fase intermedia donde se localizan las proteínas desnaturalizadas. La fase orgánica, que contiene los ácidos nucleicos, es retirada con pipeta automática y depositada en un nuevo tubo.
- Se repiten dos veces más la limpieza con CIA.
- Se deposita la fase orgánica en un nuevo tubo tras la tercera limpieza con CIA y seguidamente se le agregan 2/3 de ácido isopropílico (v/v) a -20 ºC. A continuación, se centrifugan las muestras durante 30 min a 15 000 *x g*.
- Se retira con cuidado el sobrenadante y se lava el precipitado con etanol al 80% (v/v) (200 µL), y se centrifugan de nuevo las muestras durante 5 minutos a 15 000 *x g*.
- Se retira el sobrenadante y se disponen los tubos invertidos sobre papel de filtro a efectos de facilitar la evaporación del etanol residual.

- El precipitado se resuspende en 15 µL de H_2O_{dd} libre de RNasas. Por último, se almacenan las muestras a 4 ºC.

Tabla I.16. Composición de la solución CTAB de extracción de ADN utilizada en este estudio, y función de los reactivos que la constituyen.

Reactivo	**Concentración final**	**Compuesto**	**Función**
CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio)	2%	Detergente	Empleado para despolimerizar las membranas celulares y favorecer la extracción del ADN, así como para proteger de la acción de las nucleasas.
TRIS-HCl (Hidroximetil Amino Metano)-HCl (pH= 8)	100 mM	*Buffer*	Estabilizar el medio, asegurando que el pH se mantenga constante. La alcalinidad de este compuesto favorece la solubilidad del ADN.
EDTA (Ácido Etilendiaminotetracético Tetrasódico) (pH= 8)	25 mM	Agente quelante	Agente quelante de cationes divalentes, como son Ca^{2+} y Mg^{2+}. En especial el Mg^{2+} es un cofactor requerido por la mayoría de nucleasas, su secuestro por el reactivo EDTA evita la degradación del ADN.
PVPP (Polivinil polipirrolidona)	0,5%	Detergente	Polímero soluble en agua cuya acción elimina compuestos polifenólicos que pueden inhibir la reacción de extracción.
SDS (Dodecil sulfato de sodio)	0,1%	Detergente aniónico	Actúa como agente solubilizante de proteínas y membranas celulares.
NaCl (Cloruro sódico)	2 M	Sal	Aumenta el poder iónico de la solución, favoreciendo la precipitación del ADN.
β-mercaptoetanol	2%	Antioxidante	Inactiva las proteínas por reducción de los puentes disulfuro.

I.2.2.3. Amplificación con los juegos de cebadores específicos diseñados

Los juegos de oligos diseñados para los bioindicadores y patógenos bacterianos objetivo se validaron en las muestras de ADN ambiental aislado. Las amplificaciones por PCR se realizaron a partir de 30–50 ng del ADN extraído de las tres matrices (agua de mar, ARU y ARUr). La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL de mezcla de reacción, para cada muestra, conteniendo 10 µL de 5X *PrimerSTAR™ buffer*, 0,5 µL de *PrimerSTAR™ HS DNA Polymerase* (2,5 U μL^{-1}), 4 µL de la mezcla dNTPs (2,5 mM de cada uno), todos ellos de la

casa comercial TaKaRa Shuzo Co. (Shiga, Japan), así como, 2 µL de cada uno de los *primers* (10 µM) y 5 µL de ADN ambiental.

En todo protocolo de PCR se incluyó un control negativo y un control. El control negativo consistió en la sustitución del ADN *template* por H_2O_{dd} libre de ARNasas, mientras el control correspondió a la mezcla del ADN aislado de las cepas puras.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador *MyCycler™* (Biorad), con una desnaturalización inicial a 94 ºC durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 ºC durante 30 s, la temperatura de hibridación correspondiente a cada juego de cebadores durante 45 s, y, 72 ºC durante 2 min. La elongación final se llevó a cabo con un único ciclo a 72 ºC durante 10 min. La visualización de los productos de amplificación se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% (v/v) a 75 V, procediendo como se ha descrito con anterioridad. Todas las amplificaciones se realizaron por triplicado.

I.2.2.4. Validación de los amplicones

Antes de ser secuenciados los amplicones obtenidos se purificaron utilizando el *kit Quantum Prep™ Freese 'N DNA Gel Extraction Spin Columns* (BioRad). La purificación se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, tal y como se ha descrito con anterioridad. Las bandas purificadas se prepararon y se enviaron para su secuenciación a la empresa Sistemas Genómicos (Valencia, España). Los fragmentos se secuenciaron en un *ABI-310 DNA automated sequencer* (Applied Biosystems). Las secuencias recibidas se validaron a través de la herramienta bioinformática BLAST, mediante la identificación de valores de similitud de la secuencia de nucleótidos. Una vez validadas las mismas se procedió a realizar el análisis filogenético mediante la construcción de árboles de las secuencias obtenidas.

I.2.3 │ Análisis filogenético

Para realizar la anotación de las secuencias amplificadas, se realizó el análisis filogenético. Para ello, en primer lugar, se procedió a la adquisición de las secuencias a incluir en cada uno de los árboles filogenéticos a partir de la herramienta TAXONOMY, ubicada en la base de datos *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy).

Por un lado, se seleccionaron las secuencias anotadas como cercanas a la secuencia problema, y por otro, a la secuencia que forma el *outgroup*, consistiendo el mismo en una secuencia que se relaciona más distantemente con la secuencia problema (Hall, 2001). De forma estandarizada, la secuencia que configura el *outgroup* se selecciona de un género perteneciente a la misma familia taxonómica de la secuencia problema.

A continuación, se realizaron los alineamientos múltiples entre las secuencias, gracias a la herramienta CLUSTAL Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) (Thompson *et al*., 1994), utilizando los parámetros por defecto. A partir de los alineamientos múltiples se llevó a cabo el ajuste de las secuencias mediante el software *BioEdit Biological Sequence Alignment Editor v 7.2* (Hall, 1999), y se volvió a realizar el alineamiento múltiple de las secuencias ajustadas.

El archivo resultante del alineamiento múltiple final, en formato FASTA (.fsa), se utilizó para la generación de los árboles filogenéticos basados en el método *Maximun Likelihood* (ML) (Nei & Kumar, 2000) implementado en el software genómico *MEGA-X* (Kumar *et al.*, 2018). En concreto, la base fundamental del método ML consiste en la inferencia del «mejor» árbol evolutivo mediante la búsqueda de un árbol a partir de múltiples árboles alternativos. La bondad de este árbol viene dada por la probabilidad de que un árbol generado incluya todos los datos (Hall, 2001).

Asimismo, se utilizó el modelo GTR (*Generalised Time Reversible*), donde las probabilidades de la tasa de sustitución se ajustan a una Distribución Gamma (G), para modelar las diferencias de la tasa de evolución entre caracteres (2

categorías (+G, parámetro = 0,1000)), como criterios de optimización del método ML.

La evaluación de la fiabilidad del árbol se comprobó realizando 1 000 réplicas a partir del método estadístico *Bootstrapping*, el cual genera múltiples iteraciones. Este método crea réplicas al azar de un conjunto o set de datos por el reemplazo de caracteres a partir del set original.

Concretamente, los árboles *bootstrap* consenso construidos se seleccionaron para representar la historia evolutiva de los taxones analizados (Felsenstein, 1985). El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agrupan en el ensayo *bootstrap* (1 000 réplicas), se muestra junto a las ramas (1-100%). Aquellos valores *bootstrap* $\leq$ 50%, no son admitidos (Felsenstein, 1985). De manera análoga, los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos *Neighbour-Join* y *BioNJ* a una matriz de distancias por pares estimada a partir de la aproximación *Maximum Composite Likelihood*, y luego seleccionando la topología con un valor de logaritmo de verosimilitud o *likelihood* superior.

I.3 │ RESULTADOS

I.3.1 │ Diseño de cebadores específicos de los bioindicadores y patógenos bacterianos de valoración de calidad de aguas

A continuación, se describen los resultados obtenidos del diseño de cebadores específicos para la valoración molecular de los bioindicadores y patógenos bacterianos objetivo (*E. coli*, *Enterococcus intestinalis*, *Salmonella* spp y *Legionella* spp), así como cada uno de los pasos acometidos para llevarlo a cabo, siendo los mismos i) cultivo de las cepas puras de referencia; ii) aislamiento del ADN de las cepas puras, valoración de la integridad y cuantificación del ADN; y, iii) diseño de juegos de cebadores del gen *16S rRNA* específicos de los bioindicadores y patógenos bacterianos mediante herramientas bioinformáticas.

I.3.1.1. Cepas de referencia y condiciones de cultivo

Tras los diversos cultivos, en medios específicos, realizados a partir de la siembra de las cepas puras correspondientes a los bioindicadores y patógenos de interés (*E. coli*, *Enterococcus intestinalis*, *Legionella spp.* y *Salmonella spp.*), (Tabla I.5), se obtuvieron crecimientos selectivos y diferenciales en todos los casos, todos ellos en ausencia de contaminación. El factor de dilución empleado ($1/10^3$) facilitó el crecimiento diferencial en todos los cultivos, pudiendo aislar de todos ellos el número de UFC necesarios en cada caso.

I.3.1.2. Aislamiento, valoración de la integridad y cuantificación del ADN de las cepas puras bacterianas

Como resultado de la puesta a punto de los cuatro protocolos de aislamiento ADN para las cepas bacterianas se obtuvo que solo el *kit REDExtract-N-Amp™ Plant PCR* (Sigma-Aldrich) reveló bandas para todos los tipos bacterianos utilizados, presentado una clara integridad del ADN (determinada por la ausencia de ADN fragmentado).

Por ello, este protocolo fue el utilizado para la extracción de ADN de las cuatro cepas bacterianas de referencia (Figura I.6), cuyo ADN se usó en las amplificaciones del gen *16S rRNA* llevadas a cabo posteriormente.

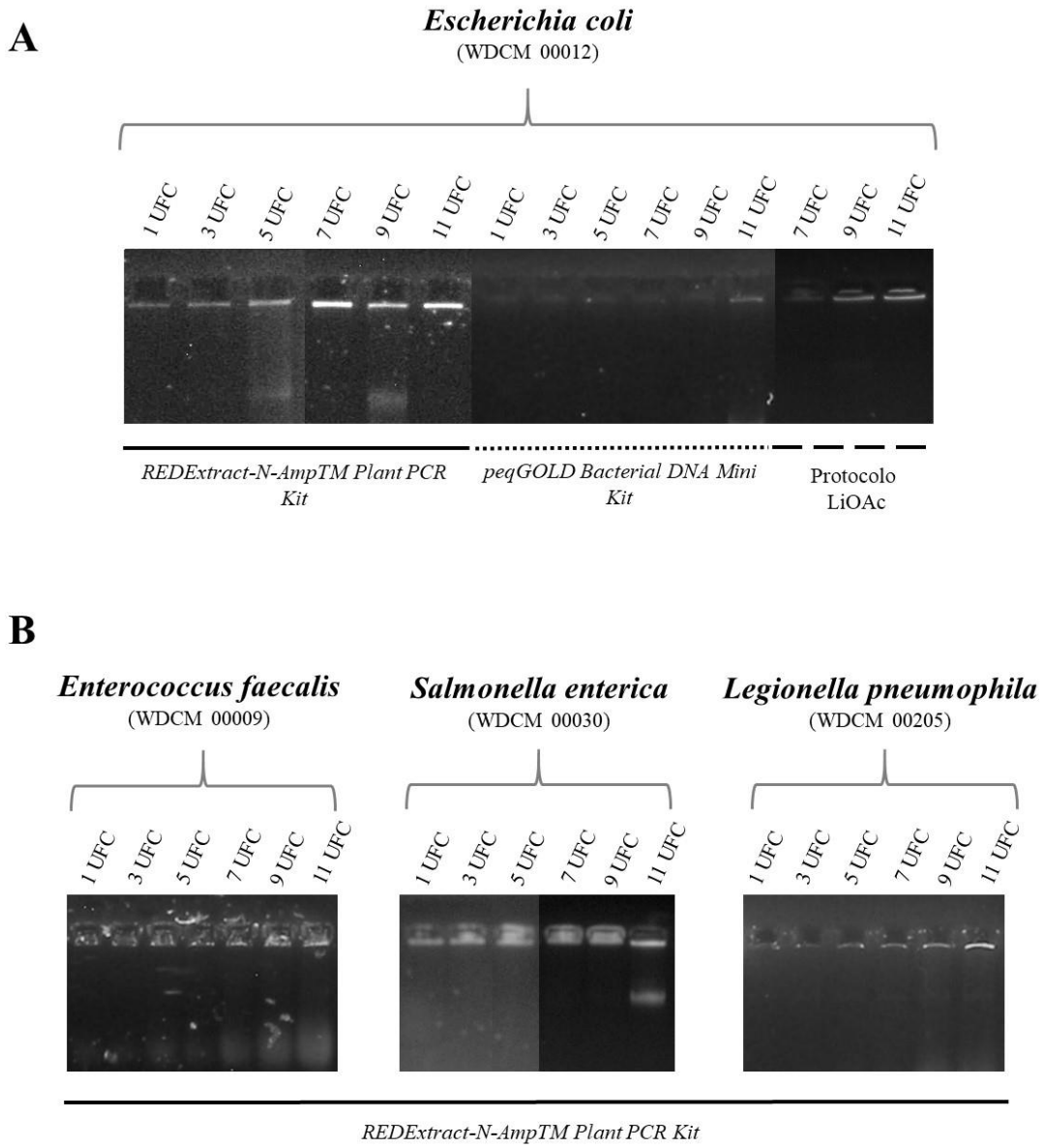


Figura I.6. Electroforesis de control del aislamiento de ADN correspondiente a las UFC de las cuatro cepas puras utilizadas en este trabajo. **A.** ADN aislado de la cepa pura *E. coli* (WDCM 00012) extraído con los protocolos *REDExtract-N-Amp™ Plant PCR KIT* (Sigma-Aldrich); *peqGOLD Bacterial DNA Mini Kit (VWR International Eurolab)*; y, el protocolo manual descrito por Lõoke y colaboradores (2011). **B.** ADN aislado con el *REDExtract-N-Amp™ Plant PCR KIT* (Sigma-Aldrich) de las cepas puras *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica subp. enterica*, y, *Legionella pneumophila subp. pneumophila*.

En la Figura I.6A, se muestran los resultados obtenidos con los tres protocolos restantes, para la especie *E. coli*. Como se puede observar, los aislamientos

llevados a cabo con el kit *peqGOLD Bacterial DNA Mini* (VWR International Eurolab), y el kit *GenElute Plant Genomic DNA Miniprep* (SIGMA), no obtuvieron resultados satisfactorios.

En el caso del kit *peqGOLD Bacterial DNA Mini* (VWR International Eurolab) las bandas obtenidas eran tenues (Figura I.6A, resultados obtenidos para la cepa de *E. coli*). Además, las concentraciones, valoradas para *E. coli*, estaban comprendidas entre un rango de 0,85±0,13 ng μL^{-1} – 9,88±0,73 ng μL^{-1}, correspondientes a 1 UFC y 11 UFC, respectivamente.

Respecto a la extracción realizada con *GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit* (SIGMA), precisar que no se obtuvieron bandas de ADN para ninguna de las cepas utilizadas.

Por otro lado, mediante el protocolo manual descrito previamente por Lõoke y colaboradores (2011), se obtuvieron bandas tenues para las muestras con mayor cantidad de UFC (a partir de 7 UFC) (Figura I.6A, resultados obtenidos para *E. coli*), estando las concentraciones obtenidas comprendidas en un rango de 20,76±1,04 – 39,81±2,51 ng μL^{-1}, correspondientes a 7 UFC y 11 UFC, respectivamente.

Las concentraciones de ADN aislado con el kit *REDExtract-N-Amp™ Plant PCR* (Sigma-Aldrich) resultaron ser óptimas (Tabla I.17) para la utilización del ADN en las acciones posterior.

Tabla I.17. Valores de concentración de ADN, aislado mediante el método de extracción *REDExtract-N-Amp™ Plant PCR KIT* (Sigma-Aldrich), y determinados mediante espectrofotometría.

Bioindicador / **Nº de UFC**	***Escherichia coli*** (WDCM 00012)	***Enterococcus faecalis*** (WDCM 00009)	***Salmonella enterica*** (WDCM 00030)	***Legionella pneumophila*** (WDCM 00205)
	Concentración media (ng μL^{-1}) ± sd (n=3)			
1	9,82 ± 3,61	1,70 ± 0,39	10,23 ± 1,17	11,36 ± 0,54
3	19,59 ± 1,06	3,53 ± 1,54	13,80 ± 1,54	18,72 ± 0,49
5	35,00 ± 1,96	7,901 ± 0,77	17,83 ± 0,73	22,62 ± 0,54
7	47,60 ± 1,58	11,71 ± 1,32	33,11 ± 2,32	41,46 ± 0,98
9	51,49 ± 0,59	14,98 ± 0,84	43,33 ± 0,46	46,35 ± 2,78
11	57,69 ± 1,58	15,92 ± 2,11	49,68 ± 0,50	50,97 ± 0,98

I.3.1.3. Diseño de juegos de cebadores de la región 16S rRNA específicos de los bioindicadores y patógenos bacterianos

Los resultados de las dos aproximaciones llevadas a cabo para el diseño de los juegos de cebadores específicos de los bioindicadores y patógenos bacterianos se detallan en las secciones siguientes.

Aproximación 1: Validación de los juegos de *primers* específicos a partir de la región completa del *16S rRNA*

Los resultados de las amplificaciones del gen *16S rRNA* llevadas a cabo con los juegos de *primers* universales para procariotas descritos en la Tabla I.10, se muestran en la Figura I.7.

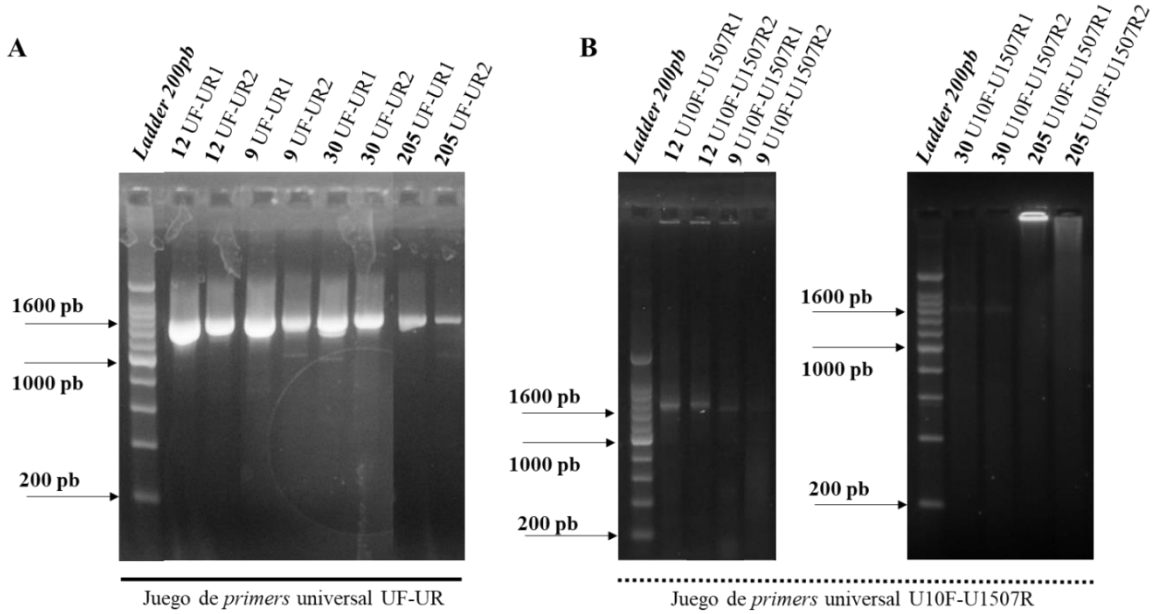


Figura I.7. Electroforesis de control de los productos de amplificación del gen *16S rRNA* de las cepas bacterianas de referencia. **A.** Amplificaciones realizadas con el par de *primers* universal UF-UR (Cho *et al.*, 2003); **B.** Amplificaciones llevadas a cabo con el juego de oligos universal U10F-U1507R (Heyndrickx e*t al.*, 1996). Los códigos de las muestras corresponden a **12**: WDCM 00012, *Escherichia coli*; **9**: WDCM 00009, *Enterococcus faecalis*; **30**: WDCM 00030, *Salmonella enterica subp. enterica*; y, **205**: WDCM 00205, *Legionella pneumophila subp. pneumpophila*. Los números 1 y 2 hacen referencia al número del duplicado de la muestra. Ladder 200 bp*:* escalera de peso molecular utilizada *Ladder 200 bp DNA ladder* (Omega Bio-Tek Inc.), constando de once fragmentos que variaban en tamaño desde 200 pb hasta 2 000 pb en incrementos de 200 pb, incluyendo un fragmento de 3 000 pb.

En particular, con los pares de cebadores U10F-U1507R no se obtuvieron bandas para la cepa pura de *Legionella pneumophila*, y las bandas obtenidas para las cepas bacterianas *E. coli*, *Enterococcus faecalis* y *Salmonella entérica*, no resultaron óptimas para su utilización en el diseño de cebadores (Figura I.7B). Por el contrario, las amplificaciones obtenidas con el par de oligos UF-UR dieron como resultado bandas definidas de los tamaños esperados (ca. 1 500 pb), para todas las cepas puras amplificadas (Figura I.7A).

Atendiendo a los resultados obtenidos, el juego de *primers* UF-UR fue el utilizado para la obtención de los amplicones, y correspondientes secuencias a emplear en el diseño de cebadores específicos. Las secuencias obtenidas se validaron mediante la herramienta BLAST, anotándose todas ellas dentro del taxón esperado de acuerdo a la filogenia.

En las siguientes figuras se presentan los resultados del diseño de los juegos de cebadores específicos obtenidos con la herramienta bioinformática *Primer3Plus*. En concreto, en la Figura I.8 se muestra el fragmento del gen *16S rRNA* obtenido para el bioindicador *Escherichia coli* y la localización de los cebadores diseñados. Los cebadores diseñados específicos para *Enterococcus intestinalis* se muestran en la Figura I.9, para *Salmonella* spp en la Figura I.10, y para *Legionella* spp en la Figura I.11.

En la Tabla I.18 se recogen los cebadores específicos diseñados en la aproximación 1.

Escherichia coli

(WDCM 00012)

1 CTTAGGGCCT CTTGCCATCG GATGTGCCCA GATGGGATTA GCTAGTAGGT

51 GGGGTAACGG CTCACCTAGG CGACGATCC***C TAGCTGGTCT GAGAGGATG***A

ECU1F

101 CCAGCCACAC TGGAACTGAG ACACGGTCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA

151 GTGGGGAATA TTGCACAATG GGCGCAAGCC TGATGCAGCC ATGCCGCGTG

201 TATGAAGAAG GCCTTCGGGT TGTAAAGTAC TTTCAGCGGG GAGGAAGGGA

251 GTAAAGTTA***A TACCTTTGCT CATTGACG***TT ACCCGCAGAA GAAGCACCGG

ECU2F

301 CTAACTCCGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGGTGCA AGCGTTAATC

351 GGAATTACTG GGCGTAAAGC GCACGCAGGC GGTTTGTTAA GTCAGATGTG

401 AAATCCCCGG GCTCAACCTG GGAACTGCAT CTGATACTGG CAAGCTTGAG

451 TCTCGTAGAG GGGGGNAGAA TTCCAGGTGT AGCGGTGAAA TGCGTAGAGA

501 TCTGGAGGAA TACCGGTGGC GAAGGCGGCC CCCTGGACGA AGACTGACGC

551 TCAGGTGCGA AAGCGTGGGG AGCAAACAGG ATTAGATACC CTGGTAGTCC

601 ACGCCGTAAA CGATGTCGAC TTGGAGGTTG TGCCCTTGAG GCGTGGCTTC

651 CGGAGCTAAC GCGTTAAGTC GACCGCCTGG GGAGTACGGC CGCAAGGTTA

701 AAACTCAAAG GAATTGACGG GGGCCCGCAC AAGCG***GTGGA GCATGTGGTT***

ECU1R

751 ***TAAT***TCGATG CAACGCGAAG ***AACCTTACCT GGTCTTGACA*** TCCAGGGAAG

ECU2R

801 TTTTCCGAGA TACTAACTTC CCTGCCGCAC CTGCGCCACC ACTATACAAT

851 CGCTACCATC GCGTTGACAT AGGTGGGCGT AGCGTTATCG GTAATGCCCA

901 GCGCCACCGG TACCCACAGT TACCAGCAGT CCGAAACGCA GCGTGACAGC

951 CGCTCCCCAG AATAAACTGG TGCCCTGCAG CGAAAAACGC GTTTCACCAT

1001 TGCCCTTACG ACCAGGGCCA ***CACACGAGTT GCATGTATTC*** ATGAAACGGC

ECU3R

1051 GGGTCATGTT GATGAAATTC CAGGACTGCC CCGGACGCGC CACCGCCCGT

1101 TTGGGAATGT AAATATTGAC TCAACGACCG CACCACCGTA GGCCAGTGCG

1151 CATGCGAATG CCAGGGCTGA CAAGGACATG CCAGCGTACA CACCGCCCGT

Figura I.8. Localización de los cebadores propios diseñados, con orientación *forward* (F) y *reverse* (R), en la secuencia de la cepa pura de *Escherichia coli* (WDCM 00012) obtenida de la amplificación realizada con los juegos de oligos universales UF-UR (Cho *et al.*, 2003).

Enterococcus faecalis
(WDCM 00009)

1 TCGCTGATGG ATGGACCCGC GGTGCATTAG CTAGTTGGTG AGGTAACGGC

51 TCACCAAGGC CACGATGCAT AGCCGACCTG AGAGGGTGAT CGGCCACACT

101 GGGACTGAGA CACGGCCCAG ACTCCTACGG G***AGGCAGCAG TAGGGAATCT***
EFU1F

151 ***T***CGGCAATGG GCGAAAGTCT GACCGAGCAA CGCCGCGTGA GTGAAGAAGG

201 TTTTCGGATC GTAAAACTCT GTTGTTAGAG AAGAACAAGG ACGTTAGTAA

251 CTGAACG***TCC CCTGACGGTA TCTAACCAGA*** AAGCCACGGC TAACTACGTG
EFU2F

301 CCAGCAGCCG CGGTAATACG TAGGTGGCAA GCGTTGTCCG GATTTATTGG

351 GCGTAAAGCG AGCGCAGGCG GTTTCTTAAG TCTGATGTGA AAGCCCCCGG

401 CTCAACCGGG GAGGGTCATT GGAAACTGGG AGACTTGAGT GCAGAAGAGG

451 AGAGTGGAAT TCCATGTGTA GCGGTGAAAT GCGTAGATAT ATGGAGGAAC

501 ACCAGTGGCG AAGGC***GGCTC TCTGGTCTGT AACTG***ACGCT GAGGCTCGAA
EFU3F

551 AGCGTGGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCCGTAAAC

601 GATGAGTGCT AAGTGTTGGA GGGTTTCCGC CCTTCAGTGC TGCAGCAAAC

651 GCATTAAGCA CTCCGCCTGG GGAGTACGAC CGCAAGGTAG AAACTCAAAG

701 GAATTGACGG GGACCCGCAC AAGCGGTGGA GCATGTGGTT TAATTCGAAG

751 CAACGCGAAG AACCTTACCA GGTCTTGACA TCCTTTGACC ACTCTAGAGA

801 TAGAGCTTTC CCTTCGGGGA CAAAGTGACA GGTGGTGCAT GGTTGTCGTC

851 AGCTCGTG***TC GTGAGATGTT GGGTTAA***GTC CCGCAACGAG CGCAACCCTT
EFU1R

901 ATTGTTAGTT GCCATCATTT AGTTGGGCAC TCTAGCGAGA CTGCCGGTGA

951 CAAACCGGAG GAAGGTGGGG ATGACGTCAA ATCATCATGC CCCTTATGAC

1001 CTGGGCTACA CACGTGCTAC AATGGGAAGT ACAACGAGTC GCTAGACCGC

1051 GAGGTCATGC AAATCTCTTA AAGCTTCTCT CAG

Figura I.9. Localización de los cebadores propios diseñados, con orientación *forward* (F) y orientación *reverse* (R), en la secuencia correspondiente a la cepa pura de *Enterococcus faecalis* (WDCM 00009) obtenida de la amplificación con los juegos de oligos universales UF-UR (Cho *et al*., 2003).

Salmonella enterica
(WDCM 00030)

1 GAAACTGCCT GATGGAGGGG GATAACTACT GGAAACGGTG GCTAATACCG

51 CATAACGTCG CAAGACCAAA GAGGGGGACC TTCGGGCCTC TTGCCATCAG

101 ATGTGCCCAG ATGGGATTAG CTAGTTGGTG AGGTAACGGC TCACCAAGGC

151 GAC*GATCCCT AGCTGGTCTG AG*AGGATGAC CAGCCACACT GGAACTGAGA
SALU1F

201 CACGGTCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG TGGGGAATAT TGCACAATGG

251 GCGCAAGCCT GATGCAGCCA TGCCGCGTGT ATGAAGAAGG CCTTCGGGTT

301 GTAAAGTACT TTCAGCGGGG AGGAAGGTGT TGTGGT*TAAT AACCGCAGCA*
SALU1R

351 *ATTGA*CGTTA CCCGCAGAAG AAGCATCGGC TAACTCCGTG CCAGCAGCCG

401 CGCAAATACG GAGGGTTCTA GCGTTAATCG GAATTACTGG GCGTAAAGCG

451 CATTCAGGCG GTGTGTCAAG TCGGATGTGA AATCCCCGGG CTCAACCTGG

501 GAAATGCATT CGAAACTGGC AGGCTTGAGT CTTGTAGAGG GCGGGTAGAA

551 TTCCAGGTGT AGCGGAATAA T*GCGTAGAGA TCTGGAGGAA T*ACCGGTGGC
SALU2R

601 GAAGGCGGCC CCCTGGACAA AGACTGACGC TCAGGTGCGA AAGCGTGGGG

651 AGCAAACAGG ATTAGATACC CTGGTAGTCC ACGCCGTAAA CGATGTCTAC

701 TTGGAGGTTG TGCCCTTGAG GCGTGGCTTC CGGAGCTAAC GCGTTAAGTA

751 GACCGCACTG GGGAGTACGG CCGCAAGGTT AAAACTCAAA GGAATTGACG

801 GGGGCCCGCA TCAAGCGGTG GAGCATGTGG TTTTAATTCG ATGCAACGCG

851 AAGAACCTTA CCTGGTCTGT GACATCCACA AAAGAATCCA GAGATGGATT

901 TGTGCCTTCG GGAACTGTGA GACAGGTGCT GCATGGCTGT CGTCAGCTCG

951 TGTTGTGAAA TGTTGGGTTA AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CCTTATCCTT

1001 TGTTGCCAGC GGTTAGGCCG GGAACTCAAA GGAGACTGCC AGTGATAAAC

1051 TGGAGGAAGG TGGGGATGAC GTCAAGTCAT CATGGCCCTT ACGACCAGGG

1101 CTACACACGT GCTACAATGG CG*CATACAAA GAGAAGCGAC* CTCGCGAGAG
SALU3R

Figura I.10. Localización de los cebadores propios diseñados, con orientación *forward* (F) y orientación *reverse* (R), en la secuencia correspondiente a la cepa pura de *Salmonella enterica* (WDCM 00030) obtenida de la amplificación con los juegos de oligos universales UF-UR (Cho *et al*., 2003).

Legionella pneumophila
(WDCM 00205)

1 AGATGGCGAG TGGCGAACGG GTGAGTAACG C*GTAGGAATA TGCCTTGAAG*
LPU1F
51 *A*GGGGGACAA CT*TGGGGAAA CTCAAGCTAA TA*CCGC*ATAA TGTCTGAGGA*
LPU2F *LPU3F*
101 *CGAAAG*CTGG GGACCTTCGG GCCTGGCGCT TTAAGATTAG CCTGCGTCCG
151 ATTAGCTAGT TGGTGGGGTA AGGGCCTACC AAGGCGACGA TCGGTAGCTG
201 GTCTGAGAGG ATGACCAGCC ACACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC
251 TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATATTGGAC AATGGGGGCA ACCCTGATCC
301 AGCAATGCCG CGTGTGTGAA GAAGGCCTGA GGGTTGTAAA GCACTTTCAG
351 TGGGGAGGAG GGTTGATAGG TTAAGAGCTG ATTAACTGGA CGTTACCCAC
401 AGAAGAAGCA CCGGCTAACT CCGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGGAGGG
451 TGCGAGCGTT AATCGGAATT ACTGGGCGTA AAGGGTG*CGT AGGTGGTTGA*
LPU1R
501 *TTAAGTT*ATC TGTGAAATTC CTGGGCTTAA CCTGGGACGG TCAGATAAT*A*
551 *CTGGTTGACT CGAGTATGG*G AGAGGGTAGT GGAATTTCCG GTGTAGCGGT
LPU2R
601 GAAATGCGTA GAGATCGGAA GGAACACCAG TGGCGAAGGC GGCTACCTGG
651 CCTAATACTG ACACTGAGGC ACGAAAGCGT GGGGAGCAAA CAGGATTAGA
701 TACCCTGGTA GTCCACGCTG TAAACGATGT CAACTAGCTG TTGGTTATAT
751 GAAAATAATT AGTGGCGCAG CAAACGCGAT AAGTTGACCG CCTGGGGAGT
801 ACGGTC*GCAA GATTAAAACT CAAAGG*AATT GACGGGGGCC CGCACTAGAG
LPU3R
851 GTGGTACACG TAGTGTAATT TGATGCAACG ATCGTAATCC TGTTTGCTCT
901 TCACGCACAG TGAATTTCGC AGAGATGCCT CAGTGTCAGT ATTAGGCCAG
951 GTACAGCCGC CTTCTGACTG CTGTTCCTTC CGATCGCGAC GCATTTCGGC
1001 TTTACACCGG AGATTCCATT ACCCTCTACT CAAGTCAACT TTATGTGATG
1051 GTGGGGACTC TAAGGAGACT GCCGGTGACA AACCGGAGGA AGGCGGGGAT
1101 GACGTCAAGT CATCATGGCC CTTACGGGTA GGGCTACACA CGTGCTACAA
1151 TGGCCGATAC AGAGGGCGGC G

Figura I.11. Localización de los oligos propios diseñados, con orientación *forward* (F) y orientación *reverse* (R), en la secuencia correspondiente a la cepa pura de *Legionella pneumophila* (WDCM 00205) obtenida de la amplificación con los juegos de *primers* universales UF-UR (Cho *et al.*, 2003).

Tabla I.18. Pares de cebadores específicos usados para la identificación de los bioindicadores y patógenos bacterianos empleados en valoración de calidad de aguas, diseñados en este trabajo, a partir de la región completa del gen *16S rRNA*.

Organismo	**Oligos**	**Secuencia** (5'→3')	**Juegos de cebadores**	**Par de oligos** [a]	**Amplicón**[b] (pb)	**T_m**[c] (ºC)
Escherichia coli	ECU1F	CTAGCTGGTCTGAGAGGATG	ECU1F- ECU2R ECU2F- ECU2R ECU2F- ECU3R	ECU2F-ECU2R	531	54
	ECU2F	ATACCTTTGCTCATTGACG				
	ECU1R	ATTAAACCACATGCTCCAC				
	ECU2R	TGTCAAGACCAGGTAAGGTT				
	ECU3R	GAATACATGCAACTCGTGTG				
Enterococcus intestinalis	EFU1F	AGGCAGCAGTAGGGAATCTT	EFU1F- EFU1R EFU2F-EFU1R EFU3F-EFU1R	EFU2F-EFU1R	620	55
	EFU2F	TCCCCTGACGGTATCTAAC				
	EFU3F	GGCTCTCTGGTCTGTAACTG				
	EFU1R	TTAACCCAACATCTCACGA				
Salmonella spp	SALU1F	GATCCCTAGCTGGTCTGAG	SALU1F-SALU1R SALU1F-SALU2R SALU1F-SALU3R	SALU1F-SALU1R	202	55
	SALU1R	TCAATTGCTGCGGTTATTA				
	SALU2R	ATTCCTCCAGATCTCTACGC				
	SALU3R	GGTCGCTTCTCTTTGTAT				
Legionella spp	LPU1F	GTAGGAATATGCCTTGAAGA	LPU1F- LPU3R LPU2F- LPU2R LPU3F- LPU1R	LPU3F-LPU1R	421	52
	LPU2F	TGGGGAAACTCAAGCTAATA				
	LPU3F	ATAATGTCTGAGGACGAAAG				
	LPU1R	AACTTAATCAACCACCTACG				
	LPU2R	CCATACTCGAGTCAACCAGT				
	LPU3R	CCTTTGAGTTTTAATCTTGC				

Primers diseñados en la Aproximación 1 (acorde al *16S rRNA* completo): ECU: específicos para *Escherichia coli*; EFU: específicos para *Enterococcus intestinalis*; SALU: específicos para *Salmonella* spp; LPU: específicos para *Legionella* spp. Cebadores diseñados en la Aproximación 2 (de acuerdo al dominio Bacteria): ECD: específicos para *Escherichia coli*; EFD: específicos para *Enterococcus intestinalis*; SALD: específicos para *Salmonella* spp; LPD: específicos para *Legionella* spp.

a: Par de oligos seleccionado para ser validado en ADN ambiental; b: Tamaño esperado del amplicón; c: Tm: *Melting temperature* o temperatura de hibridación.

Aproximación 2: Validación de los juegos de *primers* específicos a partir del domino Bacteria

Como resultado de la segunda aproximación, se obtuvieron bandas de los tamaños esperados para los dos juegos de *primers* específicos del dominio Bacteria, utilizando el ADN de las diferentes cepas como *template* (Tabla I.12).

En concreto, con el juego de oligos 9F-926R se obtuvieron amplicones solo para los bioindicadores *E. coli* y *Enterococcus faecalis* de ca. 917 pb (Figura I.12B). Mientras que, de las amplificaciones realizadas con el par de cebadores 341F-926R, se obtuvieron amplicones de ca. 585 pb, para todas las cepas bacterianas ensayadas (Figura I.12B).

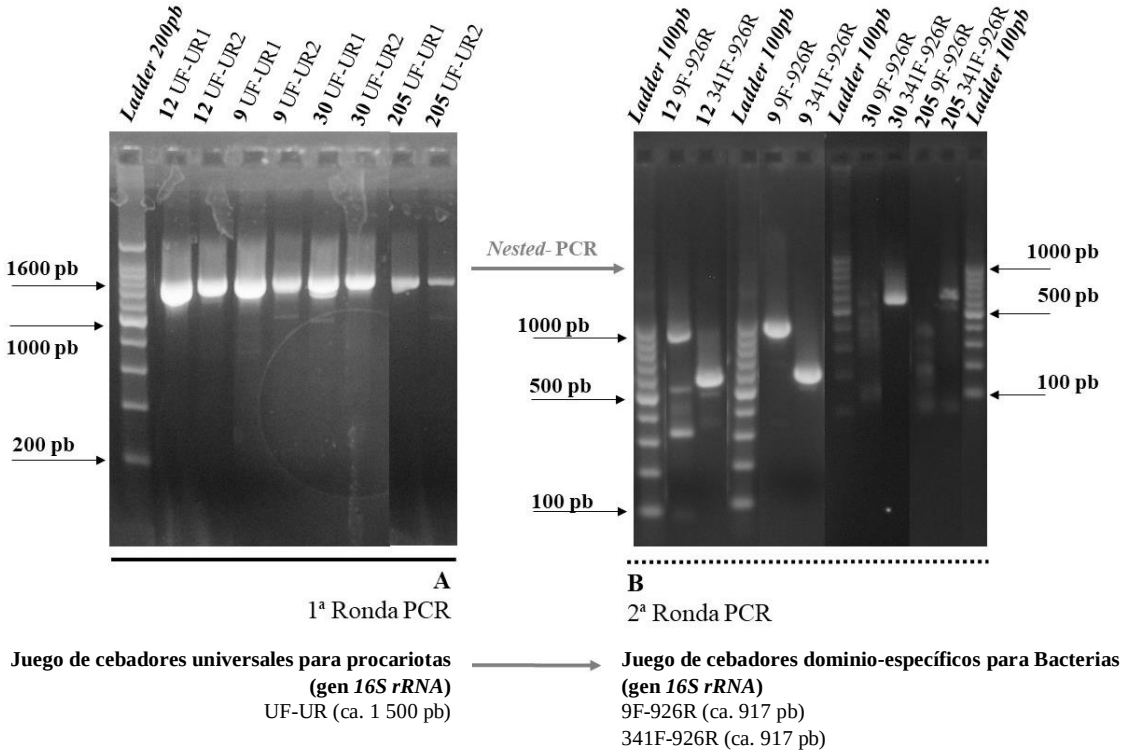


Figura I.12. Electroforesis de control de las amplificaciones *nested*-PCR correspondientes a la Aproximación 2. **A.** 1ª Ronda con el par de *primers* universal del *16S rRNA* (UF-UR) (región extensa); **B.** 2ª Ronda PCR con los juegos de oligos dominio-específicos (Muyzer *et al.*, 1993, 1995; Lee *et al.*, 2010) (regiones diana). Códigos de las muestras 12: WDCM 00012, *Escherichia coli;* 9: WDCM 00009, *Enterococcus intestinalis*; 30: WDCM 00030, *Salmonella enterica.*; y, 205: WDCM 00205, *Legionella pneumophila*). 1 y 2 hacen referencia al número de duplicado de la muestra. Las escaleras de ADN utilizadas son: *200 bp DNA ladder* y *100 bp DNA ladder* (Omega Bio-Tek Inc). La primera de ellas consta de 11 bandas con tamaños desde 200 pb hasta 2 000 pb en incrementos de 200 pb, incluyendo un fragmento de 3 000 pb. La segunda consta de 10 bandas con tamaños desde 100 pb hasta 1 000 pb, en incrementos de 100 pb.

Las bandas seleccionadas para su purificación y posterior secuenciación fueron las obtenidas con el juego de cebadores 9F-926R para *E. coli* y *Enterococcus faecalis* (ca. 917 pb) y el par de oligos 341F-926R, con las cepas bacterianas *Salmonella enterica* y *Legionella pneumophila* (ca. 585 pb). La validación de las secuencias obtenidas en la herramienta BLAST resultó corresponder al taxón filogenético esperado en todos los casos.

Al igual que en la primera aproximación, se acometió el diseño de los *primers* con la herramienta *Primer3Plus*, obteniendo del mismo tres juegos de *primers* específicos para cada uno de los bioindicadores y patógenos bacterianos objetivo. En la Figura I.13 se muestra la secuencia resultante de la amplificación con los *primers* domino-específicos (9F-926R) para el bioindicador bacteriano *E. coli*. De igual modo, en esta figura se presentan las localizaciones de los cebadores diseñados.

Escherichia coli
(WDCM 00012)

```
1     CATGCAGTCG AACGGTAACA GGAAGCAGCT TGCTGCTTTG CTGACGAGTG
51    GCGGACGGGT GAGTAATGTC TGGGAAACTG CCTGATGGAG GGGGATAACT
                                       ECD1F
101   ACTGGAAACG GTAGCTAATA CCGCATAACG TCGCAAGACC AAAGAGGGGG
151   ACCTTCGGGC CTCTTGCCAT CGGATGTGCC CAGATGGGAT TAGCTAGTAG
201   GTGGGGTAAC GGCTCACCTA GGCGACGATC CCTAGCTGGT CTGAGAGGAT
                                       ECD2F
251   GACCAGCCAC ACTGGAACTG AGACACGGTC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG
301   CAGTGGGGAA TATTGCACAA TGGGCGCAAG CCTGATGCAG CCATGCCGCG
351   TGTATGAAGA AGGCCTTCGG GTTGTAAAGT ACTTTCAGCG GGGAGGAAGG
401   GAGTAAAGTT AATACCTTTG CTCATTGACG TTACCCGCAG AAGAAGCACC
451   GGCTAACTCC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGGAGGGTG CAAGCGTTAA
501   TCGGAATTAC TGGGCGTAAA GCGCACGCAG GCGGTTTGTT AAGTCAGATG
551   TGAAATCCCC GGGCTCAACC TGGGAACTGC ATCTGATACT GGCAAGCTTG
601   AGTCTCGTAG AGGGGGGTAG AATTCCAGGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA
                            ECD1R
651   GATCTGGAGG AATACCGGTG GCGAAGGCGG CCCCCTGGAC GAAGACTGAC
701   GCTCAGGTGC GAAAAGCGTG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG
                                       ECD2R
751   TCCACGCCGT AAACGATGTC GACTTGNAGG TTGTGCCCTT GAGGCGTGGC
801   TTCCGGAGCT AACGCGTTAA GTCGACCCGC CTGNGGGAGT ACGGG
```

Figura I.13. Localización de los oligos diseñados, con orientación *forward* (F) y *reverse* (R), en la secuencia de *E. coli* resultante de la amplificación con los juegos de oligos domino-específicos 9F-926R (Muyzer *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2010).

Igualmente, en la Figura I.14, se presentan los cebadores diseñados para *Enterococcus* (*E. faecalis*), así como, la localización de los mismos en el fragmento de la secuencia del gen *16S rRNA* obtenida. En la Figura I.15, se presentan los *primers* diseñados, y su localicación en la secuencia del gen *16S rRNA*, de los patógenos *Salmonella* spp (Figura I.15A) y de *Legionella* spp (Figura I.15B).

Enterococcus faecalis
(WDCM 00009)

1 ATACNTGCAA GTCGAACGCT TCTTTCCTCC CGAGTGCTTG C*ACTCAATTG*
EFD1F

51 *GAAAGAGGAG* TGGCGGACGG GTGAGTAACA CGTGGGTAAC CTA*CCCATCA*
EFD2F

101 *GAGGGGGATA AC*ACTTGGAA ACAGGTGCTA ATACCGCATA ACAGTTTATG

151 CCGCATGGCA TAAGAGTGAA AGGCGCTTTC GGGTGTCGCT GATGGATGGA

201 CCCGCGGTGC ATTAGCTAGT TGGTGAGGTA ACGGCTCACC AAGGCCACGA

251 TGCATAGCCG ACCTGAGAGG GTGATCGGCC ACACTGGGAC TGAGACACGG

301 CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCG*GC AATGGACGAA*
EFD1R

351 *AGTCTG*ACCG AGCAACGCCG CGTGAGTGAA GAAGGTTTTC GGATCGTAAA

401 ACTCTGTTGT TAGAGAAGAA CAAGGACG*TT AGTAACTGAA CGTCCCCT*GA
EFD2R

451 CGGTATCTAA CCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACATGCCAGC AGCCGCGGTA

501 ATACGTAGGT GGCAAGCGTT GTCCG*GATTT ATTGGGCGTA AAG*CGAGCGC
EFD3R

551 AGGCGGTTTC TTAAGTCTGA TGTGAAAAGC CCCC

Figura I.14. Localización de los cebadores diseñados, con orientación *forward* (F) y orientación *reverse* (R), en la secuencia de *Enterococcus faecalis* resultante de la amplificación con los juegos de oligos domino-específicos 9F-926R (Muyzer *et al*., 1995; Lee *et al.*, 2010).

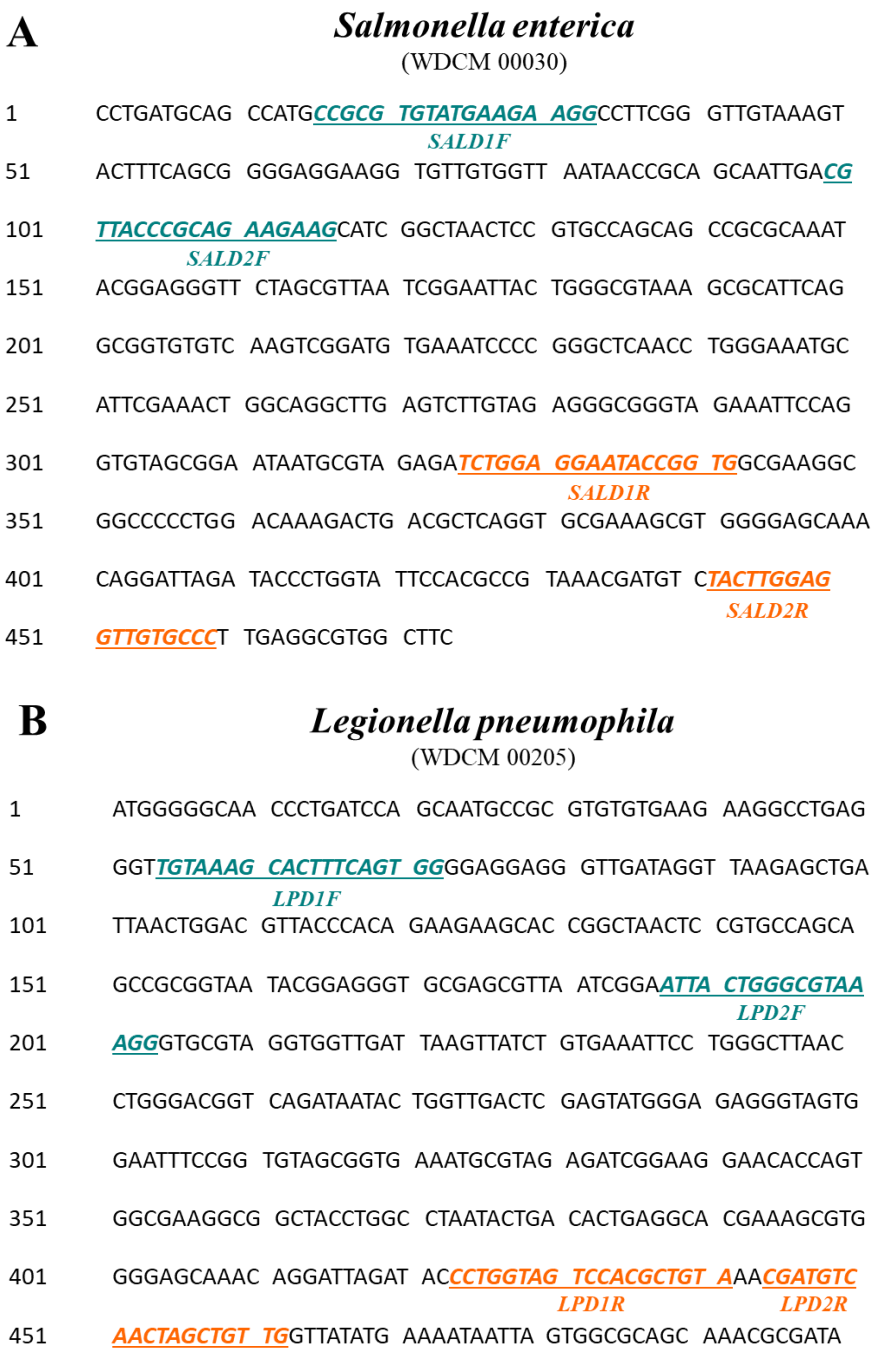


Figura I.15. Localización de los *primers* diseñados, con orientación *forward* (F) y orientación *reverse* (R), en las secuencias del fragmento del gen *16S rRNA* obtenidas de las amplificaciones realizadas con los juegos de oligos dominio-específicos 3418F-926R (Muyzer *et al.*, 1993, 1995) y las cepas bacterianas WDCM 00030 y WDCM 00205. **A.** Secuencia de *Salmonella enterica* y localización de los *primers* diseñados a partir de la misma; **B.** Secuencia de *Legionella pneumophila* y localización de los cebadores diseñados a partir de esta.

En la Tabla I.19 se muestran tanto los primers diseñados acorde al dominio Bacteria, como aquellos juegos de cebadores seleccionados para cada uno de los tipos bacterianos de interés.

Tabla I.19. Juegos de *primers* específicos usados para la identificación de los bioindicadores y patógenos bacterianos empleados en valoración de calidad de aguas, diseñados en este estudio acorde al Dominio Bacteria.

Organismo	**Oligos**	**Secuencia** (5'→3')	**Juegos de cebadores**	**Par de oligos** [a]	**Amplicon**[b] (pb)	$\mathbf{T_m}$[b] (ºC)
Escherichia coli	ECD1F	GGGATAACTACTGGAAACGGTAG	ECD1F-ECD1R ECD1F-ECD2R ECD2F-ECD1R	ECD1F-ECD1R	551	53
	ECD2F	CTAGCTGGTCTGAGAGGATG				
	ECD1R	CGCTACACCTGGAATTCTAC				
	ECD2R	CCAGGGTATCTAATCCTGT				
Enterococcus intestinalis	EFD1F	ACTCAATTGGAAAGAGGAG	EFD1F-EFD2R EFD1F-EFD3R EFD2F-EFD1R	EFD1F-EFD2R	407	52
	EFD2F	CCATCAGAGGGGGATAAC				
	EFD1R	CAGACTTTCGTCCATTGC				
	EFD2R	AGGGGACGTTCAGTTACTA				
	EFD3R	CTTTACGCCCAATAAATC				
Salmonella spp	SALD1F	CCGCGTGTATGAAGAAGG	SALD1F-SALD2R SALD2F-SALD1R SALD2F-SALD2R	SALD1F-SALD2R	444	57
	SALD2F	CGTTACCCGCAGAAGAAG				
	SALD1R	CACCGGTATTCCTCCAGA				
	SALD2R	GGGCACAACCTCCAAGTA				
Legionella spp	LPD1F	TGTAAAGCACTTTCAGTGG	LPD1F-LPD1R LPD1F-LPD2R LPD2F-LPD1R	LPD2F-LPD1R	256	52
	LPD2F	AATTACTGGGCGTAAAGG				
	LPD1R	TCAAGCTTGCCAGTATCAG				
	LPD2R	CAACAGCTAGTTGACATCG				

Primers diseñados en la Aproximación 1 (acorde al *16S rRNA* completo): ECU: específicos para *Escherichia coli*; EFU: específicos para *Enterococcus intestinalis*; SALU: específicos para *Salmonella* spp; LPU: específicos para *Legionella* spp. Cebadores diseñados en la Aproximación 2 (de acuerdo al dominio Bacteria): ECD: específicos para *Escherichia coli*; EFD: específicos para *Enterococcus intestinalis*; SALD: específicos para *Salmonella* spp; LPD: específicos para *Legionella* spp.

a: Par de oligos seleccionado para ser validado en ADN ambiental; b: Tamaño esperado del amplicón; c: Tm: *Melting temperature* o temperatura de hibridación.

I.3.2 | Validación de los cebadores diseñados en muestras de ADN ambiental

En los siguientes apartados se presentan los resultados de la puesta a punto de los procedimientos experimentales llevados a cabo para la validación de los juegos de cebadores diseñados en muestras de ADN ambiental i) preparación de las muestras y aislamiento del ADN ambiental; y, ii) amplificación con los juegos de *primers* diseñados y validación de los mismos.

I.3.2.1. Preparación de las muestras y aislamiento del ADN ambiental

La preparación de las matrices llevada a cabo, específica a cada matriz (Tabla I.20), permitió concentrar y obtener cantidades adecuadas de las muestras (400-1 200 mg) para el óptimo aislamiento del ADN de las mismas.

Tabla I.20. Procedimientos llevados a cabo para la preparación de las matrices agua de mar, agua residual urbana (ARU) y agua residual urbana regenerada (ARUr), utilizados en este estudio.

Procedimiento \ Matriz	Agua de mar	ARU	ARUr
Volumen= 500 mL	+	-	-
Volumen= 100 mL	-	+	+
Filtración [a]	+	-	-
Homogeneización con nitrógeno líquido [b]	+	-	-
Concentración mediante centrifugación [c]	+	+	+
Obtención de *pellet* [d]	+	+	+

+ Procedimiento realizado; - Procedimiento no realizado

[a] Filtración llevada a cabo a través de membranas filtrantes de mix de ésteres de celulosa con tamaño de poro 0,45 µm y 47 mm Ø (HAWP04700, Millipore)

[b] Homogeneizado de las muestras con nitrógeno líquido utilizando morteros de porcelana, para favorecer la lisis celular.

[c] Centrifugaciones sucesivas en rangos de 22 000-25 000 *x g*, empleadas para la concentración de la muestra.

[d] Obtención de precipitados o *pellets* en cantidades óptimas (400-1 200 mg) para el aislamiento del ADN ambiental.

Los resultados obtenidos con el kit *REDExtract-N-Amp™ Plant PCR* (Sigma-Aldrich), no fueron satisfactorios. Como muestra la Figura I.16 y la Tabla I.21, se puede observar la ausencia de bandas definidas en algunas muestras de ARU y ARUr. Por el contrario, los dos protocolos manuales revelaron presencia de

bandas. En concreto, con el protocolo basado en la sal LiOAc, modificado en este estudio, y descrito por Lõoke y colaboradores (2011), se obtuvieron bandas definidas en todas las muestras (Figura I.16 y Tabla I.21). Sin embargo, algunas de las ellas presentaron ADN fragmentado (*smear*).

Respecto al aislamiento de ADN basado en el detergente CTAB (Garcia-Jimenez *et al*., 2009), resultó ser el método a través del cual se obtuvieron bandas de ADN definidas con mayor integridad (escasez o ausencia de ADN fragmentado) (Figura I.16 y la Tabla I.21), y además, en todas las muestras de ADN obtenidas con el protocolo CTAB, las concentraciones resultaron ser óptimas para su posterior utilización como *template* en las reacciones de amplificación (Tabla I.21).

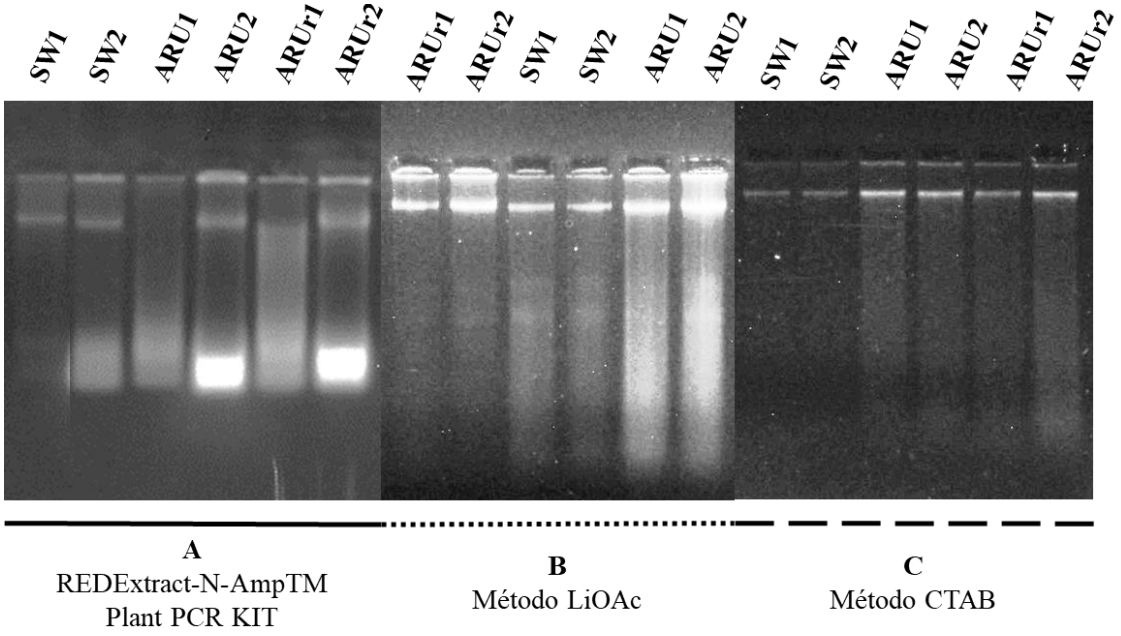


Figura I.16. Electroforesis de control del ADN aislado del agua de mar y agua residual urbana sin tratar y regenerada. **A.** Extracción de ADN realizada con el kit *REDExtract-N-AmpTM Plant PCR* (Sigma-Aldrich); **B.** Protocolo de aislamiento de ADN basado en la acción de LiOAc modificado en este estudio (Lõoke *et al.*, 2011); **C.** Protocolo de extracción de ADN modificado CTAB (Garcia-Jimenez *et al.*, 2009). SW: agua de mar; ARU: agua residual urbana; ARUr: agua residual urbana regenerada. 1 y 2 corresponden al número de duplicado de la muestra.

Atendiendo a los resultados obtenidos para los protocolos de aislamiento de ADN ambiental descritos, la validación de los cebadores diseñados se realizó utilizando como *template* el ADN extraído a partir del método de aislamiento CTAB modificado (Garcia-Jimenez *et al.*, 2009).

Tabla I.21. Resultados de la integridad y concentración del ADN ambiental extraído de muestras de agua de mar, agua residual urbana (ARU) y agua residual urbana regenerada (ARUr), con los protocolos de aislamiento de ADN puestos a puntos en este estudio.

Matriz / **Protocolo de aislamiento de ADN**	**Agua de mar**	**ARU**	**ARUr**
REDExtract-N-Amp™ Plant PCR KIT (Sigma-Aldrich)	+/-	-/+	-
Protocolo LiOAc modificado en este estudio (Lõoke *et al.*, 2011)	+	-/+	+
Protocolo modificado CTAB (Garcia-Jimenez *et al.*, 2009)	+	+	+

Parámetros de itegridad: ausencia de ADN fragmentado o *smear*; y, concentración de ADN: >20 ng μL^{-1} (Meijering *et al.*, 2007)
+ cumple parámetros tanto de integridad, como de concentración
- no cumple parámetros ni de integridad, ni de concentración
+/- cumple parámetros de integridad, pero no de concentración
-/+ no cumple parámetros de integridad, pero sí de concentración

I.3.2.2. Amplificación y validación de los juegos de primers específicos

Los cebadores específicos de los bioindicadores y patógenos bacterianos objetivo diseñados y seleccionados para su validación se recogen en la Tabla I.22.

Asimismo, en la Figura I.17, se muestra la localización, en base a la numeración del gen *16S rRNA* de *E. coli* (Chakravorty *et al.*, 2007), de los pares de cebadores diseñados a valorar, la ubicación de las regiones variables del gen *16S rRNA* y los porcentajes de cobertura de las regiones hipervariables que presentan los *primers* específicos diseñados.

Tabla I.22. Pares de cebadores específicos del segmento completo del gen *16S rRNA* y del dominio Bacteria (gen *16S rRNA*), seleccionados para su validación en muestras de ADN ambiental.

Organismo	**Oligos**	**Posición** [a] (pb)	**Secuencia** (5'→3')	**Par de oligos** [b]	**Amplicon** [c] (pb)	**Tm** [d] (ºC)
Escherichia coli	ECU2F	458	ATACCTTTGCTCATTGACG			
	ECU2R	989	TGTCAAGACCAGGTAAGGTT	ECU2F-ECU2R	531	54
	ECD1F	138	GGGATAACTACTGGAAACGGTAG	ECD1F-ECD1R	551	53
	ECD1R	674	CGCTACACCTGGAATTCTAC			
Enterococcus intestinalis	EFU2F	467	TCCCCTGACGGTATCTAAC			
	EFU1R	1089	TTAACCCAACATCTCACGA	EFU2F-EFU1R	620	55
	EFD1F	77	ACTCAATTGGAAAGAGGAG	EFD1F-EFD2R	407	52
	EFD2R	473	AGGGGACGTTCAGTTACTA			
Salmonella spp	SALU1F	274	GATCCCTAGCTGGTCTGAG			55
	SALU1R	478	TCAATTGCTGCGGTTATTA	SALU1F-SALU1R	202	
	SALD1F	392	CCGCGTGTATGAAGAAGG	SALD1F-SALD2R	444	57
	SALD2R	834	GGGCACAACCTCCAAGTA			53
Legionella spp	LPU3F	171	ATAATGTCTGAGGACGAAAG			
	LPU1R	592	AACTTAATCAACCACCTACG	LPU3F-LPU1R	421	52
	LPD2F	551	AATTACTGGGCGTAAAGG	LPD2F-LPD1R	256	52
	LPD1R	807	TACAGCGTGGACTACCAGG			

Primers diseñados en la Aproximación 1 (acorde al *16S rRNA* completo): ECU: específicos para *Escherichia coli*; EFU: específicos para *Enterococcus intestinalis*; SALU: específicos para *Salmonella* spp; LPU: específicos para *Legionella* spp. Cebadores diseñados en la Aproximación 2 (de acuerdo al dominio Bacteria): ECD: específicos para *Escherichia coli*; EFD: específicos para *Enterococcus intestinalis*; SALD: específicos para *Salmonella* spp; LPD: específicos para *Legionella* spp.

[a] Localización de los cebadores según enumeración del gen *16S rRNA* de *E. coli*; [b] Par de oligos seleccionado para ser validado en ADN ambiental; [c] Tamaño esperado del amplicón; [d] Tm: *Melting temperature* o temperatura de hibridación.

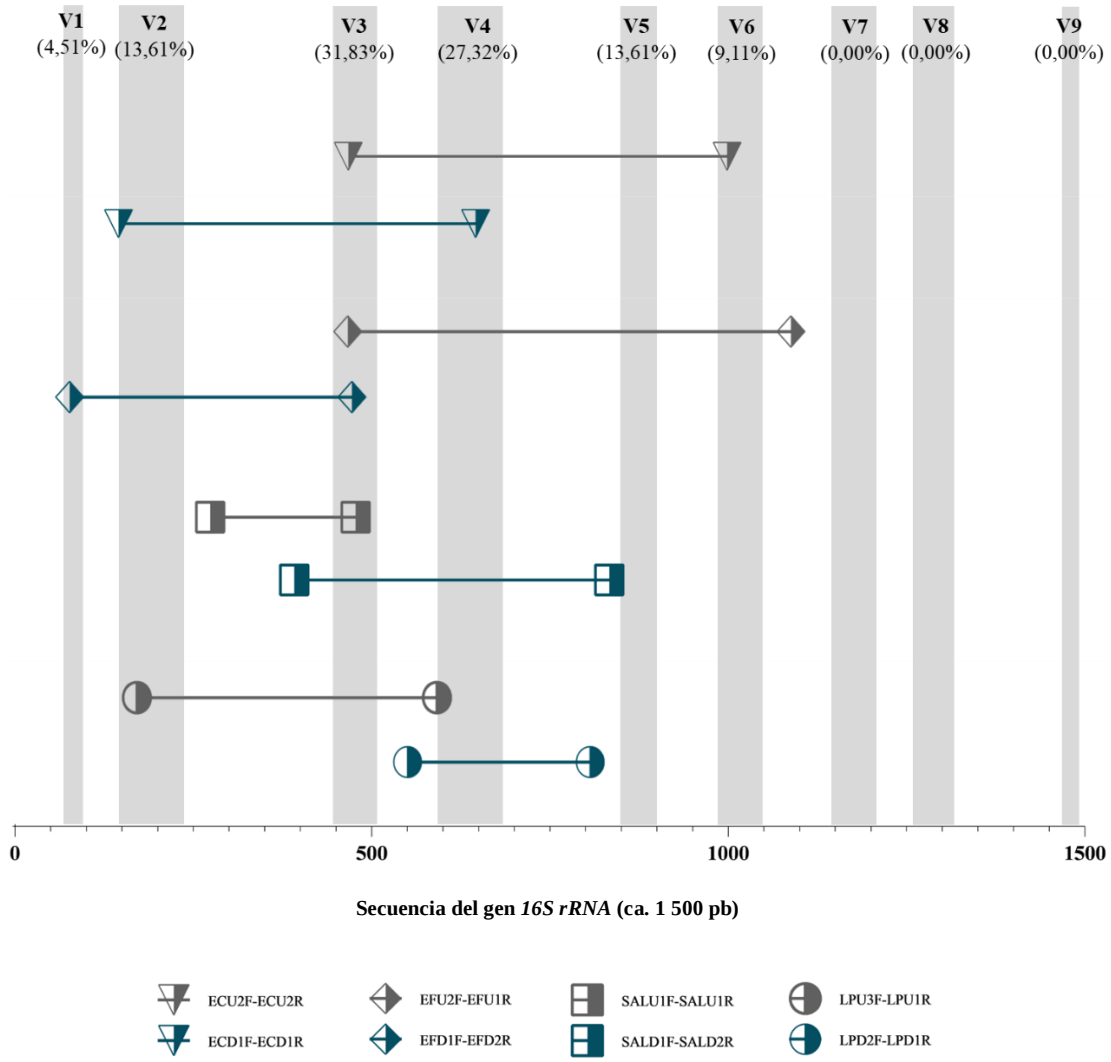


Figura I.17. Fragmento completo del gen *16S rRNA* (ca. 1 500 pb), ubicaciones de las regiones hipervariables, y localización y tamaños de los amplicones esperados de los juegos de cebadores diseñados en este estudio. La localización de las regiones hipervariables del gen *16S rRNA*, responde a las posiciones descritas para *Escherichia coli* (Chakravorty *et al.*, 2007). Las zonas sombreadas muestran las regiones hipervariables (V1-V9). Los porcentajes indican las tasas de cobertura de los segmentos hipervariables de cada uno de los *primers* diseñados (100%= 22 regiones hipervariables amplificadas). *Primers* diseñados en la Aproximación 1 (acorde al *16S rRNA* completo): ECU: específicos para *Escherichia coli*; EFU: específicos para *Enterococcus intestinalis*; SALU: específicos para *Salmonella* spp; LPU: específicos para *Legionella* spp. Cebadores diseñados en la Aproximación 2 (de acuerdo al dominio Bacteria): ECD: específicos para *Escherichia coli*; EFD: específicos para *Enterococcus intestinalis*; SALD: específicos para *Salmonella* spp; LPD: específicos para *Legionella* spp.

Como se puede observar en la figura anterior (Figura I.17), las regiones hipervariables V3 y V4, son las regiones que presentan una mayor tasa de cobertura, 31,83% y el 27,32%, respectivamente, seguidas por las regiones V2 y V5, ambas con un porcentaje de cobertura del 13,61%, la región V6 (9,11%), y por último, la región V1 (4,51%).

A diferencia de las regiones mencionadas, las regiones V7, V8 y V9, resultaron no ser amplificadas por ninguno de los pares de cebadores diseñados.

Con respecto a las amplificaciones llevadas a cabo con los juegos de *primers* presentados anteriormente (Tabla I.22 y Figura I.17), los resultados obtenidos se muestran en las Figuras I.18 y I.19, y la Tabla I.23. Específicamente, en la Figura I.18 se presentan los resultados obtenidos para los juegos de cebadores específicos de los bioindicadores *E. coli* y *Enterococcus intestinalis*, y en la Figura I.19, los resultados de las amplificaciones obtenidas con los pares de oligos específicos de los patógenos bacterianos *Salmonella* spp y *Legionella* spp. Todas las amplificaciones mostradas en las dos figuras corresponden a las PCR llevadas a cabo en muestras de ADN aisladas de agua residual urbana.

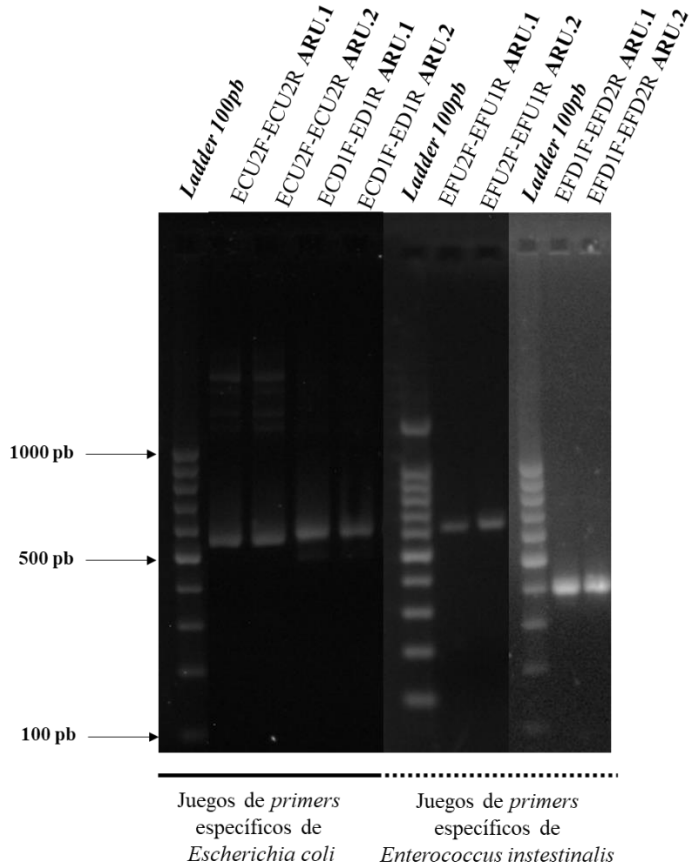


Figura I.18. Electroforesis de control de las bandas amplificadas con los juegos de cebaderos específicos para *E. coli* (ECU2F-ECU2R, ca. 531 pb y ECD1F-ECD1R, ca. 551 pb) y *Enterococcus faecalis* (EFU2F-EFU1R, ca. 620 pb y EFD1F-EFD2R, ca. 407 pb) realizadas con el ADN aislado de las muestras de agua residual urbana (ARU). 1 y 2 hacen referencia al número de duplicado de la muestra. La escalera de ADN utilizada fue *100 bp DNA ladder* (Omega Bio-Tek Inc).

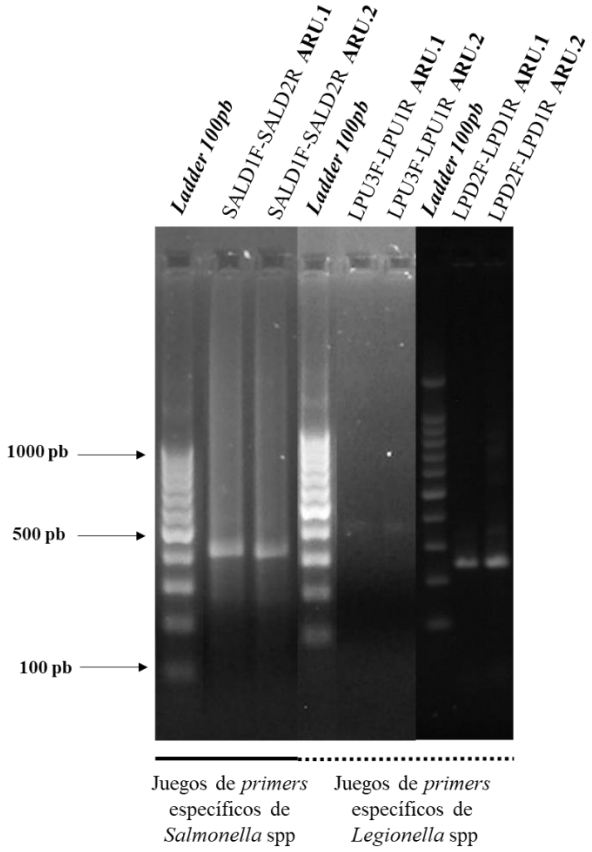


Figura I.19. Electroforesis de control de las amplificaciones realizadas con los juegos de cebaderos específicos para *Salmonella* spp (SALD1F-SALD2R, ca. 444 pb) y *Legionella* spp (LPU3F-LPU1R, ca 421 pb y LPD2F-LPD1R, ca. 256 pb) realizadas con el ADN aislado de las muestras de agua residual urbana (ARU). 1 y 2 hacen referencia al número de duplicado de las muestras. La escalera de ADN utilizada fue *100 bp DNA ladder* de la casa comercial Omega Bio-Tek Inc.

Atendiendo a los resultados de las amplificaciones llevadas a cabo con ADN extraído de agua residual urbana, expuestos en las Figuras I.18 y I.19, se observa que las amplificaciones con todos los juegos de cebadores diseñados resultaron en amplicones de los tamaños esperados en ausencia de amplificaciones inespecíficas (no se visualizan bandas múltiples), a excepción del juego de *primers* SALU1F-SALU1R, para el cual no se obtuvo amplificación, y para el par de oligos ECU2F-ECU2R, cuya amplificación presentó múltiples bandas tenues.

No obstante, el juego de oligos específico del patógeno *Legionella* spp (LPU3F-LPU1R), procedente del diseño de *primers* de acuerdo a la región completa del gen *16S rRNA* (Aproximación 1), dió como resultado bandas tenues (Figura I.19).

Igualmente, respecto a los resultados de las amplificaciones obtenidas con las muestras de ADN de las dos matrices restantes (agua de mar y agua residual urbana regenerada), cabe mencionar que se obtuvieron resultados similares a los expuestos anteriormente para ARU (Tabla I.23), solo detectándose diferencias entre la matriz de origen marino (agua de mar) y las matrices de origen residual (ARU y ARUr) en las amplificaciones llevadas a cabo con los juegos de *primers* específicos de *Legionella* spp.

En agua de mar, las amplificaciones realizadas con los dos juegos de cebadores diseñados para la detección de *Legionella* spp, no obtuvieron amplicones (Tabla I.23).

Tabla I.23. Resultados de las amplificaciones de los fragmentos del gen *16S rRNA* a partir de los juegos de cebadores diseñados para los bioindicadores y patógenos bacterianos objetivo, y, el ADN ambiental extraído de muestras de agua de mar, agua residual urbana (ARU) y agua residual urbana regenerada (ARUr).

Organismo	**Par de oligos**	**Matriz**		
		ARU	**ARUr**	**Agua de mar**
Escherichia coli	ECU2F-ECU2R	+	+	+
	ECD1F-ECD1R	+	+	+
Enterococcus intestinalis	EFU2F-EFU1R	+	+	+
	EFD1F-EFD2R	+	+	+
Salmonella spp	SALU1F-SALU1R	-	-	-
	SALD1F-SALD2R	+	+	+
Legionella spp	LPU3F-LPU1R	-*	-*	-
	LPD2F-LPD1R	+	+	-

Primers diseñados en la Aproximación 1 (acorde al *16S rRNA* completo): ECU: específicos para *Escherichia coli*; EFU: específicos para *Enterococcus intestinalis*; SALU: específicos para *Salmonella* spp; LPU: específicos para *Legionella* spp. Cebadores diseñados en la Aproximación 2 (de acuerdo al dominio Bacteria): ECD: específicos para *Escherichia coli*; EFD: específicos para *Enterococcus intestinalis*; SALD: específicos para *Salmonella* spp; LPD: específicos para *Legionella* spp.
+ Obtención de amplicón; - No se obtiene amplicón; *La banda obtenida es tenue.

En la Tabla I.24 se muestra la anotación de las secuencias obtenidas y validadas en la herramienta BLAST.

Tabla I.24. Anotación de las secuencias obtenidas en este estudio y validadas en la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Organismo *target*	**Juego de primers**	**Matriz**	**Secuencia**	**Anotación** (secuencia parcial del gen *16S rRNA*)	**% de identidad**	**E-valor**
Escherichia coli	ECU2F-ECU2R	Agua de mar	SW_EC_U	*Escherichia coli* cepa Huaian-183	98,34	0,0
		ARU	ARU_EC_U	*Escherichia coli* cepa SF3	99,44	0,0
		ARUr	ARUr_EC_U	*Escherichia coli* cepa 273-c	99,79	0,0
	ECD1F-ECD1R	Agua de mar	SW_EC_D	*Escherichia coli* cepa SB3	100	0,0
		ARU	ARU_EC_D	*Escherichia coli* cepa Ecoli_K12	100	0,0
		ARUr	ARUr_EC_D	*Escherichia coli* cepa AAK_MD_33	99,15	0,0
Enterococcus intestinalis	EFU2F-EFU1R	Agua de mar	SW_EF_U	*Enterococcus sp.* cepa E1RBL5	100	0,0
		ARU	ARU_EF_U	*Enterococcus faecalis* cepa RBRJ015	100	$4x10^{-177}$
		ARUr	ARUr_EF_U	*Enterococcus faecalis* cepa 1OC	99,64	0,0
	EFD1F-EFD2R	Agua de mar	SW_EF_D	*Enterococcus sp.* cepa E1RBL5	99,60	0,0
		ARU	ARU_EF_D	*Enterococcus sp.* cepa E1RBL23	95,60	0,0
		ARUr	ARUr_EF_D	*Enterococcus sp.* cepa E1RBL23	99,14	0,0
Salmonella spp	SALD1F-SALD2R	Agua de mar	SW_SAL_D	*Salmonella sp.* cepa S25-0619	96,57	$2x10^{-176}$
		ARU	ARU_SAL_D	*Salmonella enterica* cepa NRT123	96,75	0,0
		ARUr	ARUr_SAL_D	*Salmonella enterica* cepa NRT123	96,77	$2x10^{-175}$
Legionella spp	LPU3F-LPU1R	ARU	ARU_LP_U	*Legionella pneumophila* cepa Med	100	0,0
		ARUr	ARUr_LP_U	*Legionella pneumophila* cepa Med	99,72	0,0
	LPD2F-LPD1R	ARU	ARU_LP_D	*Legionella pneumophila* cepa OIPH 14_48	100	$2x10^{-129}$
		ARUr	ARUr_LP_D	*Legionella pneumophila* cepa OIPH 14_48	100	$2x10^{-115}$

Primers diseñados y secuencias obtenidas en la Aproximación 1 (acorde al *16S rRNA* completo): EC_U: específicos para *Escherichia coli*; EF_U: específicos para *Enterococcus intestinalis*; SAL_U: específicos para *Salmonella* spp; LP_U: específicos para *Legionella* spp. Cebadores diseñados y secuencias obtenidas en la Aproximación 2 (de acuerdo al dominio Bacteria): EC_D: específicos para *Escherichia coli*; EF_D: específicos para *Enterococcus intestinalis*; SAL_D: específicos para *Salmonella* spp; LP_D: específicos para *Legionella* spp.
ARU: Agua residual urbana; ARUr: Agua residual urbana regenerada.

I.3.3 | Análisis filogenético

El análisis filogenético de las secuencias obtenidas, a través de las dos aproximaciones, se llevó a cabo mediante la estimación *Maximum Likelihood*, y resultó en árboles filogenéticos para cada uno de los tipos bacterianos objetivo. La construcción de los árboles filogenéticos se llevó a cabo en el software genómico MEGA-X (Kumar *et al*., 2018) según el procedimiento descrito en el apartado I.2.3 de material y métodos. En las siguientes tablas (I.25- I.28) se recogen los listados de especies anotadas con mención al número de acceso de cada una de ellas a la base de datos NCBI. En las figuras (I.20-I.23) se muestran los árboles filogenéticos obtenidos correspondientes a los bioindicadores y patógenos estudiados.

Para *E. coli* se extrajeron 13 secuencias de la base de datos (Tabla I.25) que junto con las secuencias problema resultaron en 842 posiciones en el conjunto de datos final. Para *Enterococcus intestinalis* el número de secuencias fue de 17 (Tabla I.26), dándose un total de 1 029 posiciones en el conjunto final de datos; para *Salmonella* spp, el análisis evolutivo abarcó un total de 18 secuencias de nucleótidos (Tabla I.27) con un total de 404 posiciones en el conjunto de datos final; y para *Legionella* spp se utilizó un total de 16 secuencias (Tabla I.28) con un total de 628 posiciones en el conjunto final de datos.

Tabla I.25. Secuencias de *Escherichia* spp incluidas en el análisis filogenético del gen *16S rRNA* realizado en este estudio.

Especies y cepas	**Nº de acceso del gen *16S rRNA***
Proteobacteria Filo	
γ-Proteobacteria	
Enterobacteriaceae familia, *Escherichia* género	
Escherichia albertii TY2018187-8	MK880353
Escherichia albertii Albert 19982	NR_025569
Escherichia albertii BT_HNGU_407	MF573977
Escherichia albertii SP20150242	KX765472
Escherichia coli FC5906	MN661169
Escherichia coli M22	MN305833
Escherichia coli XII-4	MN368506
Escherichia coli YHE-35	KR010977
Escherichia coli UFV 566	MN557318
Escherichia fergusonii KU27	MT032340
Escherichia sp. CA_136_AE_63	LC509337
Escherichia sp. CA_136_AE_79	LC509353
Escherichia sp. CA_136_AN_83	LC509432
Otros géneros de Enterobacteriaceae	
Salmonella bongori GH3Rp	KC864776

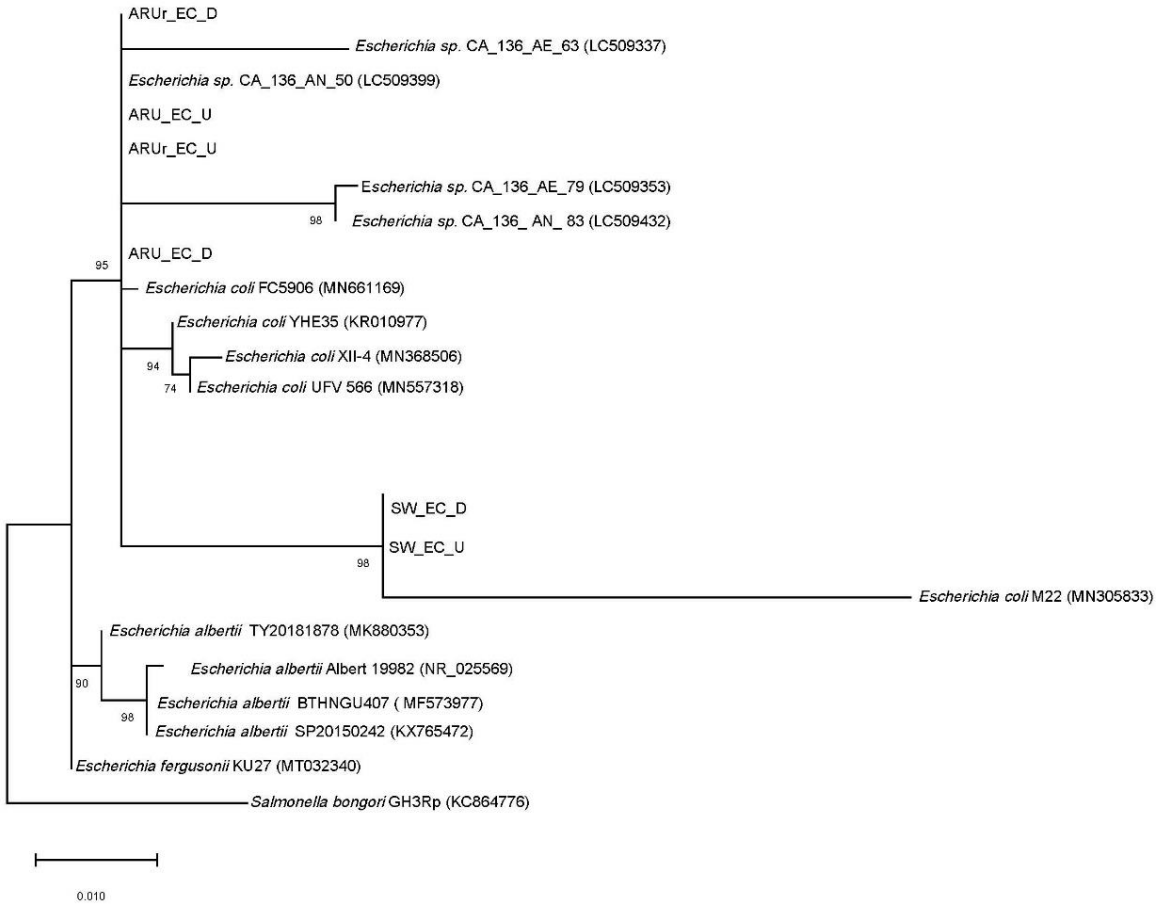


Figura I.20. Árbol *Maximum Likelihood* (ML) de *Escherichia coli* construido a partir de la secuencia del gen *16S rRNA*, utilizando el modelo (GTR) y la Distribución Gamma (G) (2 categorías (+G, parámetro = 0,2573)). El número en el nodo representa los porcentajes *bootstrap*. La evaluación de la fiabilidad del árbol se comprobó realizando 1 000 réplicas a partir del método estadístico *Bootstrapping*. ARU: agua residual urbana; ARUr: agua residual urbana regenerada; SW: agua de mar; EC: juegos de *primers* específicos de *Escherichia coli*; U: par de oligos diseñado en la Aproximación 1 (acorde al *16S rRNA* completo); D: juego de *primers* en la Aproximación 2 (de acuerdo al dominio Bacteria).

Tabla I.26. Secuencias de *Enterococccus* spp incluidas en el análisis filogenético del gen *16S rRNA* realizado en este estudio.

Especies y cepas	**Nº de acceso del gen *16S rRNA***
Firmicutes Filo	
Bacilli	
Enterococcaceae familia, *Enterococcus* género	
Enterococcus durans 2-4	GU139738
Enterococcus durans 6-2	GU177630
Enterococcus durans CNM498_12	KC699219
Enterococcus durans PON12	KF147885
Enterococcus faecalis DUT1805	MN880256
Enterococcus faecalis 5	MH236306
Enterococcus faecalis EF2-7	MN867947
Enterococcus faecium tala2	MG966457
Enterococcus faecium Tala1	MG966456
Enterococcus hirae Su37	KF767935
Enterococcus hirae Su46	KF767944
Enterococcus saccharolyticus qz978	AB761306
Enterococcus saccharolyticus SI46	MN923405
Enterococcus saccharolyticus RCB993	KT261205
Enterococcus saccharolyticus RCB440	KT260652
Enterococcus sp. A3753	MN453632
Enterococcus sp. A3756	MN453635
Otros géneros de Enterococcaceae	
Catellicoccus marimammalium M35043	NR_042357

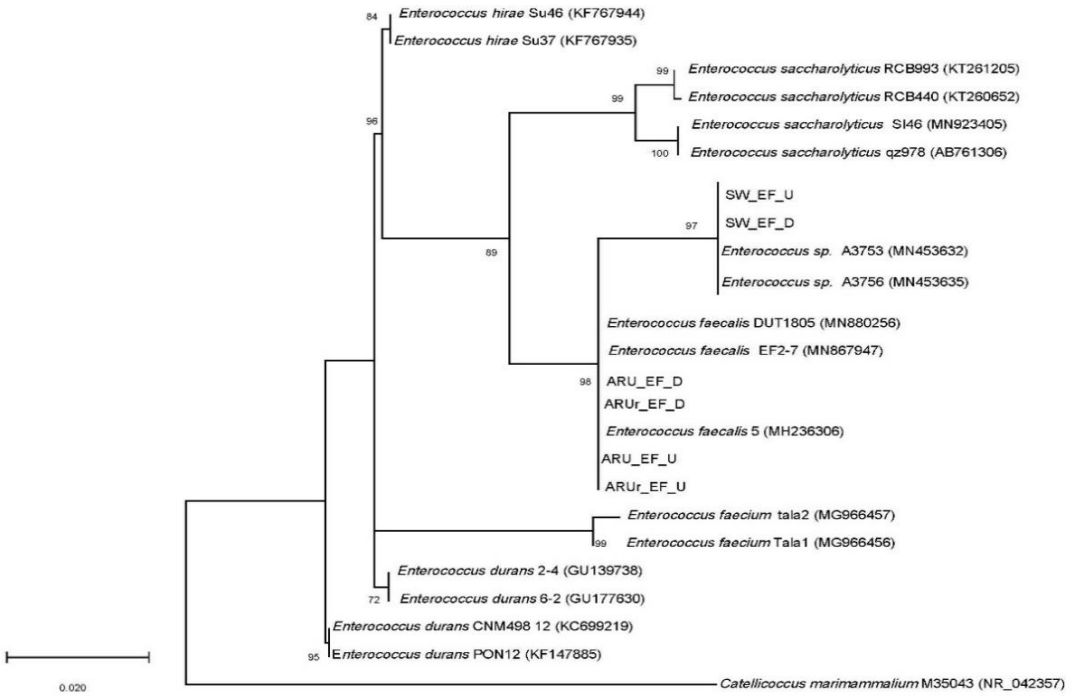


Figura I.21. Árbol ML de *Enterococcus* spp del gen *16S rRNA* construido con el modelo GTR y la distribución G (2 categorías (+G, parámetro= 0,1459)). El número en el nodo representa los valores *bootstrap*. La evaluación de la fiabilidad del árbol se comprobó realizando 1 000 réplicas con el método *Bootstrapping*. ARU: agua residual urbana; ARUr: agua residual urbana regenerada; SW: agua de mar; EC: pares de *primers* de *Enterococcus intestinalis*; U: par de oligos diseñado en la Aproximación 1 (acorde al *16S rRNA* completo); D: par de *primers* en la Aproximación 2 (de acuerdo al dominio Bacteria).

Tabla I.27. Secuencias de *Salmonella* spp incluidas en el análisis filogenético del gen *16S rRNA* llevado a cabo en este trabajo.

Especies y cepas	**Nº de acceso del gen *16S rRNA***
Proteobacteria Filo	
γ-Proteobacteria	
Enterobacteriaceae familia, *Escherichia* género	
Salmonella bongori NCTC 12419	NR_074888
Salmonella bongori GH3Rp	KC864776
Salmonella bongori CalAng_046IBB	MN814059
Salmonella bongori VGM7	MN623691
Salmonella bongori SAMC-RUSOL(18)6	MN606194
Salmonella enterica B6	MN911418
Salmonella enterica FBUI-5	MN596172
Salmonella enterica subsp. enterica JKJKSWS8	MN192076
Salmonella enterica subsp. enterica JKJKSWS6	MN192073
Salmonella enterica subsp. enterica JCM 6982	LC462183
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi UCP-ASN79	MN726575
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi UCP-ASN52	MN726572
Salmonella sp. FC1397	MG871244
Salmonella sp. SP6	MH985331
Otros géneros de Enterobacteriaceae	
Shigella boydii P288	NR_104901

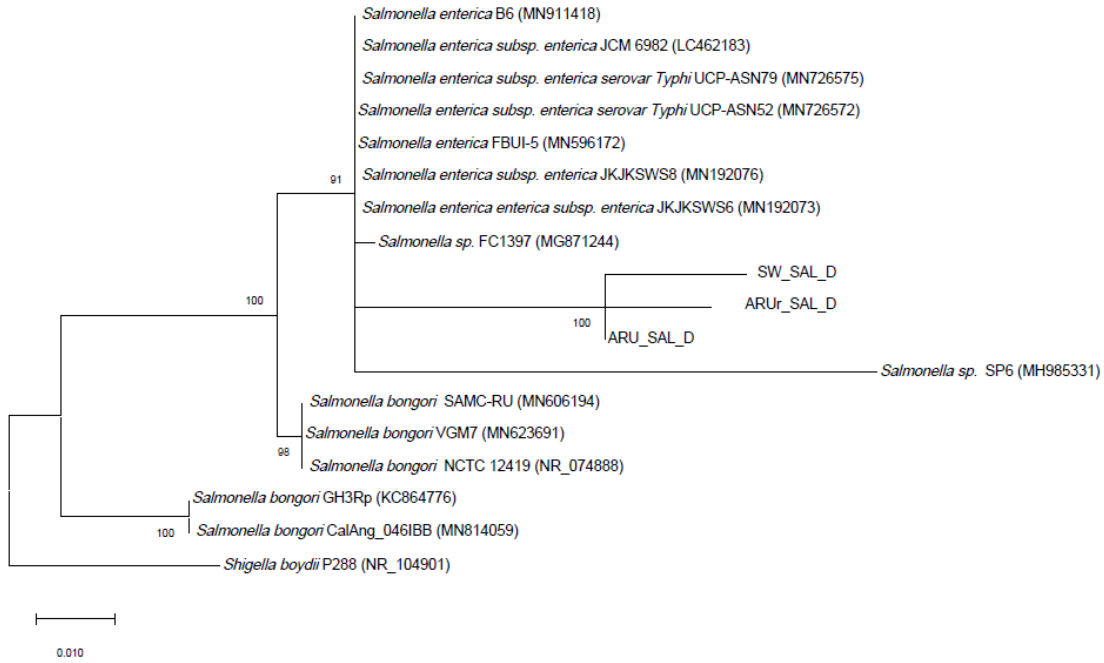


Figura I.22. Árbol *Maximum Likelihood* (ML) de *Salmonella* spp construido a partir de la secuencia del gen *16S rRNA* obtenido mediante el modelo (GTR) y la Distribución Gamma (G) (2 categorías (+G, parámetro = 0,2538)). El número en el nodo representa los valores boostrap. La evaluación de la fiabilidad del árbol se comprobó realizando 1 000 réplicas a partir del método estadístico *Bootstrapping*. ARU: agua residual urbana; ARUr: agua residual urbana regenerada; SW: agua de mar; EC: juegos de *primers* específicos de *Salmonella* spp; U: par de oligos diseñado en la Aproximación 1 (acorde al *16S rRNA* completo).

Tabla I.28. Secuencias de *Legionella* spp. incluidas en el análisis filogenético del gen *16S rRNA* llevado a cabo en este estudio.

Especies y cepas	**Nº de acceso del gen *16S rRNA***
Proteobacteria Filo	
γ-Proteobacteria	
Legionellaceae familia, *Legionella* género	
Legionella anisa UCSC 23	AJ969024
Legionella anisa ucsc16	FN667811
Legionella anisa ucsc17	FN667912
Legionella gratiana MDC1600	JF720403
Legionella gratiana NCTC 12388	NR_044958
Legionella longbeachae Long Beach-4	NR_118714
Legionella pneumophila AIRBIOTA-BSP7	MH412938
Legionella pneumophila AIRBIOTA-BSP5	MH412936
Legionella pneumophila AIRBIOTA-BSP4	MH412935
Legionella pneumophila subsp. pneumophila BO71 33	KF537559
Legionella pneumophila subsp. pneumophila WOC14 11	KF537554
Otros géneros de Enterococcaceae	
Tatlockia micdadei ATCC 33218	NR_041791

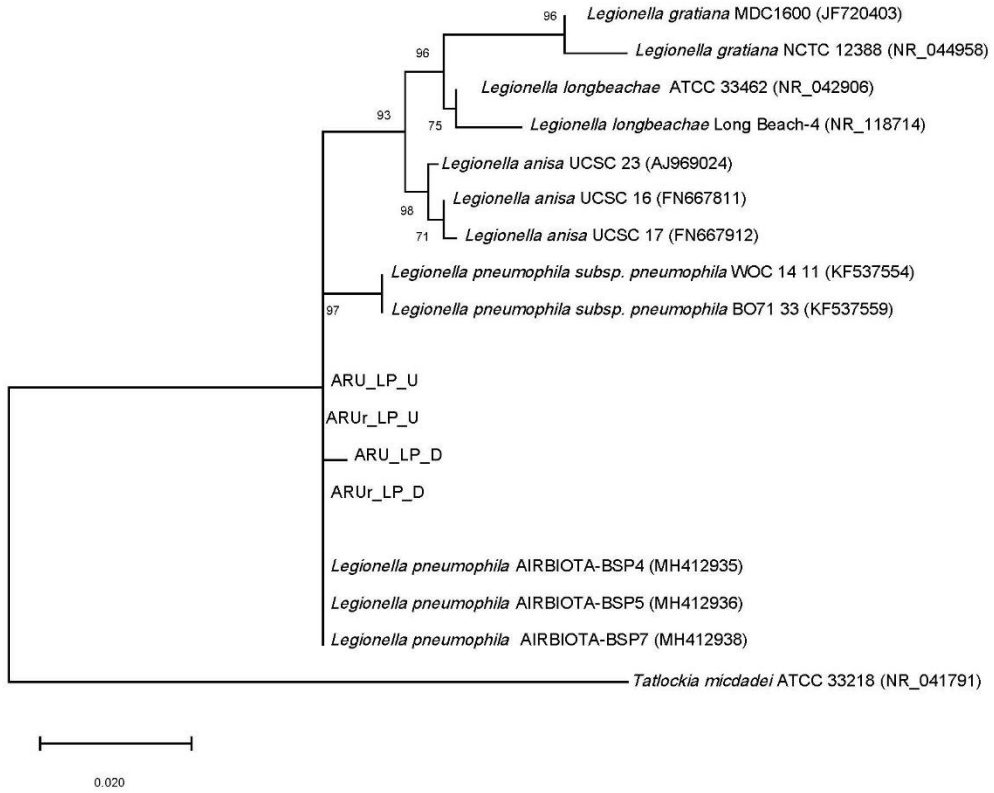


Figura I.23. Árbol *Maximum likelihood* (ML) de *Legionella* spp construido a partir de la secuencia del gen *16S rRNA* obtenido mediante el modelo (GTR) y la Distribución Gamma (G) (2 categorías (+G, parámetro = 0,7156)). El número en el nodo representa los porcentajes *bootstrap*. La evaluación de la fiabilidad del árbol se comprobó realizando 1 000 réplicas a partir del método estadístico *Bootstrapping*. ARU: agua residual urbana; ARUr: agua residual urbana regenerada; EC: juegos de *primers* específicos de *Legionella* spp; U: par de oligos diseñado en la Aproximación 1 (acorde al *16S rRNA* completo); D: juego de *primers* en la Aproximación 2 (de acuerdo al dominio Bacteria).

I.4 DISCUSIÓN

En este estudio, de manera específica, se ha trabajado con los dos bioindicadores, señalados desde el 2000 a nivel comunitario, como los bioindicadores por excelencia en calidad de aguas (Directiva 2006/7/CE): *Escherichia coli* y *Enterococcus intestinalis*.

Estos también están recogidos en la normativa española dentro del RD 1620/2007, el cual establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas, al igual que, se contempla su uso en las normativas de calidad del agua de consumo humano (RD 140/2003), y, calidad de las aguas de baño (RD 1341/2007).

Asimismo, en este trabajo, se han incluido dos de los microorganismos patógenos cuya presencia compromete la salubridad del agua (*Legionella* spp y *Salmonella* spp), en especial, de aguas dulces, aunque cabe mencionar que ambas son capaces de sobrevivir en ambientes marinos (Atlas, 1999; Winfield & Groisman, 2003; Efstratiou *et al*., 2009).

Igualmente, destacar que, estas dos bacterias patógenas se encuentran incluidas en el RD 1620/2007 de calidad de aguas depuradas reutilizables. La correlación entre la presencia de estos dos patógenos en masas de agua contaminadas y la incidencia de enfermedades en los usuarios de estas aguas, está ampliamente documentada (Cloud *et al.*, 2000; Cloete *et al*., 2004; Percival *et al.*, 2004, Elfadaly *et al.*, 2018; Walker, 2018). De ahí, la importancia de su valoración y monitorización en materia de calidad de aguas.

El uso del gen *16S rRNA* como marcador molecular para la caracterización de los bioindicadores requiere de un protocolo reproducible, sencillo y rápido de extracción de ADN bacteriano. En este aspecto, el aislamiento de este ADN –procedente tanto de cepas puras, como de muestras ambientales–, presentó complicaciones por las grandes cantidades de material extracelular que producen las células bacterianas, así como, por ciertos componentes de las membranas y paredes celulares de estos organismos. Compuestos como los polisacáridos, las

glucoproteínas y los lipopolisacáridos interfieren en el proceso de aislamiento del ADN (Volossiouk *et al*., 1995). Más aun, los polisacáridos co-precipitan con el ADN durante los procedimientos de extracción, lo que da lugar a problemas como, un bajo rendimiento de la reacción en cadena de la polimerasa o la inhibición de la misma (Chan & Goodwin, 1995).

Las extracciones de ADN ambiental tienen como punto de partida aquellos procedimientos establecidos para el aislamiento de ácidos nucleicos de las cepas puras. Estos últimos solo requieren un paso previo de concentración mediante una centrifugación. En cambio, hay que tener en cuenta que, el ADN ambiental puede presentarse en bajas cantidades cuando los organismos tienen una abundancia limitada en el ambiente (Hunter *et al*., 2019). De ahí que, las muestras de ADN ambiental –procedentes del agua de mar y las aguas residuales– precisaran de procedimientos experimentales de preparación de las muestras más elaborados que los utilizados para las cepas puras.

La elección del método de concentración previo al aislamiento de ADN ambiental, está claramente determinada por las características de la matriz a analizar. El uso de una matriz correspondiente a muestras de agua residual, con un contenido de sólidos en suspensión muy elevado, podrá requerir aquellos protocolos basados en centrifugaciones sucesivas, desarrollados originalmente para las matrices de sedimentos (Brady, 2007). En contraposición, el ADN procedente de agua de mar, con bajo contenido de partículas, puede extraerse después de un paso previo de filtración apropiado, como el aplicado para la extracción de ácido nucleico de las muestras de aguas continentales (Somerville *et al*., 1989).

En la línea de lo mencionado, en este estudio se ha estimado necesaria la preparación previa de las muestras ambientales. En particular, en las muestras de agua de mar, se considera destacable el efecto de la dilución de la misma, lo que provoca la baja concentración de los organismos presentes. De ahí que, los procedimientos de preparación de las muestras de esta naturaleza requieran como mínimo la filtración de 500 mL. En concreto, los volúmenes procesados de las muestras de agua de mar fueron cinco veces mayores que los volúmenes

procesados de las muestras de aguas residuales (100 mL). Además, el protocolo de preparación de las muestras de agua de mar requirió de la separación mediante disgregación y rotura mecánica del precipitado retenido en la membrana filtrante, así como, de la eliminación de los restos de esta membrana mediante centrifugaciones sucesivas (Figura I.5A).

En el caso de las matrices de aguas residuales, no se necesitó de la concentración por filtración, sino que, la misma se llevó a cabo mediante centrifugación y obtención de un único precipitado (Figura I.5B). Este procedimiento utilizado en la preparación de muestras de agua residual se basó, como viene reportado por varios autores, en protocolos típicos de preparación de muestras de suelos y sedimentos (Brady, 2007; Rumball *et al*., 2021).

En cuanto al aislamiento de ADN ambiental, como refiere Ficetola y colaboradores (2008), y, Taberlet y colaboradores (2012), la determinación de fragmentos de ADN ambiental a partir de la amplificación por PCR, se ve particularmente limitada por varios factores. El más significativo es la presencia en las muestras de sustancias inhibidoras de la reacción en cadena de la polimerasa, como sería el caso de las sales en el agua de mar (McKee *et al*, 2015), o de los ácidos húmicos u otros compuestos orgánicos e inorgánicos característicos de las aguas residuales (Smalla, 1995).

Esto es especialmente relevante en las muestras de aguas residuales y aguas de mar, por lo que se plantea la dilución de estas muestras para evitar la concentración de estas sustancias inhibidoras (Smalla, 1995; Hunter *et al*., 2019).

Atendiéndonos a lo expuesto, por un lado, en este trabajo, de los cuatro protocolos de extracción de ADN bacteriano puro ensayados, procedente de las cepas de referencia, se logró la optimización de uno de ellos. Este se basó en el kit *REDExtract-N-AmpTM Plant PCR* (Sigma-Aldrich), con las modificaciones incluidas correspondientes al procedimiento *Freezing-Thawing*. La conjugación de ambos procesos ha permitido la obtención de ADN con integridades y concentraciones óptimas de > 20 ng μL^{-1} (Meijering *et al.*, 2007). Por ejemplo, el

rango obtenido para la cepa pura de *E. coli* es 9,82±3,61 (1 UFC) - 57,69±1,58 ng μL^{-1} (11 UFC) (Figura I.6 y Tabla I.17).

Por otro lado, como resultado de la optimización de los tres protocolos de extracción de ADN ambiental de las matrices problema: *REDExtract-N-Amp™ Plant PCR KIT* (Sigma-Aldrich); protocolo modificado en este estudio de aislamiento de ADN basado en la sal LiOAc (Lõoke *et al*., 2011); y, el método de aislamiento CTAB modificado (Garcia-Jimenez *et al*., 2009), se obtuvo que el protocolo más eficiente tanto en rendimiento como en integridad de ADN fue el protocolo modificado CTAB (Garcia-Jimenez *et al*., 2009). El óptimo resultado obtenido con este protocolo se explica por las varias etapas de limpieza sucesivas –tres limpiezas con cloroformo y alcohol isoamílico, y una última limpieza con etanol al 80% (v/v)– que se incluyen en el mismo. Estas etapas facilitan la dilución o eliminación de los compuestos inhibidores de la PCR presentes en las muestras ambientales, sin interferir en el rendimiento de la extracción y la integridad del ADN aislado (Hunter *et al.*, 2019). Es preciso señalar la importancia de este logro, ya que la aplicación satisfactoria de las técnicas moleculares depende de la recuperación y aislamiento efectivo del ADN de las muestras (Lee *et al*., 2003).

Los resultados no tan satisfactorios de los dos protocolos restantes de extracción de ADN de las matrices problema, pueden estar relacionados con las insuficientes etapas de limpieza con reactivos orgánicos incluidas en estos protocolos. Por lo tanto, como no es sólo importante la recuperación eficiente de los ácidos nucleicos de una muestra ambiental, sino también la pureza del ADN obtenido (Bej *et al.*, 1991; Koch *et al*., 1993), las muestras de ADN ambiental a partir de las cuales se llevó a cabo la valoración de los cebaderos específicos diseñados fueron aquellas resultantes del método de aislamiento CTAB modificado (Garcia-Jimenez *et al*., 2009).

En relación a la molécula marcadora utilizada para la filogenia, el gen *16S rRNA*, se encuentra, al menos, como una copia en el genoma de los organismos

procariontes (Acinas, *et al*., 2004). Por consiguiente, la universalidad de este gen lo convierte en una región diana ideal para los estudios filogenéticos y de clasificación taxonómica de procariotas (Woese, 1982; 1987).

En cuanto a su configuración, el gen *16S rRNA* puede plegarse en una estructura secundaria compleja y estable, constituida por bucles y estructuras lineales (Noller *et al*., 1985). Las secuencias de algunos de los bucles están conservadas en casi todas las especies bacterianas debido a las funciones esenciales que intervienen, mientras que las características de las estructuras lineales son en gran medida hipervariables y específicas de una o más clases de bacterias (Wang & Qian, 2009). De esta manera, la variabilidad entre ellas las hace específicas, reconociéndose 9 regiones hipervariables (V1-V9) en el *16S rRNA*.

La secuenciación selectiva de estas regiones hipervariables se ha utilizado para la identificación específica de clases, familias, géneros y hasta especies de los dominios Archaea y Bacteria (Lane *et al*., 1985; Jonasson *et al.*, 2002; Ramazzotti &Bacci, 2018).

A pesar de que se conoce la secuencia de estas zonas, lo cierto es que los cebadores utilizados de forma generalizada pueden no ser adecuados para la valoración molecular de los organismos objetivo (Baker *et al.* 2003; Huws *et al*., 2007; Teske & Sorensen, 2007; Wang & Qian, 2009).

Con el avance de las técnicas y procedimientos de biología molecular, los nuevos trabajos han enfatizado en la necesidad de diseño de *primers* propios. En este trabajo las aproximaciones permitieron el diseño de *primers* a partir de i) el nivel taxonómico más amplio (organismos procariotas), mediante de juegos de *primers* universales para procariotas descritos previamente en la bibliografía; y, ii) hacia uno más específico (dominio Bacteria), partiendo de re-amplificaciones del fragmento completo del gen *16S rRNA*, con juegos de cebadores específicos del dominio Bacteria. El diseño de oligos propios a partir de la secuencia completa del gen *16S rRNA* de procariotas y el dominio Bacteria, se validó en base a la técnica *nested*-PCR. Este procedimiento mejora la sensibilidad y hace que se dé especificidad suficiente para la detección de regiones diana.

De acuerdo al porcentaje de cobertura de las regiones del gen *16S rRNA*, se corrobora que estas se identifican como aquellas potencialmente hipervariables y que caracterizan a los bioindicadores descritos en este trabajo (*E. coli*, *Enterococcus intestinalis* y *Salmonella* spp, *Legionella* spp). Específicamente, las regiones hipervariables con mayores porcentajes de cobertura han sido las V3 y V4, con 31,83% y 27,32%, respectivamente (Figura I.17). Estas dos regiones son usadas en estudios de clasificación taxonómica de géneros bacterianos integrantes de los filos Proteobacteria y Firmicutes de origen fecal (Tabla I.29) (Ramazzotti & Bacci, 2018). En nuestro caso, *Legionella* spp pertenece al filo Proteobacteria. Por el contrario, el bioindicador y patógeno *E. coli* y *Salmonella* spp son tipos bacterianos integrantes del filo Proteobacteria, mientras que *Enterococcus intestinalis* pertenece al filo Firmicutes, y los tres tienen un origen fecal.

Tabla I.29. Número de secuencias depositadas en la base de datos *EBI Metagenomics* (https://www.ebi.ac.uk/metagenomics/), correspondientes a cada región hipervariable del gen *16S rRNA*, extraídas de estudios de valoración molecular de muestras fecales (secuencias publicadas hasta Septiembre 2016).

Región hipervariable	**V1**	**V2**	**V3**	**V4**	**V5**	**V6**	**V7**	**V8**	**V9**
Nº de secuencias anotadas	207	245	1415	3906	169	44	20	13	15

Datos extraídos del trabajo Ramazzotti & Bacci (2018)

La cobertura de las regiones V1 (4,51%), V2 (13,61%), V5 (13,61%) y V6 (9,11%) (Figura I.17), se utilizan para complementar la información aportada por el análisis de las regiones V3 y V4 de los géneros integrantes de los filos Proteobacteria y Firmicutes (Wang & Qian, 2009; Costantini *et al.*, 2018; Ramazzotti & Bacci 2018).

Las regiones V7, V8 y V9, no se recomiendan en estudios de clasificación taxonómica de las tipologías bacterianas de interés, debido a la inconsistencia de una amplia proporción de secuencias anotadas en las bases de datos para estas regiones hipervariables (Guo *et al.*, 2013).

La validación de las secuencias obtenidas, mediante el alineamiento con aquellas depositadas en la base de datos NCBI, a partir de la herramienta BLAST, confirma la anotación esperada de cada una de ellas (Tabla I.24), logrando porcentajes de identidad óptimos entre 95,60%-100% y E-valores en un rango de 0,0-2,0 x 10^{-129}. No obstante, en los últimos años, la preocupación respecto a la certeza de la anotación de las secuencias en las bases de datos ha aumentado considerablemente, no siendo conocedores aún del alcance del número de secuencias anotadas erróneamente, y cuyo uso implicaría la exclusión de esas secuencias como bioindicadores (Bakke *et al*., 2009).

El análisis filogenético realizado con los amplicones secuenciados a partir de los juegos de *primers* específicos confirman la anotación de las secuencias y corroboran de forma fiable los resultados obtenidos en el alineamiento local de las secuencias mediante BLAST, discutido anteriormente. Específicamente, la validación del análisis filogenético se ha realizado siguiendo el criterio ampliamente utilizado por la comunidad científica, según el cual, los valores > 95% de valor bootstrap obtenidos en los análisis filogenéticos realizados a partir del segmento del gen *16S rRNA*, determinan la consistencia de las caracterizaciones moleculares y sus afiliaciones a los niveles taxonómicos respectivos (Stackebrandt *et al.*,1994).

En consecuencia, a partir de los resultados obtenidos tras el estudio filogenético se corrobora i) la sensibilidad e idoneidad de los juegos de cebadores específicos diseñados; y ii) que los bioindicadores se incluyen en los clados correspondientes a su filogenia.

Atendiendo a este análisis, *Escherichia coli* se ha localizado en el clado correspondiente a *Escherichia coli* y *Escherichia sp.* (Figura I.20). Una evaluación crítica de la información depositada nos permite inferir que puede haber anotaciones y asignaciones erróneas en las bases de datos. En este sentido se ha recogido que *E. coli* puede compartir secuencias con otras bacterias de la familia Enterobacteriaceae, y particularmente, con las cuatro especies integrantes del género *Shigella* (Lan & Reeves, 2002). Además, Orsi y colaboradores (2007),

también han reportado que *E. coli* y *Shigella* spp presentan una alta similitud entre sus genomas.

En relación al grupo *Enterococcus intestinalis*, este ha sido anotado a partir del análisis filogenético dentro del clado correspondiente a *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus sp*. (Figura I.21). Este resultado está en línea con lo ya expuesto en relación a los límites laxos que definen a este grupo. Más aun, aunque no se tiene información suficiente sobre el hospedador de las especies del género *Enterococcus* (Leclerc *et al*., 1996; Bohem & Sassoubre, 2014; Tedim *et al*., 2015), se sabe que *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* colonizan el tracto gastrointestinal humano (Nallapareddy *et al*., 2005; Galloway-Peña *et al*., 2012; Palmer *et al*., 2012; Qin *et al*., 2012), y además son abundantes en medio acuático (Gotkowska-Płachta, 2021). Por tanto, nuestra asignación parece correcta y representativa del grupo.

No obstante, para futuros trabajos parece ineludible la valoración de la especie *Enterococcus faecium*, junto con la ya mencionada *E. faecalis*, cuando se utilicen las valoraciones moleculares para determinar el parámetro microbiológico *Enterococcus intestinalis* que reporta la normativa.

Los patógenos bacterianos, *Salmonella* spp y *Legionella* spp, se localizaron dentro de los clados correspondientes a las especies representativas de los dos géneros objetivo, *Salmonella enterica* y *Salmonella sp*. (Figura I.22) y *Legionella pneumophila* (Figura I.23).

Se sabe que algunos de los reservorios de las especies del género *Salmonella* spp son las aguas contaminadas por materia fecal, las aguas residuales urbanas, así como las aguas residuales urbanas regeneradas (Percival *et al.*, 2004). Por tanto, estas evidencias justifican la anotación de las secuencias como *S. enterica*, obtenidas para las matrices analizadas en este estudio.

Añadido a lo anterior, se ha reportado que los tratamientos de agua residuales no eliminan a *Salmonella*, aunque pueden reducirla (Percival *et al*., 2004). De ahí, que se hayan detectado en aguas marinas, como resultado de la

emisión en aguas costeras, de las aguas residuales tratadas (Winfield & Groisman, 2003; Rubini *et al*., 2018). En este sentido, lo que se propone, es la monitorización de este patógeno en aguas marinas costeras cuando puedan verse afectadas por la entrada de aguas residuales.

Con respecto a *Legionella* spp se ha determinado que no es de ambientes salinos y cuando se presenta tiene una tasa muy baja de supervivencia (Gast *et al.*, 2011). No obstante, se ha reportado la presencia de especies del género *Legionella* a lo largo del tratamiento de las aguas residuales, y donde el número de células bacterianas no disminuye significativamente tras el tratamiento de las mismas (Percival *et al.*, 2004). Incidiendo en la presencia en el entorno marino y considerando las posibles emisiones de aguas residuales en el mismo, se sabe que las legionelas coexisten con protozoos que ayudan a la supervivencia de estas bacterias (Gast *et al.*, 2011). De ahí que, potencialmente a través de la valoración de estos protozoos –principalmente de especies de amebas del género *Acanthamoeba* (Kuroki *et al.*, 2017; Moon *et al.*, 2021), las cuales posibilitan la supervivencia de *Legionella* spp en entornos acuáticos a través de su crecimiento intracelular–, se pueda inferir la presencia de *Legionella* spp.

En definitiva, este capítulo permite enmarcar la determinación molecular de los bioindicadores y patógenos bacterianos en los estudios de calidad de aguas, al tiempo que reflexiona sobre la idoneidad de los parámetros microbiológicos y metodologías de indentificación. Asimismo, este trabajo ha sentado la base para las aplicaciones presentadas en los siguientes capítulos todas ellas centradas en la microbiología ambiental.

REFERENCIAS

Acinas, S.G., Marcelino, L.A., Klepac-Ceraj, V., Polz, M.F., 2004. Divergence and redundancy of *16S rRNA* sequences in genomes with multiple rrn operons. J. Bacteriol. 186, 2629–2635.

Atlas, R.M., 1999. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. Environ. Microbiol., 1(4), 283-293.

Baker, G.C., Smith, J.J., Cowan, D.A., 2003. Review and re-analysis of domain specific 16S primers. J. Microb. Methods, 55, 541–555.

Bakke, P., Carney, N., DeLoache, W., Gearing, M., Ingvorsen, K., Lotz, M., McNair, J., Penumetcha, P., Simpson, S., Voss, L., Win, M., Heyer, L. J., and Campbell, A. M., 2009. Evaluation of three automated genome annotations for *Halorhabdus utahensis*. PLoS ONE, 4(7), e6291.

Bartlett, J.M.S, Stirling, D., 2003. A short history of the polymerase chain reaction. Methods Mol. Biol., 226, 3–6.

Bej, A.K., Mahbubani, M.H., Atlas, R.M., 1991. Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol., 57, 597–600.

Brady, S.F., 2007. Construction of soil environmental DNA cosmid libraries and screening for clones that produce biologically active small molecules. Nat. Protoc., 2(5), 1297.

Bramburger, A.J., Brown, R.S., Haley, J., Ridal, J.J., 2015. A new, automated rapid fluorometric method for the detection of *Escherichia coli* in recreational waters. J. Great Lakes Res., 41(1), 298-302.

Cabelli, V.J., Dufour, A.P. McCabemm, L.J., Levinm M.A., 1982. Swimming associated gastroenteritis and water quality. Am. J. Epidemiol., 115,606–616.

Cabelli, V.J., 1983. Health effects criteria for marine recreational waters. EPA-600/1-80-031. U.S. Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC.

Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., Alland, D., 2007. A detailed analysis of *16S ribosomal RNA* gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. J. Microbiol. Methods, 69(2), 330-339.

Chan, J.F., Goodwin, P.H., 1995. Extraction of genomic DNA from extracellular polysaccharide-synthesizing gram-negative bacteria. BioTechniques, 18(3), 418-422.

Cheung, W.H.S., Chang, K.C.K., Hung., R.P.S., 1990. Health effects of beach water pollution in Hong Kong. Epidemiol. Infect., 105,139–162.

Chevremont, A.C., Farnet, A.M., Coulomb, B., Boudenne, J.L., 2012. Effect of coupled UV-A and UV-C LEDs on both microbiological and chemical pollution of urban wastewaters. Sci. Total Environ., 426, 304-310.

Chiang, Y.C., Yang, C.Y., Li, C., Ho, Y.C., Lin, C.K., Tsen, H.Y., 2006. Identification of *Bacillus spp.*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus spp.* and *Vibrio spp.* with 16S ribosomal DNA-based oligonucleotide array hybridization. Int. J. Food Microbiol., 107(2), 131-137.

Cho, H.B., Lee, J.K., Choi, Y.K., 2003. The Genetic Diversity Analysis of the Bacterial Community in Groundwater by Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). J. Microbiol., 41(4), 327-334.

Cloete, T.E., Rose, J.B., Nel, L.H., Ford, T., 2004. Microbial waterborne pathogens. Eds., Iwa publishing, Londres, pp. 231.

Cloud, J.L., Carroll, K.C., Pixton, P., Erali, M., Hillyard, D.R., 2000. Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. J. Clin. Microbiol., 38(5), 1709-1712.

Converse, R.R., Blackwood, A.D., Kirs, M., Griffith, J.F., Noble, R.T., 2009. Rapid QPCR-based assay for fecal *Bacteroides* spp. as a tool for assessing fecal contamination in recreational waters. Water Res., 43(19), 4828-4837.

Costán-Longares, A., Montemayor, M., Payan, A., Mendez, J., Jofre, J., Mujeriego, R., Lucena, F., 2008. Microbial indicators and pathogens: removal, relationships and predictive capabilities in water reclamation facilities. Water Res., 42(17), 4439-4448.

Costantini, L., Magno, S., Albanese, D., Donati, C., Molinari, R., Filippone, A., Masetti, R., Merendino, N., 2018. Characterization of human breast tissue microbiota from core needle biopsies through the analysis of multi hypervariable *16S-rRNA* gene regions. Sci. Rep., 8(1), 1-9.

Crosby, S.C., Spiller, N.C., Tietz, K. E., Cooper, J.R., Fraboni, P.J., 2019. Temporal and spatial variability of instream indicator bacteria (*Escherichia coli*) and implications for water quality monitoring. Environ. Monit. Assess., 191(12), 745.

Directive 76/160/EEC of the European Parliament and of the Council of 8 December 1975, concerning the management of bathing water quality. J. Eur. Union., 1,133–139.

Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000, establishing a framework for Community action in the field of water policy. J. Eur. Union., 327, 1-51.

Directive 2006/7/EEC of the European Parliament and of the Council of 15 February 2006, concerning the management of bathing water quality. J. Eur. Union., 64,37–51.

Dufour, A.P., 1977. *Escherichia coli*: the fecal coliform. En Bacterial indicators/health hazards associated with water. Eds. Hoadley A.W., B. Dutka, J. ASTM Publication 635. American Society for Testing and Materials, Filadelfia. pp. 59-64.

EEA: European Environment Agency, 2005. The European environment: State and outlook 2005. European Communities.

Efstratiou, M.A., Mavridou, A., Richardson, C., 2009. Prediction of *Salmonella* in seawater by total and faecal coliforms and *Enterococci*. Mar. Pollut. Bull., 58(2), 201-205.

Elfadaly, H.A., Hassanain, N.A., Hassanain, M.A., Barakat, A.M., Shaapan, R.M., 2018. Evaluation of primitive ground water supplies as a risk factor for the development of major waterborne zoonosis in Egyptian children living in rural areas. J. Infect. Pub. Health, 11(2), 203-208.

EPA, 1976. Quality criteria for water. EPA-440/g-76-023.

EPA, 2012. Method 1611: *Enterococci* in Water by TaqMan® Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) Assay EPA-821-R-12-008. US Environmental Protection Agency, Washington D.C., pp.72.

EPA, 2015. Review of coliphages as possible indicators of fecal contamination for ambientwater quality, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water and Office ofScience and Technology, Health and Ecological Criteria Division: Washington D.C., EPA 820-R-15-098.

Erdem, Ö., Saylan, Y., Cihangir, N., Denizli, A., 2019. Molecularly imprinted nanoparticles based plasmonic sensors for real-time *Enterococcus faecalis* detection. Biosens. Bioelectron., 126, 608-614.

Fariñas, M.C., Martínez-Martínez, L., 2013. Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin., 31(6), 402-409.

Felsenstein, J., 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. Evolution, 39, 783-791.

Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P., 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. Biol. Letters 4, 423–425.

Galloway-Peña, J., Roh, J.H., Latorre, M., Qin, X., Murray, B.E., 2012. Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcus faecium*. PLoS ONE 7, e30187.

Garcia-Jimenez, P., García-Maroto, F., Garrido-Cárdenas, J.A., Ferrándiz, C., Robaina, R.R., 2009. Differential expression of the ornithine decarboxylase gene during carposporogenesis in the thallus of the red seaweed *Grateloupia imbricata* (Halymeniaceae). J. Plant Physiol., 166(16), 1745-1754.

Gast, R.J., Moran, D.M., Dennett, M.R., Wurtsbaugh, W.A., Amaral-Zettler, L.A., 2011. Amoebae and *Legionella pneumophila* in saline environments. J. Water Health, 9(1), 37-52.

Gerba, C.P., 2000. Indicator Microorganisms. En *Environmental Microbiology*. Ed. Maier RM, Pepper IL, Gerba CP. CA: Academic Press, San Diego. pp. 491-503.

Gotkowska-Płachta, A., 2021. The Prevalence of Virulent and Multidrug-Resistant *Enterococci* in River Water and in Treated and Untreated Municipal and Hospital Wastewater. Int. J. Environ. Res. Public Health, 18(2), 563.

Guo, F., Ju, F., Cai, L., Zhang, T., 2013. Taxonomic precision of different hypervariable regions of *16S rRNA* gene and annotation methods for functional bacterial groups in biological wastewater treatment. PloS ONE, 8(10), e76185.

Hall, T.A., 1999, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. En *Nucleic acids symposium series*. Information Retrieval Ltd., Londres. pp. 95-98.

Hall, B.G., 2001. Phylogenetic Trees Made Easy. Sinuaer Associates, Massachussetts, Sunderland, pp. 282.

Hassan, K.A., Elbourne, L.D.H., Tetu, S.G., Melville, S.B., Rood, J.I. & Paulsen, I.T., 2015. Genomic analyses of *Clostridium perfringens* isolates from five toxinotypes. Res. Microbiol., 166 (4), 255–263.

Haugland, R.A., Siefring, S.C., Wymer, L.J., Brenner, K.P., Dufour, A.P., 2005. Comparison of *Enterococcus* measurements in freshwater at two recreational beaches by quantitative polymerase chain reaction and membrane filter culture analysis. Water Res., 39(4), 559-568.

Heyndrickx, M., Vauterin, L., Vandamme, P., Kersters, K., De Vos, P., 1996. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. J. Microbiol. Methods, 26(3), 247-259.

Hunter, M.E., Ferrante, J.A., Meigs-Friend, G., Ulmer, A., 2019. Improving eDNA yield and inhibitor reduction through increased water volumes and multi-filter isolation techniques. Sci. Rep., 9(1), 1-9.

Huse, S.M., Dethlefsen, L., Huber, J.A., Welch, D.M., Relman, D.A., Sogin, M.L., 2008. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. PLoS Genet., 4(11), e1000255.

Huws, S.A., Edwards, J.E., Kim E.J., Scollan, N.D., 2007. Specificity and sensitivity of eubacterial primers utilized for molecular profiling of bacteria within complex microbial ecosystems. J. Microbiol. Methods., 70, 565–569.

Jonasson, J., Olofsson, M., Monstein, H.J., 2002. Classification, identification and subtyping of bacteria based on pyrosequencing and signature matching of *16S rRNA* fragments. APMIS, 115, 668–677.

Kapuscinski, R.B., Mitchell, R., 1981. Solar radiation induces sublethal injury in *Escherichia coli* in seawater. Appl. Environ. Microbiol., 41(3), 670-674.

Kay, D., Jones, F., Wyer, M. D., Fleisher, J. M., Salmon, R. L., Godfree, A.F., Shore, R., 1994. Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing: results from randomised exposure. The Lancet, 344(8927), 905-909.

Kiu, R., Hall, L.J., 2018. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. Emerg. Microbes Infect., 7(1), 1-15.

Koch, W.H., Payne, W.L., Wentz, B.A., Cebolla, T.A., 1993. Rapid polymerase chain reaction for detection of *Vibrio cholerae* in foods. Appl. Environ. Microbiol., 59, 556–560.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol. Biol. Evol., 35, 1547-1549.

Kuroki, T., Watanabe, Y., Teranishi, H., Izumiyama, S., Amemura-Maekawa, J., Kura, F., 2017. *Legionella* prevalence and risk of legionellosis in Japanese households. Epidemiol. Infect., 145(7), 1398-1408.

Lan, R., Reeves, P.R., 2002. *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of *Shigella*. Microb. Infect., 4(11), 1125-1132.

Lane, D., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R., 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 6955–6959.

Layton, B.A., Walters, S.P., Lam, L.H., Boehm, A.B., 2010. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. J. Appl.Microbiol., 109(2), 539-547.

Leclerc, H., Devriese, L.A., Mossel, D.A.A., 1996. Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. J. Appl. Bacteriol., 81(5), 459-466.

Lee, Y.K., Kim, H.W., Liu, C.L., Lee, H.K., 2003. A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extracellular materials. J. Microbiol. Methods, 52(2), 245-250.

Lee, J.W., Ren, X., Yu, H.W., Kim, S.J., Kim, I.S., 2010. Membrane biofouling of seawater reverse osmosis initiated by sporogenic *Bacillus* strain. Environ. Engin. Res., 15(3), 141-147.

Lõoke, M., Kristjuhan, K., Kristjuhan, A., 2011. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. BioTechniques, 50, 325-328.

Ludwig, W., Schleifer., K.H., 2000. How quantitative is quantitative PCR with respect to cell counts? System Appl. Microbiol. 23(4), 556-562.

Madigan, M., Martinku, J.Y., Parker, J., 1997. Biología de los microorganismos. Prentice Hall. Madrid, pp. 1064.

McClane, B.A., 2003. *Clostridium perfringens*. En *International handbook of foodborne pathogens*. CRC Press, pp. 111-124.

McKee, A.M., Spear, S.F., Pierson, T.W., 2015. The effect of dilution and the use of a post-extraction nucleic acid purification column on the accuracy, precision, and inhibition of environmental DNA samples. Biol. Conserv. 183, 70–76.

Meijering, B.D., Henning, R.H., Van Gilst, W.H., Gavrilović, I., Van Wamel, A., Deelman, L. E., 2007. Optimization of ultrasound and microbubbles targeted gene delivery to cultured primary endothelial cells. J. Drug Target., 15(10), 664-671.

Miller-Pierce, M.R., Rhoads, N.A., 2019. *Clostridium perfringens* testing improves the reliability of detecting non-point source sewage contamination in Hawaiian coastal waters compared to using *Enterococci* alone. Mar. Pollut. Bull., 144, 36-47.

Moon, E.K., Park, S.M., Chu, K.B., Quan, F.S., Kong, H.H., 2021. Differentially Expressed Gene Profile of *Acanthamoeba castellanii* Induced by an Endosymbiont *Legionella pneumophila*. Korean J. Parasitol., 59(1), 67.

Munn, C.B., 2004. Marine Microbiology: ecology and applications. BIOS Scientific Publisher, Nueva York, pp. 274.

Murray, M.G., Thompson, W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Res., 8(19), 4321-4326

Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for *16S rRNA*. App. Environ. Microbiol., 59(3), 695-700.

Muyzer, G., Teske, A., Wirsen, C.O., Jannasch, H.W., 1995. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of *16S rRNA* fragments. Arch. Microbiol., 164(3), 165-172.

Nallapareddy, S.R., Wenxiang, H., Weinstock, G.M., Murray, B.E., 2005. Molecular characterization of a widespread, pathogenic, and antibiotic resistance-receptive *Enterococcus faec*alis lineage and dissemination of its putative pathogenicity island. J. Bacteriol., 187, 5709–5718.

Nei, M., Kumar, S., 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, Nueva York, pp. 329.

Noller, H.F., Stolk, B.J.V., Moazed, D., Douthwaite, S., Gutell, R.R., 1985. Studies on the structure and function of 16S ribosomal RNA using structure-specific chemical probes. J. Biosci., 8(3), 747–755.

NRC: National Research Council., 2004. Indicators for waterborne pathogens. National Academies Press, Washington D.C., pp. 311.

Orden SCO/778/2009, de 17 de marzo, sobre métodos alternativos para el análisis microbiológico del agua de consumo humano. Boletín Oficial del Estado, de 31 de marzo de 2009, 78, pp. 30417-30420.

Orsi, R.H., Stoppe, N.C., Sato, M.I.Z., Gomes, T.A., Prado, P.I., Manfio, G.P., Ottoboni, L.M., 2007. Genetic variability and pathogenicity potential of *Escherichia coli* isolated from recreational water reservoirs. Res. Microbiol., 158(5), 420-427.

Palmer, K.L., Godfrey, P., Griggs, A., Kos, V.N., Zucker, J., Desjardins, C., Cerqueira, G., Gevers, D., Walker, S., Wortman, J., Feldgarden, M., Haas, B., Birren, B., Gilmore, M.S., 2012. Comparative genomics of enterococci: variation in *Enterococcus faecalis*, clade structure in *E. faecium*, and defining characteristics of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*. mBio, 3(1), e00318-11.

Paredes-Sabja, D., Torres, J.A., Setlow, P., Sarker, M.R., 2008. *Clostridium perfringens* spore germination: characterization of germinants and their receptors. J. Bacteriol., 190 (4), 1190–1201.

Percival, S.L., Chalmers, R., Embrey, M., Hunter, P.R., Sellwood, J., Wyn-Jones, P., 2004. Microbiology of waterborne diseases. Elsevier Academic Press, Londres, pp. 480.

Pérez-Osorio, A.C., Franklin, M.J., 2008. qRT-PCR of microbial biofilms. Cold Spring Harb. Protoc., 2008(10), 5066.

Petit, L., Gibert, M., Popoff, M.R., 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. Trends Microbiol., 7(3), 104-110.

Prüss, A., 1998. A review of epidemiological studies from exposure to recreational water. Int. J. Epidemiol., 27, 1–9.

Qin, X., Galloway-Peña, J.R., Sillanpaa, J., Roh, J.H., Nallapareddy, S.R., Chowdhury, S, Bourgogne, A., Choudhury, T., Muzny, D.M., Buhay, C.J., Ding, Y., Dugan-Rocha, S., Liu, W., Kovar, C., Sodergren, E., Highlander, S., Petrosino, J.F., Worley, K.C., Gibbs, R.A., Weinstock, G.M., Murray, B.E., 2012. Complete genome sequence of *Enterococcus faecium* strain TX16 and comparative genomic analysis of *Enterococcus faecium* genomes. BMC Microbiol., 12,135.

Ramazzotti, M., Bacci, G., 2018. 16S rRNA-Based taxonomy profiling in the metagenomics era. En *Metagenomics. Perpectives, methods and applications.* Ed. Nagarajan, M. Academic Press, Paises Bajos, Ámsterdam, pp. 103-119.

Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. Boletín Oficial del Estado. texto consolidado, 1 de agosto de 2018, 45, pp. 3596.

Real Decreto 1341/2007, de 11 de octubre, sobre la gestión de la calidad de las aguas de baño. Boletín Oficial del Estado, de 26 de octubre de 2007, 257, pp. 43620-43629.

Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. Boletín Oficial del Estado, de 8 de diciembre de 2007, 294, pp. 50639-50661.

Rodgers, F.G., Macrae, A.D., Lewis, M.J., 1978. Electron microscopy of the organism of Legionnaires' disease. Nature, 272(5656), 825-826.

Rodicio, M.R., Mendoza, M.C., 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin., 22(4), 238-245.

Rodrigues, C., Cunha, M.Â., 2017. Assessment of the microbiological quality of recreational waters: indicators and methods. EMJE, 2(1), 1-18.

Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., Roubin, M.R., Laurent P., 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. J. Microbiol. Methods, 49,31-54.

Rozen, Y., Belkin, S., 2001. Survival of enteric bacteria in seawater. FEMS Microbiol. Rev., 25(5), 513-529.

Rubini, S., Galletti, G., D'Incau, M., Govoni, G., Boschetti, L., Berardelli, C., Barbieri, S. Merialdi, G., Formaglio, A., Guidi, E., Bergamini, M., Piva, S., Serraino, A., Gacometti, F., 2018. Occurrence of *Salmonella enterica subsp. enterica* in bivalve molluscs and associations with *Escherichia coli* in molluscs and faecal coliforms in seawater. Food Control, 84, 429-435.

Rumball, N.A., Mayer, H.C., McLellan, S.L., 2021. Selective survival of *Escherichia coli* phylotypes in freshwater beach sand. Appl. Environ. Microbiol., 87(4).

Rusiñol, M., Hundesa, A., Cárdenas-Youngs, Y., Fernández-Bravo, A., Pérez-Cataluña, A., Moreno-Mesonero, L., Moreno, Y., Calvo, M., Alonso, J.L., Figueras, M.J., Araujo, A, Bofill-Mas, S., Girones, R., 2020. Microbiological contamination of conventional and reclaimed irrigation water: Evaluation and management measures. Sci. Total Environ., 710, 136298.

Sagarduy, M., Courtois, S., Del Campo, A., Garmendia, J.M., Petrau, A., 2019. Differential decay and prediction of persistence of *Enterococcus* spp and *Escherichia coli* culturable cells and molecular markers in freshwater and seawater environments. Int. J. Hyg. Envir. Heal., 222(4), 695-704.

Sathish, S., Swaminathan, K., 2008. Molecular characterization of the diversity of *Clostridium chauvoei* isolates collected from two bovine slaughterhouses: analysis of crosscontamination. Anaerobe, 14(3), 190-9.

Schlenk, R., Wildfeuer, A., Haferkamp, O., 1993. Identification of *Legionella pneumophila* in various specimens by the polymerase chain reaction. Arzneimittelforschung, 43, 1249-1252.

Shahraki, A.H., Heath, D., Chaganti, S.R., 2019. Recreational water monitoring: Nanofluidic qRT-PCR chip for assessing beach water safety. Environ. DNA, 1(4), 305-315.

Slanetz, L.W., Bartley, C.H., 1957. Numbers of enterococci in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. J. Bacteriol., 74(5), 591.

Smalla, K., 1995. Extraction of microbial DNA from sewage and manure slurries. En *Molecular microbial ecology manual*. Eds. Akkermans, A.D.L., Van Elsas, J.D., De Brujin, F.J. Springer, Dordrecht, pp. 13-22.

Somerville, C.C., Knight, I.T., Straube, W.L., Colwell, R.R., 1989. Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. Appl. Environ. Microbiol., 55, 548–554.

Stackebrandt, E., Goebel, B.M., 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and *16s rRNA* Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol., 44, 846-849.

States, S.L., Wadowsky, R.M., Kuchta, J.M., Wolord, R.S., Conley, L.F., Yee, R.B., 1990. *Legionella* in drinking water. En *Drinking water Microbiology*. Ed. G.A. McFeters. Springer-Verlag, Nueva York, pp. 340-368.

Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., Rieseberg, L.H. 2012. Environ. DNA. Mol. Ecol., 21, 1789–1793.

Tedim, A.P., Ruiz-Garbajosa, P., Corander, J., Rodríguez, C.M., Cantón, R., Willems, R.J., Baquero, F. Coque, T.M., 2015. Population biology of intestinal Enterococcus isolates from hospitalized and nonhospitalized individuals in different age groups. Appl. Environ. Microbiol., 81(5), 1820-1831.

Tendolkar, P.M., Baghdayan, A.S., Shankar, N., 2003. Pathogenic *enterococci*: new developments in the 21st century. Cell. Mol. Life Sci., 60(12), 2622–2636.

Teske, A., Sorensen, K.B., 2007. Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? ISME, 2, 3–18.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res., 22(22), 4673-4680.

Verhougstraete, M.P., Brothers, S., Litaker, W., Blackwood, A. D., Noble, R., 2015. Lessons Learned from Implementing a Wet Laboratory Molecular Training Workshop for Beach Water Quality Monitoring. PloS ONE, 10(3).

Volossiouk, T., Robb, E.J., Nazar, R.N., 1995. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. Appl. Environ. Microbiol., 61(11), 3972-3976.

Wade, T.J., Pai, N., Eisenberg, J.N., Colford Jr, J.M., 2003. Do US Environmental Protection Agency water quality guidelines for recreational waters prevent gastrointestinal illness? A systematic review and meta-analysis. Environ. Health Perspect., 111(8), 1102-1109.

Walker, J.T., 2018. The influence of climate change on waterborne disease and *Legionella*: a review. Perspect. Public Health, 138(5), 282-286.

Wang, Y., Qian, P.Y., 2009. Conservative fragments in bacterial *16S rRNA* genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. PloS ONE, 4(10).

Winfield, M.D., Groisman, E.A., 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., 69(7), 3687-3694.

Woese, C.R., 1982. Archaebacteria and cellular origins: an overview. Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie, 3(1), 1-17.

Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev., 51(2), 221–271.

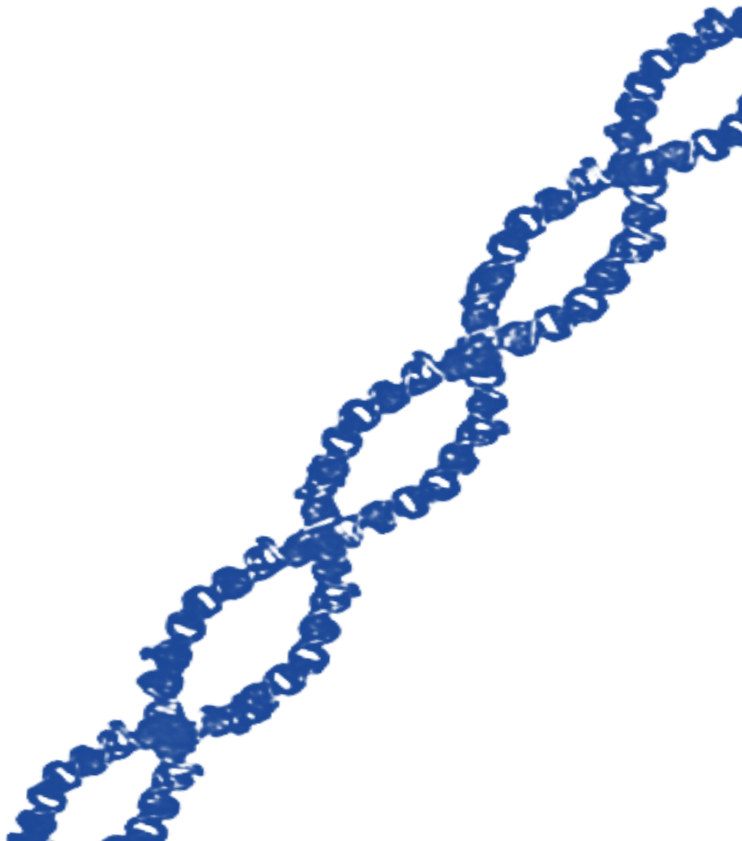
Yang, Y., Hoe, Y.W., Zheng, Q., Chung, H.J. & Yuk, H.G., 2017. Biofilm formation by *Salmonella Enteritidis* in a simulated liquid egg processing environment and its sensitivity to chlorine and hot water treatment. Food Control, 73, 595-600.

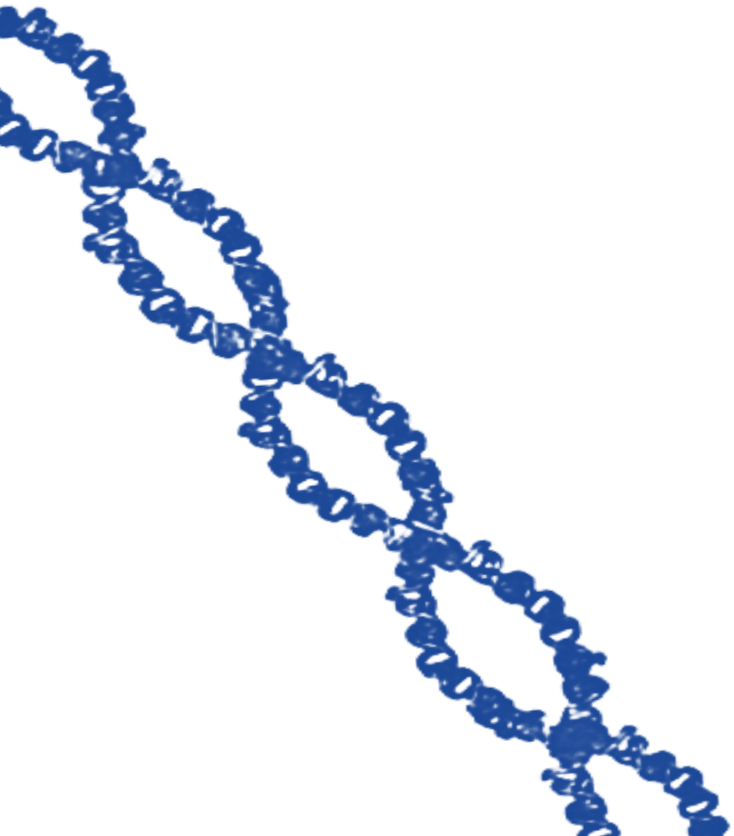
Zubrzycki, L., Spaulding, E.H., 1962. Studies on the stability of the normal human fecal flora. J. Bacteriol., 83(5), 968-974.

Capítulo I.1

Aplicaciones:

Composición e identificación molecular de la comunidad bacteriana de una planta desalinizadora de agua de mar





Capítulo I.1

Aplicaciones:

Composición e identificación molecular de la comunidad bacteriana de una planta desalinizadora de agua de mar

Composition and Molecular Identification of Bacterial Community in Seawater Desalination Plants

Garcia-Jimenez, P., Carrasco-Acosta, M., Payá, C.E., López, I.A., Rodríguez, J.R.B., Melián, J.A.H., 2019, Advances in Microbiology, 9(10), 863-876. *https://doi.org/10.4236/aim.2019.910053*

I.1.1 | INTRODUCCIÓN

Según lo descrito en el Capítulo I, a continuación, abordaremos la caracterización de bioindicadores bacterianos en un tipo de matriz, fundamental para el uso y destino de las aguas de mar, procedentes de sistemas de desalación.

La escasez de agua implica un gran desafío a la sociedad actual, estimulando la investigación para encontrar medios efectivos de producción de agua pura (Qasim *et al.*, 2019). Concretamente, la desalinización del agua de mar es una de las prácticas más utilizadas, a nivel mundial, para este fin. Una prueba de ello, son las poblaciones urbanas que viven cerca de las zonas costeras, las cuales cada vez más recurren a la adquisición de grandes cantidades de agua dulce mediante la desalinización de aguas marinas (Fritzmann *et al.*, 2007).

Entre los sistemas de desalación, la ósmosis inversa se considera el principal y más óptimo proceso de desalinización basado en membranas (Qasim *et al.*, 2019). Sin embargo, el empleo de estos sistemas presenta ciertos hándicaps relacionados con la disminución de la calidad del agua desalada, así como del rendimiento del proceso (alto contenido en sales o presencia de microorganismos).

Específicamente, las plantas desalinizadoras de ósmosis inversa (OI) se basan en la configuración del sistema a partir de membranas semipermeables, pudiéndose encontrar hasta cuatro tipos: planas, tubulares, de fibra hueca y de enrollamiento en espiral. Estas últimas son las más ampliamente utilizadas, y se fabrican con poliamidas aromáticas, alcanzando tamaños de 200 mm de diámetro y 1 m de longitud (Feo, 2013). Con objeto de soportar altas presiones de operación, las membranas se instalan dentro de recipientes contenedores horizontales, llamados módulos, que mejoran su rendimiento y limpieza, así como facilitan su manejo, transporte y sustitución (Feo, 2013).

La configuración de los módulos (Figura I.1.1) se compone por múltiples capas conformadas por dos láminas de membrana junto con un espaciador de permeado –fabricado con nilón o acrílico– colocado entre las dos láminas (MacNeil & Gibson, 1988; Kucera, 2015). Las láminas de la membrana se fijan por tres lados, quedando el cuarto abierto, y se conectan con el tubo central colector de permeado. La combinación de hojas y espaciadores de alimentación se envuelve alrededor del tubo colector de permeado para crear una conformación en espiral, y, finalmente, son colocados dentro del recipiente o módulo (Kucera, 2015).

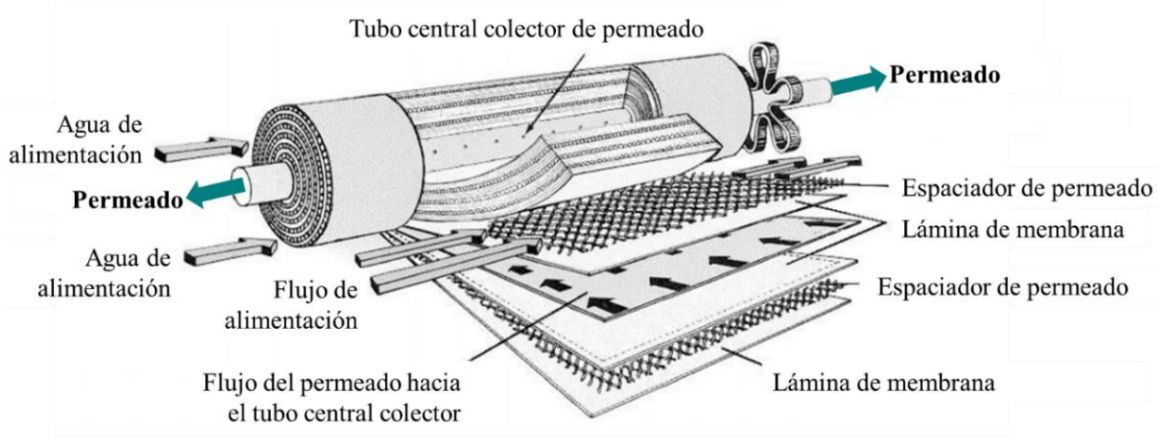


Figura I.1.1. Configuración de un módulo de membrana en espiral (adaptada de Fritzmann *et al.*, 2007).

En cuanto al agua a tratar, o de alimentación, se introduce por un extremo del módulo y se desplaza axialmente a lo largo de la longitud del mismo. Las

moléculas de agua son forzadas a pasar a través de la membrana y se recogen como permeado a través del tubo colector de permeado.

Las membranas de OI son los sistemas de desalinización más eficaces en términos de permeabilidad y densidad de empaquetamiento (Fritzmann *et al.*, 2007; Belila *et al*., 2016). Sin embargo, son difíciles de limpiar y son susceptibles de ensuciarse por el asentamiento de incrustaciones o *fouling* (Azis *et al.*, 2001; Qasim *et al.*, 2019).

El ensuciamiento orgánico o *biofouling*, entendido como la deposición y crecimiento no deseado de organismos adheridos a una superficie (Anwar *et al.*, 2020), contribuye a >45% del total del *fouling* de la membrana (Komlenic, 2010). A diferencia del *fouling* inorgánico, causado por la precipitación salina, el *biofouling* de las membranas de OI de plantas desaladoras se constituye por organismos marinos (bacterias, algas, protozoos y hongos), así como por sus residuos metabólicos (mayoritariamente por polisacáridos, proteínas y lípidos). La presencia de este *biofouling* en la superficie de las membranas puede reducir el flujo del agua de alimentación, la permeabilidad de la membrana de OI (Hörsch *et al.*, 2005; Ivnitsky *et al*., 2007), y por consiguiente la tasa de rechazo de sal (Matin *et al*., 2011).

De manera general, la formación del *biofouling* consta de tres etapas (Figura I.1.2), y se inicia por la adhesión de microorganismos a la superficie de la membrana. Se trata de un proceso dinámico en el que los microorganismos se aproximan a la membrana y, posteriormente, se fijan a ella.

Después de la fijación, los microorganismos crecen y se reproducen asimilando los nutrientes contenidos en el agua de alimentación, dando paso así, a la formación de agregados microbianos o microcolonias (Figura I.1.2). Durante esta segunda etapa, las actividades metabólicas de la microbiota liberan sustancias poliméricas extracelulares o EPS (*Extracellular Polymeric Substances*), incluyendo entre ellas polisacáridos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y sustancias húmicas (Branda *et al.*, 2006; Vu *et al.*, 2009). Las células microbianas

se encierran en estas sustancias poliméricas extracelulares autoproducidas que les facilitan la adhesión a las membranas de ósmosis inversa, dando lugar a la formación de una biopelícula madura (Figura I.1.2), definida esta, como una comunidad microbiana enclavada en la matriz de EPS (Watnick & Kolter, 2000). Significativo es el papel que desempeñan los EPS en la dinámica del *biofouling* llegando a representar >90% de la abundancia relativa de la biomasa total de una biopelícula madura (Achinas *et al*., 2019; Stuyfzand & Osma, 2019). Asimismo, la mejor o peor adherencia de la biopelícula a la membrana vendrá influenciada en gran parte por la naturaleza de estos EPS, determinada mayoritariamente por su contenido en glucosa, galactosa, ramnosa y N-acetilglucosamina (Verhoef *et al*., 2002; Fahs *et al*., 2014). Ejemplos de ello, son ciertos tipos de EPS, más ricos en glucosa que en galactosa, tales como los producidos por especies marinas de los géneros *Vibrio* (Yildiz & Visick, 2009) y *Brevundimonas* (Verhoef *et al*., 2002; Fahs *et al*., 2014), los cuales aparentemente pueden estar relacionados con evoluciones no satisfactorias, en el tiempo, de biopelículas formadas por estas bacterias.

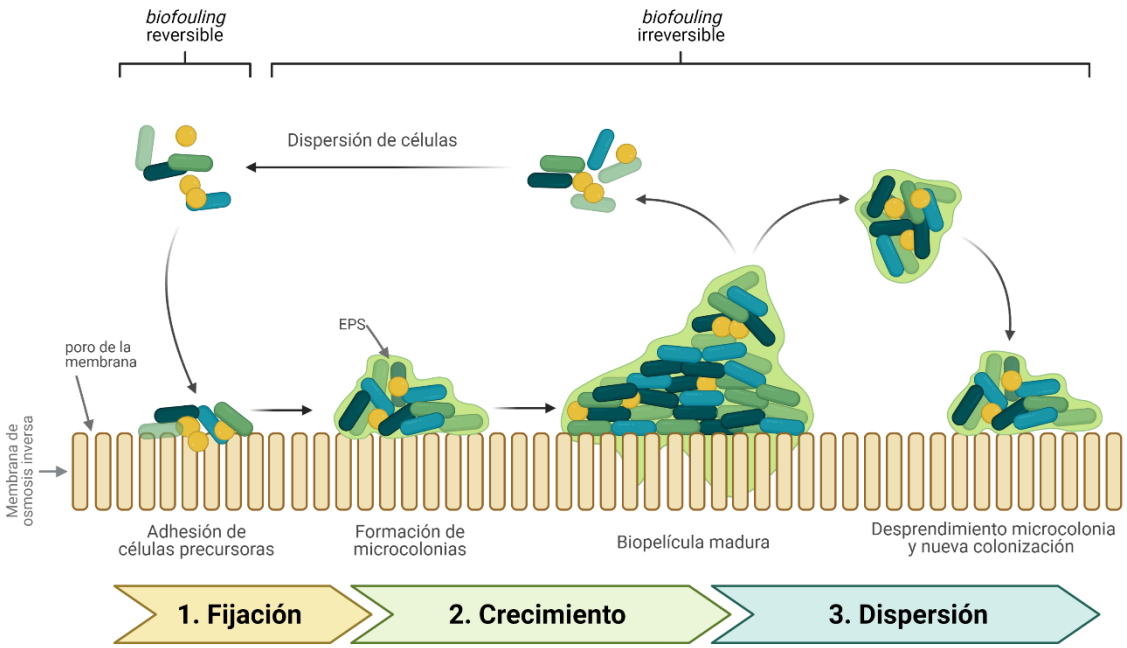


Figura I.1.2. Etapas de formación de biopelículas en la superficie de las membranas de osmosis inversa (adaptado de Watnick & Kolter, 2000; Curtin *et al*., 2020).

Por el contrario, los EPS constituidos de forma mayoritaria por alginato –descritos principalmente en biopelículas maduras– aportan equilibrio y estabilidad mecánica a la población adherida (Allison, 2010). Específicamente, se ha evidenciado que la incorporación de este polisacárido a la matriz de EPS favorece la transición de una biopelícula inicial, pasando de una estructura elevada y lábil, a una configuración plana y más compacta de una biopelícula en estado maduro, y, proporcionando así a la biopelícula de una mayor resistencia hidráulica al flujo de agua de alimentación del sistema de desalación (Li *et al*., 2018). Un ejemplo claro son las matrices de EPS, abundantes en alginato y polisacáridos ricos en galactosa, típicas de algunos miembros del género *Pseudomonas*, las cuales se caracterizan por una mayor fuerza de adhesión en comparación con las matrices de EPS ricas en glucosa o N-acetilglucosamina (Fahs *et al*., 2014).

Alcanzada una tasa de crecimiento de la biopelícula específica, se inicia la tercera etapa con la dispersión (Figura I.1.2). En esta etapa los microorganismos se pueden diseminar de dos maneras i) se liberan de la matriz de EPS dispersándose hacia nuevas localizaciones donde reiniciaran la formación de una biopelícula (Kochkodan & Hilal, 2015); o, ii) varias partes de la biopelícula se disgregan, depositándose y expandiéndose en las zonas circundantes (Watnick & Kolter, 2000; Matin *et al*., 2011; Curtin *et al.*, 2020).

A la complejidad de la formación de las biopelículas se unen los cambios que sufre la propia membrana de osmosis inversa a lo largo de tiempo. Inicialmente el entorno de crecimiento se caracteriza por ser oligotrófico, cambiando a un ambiente heterotrófico cuando la biopelícula está en estado maduro (Bereschenko *et al.,* 2008). Este cambio se debe a la acumulación de nutrientes en la matriz de EPS, aportados por las aguas de alimentación (Pollock & Armentrout, 1999).

Además, las etapas de formación de una biopelícula pueden dividirse en dos categorías según la dificultad que presenta su erradicación, siendo las mismas: *biofouling* reversible y *biofouling* irreversible (Figura I.1.2).

El *biofouling* reversible consiste en la deposición de microorganismos en la membrana que pueden ser eliminados mediante el retrolavado del sistema o el aumento de la fuerza de cizallamiento entre la membrana y el flujo de agua de alimentación (Vatansever & Turetgen, 2018). Aun pudiendo ser eliminado, el *biofouling* reversible sigue siendo perjudicial para los sistemas de membranas de OI, dado que su eliminación por retrolavado requiere el paro temporal de la producción (Anwar *et al.*, 2020).

Por su parte, el *biofouling* irreversible se inicia con la formación de los agregados microbianos (Figura I.1.2), e incluye las etapas desde la formación de microcolonias hasta la formación de biopelículas maduras (Fane, 2015). Este tipo de *biofouling* no puede eliminarse mediante el retrolavado o el aumento del flujo, provocando un incremento en la presión del sistema (Anwar *et al.*, 2020). En consecuencia, la aparición de la biopelícula madura es el factor que fuerza la eliminación del *biofouling* a partir de técnicas invasivas, o llegando en ocasiones, a forzar la sustitución completa de la membrana de OI, reduciendo la vida útil de la misma (Polman *et al*., 2020). Algunas de las técnicas generalizadas se basan en limpiezas químicas por cloro libre (HOCl, OCl-) o cloro combinado ($ClNH_2$), también conocido como cloraminación. Este tipo de tratamientos químicos pueden llegar a suponer el 50% del coste total de mantenimiento de una planta desaladora (Matin *et al*., 2011). Además, estas limpiezas aun siendo capaces de eliminar el 99,9% de los microorganismos adheridos a la membrana, el 0,1% de la microbiota no erradicada es capaz de volver a restituir la biopelícula (Nguyen *et al.*, 2012). Asimismo, se ha informado que el tratamiento de membranas de osmosis inversa con cloro, puede favorecer el predominio de bacterias nitrificantes en el *biofouling* restituido (Pintar & Slawon, 2003). Así, se ha reportado que varios miembros del género *Pseudomonas* son bacterias reductoras de nitratos y nitritos, por lo que, potencialmente, podrían ser tipologías bacterianas prevalentes en las comunidades que proliferan tras las limpiezas por cloro (Nagaraj *et al.*, 2019).

En definitiva, el *biofouling* representa el «talón de Aquiles» de los sistemas de desalinización basados en membranas de osmosis inversa. Este *biofouling*,

formado en gran parte por un complejo engranaje de células microbianas y sustancias poliméricas extracelulares, evoluciona y se perfecciona con el tiempo, hasta adquirir la resiliencia característica de estas comunidades. Por tanto, la comprensión de la estructura de las poblaciones que se depositan, adhieren y proliferan, así como la naturaleza de esa adhesión en las membranas de osmosis inversa proporciona información útil a emplear en la aplicación racional de los tratamientos de limpieza y desinfección, así como para desarrollar herramientas de detección temprana de *biofouling* que evitarían la proliferación de biopelículas maduras difíciles de erradicar.

Entre las poblaciones microbianas formadoras del *biofouling*, las bacterias han sido reportadas como aquellos microorganismos que juegan un papel crucial en la proliferación y dinámica de las biopelículas. Asimismo, las bacterias se han determinado como los organismos precursores y mayoritarios de las intricadas matrices que conforman estas bioincrustaciones adheridas a las membranas de OI (Branda *et al*., 2006; Allison, 2010; Luo *et al.*, 2015; Nagaraj *et al*., 2019). Así, conocer las comunidades bacterianas permite planificar varias estrategias de tratamiento *antifouling* basadas en i) la mejora de los tratamientos químicos; ii) la mejora de las redes poliméricas de las membranas; o, iii) la búsqueda de tratamientos biológicos.

En la línea de esta idea, varios son los estudios que trabajan en nuevos métodos de prevención y mitigación del *biofouling* mediante las mejoras de tratamientos químicos a partir de la adición de óxido nítrico (Luo *et al.*, 2015) o urea (Sanawar *et al.*, 2019). Además, también se han estudiado mejoras de la composición de la membrana integrando nuevos compuestos como nanopartículas de plata (Pan *et al.*, 2019), nanotubos de carbono (Najjar *et al.*, 2019) o goma arábiga (Sabri *et al.*, 2019). No menos importante, es la búsqueda de tratamientos biológicos basados en bacteriófagos (Ma *et al.*, 2018), así como en la utilización de sustancias *quorum-quenching* (Kim *et al.*, 2013; Bouayed *et al.*, 2016), o la caracterización de genes codificantes de compuestos precursores de *biofouling* (Wu *et al.*, 2020), así como de inhibidores del crecimiento y colonización, también conocidos como *antifouling* (Skovhus *et al.*, 2007).

Respecto a la composición de las comunidades bacterianas, parte del conocimiento obtenido sobre la misma se basa en métodos de cultivo convencionales y el análisis bioquímico de las colonias aisladas de este tipo de *biofouling*. Los primeros estudios de valoración de comunidades bacterianas asociadas a las membranas de ósmosis inversa de plantas desaladoras estimaron que el 99% de las bacterias integrantes de estas comunidades no pueden cultivarse en medios artificiales (Ferguson *et al.*, 1984). Con el transcurso del tiempo, esta estimación se ha corroborado con la escasa información descrita, mediante métodos dependientes de cultivo, de estas poblaciones en entornos naturales –entre el 0,01% y el 3%– (Bereschenko *et al*., 2008; Khambhaty & Plumb, 2011). Por tanto, este tipo de acercamientos sesgan los resultados, ya que solo incluyen tipologías bacterianas cultivables. Comúnmente, estos cultivos se basan en incubaciones prolongadas en medios con bajo contenido nutricional para facilitar el desarrollo de bacterias oligotróficas expuestas a condiciones de estrés (Reasoner & Geldreich, 1985). De manera general, a partir de estas metodologías se ha descrito que estas poblaciones bacterianas en su amplia mayoría están constituidas por especies del filo Proteobacteria (Ivnitsky *et al*., 2007). Asimismo, también se ha evidenciado que las bacterias de estos hábitats oligotróficos son capaces de desarrollar vías metabólicas alternativas para la asimilación de azúcares (Bräsen *et al.*, 2014). Esto ha permitido identificar especies con adaptaciones fisiológicas determinadas, las cuales pueden adherirse indistintamente a las diferentes superficies de las membranas de osmosis inversa.

Las especies identificadas por esta vía y asociadas a las biopelículas de ambientes marinos han sido varias, pero de entre ellas, algunas del género *Sphingomonas* son las más destacables. Dentro de este género se incluyen especies precursoras y formadoras de biopelículas (Buswell *et al*., 1997; Béchet & Blondeau, 2003; Bereschenko *et al.,* 2008; Yildiz & Visick, 2009), caracterizándose, además, por ser un grupo predominante no solo en ambientes marinos, sino, también, dominantes y formadoras de biopelículas de diversa naturaleza –p. ej. plantas de tratamiento de aguas residuales y de aguas de consumo– (Ivnitsky *et al.*, 2007; Bereschenko *et al.,* 2008; Nagaraj *et al.*, 2018).

Asimismo, se ha evidenciado que su presencia es clave en las etapas tempranas de la formación del *biofouling*, por facilitar la adhesión de otras bacterias y fomentar la maduración de la biopelícula (Pollock & Armentrout, 1999; Fegatella & Cavicchioli, 2000; Lee *et al*., 2010). En especies de este género se ha reportado la alta capacidad de producción de diferentes tipos de exopolisacáridos, los cuales parecen desempeñar un papel crucial en la fijación primaria y poder recalcitrante de las biopelículas (Johnsen *et al*., 2000; Nagaraj *et al*., 2019).

Otros géneros, identificados mediante métodos de cultivo, como *Aeromonas*, *Vibrio* y *Brevundimonas*, manifiestan comportamientos particulares que pueden determinar su presencia en el *biofouling* (Béchet & Blondeau, 2003). Estos tres géneros podrían presentarse en biopelículas en bajas concentraciones por factores relacionados, como ya hemos mencionado, con la composición de los EPS excretados, además de la abundancia de los mismos. Como ejemplo de ello, se ha determinado que miembros del género *Aeromonas* están presentes en biopelículas, de diversa naturaleza, en bajas concentraciones debido a la menor producción de EPS (Béchet & Blondeau, 2003).

Los métodos independientes de cultivo, como son los métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa, proporcionan herramientas analíticas rápidas, sensibles y específicas, con las que estudiar estas poblaciones bacterianas, incluidos los tipos bacterianos no cultivables, así como las cepas nuevas o emergentes (Girones *et al.*, 2010). Específicamente, la identificación molecular basada en el gen *16S rRNA*, mediante bibliotecas de clones, es el método más utilizado en estudios de caracterización bacteriana del *biofouling* asociado a membranas de OI (Bereschenko *et al*., 2008; Curtin, *et al.*, 2020).

Estas bibliotecas de clones se llevan a cabo a partir del aislamiento del ADN ambiental, y las posteriores reacciones en cadena de la polimerasa con *primers* específicos del gen *16S rRNA* (Figura I.1.3). Tras las amplificaciones se obtienen fragmentos de cada uno de los genes *16S rRNA*, los cuales son ligados a un vector plasmídico. Este vector es clonado en células, normalmente de la bacteria

Escherichia coli, las cuales posteriormente son cultivadas en medios específicos para revelar el crecimiento de los clones recombinantes (Figura I.1.3). Tras el reconocimiento de las colonias que poseen los vectores clonados, los plásmidos de las mismas son purificados. Finalmente, los insertos, se amplifican, se secuencian y se anota su asignación taxonómica. Cada uno de estos fragmentos se considera como una unidad biológica fundamental de diversidad bacteriana, también conocida como unidad taxonómica operativa (OTU, *Operational Taxonomic Unit*).

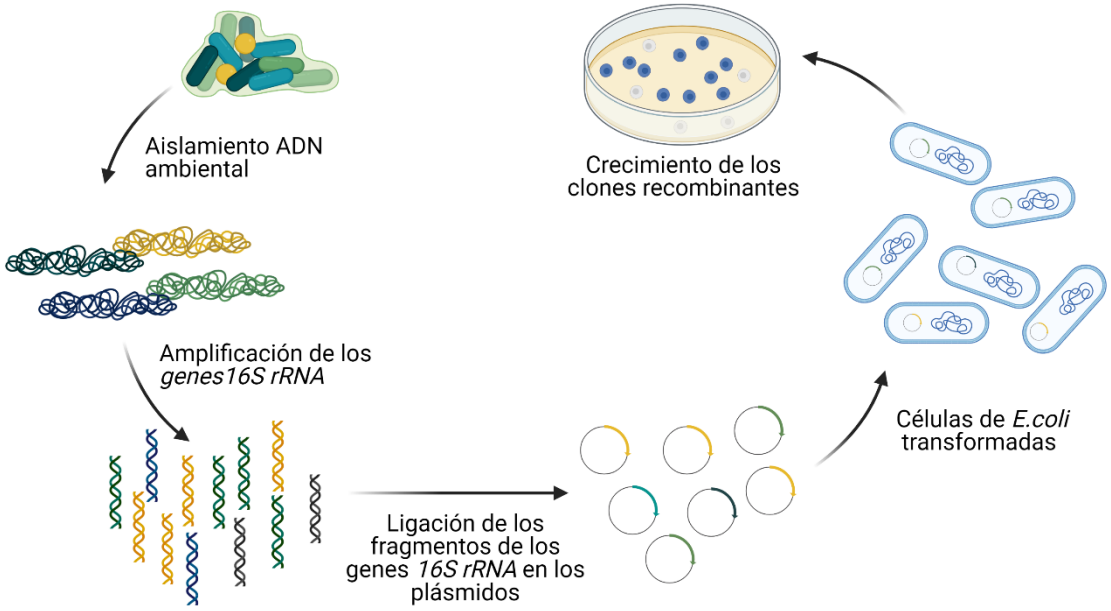


Figura I.1.3. Construcción de una biblioteca de clones a partir del análisis de los genes *16S rRNA*.

Molecularmente, la construcción de las bibliotecas de clones de los genes *16S rRNA*, ha permitido obtener un número mayor de identificaciones de las bacterias presentes en el *biofouling*, apoyadas por el análisis filogenético posterior.

De esta manera se ha corroborado, mediante metodologías moleculares, que el filo predominante en biopelículas de membranas de OI es el taxón Proteobacteria, y particularmente, las clases α-proteobacteria, β-proteobacteria y γ-proteobacteria (Hörsh *et al.*, 2005; Ivnitsky *et al.*, 2007; Matin *et al.*, 2011). En cuanto a los géneros, *Sphingomonas* es el grupo que prevalece dentro de la clase α-proteobacteria, y *Pseudomonas* en la clase γ-proteobacteria. En cambio, dentro de la clase β-proteobacteria, no hay un género claramente predominante, sino que,

se han reportado tres como los más recurrentes en este tipo de comunidades: *Acidovorax*, *Ralstonia* y *Burkholderia* (Ivnitsky *et al.,* 2007; Bereschenko *et al.*, 2008).

Otro filo dominante corresponde a los Bacteroidetes, para el cual se ha documentado que su abundancia relativa es aproximadamente siete veces menor a la determinada para el filo Proteobacteria (Curtin *et al*., 2020), siendo la clase Flavobacteriia la más características en este tipo de biomas. En menor medida, siguen los filos Actinobacteria y Firmicutes, representados por las clases Actinobacteria y Bacilli, respectivamente. El resto de filos no superan el 7% de la abundancia relativa de la comunidad (Yu *et al*., 2018), y sus clases –38 en total– corresponden a <20% del total de bacterias descritas (Curtin *et al.*, 2020).

Dada la significancia de *Sphingomonas* y *Pseudomonas* en las membranas de OI, y su destacable papel como productoras de EPS, sería factible ahondar en un futuro en el conocimiento sobre la síntesis de proteínas de unión y el potencial de bioincrustación de estas bacterias. En este sentido, se ha identificado el gen codificante de la proteína *spo0A,* encargada de la adhesión de varias tipologías bacterianas a superficies (Wu *et al.*, 2020), y el gen regulador *cdgR* del mensajero monofosfato de guanosina cíclico (C-di-GMP) ubicuo a todas las bacterias, y responsable de la transición de un estilo de vida libre a la agregación bacteriana que desencadena la formación de biopelículas (Romling & Amikam, 2006; Xiao *et al.,* 2019). Además, también se ha caracterizado el gen codificante de los mecanismos *antifouling* (*alpP*) (Skovhus *et al.*, 2007).

El estudio de estos genes bajo diferentes condiciones experimentales –p. ej. cambios en el flujo de alimentación, configuración de la membrana, estadio de desarrollo de la biopelícula, etc.–, puede ayudar a i) indicar una inclinación funcional a formar biopelículas en membranas de ósmosis inversa; ii) indagar sobre los mecanismos que facilitan la colonización de la superficie de la membrana; así como, iii) determinar cómo las sustancias poliméricas extracelulares ayudan a iniciar la formación de una biopelícula.

En este trabajo se pretende identificar taxonómicamente, con técnicas dependientes e independientes de cultivo, basadas en la valoración del gen *16S rRNA* y la construcción de una biblioteca de clones, las comunidades bacterianas predominantes en las membranas de osmosis inversa de una planta de desalinización situada en la isla de Gran Canaria. Esta caracterización permitirá en un futuro ahondar en el comportamiento de los genes codificantes de la síntesis de proteínas implicadas en los mecanismos de *fouling* y *antifouling.* Asimismo, la identificación y caracterización de estas bacterias contribuirá al diseño de membranas de osmosis inversa de mantenimiento sostenible.

I.1.2 │MATERIAL Y MÉTODOS

I.1.2.1 │Muestreo y preparación de las muestras

En este estudio, se emplearon cuatro membranas de ósmosis inversa (*Hydranautics SCW4 plus, Dow Filmtec SW30HR LE-400, NanoH$_2$O Qfx SW 365 ES* y *Nitto SWC4+*). Cada membrana se retiró del recipiente o módulo contenedor sellado a presión, una vez que las mismas completaron su ciclo de vida inherente al diseño de cada una de ellas. Concretamente, las membranas utilizadas se recogieron de la planta desalinizadora «Desaladora Las Palmas III», ubicada en la costa este de la isla de Gran Canaria. Las principales características de las membranas se muestran en la Tabla I.1.1.

Las carcasas extraídas, conteniendo las membranas, se desmontaron y se abrieron en el laboratorio, mediante un corte axial al eje longitudinal del recipiente contenedor (Figura I.1.4). A continuación, las membranas se desenrollaron y cortaron en secciones de 12 × 12 cm (recogiendo 8 porciones por membrana).

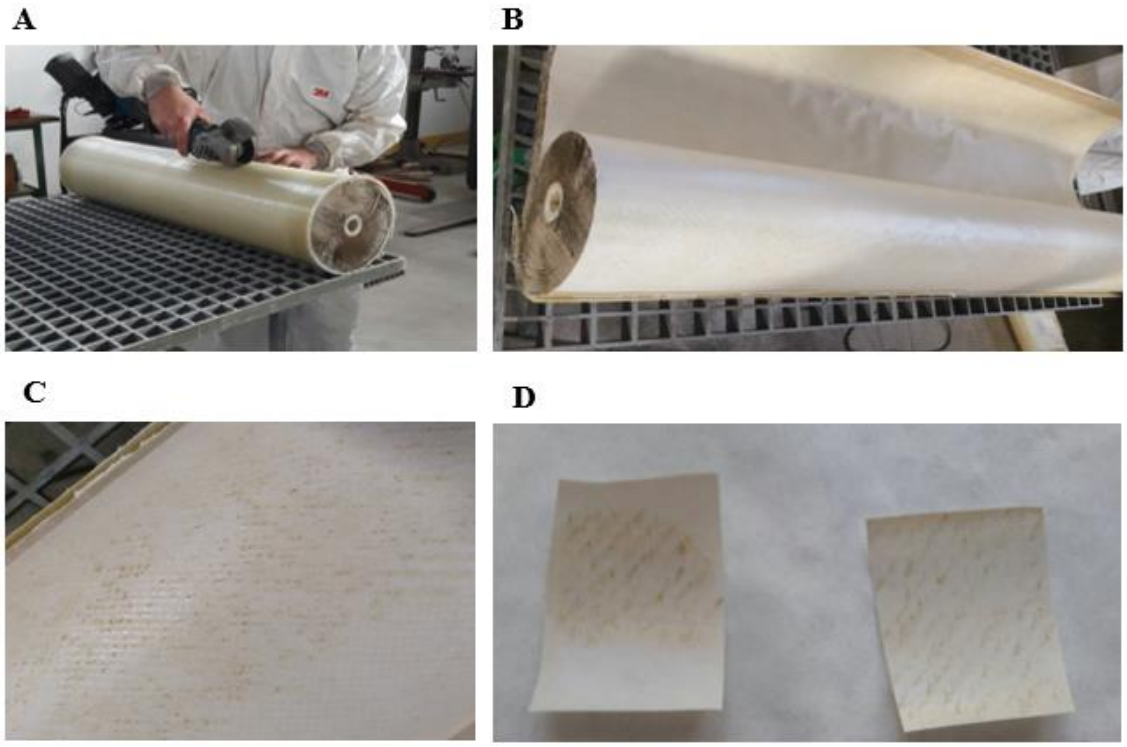


Figura I.1.4. Detalles del procedimiento de muestreo de una membrana de osmosis inversa del modelo *Qfx SW 365 ES* (LG NanoH$_2$O Inc., CA, EE. UU.). **A.** Apertura de la membrana de OI a lo largo del eje longitudinal. **B.** Estructura interna de la membrana de OI. **C.** *Fouling* adherido a la membrana de OI. **D.** Secciones de 12 × 12 cm de la membrana de OI.

Tabla I.1.1. Principales características de las membranas de osmosis inversa utilizadas en este estudio.

Tipo de membrana	**Flujo de permeado** (m^3 d^{-1})	**Rechazo de sal** Mínimo-Nominal (%)	**Estructura de la membrana**	**Polímero de la membrana**	**Área nominal de la membrana** (m^2)	**Casa comercial**
SWC4 plus	24,6	99,70 – 99,80	Enrollada en espiral	Poliamida	121,92	Hydranautics membranes (Oceanside, CA, EE. UU.)
SW30HR LE-400	28,0	99,65 - 99,80	Enrollada en espiral	Película delgada de poliamida	121,92	Dow Filmtec Membranes (Texas, EE. UU.)
Qfx SW 365 ES	47,0	99,70 – 99,75	Enrollada en espiral	TFN de poliamida[a]	111,25	LG NanoH_2O Inc. (Los Angeles, CA, EE. UU.)
SWC4+	24,6	99,70 – 99,80	Enrollada en espiral	Poliamida	121,92	Nitto Group Co. (Teaneck, NJ, EE. UU.)

[a] Película delgada de nanocompuesto de poliamida (TFN, *Thin-Film Nanocomposite*)

Las secciones extraídas de cada una de las membranas se dispusieron individualmente en matraces con solución salina de fosfato (PBS, *Phosphate Buffered Saline solution*), al 1X (m/v), y a un pH 7,5 (Tabla I.1.2). Previamente la solución PBS se esterilizó a 121 ºC durante 20 min mediante autoclave (RAYPA, Barcelona, España).

Tabla I.1.2. Composición de la solución salina de fosfato al 1X.

Reactivos	**Concentración final** (mM)	**Cantidades** (g)
NaCl	137	8
KCl	2,7	0,2
Na_2HPO_4	10	1,44
KH_2PO_4	1,8	0,24

Cantidades y volúmenes de reactivos para 1 L de solución en H_2O_{dd}.

Las bacterias adheridas a las porciones seccionadas se desprendieron combinando tres procedimientos: baño de ultrasonidos, agitación orbital y raspado. El baño de ultrasonidos se llevó a cabo a temperatura ambiente durante un minuto, repitiendo el proceso cinco veces. Tras el baño de ultrasonidos, las muestras se agitaron en un agitador orbital durante una noche a 23˚C. Durante todo el procedimiento, las membranas se mantuvieron sumergidas en solución PBS 1X (m/v).

I.1.2.2 │Identificación bioquímica de las bacterias

Para la identificación bioquímica de las bacterias adheridas a las membranas de osmosis inversa, se dispensaron alícuotas de 200 µL de las muestras desprendidas en medio PBS 1X (m/v), obtenidas según el apartado precedente, en cuatro medios de cultivo diferentes. Los medios de cultivo empleados fueron i) agar R2A (Scharlab, Barcelona, España); ii) agua de mar agarizada; iii) agar de extracto de levadura triptona preparado con agua de mar (Scharlab); y, iv) agar marino (Scharlab). Todas las placas de cultivo se incubaron a 22˚C. De cada uno de los cuatro tipos de medios se aislaron individualmente colonias con morfologías similares, en cuanto a forma y color, y se llevaron a cabo re-cultivos sucesivos hasta la obtención de cultivos puros de las mismas.

Las colonias bacterianas puras se caracterizaron bioquímicamente con el sistema de galerías estandarizadas miniaturizado *API 20 NE* (BioMerieux, Craponne, Francia). Este sistema es utilizado para la identificación de bacilos gram negativos no fermentadoras y no-entéricos. El sistema miniaturizado *API 20 NE* está constituido por un total de 20 microtubos, conteniendo en ellos sustratos deshidratados correspondientes a 8 pruebas convencionales y 12 pruebas de asimilación. La prueba *API 20 NE* se realizó según las instrucciones del fabricante. Además, la identificación bioquímica se completó con tres reacciones independientes: Tinción de Gram, prueba de la catalasa, y, tiras reactivas de oxidasa (Scharlab).

I.1.2.3 │Identificación molecular de las bacterias

a. Aislamiento del ADN

Con el objetivo de caracterizar molecularmente las bacterias, se llevó a cabo el aislamiento del ADN procedente de las secciones de las membranas.

La extracción del ADN se llevó a cabo a partir de los precipitados o *pellets* obtenidos de la centrifugación del cultivo bacteriano en medio PBS 1X (m/v) a 15 000 *x g* durante 15 min. Igualmente, se aisló el ADN correspondiente a las cepas bacterianas puras predominantes obtenidas durante la determinación bioquímica. En algunos casos, las colonias puras aisladas precisaron el incremento de biomasa, para ello, se llevaron a cabo cultivos en solución estéril de PBS 1X (m/v) enriquecida con triptona (10 g L^{-1}) y extracto de levadura (5 g L^{-1}). La incubación de estas colonias se llevó a cabo a 23˚C durante 24 h. Transcurridas las 24 h, el cultivo se centrifugó en las condiciones experimentales descritas anteriormente (15 000 *x g* durante 15 min), y del *pellet* resultante se aisló el ADN. El aislamiento del ADN ambiental y del ADN procedente de las cepas puras se realizó siguiendo el procedimiento de Murray y Thompson (1980), según las modificaciones recogidas en García-Jiménez y colaboradores (2009), y cuyo procedimiento se ha descrito en el Capítulo I (apartado I.2.2.2).

Los rendimientos del ADN aislado se evaluaron utilizando un espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE. UU.). La integridad del ADN se valoró a partir de la visualización de los fragmentos de ADN en gel de agarosa al 0,8% (m/v). La ausencia de ADN fragmentado o *smear* determinó la obtención de ADN íntegro y de calidad óptima para ser utilizado en las acciones posteriores. Todas las muestras se aislaron por triplicado.

b. Amplificación del gen 16S rRNA

Las amplificaciones de las regiones génicas *16S rRNA* se llevaron a cabo con los juegos de *primers* universales para procariotas y específicos del domino Bacteria seleccionados de la bibliografía (Tabla I.1.3), y descritos anteriormente en la introducción general (apartado I.G.3; Tabla I.G.2).

Tabla I.1.3. Juegos de cebadores del gen *16S rRNA* utilizados en este estudio.

Organismo objetivo	***Primer***	**Secuencia** (5'→3')	**Referencia**
Universal procariotas	B27F B1492R	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG TCAGGYTACCTTGTTACGACTT	Bernbom *et al.*, 2011
Domino Bacteria	518F 800R	CCAGCAGCGCTAATACG TACCAGGGTATCTAATCC	Bernbom *et al.*, 2011
Domino Bacteria	9F 1512R	GAGTTTGATCCTGGCTCAG ACGGHTACCTTGTTACGACTT	Lee *et al*., 2010
Domino Bacteria	91F 1082R	TTCGGAATAACAGTTG CGGCTGGATCTAAGGA	Lee *et al*., 2010

Las amplificaciones se llevaron a cabo a partir de 90-95 ng de ADN *template* y se realizaron en un termociclador *GenAmp 2400* (PerkinElmer Inc., MA, EE. UU.). El protocolo de amplificación llevado a cabo se presenta en la Tabla I.1.4.

Tabla I.1.4. Protocolo de amplificación realizado en este estudio con los juegos de *primers* del marcador molecular *16S rRNA*.

	Desnaturalización	**Hibridación**	**Elongación**	**Elongación final**
Ciclos		30		1
Protocolo	95 ºC; 60 s	55 ºC; 60 s	72 ºC; 90 s	72 ºC, 5 min

Cada mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL, para cada muestra, conteniendo 10 µL de 5X *PrimerSTAR™ buffer*, 0,5 µL de *PrimerSTAR™ HS DNA Polymerase* (2,5 U μL^{-1}), 4 µL de la mezcla dNTPs (2,5 mM de cada uno), todos ellos de la casa comercial TaKaRa Shuzo Co. (Shiga, Japan), además de 2 µL de cada uno de los *primers* (10 µM), y, 5 µL de ADN *template*. Los amplicones obtenidos, se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v). Con el fin de determinar el tamaño de las bandas resultante se incluyeron 5 µL del marcador de peso molecular *200 bp DNA ladder* (Omega Bio-Tek Inc, Georgia, EE. UU.).

Los fragmentos amplificados de tamaños de banda comprendidos entre 800 y 1 200 pb, se purificaron utilizando el *kit QIAEX II Gel Extraction* (Qiagen Inc., Hilden, Alemania), según las instrucciones del fabricante. A continuación, se describen los pasos acometidos durante el proceso de purificación de las bandas obtenidas:

- En primer lugar, se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v).
- Una vez visualizada la banda del producto de amplificación en el transiluminador de luz UV, se utiliza un bisturí para escindir el fragmento, eliminando el exceso de gel de agarosa.
- A continuación, el fragmento se introduce en un microtubo de capacidad 1,5 mL y se anota el peso del mismo.
- Se añade el tampón o *Buffer QX1* acorde a una ratio 300 µL de tampón:100 mg del fragmento escindido, y se agita mediante vórtex.
- Se incuba el fragmento a 50 ºC durante 10 min, agitando las muestras mediante vórtex cada 2 min.
- Se centrifuga la muestra a 13 000 rpm durante 30 s.
- Tras la centrifugación, se elimina con cuidado el sobrenadante con la ayuda de una pipeta.

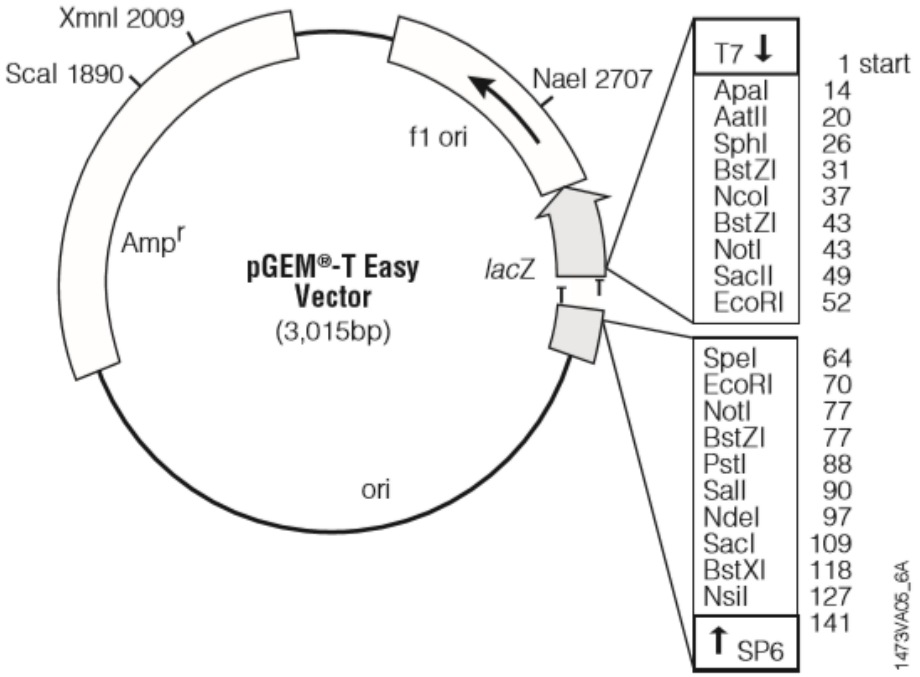
- Se lava el precipitado o *pellet* con 500 µL de *Buffer PE*. Tras el lavado, se resuspende el *pellet* mediante vórtex.
- Posteriormente, se centrifuga la muestra a 13 000 rpm durante 30 s, y se vuelve a eliminar el sobrenadante con una pipeta.
- Se lleva a cabo un segundo lavado del precipitado repitiendo los dos pasos precedentes.
- Tras el lavado se seca el *pellet* destapando el microtubo y dejando a temperatura ambiente durante 15 min.
- Para la elución de la banda purificada se utilizaron 20 µL de H_2O_{dd} libre de ARNasas, y se resuspenden mediante vórtex breve.
- La elución de las muestras finalizó con una incubación a temperatura ambiente durante 5 min.
- Finalmente, las muestras eluídas se centrifugaron 10 000 rpm durante 30 s, y cuidadosamente se transfirió el sobrenadante conteniendo el ADN purificado a un nuevo microtubo de capacidad 1,5 mL.

c. Clonación de los insertos del gen 16S rRNA

Los fragmentos purificados se clonaron en el sistema de clonación *pGEM-T Easy* (Promega, Wisconsin, EE. UU.). Este sistema requiere de la unión previa del amplicón al vector (ligación) para su inserción en el sistema que copiará el fragmento (transformación mediante *E. coli* JM109). El *pGEM-T Easy Vector*, es un sistema que replica un alto número de copias, el cual contiene dos promotores de ARN polimerasa, T7 y SP6, que flanquean una región de clonación múltiple dentro de la región de codificación de los α-péptidos de la enzima β-galactosidasa (Figura I.1.5).

La inactivación por inserción del α-péptido permite la identificación de clones recombinantes mediante un examen visual de las colonias obtenidas en las placas indicadoras, identificándose las colonias blancas como clones

recombinantes, y las colonias azules como bacterias que no poseen el vector con el inserto recombinado.



Puntos de referencia del *pGEM-T Easy Vector* (Promega, Wisconsin, EE. UU.):

· Sitio de iniciación de la transcripción de la ARN polimerasa T7	1
· Región de clonación múltiple	10-128
· SP6 ARN promotor de la polimerasa (-17 a +3)	139-158
· Sitio de inicio del SP6 ARN transcripción de la polimerasa	141
· Sitio de unión del *primer* con orientación *reverse* pUC/M13	176-197
· Codón de inicio de *lacZ*	180
· Operador *lac*	200-216
· Región de codificación de la β-lactamasa	1337-2197
· Región fago f1	2380-2835
· Operón *lac*	2836-2996, 166-395
· Sitio de unión del *primer* con orientación *forward* pUC/M13	2949-2972
· Promotor de ARN polimerasa T7 (-17 a +3)	2999-3

Figura I.1.5. Mapa genético del plásmido o vector de clonación *pGEM-T Easy Vector* (Promega, Wisconsin, EE. UU.) y sus puntos de referencia.

A continuación, se detalla cada una de las fases del proceso de clonación llevado a cabo en este estudio:

i) Ligación

Las reacciones de ligación se realizaron a partir de las mezclas descritas en la Tabla I.1.5. Para maximizar el número de los productos transformados, las incubaciones de las mezclas de reacción se llevaron a cabo durante una noche a 4 ºC.

En el procedimiento experimental se incluyeron dos controles. El primer control se establece sustituyendo el ADN problema por un ADN suministrado (control positivo), y un segundo control donde el ADN problema es sustituido por H_2O_{dd} libre de ARNasas (control *background*). Transcurrida la incubación, se tomaron 2 µL de mezcla de reacción y se procedió a la ligación propiamente. Esta se realizó con los reactivos presentados en la Tabla I.1.5, incubándose a continuación durante 1 hora.

Tabla I.1.5. Mezcla de reacción de la ligación llevada a cabo en este estudio.

Reacción / **Componentes de la reacción**	**Estándar** (µL)	**Control positivo** (µL)	**Control *background*** (µL)
2X Rapid Ligation Buffer, T DNA Ligasa	5	5	5
pGEM®-T Easy Vector (50 ng)	1	1	1
Producto de amplificación	2	-	-
Inserto de ADN Control	-	2	-
T4 DNA Ligasa (unidades Weiss μL^{-1})	1	1	1
H_2O_{dd} libre de ARNasas	1	1	1

La optimización de los volúmenes de los insertos añadidos a las mezclas de reacción de ligación, se realizó de acuerdo al cálculo de la ratio inserto:vector, dependiendo estos, del tamaño de cada uno de los fragmentos purificados. La fórmula aplicada responde a la siguiente expresión:

$$ng\ inserto = \frac{ng\ del\ vector\ \times kb\ de\ tamaño\ del\ inserto}{kb\ del\ tamaño\ del\ vector} \times ratio\ optimizada$$

En este estudio, la ratio optimizada correspondió a 2:1 (inserto:vector).

ii) Transformación

La transformación, se realizó con 50 µL de células *JM109 High Efficiency Competent Cells* (Promega) (Figura I.1.5), descongeladas previamente en hielo. La transformación se llevó a cabo atendiendo a los pasos indicados por el fabricante, como a continuación se muestra:

- Se transfieren 2 µL de la reacción de ligación a un nuevo microtubo de capacidad de 1,5 mL, previamente dispuestos en hielo.

- Se añade suavemente 50 µL de la solución *JM109 High Efficiency Competent Cells*.

- Se agitan suavemente los tubos y se dejan reposar en hielo durante 20 min.

- Seguidamente, estos tubos se disponen durante 50 s en un baño de agua a 42°C sin agitación. Transcurrido este tiempo, los tubos se depositan de nuevo en hielo, dejando reposar durante 2 min.

- A continuación, se añaden 950 µL de medio SOC a cada tubo, conteniendo las células transformadas e incubándose en un horno de hibridación con agitación suave a 150 rpm, a 37 ºC durante 90 min. La composición del medio SOC se describe en la siguiente tabla:

Tabla I.1.6. Componentes del medio SOC (*Super Optimal Broth*).

Reactivos (Concentración stock)	**Cantidades**
Triptona bacteriológica	2 g
Extracto de Levadura bacteriológica	0,5 g
NaCl (1M)	1 mL
KCl (1 M)	0,25 mL
$MgCl_2$ (2,5 M)	1 mL
Glucosa (2 M)	1 mL
Volumen final [a]	100 mL

[a] Volumen completado con agua libre de ARNasas

- En el intervalo de incubación, las placas de *Luria Bertani* (LB) conteniendo ampicilina (ver detalle más abajo) se trataron con una solución con el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido (X-Gal) y el inductor isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG). El IPTG se preparó a una concentración de 0,1 M, extendiéndose una alícuota de 100 µL sobre el medio. A continuación, 20 µL de X-Gal al 0,5% se extendieron igualmente sobre el medio agarizado LB.

- Transcurrido el tiempo de incubación (90 min), se sembraron alícuotas de 100 µL de cultivo bacteriano en las placas de agar LB con los indicadores de transformación (ampicilina, IPTG y X Gal) y se incubaron a 37 ºC durante 24 h.

El medio LB se prepara según la Tabla I.1.7 y se esteriliza en autoclave a 121 ºC durante 20 min. Al finalizar la esterilización, y cuando la temperatura ha disminuido hasta ca. 50 ºC, se le añade ampicilina a una concentración final de 100 µg mL^{-1}. El medio es entonces dispensado en placa y dejado en reposo hasta su completa polimerización.

Tabla I.1.7. Componentes del medio agarizado *Luria Bertani* (LB).

Reactivos	**Cantidades**
Triptona bacteriológica	10 g
Extracto de Levadura bacteriológica	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Volumen final [a]	1000 mL

[a] Volumen completado con agua libre de ARNasas

iii) Selección y purificación de transformantes

Las colonias bacterianas de color blanco, conteniendo el inserto, frente a aquellas sin inserto, las cuales presentan coloraciones azules, son tratadas para confirmar la presencia del fragmento de ADN clonado. Las colonias blancas se repican en una nueva placa de LB con ampicilina, y posteriormente se introducen en tampón de lisis. Así, cada colonia fue tratada con 5 µL de tampón de lisis, preparado como se describe en la Tabla I.1.8. para verificar la presencia de insertos, se siguieron los siguientes pasos:

- Las muestras se incuban en baño a 37ºC durante 5 min. Tras la incubación las muestras se transfieren a hielo y se dejan reposar 5 min, centrifugándose, después del reposo, a máxima velocidad (22 000 *x g*) durante 2 min.
- Finalmente se toma una alícuota del sobrenadante, para evitar el ADN cromosómico, y se realiza una electroforesis en gel de agarosa 1% (m/v).

- Verificada la presencia del inserto, la colonia se cultiva en 5 mL de medio LB a 37 ºC, durante 24 h.

Tabla I.1.8. Componentes del tampón de lisis.

Reactivo (concentración final)	**Concentración Stock**	**Cantidades y volúmenes**
EDTA (5 mM)	0,5 M	0,1 mL
SDS (0,25 %)	5%	0,5 mL
NaOH (0,1 M)	1 M	1,0 mL
NaCl (60 mM)	5 M	0,12 mL
Azul de Bromofenol (0,05%)	-	0,5 mg
Glicerol (10%)	87%	1,14 mL
H_2O_{dd} libre de ARNasas	-	6,64 mL
Volumen final		10 mL

Los plásmidos se aislaron utilizando el kit de purificación de plásmidos *QIAGEN Plasmid MINI* (Qiagen Inc., Hilden, Alemania). El protocolo de purificación se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante, siendo los pasos acometidos:

- El cultivo bacteriano se centrifuga a 6 000 *x g* durante 15 min, a una temperatura de 4 ºC.
- Se descarta el sobrenadante y se resuspende el *pellet* en 0,3 mL de *Buffer P1*.
- Seguidamente se adicionan 0,3 mL de *Buffer P2*. Se mezcla la muestra invirtiendo enérgicamente el tubo hasta 6 veces, seguido de una incubación a temperatura ambiente durante 5 min.
- Tras la incubación se añaden 0,3 mL *Buffer P3* a 4 ºC, se mezcla de nuevo mediante inversión enérgica de los tubos, repitiendo el procedimiento hasta 6 veces, y se incuban en hielo durante 5 min. El precipitado resultante contiene ADN genómico, proteínas y restos celulares.
- A continuación, se centrifuga a 22 000 *x g* durante 10 min. Transcurridos los 10 minutos se retira el sobrenadante que contiene el ADN del plásmido, y este es transferido a un nuevo microtubo.

- El sobrenadante se centrifuga a 22 000 *x g* durante 10 min. Durante la centrifugación, se acondicionan las columnas *QIAGEN-tip 20*, añadiéndoles 1 mL de *Buffer QBT*, y dejando reposar hasta que drene el *buffer* completamente.
- Para continuar con la purificación, el sobrenadante, recuperado de las muestras centrifugadas, se transfiere entonces a la columna.
- Se lava la *QIAGEN-tip 20* con 2 mL de *Buffer QC*.
- Se repite el paso precedente para llevar a cabo un segundo lavado.
- La elución del ADN se realiza con 0,8 mL de *Buffer QF*.
- La precipitación del ADN se lleva a cabo a partir de la adición de 0,7 volúmenes (0,56 mL por 0,8 mL de volumen de elución) de isopropanol a temperatura ambiente. Inmediatamente se mezcla por inversión y se centrifuga a 15 000 *x g* durante 30 min.
- Tras la precipitación se decanta el sobrenadante con cuidado, y se añaden 1 mL de etanol al 70% (v/v) al ADN precipitado, y, se centrifugan las muestras a 15 000 *x g* durante 10 min.
- Se descarta el sobrenadante con cuidado y se deja secar el *pellet* a temperatura ambiente durante 10 min.
- Por último, el *pellet* se resuspende en 30 µL de *Buffer TE* y se lleva el volumen a un microtubo de capacidad 1,5 mL.

iv) Amplificación y secuenciación del inserto

Las copias del ADN insertado en el plásmido fueron amplificadas usando los promotores del plásmido *pGEM-T Easy*: T7 y SP6 (Figura I.1.5). El inserto se verificó mediante reacción en cadena de la polimerasa utilizando el par de *primers* descrito por Messing (1983): M13F con orientación *forward* (5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'), y M13R con orientación *reverse* (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') (Promega). Ambos *primers* flanquean en ambos sentidos la zona del inserto dentro del plásmido (Figura I.1.5).

Las mezclas de reacción se realizaron acorde a la Tabla I.1.9. La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en un termociclador *GenAmp 2400* (PerkinElmer Inc.). El protocolo de amplificación llevado a cabo constó de una desnaturalización inicial a 94 ºC durante 3 min, seguido de 23 ciclos a 94 ºC durante 60 s, 52 ºC durante 60 s, y 72 ºC durante 2 min. La elongación final se realizó con un único ciclo a 72 ºC durante 7 min.

Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v), en el cual se incluyeron 5 µL del marcador de peso molecular *200 bp DNA ladder* (Omega Bio-Tek Inc).

Tabla I.1.9. Componentes empleados en las reacciones de amplificación de los insertos, llevadas a cabo en este estudio.

Reactivos (concentración stock)	**Volumen para una muestra** (µL)
2X GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix (Promega)	12,5
M13 F (10 µM)	2
M13 R (10 µM)	2
ADN *template*	5
Volumen final de la mezcla de amplificación[a]	25

[a] Volumen completado con agua libre de ARNasas

Los fragmentos de amplificación se secuenciaron utilizando el kit *BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing* (Thermofisher Scientific, MA, EE. UU.), y un secuenciador automatizado *ABI-310 DNA* (Applied Biosystems, CA, EE. UU.). Las secuencias de nucleótidos se validaron a través de la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST; https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

d. Análisis filogenético de los insertos

El análisis filogenético de los insertos se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el Capítulo I (apartado I.2.3) mediante el software genómico *MEGA-X* (Kumar *et al.*, 2018).

I.1.3 │RESULTADOS

I.1.3.1 │Identificación bioquímica de las bacterias

Aunque las bacterias crecieron en todos los medios de cultivo utilizados (agar R2A, agua de mar agarizada, agar de levadura de triptona preparado con agua de mar, y, agar marino), el medio agar R2A mostró la mayor recuperación de colonias bacterianas. Por ello, la selección de colonias se realizó en los cultivos en este agar, a partir de los cuales se identificaron y caracterizaron seis colonias diferentes, obteniendo de todas ellas cultivos puros (Tabla I.1.10).

Cabe destacar que, no se observaron diferencias entre los cultivos llevados a cabo a partir de los cuatro tipos de membranas de ósmosis inversa analizadas.

Tabla I.1.10. Colonias puras obtenidas en este estudio de los cultivos en agar R2A con características morfológicas distintivas.

Número de colonia	Características morfológicas
1	Color naranja
2	Color blanco con morfología uniforme
3	Color blanco con crecimiento extendido
4	Transparente
5	Color beige
6	Color amarillo

Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas con el sistema miniaturizado *API 20 NE* (BioMerieux, Craponne, Francia) se muestran en la Tabla I.1.11. Las asimilaciones de los sustratos se leyeron transcurridas 24-48 h. Cuando fue necesario, se repitieron las pruebas API, para corroborar algunos resultados ambiguos obtenidos para las pruebas bioquímicas de azúcar, que no fueron concluyentes a 42˚C.

Los resultados se interpretaron utilizando la herramienta de identificación ubicada en la web de *BioMérieux* (https://apiweb.biomerieux.com/login).

Tabla I.1.11. Resultados de los análisis bioquímicos de las seis colonias bacterianas aisladas a partir del sistema miniaturizado *API 20 NE* (BioMerieux, Craponne, France), y las pruebas bioquímicas complementarias (tinción de Gram, catalasa y oxidasa).

Test API	**Ingrediente activo**	**Reacción/Enzima**	**Nº Colonia**					
			1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
NO_3	Nitrato de potasio	Reducción de nitratos a nitritos Reducción de nitritos a nitrógeno	−	−	+	−	−	−
TRP	L-triptófano	Producción de indol	−	−	−	−	−	−
GLU	D-glucosa	Fermentación	−	−	−	−	−	−
ADH	L-arginina	Arginina hidrolasa	−	−	−	−	−	−
URE	Urea	Ureasa	−	−	−	−	−	−
ESC	Citrato férrico de esculina	Hidrólisis (β-glucosidasa)	−	−	+	+	-	+
GEL	Gelatina (origen bovino)	Hidrólisis (Proteasa)	+	−	+	+	+	−
PNPG	4-nitrofenil-β-D-galactopiranósido	β-galactosidasa	+	−	−	−	−	+
GLU	D-glucosa	Asimilación	+	+	+	−	+	+
ARA	L-arabinosa		−	−	−	−	−	−
MNE	D-manosa		−	−	−	−	−	−
MAN	D-manitol		+	−	−	−	+	−
NAG	N-acetilglucosamina		+	+	+	+	+	−
MAL	D-maltosa		+	+	+	+	+	+
GNT	Gluconato potásico		+	+	+	−	+	−
CAP	Ácido cáprico		−	−	−	−	−	−
ADI	Ácido adípico		−	−	−	−	−	−
MLT	Ácido málico		−	−	+	−	−	+
CIT	Citrato de trisodio		−	−	−	−	−	−
PAC	Ácido fenilacético		−	−	−	−	−	−
	Pruebas bioquímicas complementarias							
	Gram		−	−	−	−	−	−
	Oxidasa		−	+	+	+	+	+
	Catalasa		−	+	+	−	+	+

Las pruebas del sistema miniaturizado *API 20 NE* permitieron identificar cuatro de las seis colonias de bacterias analizadas a nivel de especie, con un nivel de confianza >90%, a excepción de *Brevundimonas vesicularis* cuya asignación respondió a un nivel de confianza del 86,5% (Tabla I.1.12).

Como muestra la Tabla I.1.12, las especies bacterianas identificadas fueron *Vibrio metschnikovii* (nº de colonia 1), *Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida* (nº de colonia 3), *Brevundimonas vesicularis* (nº de colonia 4), y, *Sphingomonas paucimobilis* (nº de colonia 6).

Tabla I.1.12. Identificación taxonómica, perfil de identificación y nivel de confianza de acuerdo a los resultados bioquímicos obtenidos con el sistema miniaturizado *API 20 NE* (https://apiweb.biomerieux.com/login), correspondientes a las seis colonias puras analizadas en este estudio**.**

Nº de colonia	**Asignación de género o especie**	**Perfil de identificación**	**Nivel de confianza** (%)
1	*Vibrio metschnikovii*	Muy bueno	99,9
2	-	Baja discriminación	-
3	*Aeromonas salmonicida ssp salmonicida*	Bueno	97,6
4	*Brevundimonas vesicularis*	Aceptable	86,5
5	-	No aceptable	-
6	*Sphingomonas paucimobilis*	Bueno	96,5

I.1.3.2 │Identificación molecular de las bacterias

Las colonias identificadas bioquímicamente como *Sphingomonas*, también fueron corroboradas como tales mediante la caracterización del gen *16S rRNA*. La secuencia obtenida (Figura I.1.6) se validó mediante la identificación de valores de similitud con las secuencias de nucleótidos depositadas en la base de datos NCBI (herramienta bioinformática BLAST).

> *Sphingomonas sp (LP)*
CCGGAATTGCCTTTGAGACTGGGTCGCTTGAATCCGGGAGAGGTGAGTGGAATTCTGAGTGTAGAGGTGA
AATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGACCGGTATTGACGCTGAGGTGC
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATAACTAGCTGTC
CGGGCACTTGGTGCTTGGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTATCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT
TAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCTGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGC
AGAACCTTACCAGCGTTTGACATGGTAGGACGGTTTCCAGAGATGGATTCCTTCCCTTCGGGGACCTACA
CACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCTCGTCCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGAAACCGCCGGTGATAAGCCGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGCGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATG
GGCAGCAATCCCGCGAGGGTGAGCTAATCTCCAAAAACCGTCTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGA
GAGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCAGGCCTTGTA
CACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGATTGACCCGAAGACAGTGAGCTAACCGCAAGGAGGCAGCTG
GCCACGGTCGGTTCAGCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACC

Figura I.1.6. Secuencia obtenida de la amplificación realizada con ADN aislado de colonias puras identificadas bioquímicamente como *Sphingomonas paucimobilis*.

Como resultado se obtuvo un alineamiento con varias secuencias anotadas como *Sphingomonas sp.* y *Sphingomonas changbaiensis*, con un rango de porcentajes de identidad del 96,5-100% y un E-valor de 0,0 (Tabla I.1.13).

Tabla I.1.13. Anotación a través de la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) de la secuencia del gen *16S rRNA* obtenida en este estudio correspondiente a las colonias de *Sphingomonas paucimobilis* identificadas bioquímicamente.

Anotación (secuencia parcial del gen *16S rRNA*)	**% de identidad**	**E-valor**
Sphingomonas sp. cepa X1-8	100,00	0,0
Sphingomonas changbaiensis cepa NBRC 104936	98,87	0,0
Sphingomonas changbaiensis cepa G119	98,62	0,0
Sphingomonas sp. cepa MAH-20	98,94	0,0
Sphingomonas sp. cepa I15B-00863	98,44	0,0
Sphingomonas sp. cepa C33	97,73	0,0
Sphingomonas changbaiensis cepa T12R12	97,73	0,0
Sphingomonas sp. cepa C73	97,47	0,0
Sphingomonas sp. cepa MN 122.2a	96,70	0,0
Sphingomonas sp. cepa ZLT-5	96,50	0,0

El análisis filogenético, el cual se llevó a cabo a través de la estimación por máxima verosimilitud (ML, *Maximum Likelihood*), agrupó la secuencia problema del segmento *16S rRNA* de *Sphingomonas* (*Sphingomonas sp (LP)*) con otras 43

secuencias del gen *16S rRNA* anotadas como pertenecientes a este género (Tabla I.1.14).

Tabla I.1.14. Secuencias del gen *16S rRNA* correspondientes a varias especies y cepas del género *Sphingomonas*.

Especies y cepas	**N` de acceso NCBI**
Proteobacteria Filo	
α-Proteobacteria	
Sphingomonadaceae familia, *Sphingomonas* género	
Sphingomonas abaci C42	AJ575817
Sphingomonas abaci C42	NR_042192
Sphingomonas abaci SS1-08	KU341393
Sphingomonas adhaesiva IFO 15099	NR_043391
Sphingomonas adhaesiva BPM19	MF289214
Sphingomonas aerolata R-36940	FR691420
Sphingomonas aerolata 1111TES25Y1	LN774415
Sphingomonas aquatilis MPR 1	KX110354
Sphingomonas aquatilis S7	KF542913
Sphingomonas asaccharolytica IFO 15499-T	Y09639
Sphingomonas asaccharolytica Gsoil 130	KY078832
Sphingomonas aurantiaca MA101b	AJ429236
Sphingomonas aurantiaca MA306a	AJ429237
Sphingomonas azotifigens NBRC 15497	AB217471
Sphingomonas azotifigens NBRC 15497	AB680881
Sphingomonas desiccabilis CP1D	NR_042372
Sphingomonas desiccabilis CP1DT	AJ871435
Sphingomonas echinoides S32312	AB649019
Sphingomonas echinoides NRRL B-3126	MG745876
Sphingomonas dokdonensis DS-4	NR_043612
Sphingomonas dokdonensis DS-4	DQ178975
Sphingomonas mali S32423	AB649020
Sphingomonas mali GM289	AB740933
Sphingomonas molluscorum An 18 (KMM 3882)	AB248285
Sphingomonas molluscorum EP2	MG778708
Sphingomonas panni T9BP11	JF459953
Sphingomonas panni L8-752	JQ659481
Sphingomonas panni T9BR13	JF459952
Sphingomonas parapaucimobilis JCM 7510	NR_115615
Sphingomonas parapaucimobilis JCM 7510T	D84525
Sphingomonas paucimobilis BN 2056	MG438514
Sphingomonas paucimobilis MFC-pH7 01	KY434108
Sphingomonas pituitosa NBRC 102491	NR_114119
Sphingomonas pituitosa EDIV	AJ243751
Sphingomonas pruni NBRC 15498	NR_113760
Sphingomonas pruni IFO 15498	NR_026373
Sphingomonas soli T5-04	AB166883
Sphingomonas soli NBRC 100801	AB681244
Sphingomonas wittichii RW1	NR_027525
Sphingomonas wittichii HJX9	KP979540
Sphingomonas sp. MAH-20	MH368767
Otros géneros de Sphingomonadaceae	
Blastomonas aquatica PE 4-5	KJ528316

El total de posiciones obtenido en el conjunto final de datos fue de 1 023 posiciones. Específicamente, el análisis filogenético posicionó a esta secuencia dentro del género *Sphingomonas*, concretamente determinada como una *Sphingomonas sp.* (Figura I.1.7). Este resultado demostró que las colonias de *Sphingomonas* obtenidas en este estudio podían considerarse representativas de una especie dentro de este género.

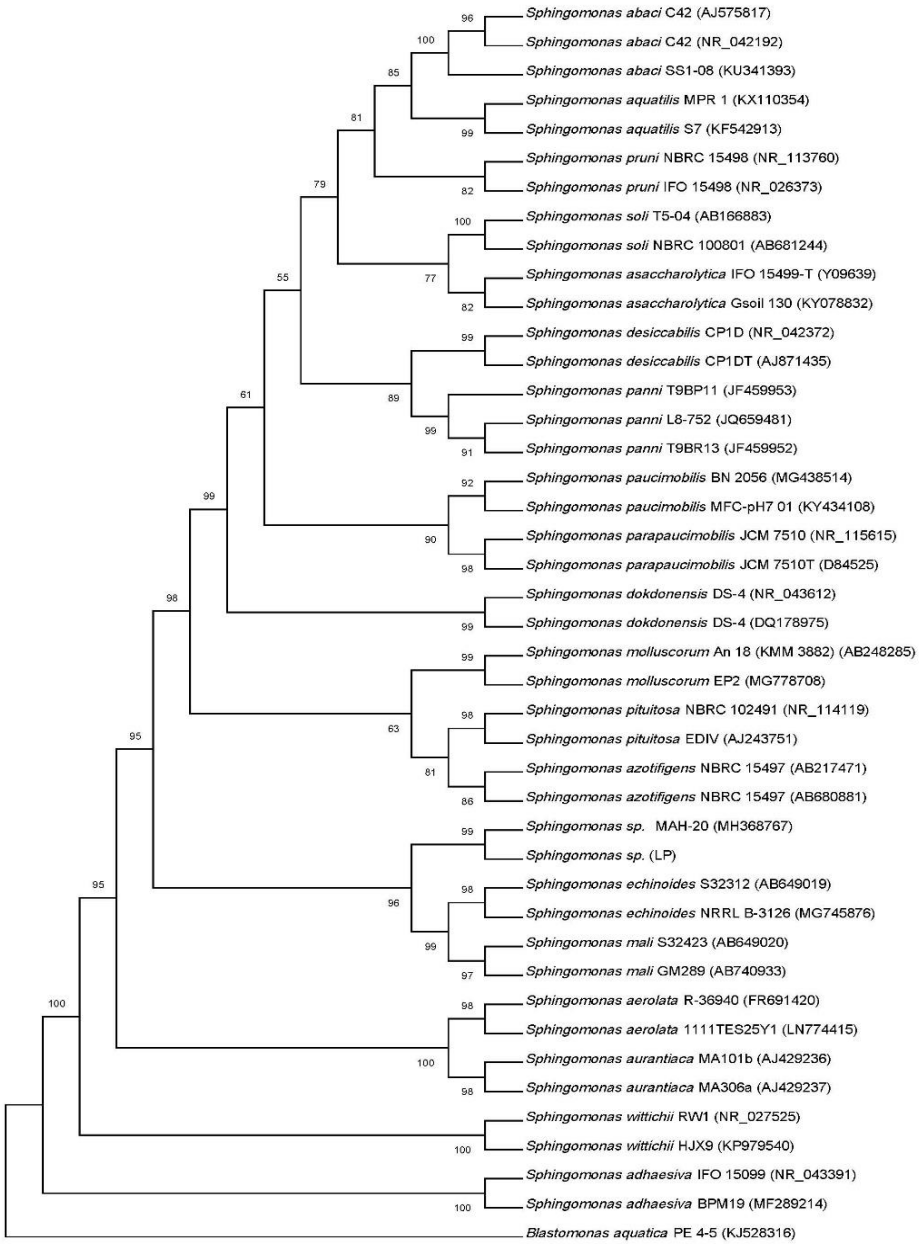


Figura I.1.7. Árbol de máxima verosimilitud de *Sphingomonas sp.* construido a partir de una secuencia del gen *16S rRNA* obtenido mediante el modelo de Tiempo General Reversible (GTR), y la Distribución Gamma (2 categorías (+G, parámetro = 0,0500)). El número en el nodo representa los valores *bootstrap*. El análisis *Bootstrap* se realizó con 1 000 réplicas. El código LP entre paréntesis indica la secuencia problema analizada en este estudio.

La secuenciación de los insertos del gen codificante *16S rRNA*, obtenidos mediante los métodos independientes de cultivo, se asumieron como unidades taxonómicas operacionales (OTU, *Operational Taxonomic Units*). En concreto, a partir de la secuenciación de fragmentos correspondientes a los insertos clonados, se revelaron un total de 40 OTU del gen *16S rRNA*.

Del número total de fragmentos de amplificación (40 OTU) las especies del género *Pseudomonas* representaron el 30%, y, el 7,5% correspondieron al género *Sphingomonas*. Las secuencias restantes no se relacionaron con bacterias conocidas, por lo que, éstas se identificaron como no representativas. Un total de 25 OTU (62,5%) se detectaron como posibles quimeras y se excluyeron del análisis.

Así, la secuencia correspondiente a los clones resultantes con mayor prevalencia entre los obtenidos para el género *Pseudomonas*, se validó y anotó como *Pseudomonas* (*Pseudomonas sp (LP);* Figura I.1.8), a través de la herramienta BLAST.

> *Pseudomonas sp. (LP)*

CCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCG
TAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAAC
CTGGGAACTGCATCCAAAACTGGCAAGCTAGAGTACAGTAGAGGGTGGTGGAA
TTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAA
GGCGACCACCTGGACTGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTG
GATTCCTTGAGAATTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGG
AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGA
CATGCTGAGAACTTT

Figura I.1.8. Secuencia de *Pseudomonas sp.* obtenida en este estudio a partir de la amplificación de ADN ambiental.

Como resultado del alineamiento local con BLAST, se obtuvo que la secuencia problema se alineó con varias secuencias anotadas como *Pseudomonas marincola*, *Pseudomonas segetis* y *Pseudomonas sp.*, todas ellas con un porcentaje de identidad del 100 % y un E-valor de 0,0 (Tabla I.1.15).

El análisis evolutivo de la secuencia de *Pseudomonas* del gen *16S rRNA*, también se llevó a cabo mediante la estimación de máxima verosimilitud. Este

abarcó 24 secuencias de nucleótidos (Tabla I.1.16) con un total de 687 posiciones en el conjunto de datos final. Específicamente, el análisis filogenético posicionó la secuencia de *Pseudomonas* en un clado dentro de la especie *Pseudomonas marincola* (Figura I.1.9).

Tabla I.1.15. Anotación a través de la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) de la secuencia del gen *16S rRNA* de *Pseudomonas sp.* obtenida en este estudio.

Anotación (secuencia parcial del gen *16S rRNA*)	**% de identidad**	**E-valor**
Pseudomonas marincola cepa SeaQual P B24	100,00	0,0
Pseudomonas marincola cepa I-S-R1-9	100,00	0,0
Pseudomonas sp. cepa RGM 2664	100,00	0,0
Pseudomonas marincola cepa 002-Na3	100,00	0,0
Pseudomonas sp. cepa SB11	100,00	0,0
Pseudomonas sp. cepa BD11M-03	100,00	0,0
Pseudomonas marincola cepa A2E9	100,00	0,0
Pseudomonas sp. cepa BD11-2	100,00	0,0
Pseudomonas segetis cepa 1110TES163	100,00	0,0
Pseudomonas sp. cepa CH2(2014)	100,00	0,0
Pseudomonas marincola cepa VSW212	100,00	0,0
Pseudomonas marincola cepa YSy11	100,00	0,0

Tabla I.1.16. Secuencias del gen *16S rRNA* correspondientes a varias especies y cepas del género *Pseudomonas*.

Especies y cepas	**Nº de acceso NCBI**
Proteobacteria filo	
γ-Proteobacteria	
Pseudomonadaceae familia *Pseudomonas* género	
Pseudomonas aeruginosa H8	MG706125
Pseudomonas aeruginosa ACa02	KJ754135
Pseudomonas aeruginosa B2	KC633284
Pseudomonas argentinensis MSS-10	KM280652
Pseudomonas argentinensis AL243	MG819449
Pseudomonas argentinensis FPBBIH7	KU605764
Pseudomonas cuatrocienegasensis SR7-86	LN995508
Pseudomonas cuatrocienegasensis SR7-79	LN995501
Pseudomonas indica MBK3	MF682348
Pseudomonas indica VITPADJ5	KU598847
Pseudomonas indica NRCNA	MH917935

Tabla I.1.16 (continuación). Secuencias del gen *16S rRNA* correspondientes a varias especies y cepas del género *Pseudomonas*.

Especies y cepas	Nº de acceso NCBI
Pseudomonas indica NBRC	NR_114196
Pseudomonas marincola KMM 3042	NR_041592
Pseudomonas marincola K-W14	JQ799067
Pseudomonas nitroreducens R5-791	JQ659791
Pseudomonas nitroreducens R5-760-1	JQ659788
Pseudomonas nitroreducens R5-758-1	JQ659785
Pseudomonas nitroreducens R1-348	JQ659567
Pseudomonas synxantha X3-5-1	MK120107
Pseudomonas synxantha KGGI14	MH079449
Pseudomonas synxantha UCM B-399	MF196188
Pseudomonas synxantha IAM 12356	NR_043425
Otros géneros de Pseudomonadaceae	
Azomonas agilis NBRC 102607	NR_114164

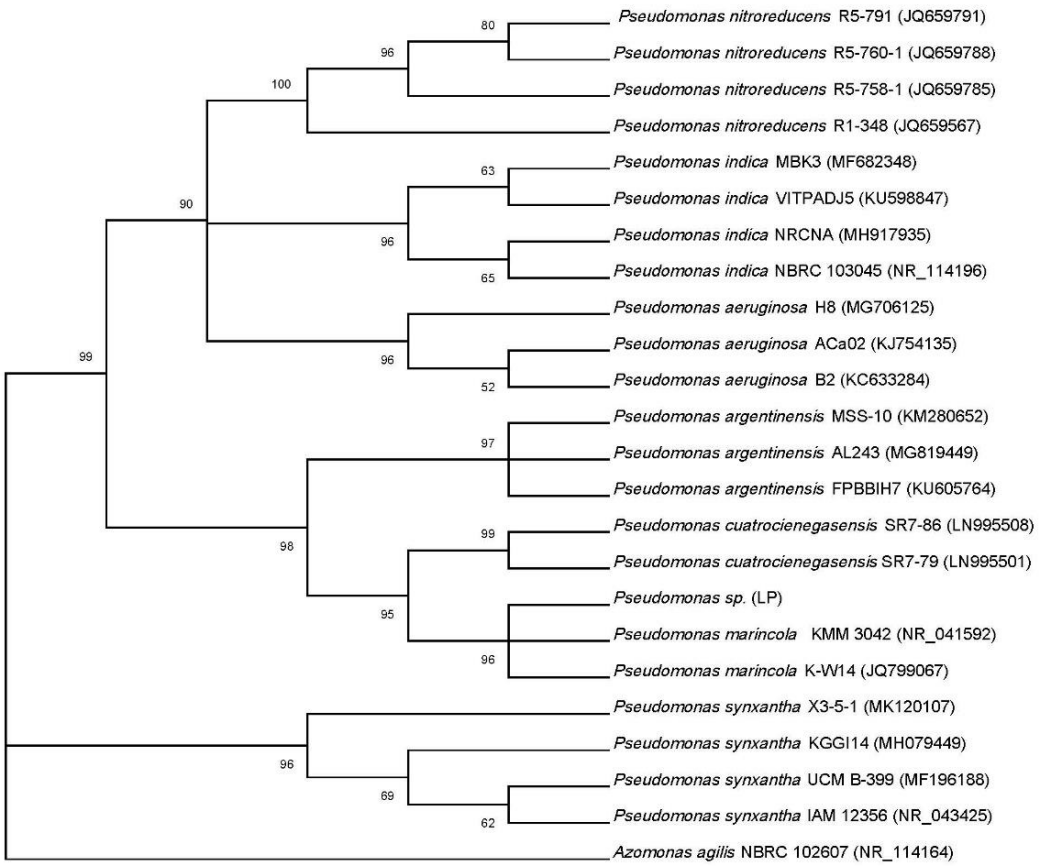


Figura I.1.9. Árbol de máxima verosimilitud de *Pseudomonas* construido a partir de secuencias del gen *16S rRNA*, obtenido mediante el modelo de Tiempo General Reversible (GTR), y la Distribución Gamma (2 categorías (+G, parámetro = 0,1000)). El número en el nodo representa los valores *bootstrap*. El análisis *Bootstrap* se realizó con 1 000 réplicas. El código LP entre paréntesis indica la secuencia problema analizada en este estudio.

Composition and Molecular Identification of Bacterial Community in Seawater Desalination Plants

Garcia-Jimenez, P., Carrasco-Acosta, M., Payá, C.E., López, I.A., Rodríguez, J.R.B., Melián, J. A.H., 2019, Advances in Microbiology, 9(10), 863-876.
https://doi.org/10.4236/aim.2019.910053

Scientific Research Publishing

Advances in Microbiology, 2019, 9, 863-876
https://www.scirp.org/journal/aim
ISSN Online: 2165-3410
ISSN Print: 2165-3402

Composition and Molecular Identification of Bacterial Community in Seawater Desalination Plants

Pilar Garcia-Jimenez[1*], Marina Carrasco-Acosta[1], Carlos Enrique Payá[1], Irina Alemán López[1], Juana Rosa Betancort Rodríguez[2], José Alberto Herrera Melián[3]

[1]Department of Biology, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Campus de Tafira, Las Palmas, Spain
[2]Department of Water, Instituto Tecnológico de Canarias, Playa de Pozo Izquierdo, Las Palmas, Spain
[3]Department of Chemistry, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Campus de Tafira, Las Palmas, Spain
Email: *pilar.garcia@ulpgc.es

How to cite this paper: Garcia-Jimenez, P., Carrasco-Acosta, M., Payá, C.E., López, I.A., Rodríguez, J.R.B. and Melián, J.A.H. (2019) Composition and Molecular Identification of Bacterial Community in Seawater Desalination Plants. *Advances in Microbiology*, **9**, 863-876.
https://doi.org/10.4236/aim.2019.910053

Received: July 23, 2019
Accepted: October 18, 2019
Published: October 21, 2019

Copyright © 2019 by author(s) and Scientific Research Publishing Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).
http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Open Access

Abstract

Biofouling is an important problem for reverse osmosis (RO) membrane manufacturers. Bacteria are mainly involved in generating fouling and obturating RO membranes. Insights into biofilm bacteria composition could help prevent biofouling, reduce the cost of using RO-fouling membranes and guarantee safe water. Culture-dependent and independent techniques were then performed in order to identify bacteria associated with RO membranes. Bacteria cultures described the presence of six pure colonies, four of which were identified through API testing. Based on 16s rRNA gene analysis, a predominant bacterium was identified and annotated as *Sphingomonas sp.* The 16s rRNA gene clone library, on the other hand, showed that the bacterium, *Pseudomonas marincola*, accounted for nearly 30% of the clone library, while the rest of bacteria were chimeras (62%) and non-representative species (3%). In conclusion, culture-dependent and independent approaches showed that two dominant bacteria were commonly observed in RO desalination membranes.

Keywords

Biofouling, Bacteria, 16s rRNA, Reverse Osmosis Membrane, *Pseudomonas sp.*, *Sphingomonas sp.*

1. Introduction

Sea water desalination is an increasing practice all over the world. Urban populations that live close to coastal areas can acquire significant quantities of fresh

water through desalination [1]. Reverse osmosis (RO) membranes perform an effective desalination method in terms of permeability, packing density, and fouling control [1] [2] [3]. Conversely, membrane fouling reduces membrane lifetime and increases cost-effective maintenance. In particular, organic fouling could result in water flux decline through RO membranes so complex structures are formed by dissolved organic matters in combination with other substances [4] [5] [6]. Unlike inorganic fouling caused by salt precipitation, organic fouling consists of marine organisms and their metabolic residues such as extracellular polysaccharides, proteins and lipids. Bacteria cells are enclosed in self-produced extracellular polymeric substances that adhere the bacteria to osmosis membranes [7] [8] [9].

Bacteria fouling is difficult to eradicate with pre-treatment methods, which has huge implications on operational costs. Several approaches based in dissecting fouled-RO membranes have given greater understanding of the specific origin and composition of biofilms.

Bacteria analyses of RO membranes have identified bacteria from phyla β-proteobacteria, γ-proteobacteria and α-proteobacteria, with representative genus of *Sphingomonas*, *Pseudomonas* and *Acidovorax* [10] [11]. This has allowed science to discover the types of bacteria that adhere, grow and participate in forming the biofilm on RO membranes. Biochemical analysis of fouled-RO membranes has also described conspicuous information on bacteria communities, although only between 0.01% and 3% of the population in natural environments has been described.

Notwithstanding the above, molecular identification based on 16s rRNA gene and the specific genes that encode both fouling and anti-fouling proteins can also reveal important information and allow for the development of biotechnological applications in the future. We hypothesised that appropriate identification of the dominant bacteria from biofouling, along with the study of gene behaviour has to improve RO-membranes designs in order to prevent biofouling. The objective of this work was to molecularly characterise bacteria associated with several kinds of RO membranes with culture-dependent and culture-independent techniques, based on region 16s rRNA.

2. Materials and Methods

2.1. Bacteria Detachment Procedure

Four reverse osmosis membranes were employed for the experiments (Hydranautics SCW4 plus, Dow Filmtec SW30HR LE-400, Nano H_2O Qfx SW 365 ES and Nitto SWC4+). Each membrane was removed from the pressure vessel once it completed its design life cycle at the desalination plant located on the east coast of Gran Canaria (Canary Islands, Spain). The main characteristics of the membrane are shown in Table 1.

The removed RO membrane was taken apart and opened in the laboratory. The membrane was then laid out and cut in 12 × 12 cm (approx. 8 pieces per

Table 1. Main characteristics of reverse osmosis membranes used in this study.

Membrane Type	Permeate Flow (m^3d^{-1})	Salt Rejection (%) Nominal Minimum	Configuration	Membrane Polymer	Nominal Membrane Area: (ft^2)	Reference
SCW4 plus	24.6	99.8 99.7	Spiral Wound	Composite	Polyamide 400	Hydranautics. Nitto Group Co. Teaneck. NJ (USA)
SW30HR LE-400	28	99.80 99.95	Spiral Wound	Polyamide thin-film composite	400	Dow Filmtec Texas (USA)
Qfx SW 365 ES	47	99.75 99.70	8-inch Spiral Wound	Thin-film composite	365	NanoH_2O Inc. Los Angeles, CA (USA)
SWC4+	24.5	99.8 99.7	Spiral Wound	Composite polyamide	400	Nitto Group Co. Teaneck, NJ (USA)

membrane) to identify and characterise the bacteria with a 16s rRNA-molecular marker. These pieces were identified according to the membrane manufacturer and placed into beaker flask containing sterile phosphate buffered saline (PBS, pH 7.5).

Bacteria adhered to pieces of RO membranes were detached using ultrasounds bath, orbital shaking and scraping when required. Ultrasound bath was carried out for 1 min × 5 times each, at room temperature. Then orbital shaking was performed overnight at 23˚C. The pieces of reverse osmosis membranes were always submerged in phosphate buffered saline.

Two approaches were used for analysing the bacteria, biochemical identification (culture-dependent) and molecular identification (16s rRNA gene, culture-independent). In addition, pure bacteria cultures were also confirmed through 16s rRNA identification.

2.2. Bacteria Biochemical Identification

De-attached bacteria aliquots (200 µl) were plated in four different culture media. These were R2A Agar, seawater supplemented with agar, tryptone yeast agar prepared with seawater and marine agar. All the bacteria plates were then cultivated at 22˚C and all media and reagents were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain).

Bacteria colonies with similar morphologies in terms of shape and colour were isolated from each plate and grown successively to attain the pure culture separately. The pure bacteria cultures were characterised with API 20 NE (BioMerieux, Craponne, France) to identify non-fastidious and non-enteric Gram-negative rods, combining 8 conventional tests and 12 assimilation tests. API 20 NE test were performed according to the instructions of the supplier. In addition, three independent biochemical reactions were performed: Gram staining, catalase and oxidase reagent strips (Scharlab, Barcelona, Spain).

2.3. Bacteria Molecular Identification

In order to characterise the bacteria molecularly, environmental DNA from de-

tached bacteria in the PBS solution was obtained from centrifugation at 15,000 g for 15 min. DNA was also obtained from pure-colonies from bacteria colonies isolated individually in different culture media as previously described. When bacteria biomass needed to be increased, pure colonies were cultivated in sterile PBS solution containing tryptone (10 $g \cdot l^{-1}$) and yeast extract (5 $g \cdot l^{-1}$) at 23˚C for 24 h. The culture was then centrifuged under the experimental conditions described above (*i.e.* 15,000 g for 15 min) and the resulting pellet was taken as template DNA.

DNA extraction was performed following the Murray and Thompson [12] procedure with modifications. DNA from each of the pure colonies and from detached bacteria pellets (sediments) were separately isolated. This way, the bacteria were homogenised in liquid nitrogen and then incubated in 800 µl of isolation solution containing 100 mM Tris-HCl (pH 8.2), 4 M NaCl, 20 mM EDTA, CTAB (2%, w/v), PVPP (0.1%, w/v), SDS (0.1%, w/v) and mercaptoethanol (2%) in a water bath at 65˚C for 1 h. A volume of chloroform was then added: isoamyl alcohol solution (24:1 v/v) was added and the samples were gently mixed by inversion at intervals of 20 s. The mixture was then centrifuged for 10 min at 3000 rpm in a Beckman Coulter Allegra X-22R centrifuge (Beckman Coulter Inc. Brea, CA USA). Successive washings with chloroform: isoamyl alcohol (24:1 v/v) solution were performed. The supernatant was then placed in a fresh tube and an equal volume of n-propanol (−20˚C) was added, mixed gently and centrifuged at 13,000 g for 30 min. The resulting pellet, containing DNA was washed with ethanol (80%, v/v, molecular grade), dried and suspended in sterile deionised water. DNA yield was assessed using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA). All samples were in triplicate. Purity DNA was valued by smear absence migrating on a 0.8% (w/v) agarose gel.

After several attempts with various 16s rRNA gene primer designs, DNA (90 - 95 ng) was amplified using oligonucleotide pairs, 16s rRNA-F as a forward primer, and 16s rRNA-R as a reverse primer (**Table 2**).

Amplification was performed in a GenAmp 2400 thermal cycler (PerkinElmer Inc., USA) with 30 cycles consisting at 95˚C for 1 min, 55˚C for 1 min, and 72˚C for 1.5 min, followed by a final extension step of 5 min at 72˚C. Each PCR reaction mixture contained 0.5 U Takara Ex Taq DNA polymerase (TaKaRa Shuzo Co., Shiga, Japan), dNTP, 2.5 mM, Takara Ex Taq PCR buffer with $MgCl_2$, 10 µl, forward and reverse primers, 10 µM each and DNA template.

PCR products were visualised by agarose gel electrophoresis. In addition, amplification products ranging from 800 to 1200 bp were obtained and purified using the QIAEX agarose gel extraction kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany). The fragments were then ligated to the pGEM-T-easy cloning vector (Promega, Wisconsin, USA) and cloned in JM109 cells according to the manufacturer's instructions (Promega). Plasmids were isolated using a plasmid purification kit (Qiagen Inc.). The insert in the plasmid was checked by PCR using primers M13F and M13R (Promega). The insert was then sequenced on both strands

Table 2. Sequences of the forward (F) and reverse (R) primers, for 16s rRNA gene. Sequences were retrieved from [13] [14].

Gene	Primer name	Sequence (5'-3')
16s rRNA	Forward	TTCGGAATAACAGTTG
	Reverse	CGGCTGGATCTAAGGA
	Forward	GAGTTTGATCCTGGCTCAG
	Reverse	ACG GHT ACC TTG TTA CGA CTT
	Forward	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
	Reverse	TACGGYTACCTTGTTACGACTT
	Forward	CCAGCAGCGCTAATACG
	Reverse	TACCAGGGTATCTAATCC

using an ABI-310 DNA automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and BigDye Terminator v3.1. Nucleotide sequences were submitted to NCBI GenBank BLAST search and identified through similarity values. Alignment of 16s rRNA sequences was performed with ClustalX v.1.7 [15] using the default settings and was further refined by visual inspection. The alignment output was used to generate a phylogenetic tree based on the Maximum Likelihood method and General Time Reversibility model [16] as implemented in MEGA X [17]. The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates is taken to represent the evolutionary history of the taxa analysed [18]. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% of the bootstrap replicates collapse. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches [18]. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbour-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. A discrete gamma distribution was used to model evolutionary rate differences between sites (2 categories (+G, parameter = 0.1000)).

3. Results and Discussion

The microbial community of biofouling in RO membranes is barely known since many papers are based on bacteria which are easily cultivable on a nutrient rich artificial medium. As a benchmark, this paper focuses on isolates using approaches based on culture-dependent and culture-independent techniques through the clone library. Differences between the four reverse osmosis membranes analysed were not observed.

Although bacteria were able to grow in all the culture media—namely R2A Agar, seawater supplemented with agar, tryptone yeast agar prepared with seawater, and marine agar-, R2A Agar media showed the highest recovery of bacteria colonies and was used to differentiate bacteria. Thus, six different colonies were characterised and selected in order to obtain pure culture (Table 3).

Table 3. Pure colonies (colony number from 1 to 6) cultured on R2A Agar and distinctive morphological characteristics.

Colony number	Morphological Characteristics
1	Orange
2	White uniform
3	White with expansive growth
4	Transparent
5	Beige
6	Yellow

Biochemical tests performed with API 20 NE are shown in Table 4. Substrate assimilations were read after 24 and 48 h. The results were interpreted after 48 h using the identification software from the BioMérieux web site [19]. When required, API tests were carried out two or three times to corroborate ambiguous sugar results that were inconclusive at 42˚C. The results agreed with those previously reported in bacteria from sugar-starved habitats that were able to develop alternative metabolic pathways for sugars [20]. The API results also only showed gram-negative bacteria colonies (Table 4).

Although it was easy to grow the bacteria, the presence of gram-negative bacteria suggested that the natural bacteria communities were not fully represented. Hence, this work was also supported by culture-independent techniques. Khambhaty and Plumb [21] reported that a culture-based approach favoured the presence of bacteria such as proteobacteria over other bacteria groups. Moreover, over 99% of bacteria in seawater reverse osmosis membranes cannot be cultivated on nutrient rich artificial media [22].

Moreover, the API test allowed us to identify four out of six bacteria colonies at species level based on a >90% confidence level reported by the manufacturer (Table 5).

As Table 5 shows, the bacteria species identified were *Vibrio metschnikovii*, *Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida* w., *Brevundimonas vesicularis* and *Sphingomonas paucimobilis*. These biofouling bacteria were reported on the four RO membranes analysed, indicating that they probably adapted to attaching on RO membrane surfaces as they grew on different types of membranes. Although all these species were recognised as marine species, *Sphingomonas sp.* also constituted the dominant bacteria colonies. *Sphingomonas* has been described as the dominant bacteria on RO membranes of desalination plants and in water purification processes, as related with the formation of biofilms by this bacterium [11]. *Sphingomonas* also facilitates the adherence of other bacteria and encourages the maturing of the biofilm [23]. Thus, these results open the door to investigating bacteria communities involved in biofouling and their role in triggering a biofilm network.

Several *Sphingomonas* colonies were molecularly identified using the 16s rRNA gene. Using maximum likelihood, the analysis recovered a higher resolution

Table 4. Biochemical test from API 20 NE (BioMerieux, Craponne, France) in six pure bacteria colonies.

API test	Bacteria Colonies					
	1	2	3	4	5	6
Gram	−	−	−	−	−	−
Catalase	−	+	+	−	+	+
NO3	−	−	+	−	−	−
TRP	−	−	−	−	−	−
GLU	−	−	−	−	−	−
ADH	−	−	−	−	−	−
URE	−	−	−	−	−	−
ESC	−	−	+	+	−	+
GEL	+	−	+	+	+	−
PNPG	+	−	−	−	−	+
GLU	+	+	+	−	+	+
ARA	−	−	−	−	−	−
MNE	−	−	−	−	−	−
MAN	+	−	−	−	+	−
NAG	+	+	+	+	+	−
MAL	+	+	+	+	+	+
GNT	+	+	+	−	+	−
CAP	−	−	−	−	−	−
ADI	−	−	−	−	−	−
MLT	−	−	+	−	−	+
CIT	−	−	−	−	−	−
PAC	−	−	−	−	−	−
Oxidase	−	+	+	+	+	+

Table 5. Taxonomical identification, profile and confidence level, according to API 20 NE, corresponding to 6 pure colonies.

Colony number	Genus and Specie assignation	Profile	Confidence level %
1	*Vibrio metschnikovii*	Very good	99.9
2	−	Low discrimination	−
3	*Aeromonas salmonicida ssp salmonicida*	Good	97.6
4	*Brevundimonas vesicularis*	Acceptable	86.5
5	−	Unacceptable	−
6	*Sphingomonas paucimobilis*	Good	96.5

Table 6. Sequences of 16s rRNA-gene sequences corresponding to diverse *Sphingomonas* strains.

Species and strain	Accession No.
Proteobacteria phylum	
α-Proteobacteria	
Sphingomonadaceae family, Sphingomonas genus	
Sphingomonas abaci C42	AJ575817
Sphingomonas abaci C42	NR_042192
Sphingomonas abaci SS1-08	KU341393
Sphingomonas adhaesiva IFO 15099	NR_043391
Sphingomonas adhaesiva BPM19	MF289214
Sphingomonas aerolata R-36940	FR691420
Sphingomonas aerolata 1111TES25Y1	LN774415
Sphingomonas aquatilis MPR 1	KX110354
Sphingomonas aquatilis S7	KF542913
Sphingomonas asaccharolytica IFO 15499-T	Y09639
Sphingomonas asaccharolytica Gsoil 130	KY078832
Sphingomonas aurantiaca MA101b	AJ429236
Sphingomonas aurantiaca MA306a	AJ429237
Sphingomonas azotifigens NBRC 15497	AB217471
Sphingomonas azotifigens NBRC 15497	AB680881
Sphingomonas desiccabilis CP1D	NR_042372
Sphingomonas desiccabilis CP1DT	AJ871435
Sphingomonas echinoides S32312	AB649019
Sphingomonas echinoides NRRL B-3126	MG745876
Sphingomonas dokdonensis DS-4	NR_043612
Sphingomonas dokdonensis DS-4	DQ178975
Sphingomonas mali S32423	AB649020
Sphingomonas mali GM289	AB740933
Sphingomonas molluscorum An 18 (KMM 3882)	AB248285
Sphingomonas molluscorum EP2	MG778708
Sphingomonas panni T9BP11	JF459953
Sphingomonas panni L8-752	JQ659481
Sphingomonas panni T9BR13	JF459952
Sphingomonas parapaucimobilis JCM 7510	NR_115615
Sphingomonas parapaucimobilis JCM 7510T	D84525
Sphingomonas paucimobilis BN 2056	MG438514
Sphingomonas paucimobilis MFC-pH7 01	KY434108
Sphingomonas pituitosa NBRC 102491	NR_114119
Sphingomonas pituitosa EDIV	AJ243751
Sphingomonas pruni NBRC 15498	NR_113760
Sphingomonas pruni IFO 15498	NR_026373
Sphingomonas soli T5-04	AB166883
Sphingomonas soli NBRC 100801	AB681244
Sphingomonas wittichii RW1	NR_027525
Sphingomonas wittichii HJX9	KP979540
Sphingomonas sp. MAH-20	MH368767
Other Sphingomonadaceae genera	
Blastomonas aquatica PE 4-5	KJ528316

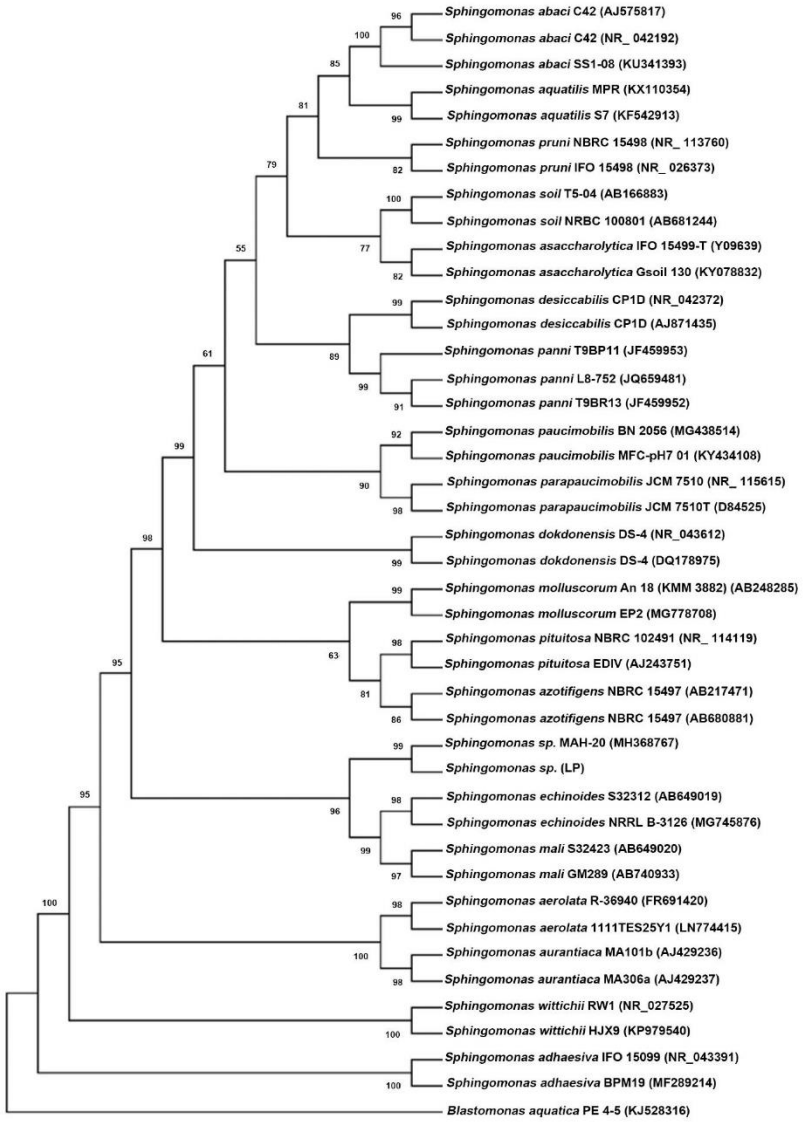


Figure 1. Maximum likelihood (ML) tree of *Sphingomonas sp.* inferred from 16s rRNA sequence calculated using general time reversible model plus gamma distribution (2 categories (+G, parameter = 0.0500)). Number in node represents values referring to sequence similarity. Bootstrap test was performed with 1000 replicates. LP in brackets indicates sequences analysed in the present study.

and grouped 16s rRNA *Sphingomonas* with another 43 16s rRNA gene sequences annotated as belonging to this genus (**Table 6**).

There were a total of 1023 positions in the final dataset. The phylogenetic analysis positioned the *Sphingomonas* sequences, from colonies determined biochemically, within the *Shingomonas sp.* genus. This result (**Figure 1**) demonstrated that the *Sphingomonas* obtained in this study could be regarded as representing a species within the genus.

Table 7. Sequences of 16s rRNA-gene sequences corresponding to diverse *Pseudomonas* strains.

Species and strain	Accession No.
Proteobacteria phylum	
γ-Proteobacteria	
Pseudomonadaceae family, *Pseudomonas* genus	
Pseudomonas aeruginosa H8	MG706125
Pseudomonas aeruginosa ACa02	KJ754135
Pseudomonas aeruginosa B2	KC633284
Pseudomonas argentinensis MSS-10	KM280652
Pseudomonas argentinensis AL243	MG819449
Pseudomonas argentinensis FPBBIH7	KU605764
Pseudomonas cuatrocienegasensis SR7-86	LN995508
Pseudomonas cuatrocienegasensis SR7-79	LN995501
Pseudomonas indica MBK3	MF682348
Pseudomonas indica VITPADJ5	KU598847
Pseudomonas indica NRCNA	MH917935
Pseudomonas indica NBRC	NR_114196
Pseudomonas marincola KMM 3042	NR_041592
Pseudomonas marincola K-W14	JQ799067
Pseudomonas nitroreducens R5-791	JQ659791
Pseudomonas nitroreducens R5-760-1	JQ659788
Pseudomonas nitroreducens R5-758-1	JQ659785
Pseudomonas nitroreducens R1-348	JQ659567
Pseudomonas synxantha X3-5-1	MK120107
Pseudomonas synxantha KGGI14	MH079449
Pseudomonas synxantha UCM B-399	MF196188
Pseudomonas synxantha IAM 12356	NR_043425
Other Pseudomonadaceae genera	
Azomonas agilis NBRC 102607	NR_114164

On the other hand, sequencing of 16s rRNA gene amplification fragments, assumed as operational taxonomic units (OTU) from independent cultures, revealed forty 16s rRNA gene fragments which were identified. Thirty percent of the total number of amplification fragments (total number of OTU, 40) was related to *Pseudomonas* species and 3 OTUs to *Sphingomonas*. The dominance of *Pseudomonas* may be explained by the association of these organisms with submerged surfaces. The remaining sequences were unrelated to other known bacteria and these were identified as non-representative. A total of 25 OTUs were detected as possible chimeras and were excluded from analysis.

Evolutionary analysis using the Maximum Likelihood method involved 24 nucleotide sequences (Table 7) with a total of 687 positions in the final dataset.

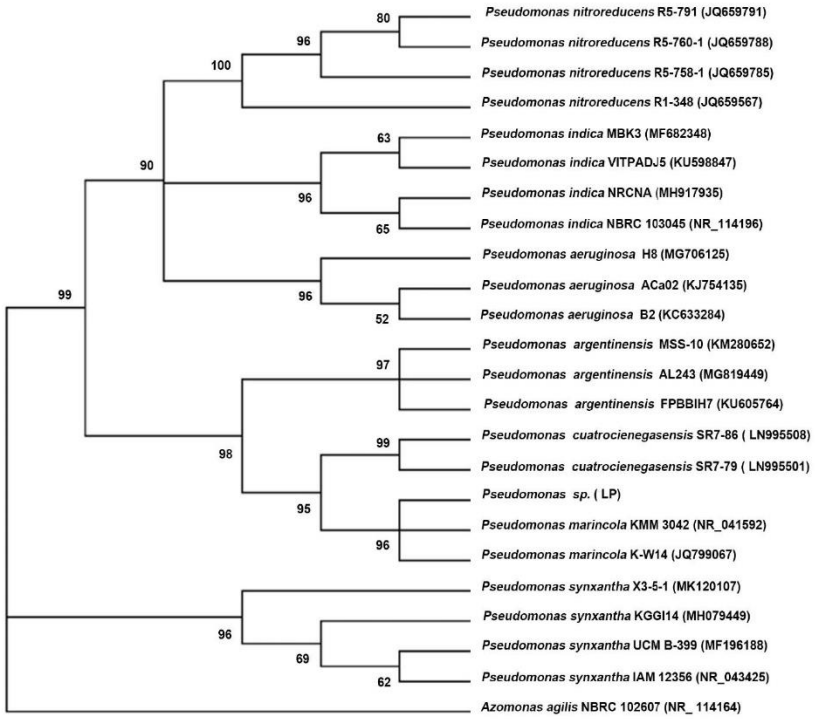


Figure 2. Maximum likelihood (ML) tree of *Pseudomonas sp.* inferred from 16s rRNA sequence calculated using general time reversible model plus gamma distribution (2 categories (+G, parameter = 0.1000)). Number in node represents values referring to sequence similarity. Bootstrap test was performed with 1000 replicates. LP in brackets indicates sequences analysed in the present study.

The phylogenetic analysis positioned the *Pseudomonas* sequences in a clade within *Pseudomonas marincola* (**Figure 2**). *Pseudomonas marincola* has been recently annotated as a marine species [22].

All in all, assuming the criterion for differentiating bacteria with a 16s rRNA gene sequence similarity value of over 95% [24], the phylogenetic trees of *Sphingomonas sp.* and *Pseudomonas marincola* were consistent with the molecular characterisation and their affiliations to the respective genus.

From an application point of view, it is worth mentioning that *Sphingomonas* and *Pseudomonas* have been described as containing an open reading frame coding for enzymes that are necessary for the initial stages of biofilm development [13]. Therefore, these molecular identifications open the door to studying the gene expression levels that encode the attachment protein and the biofouling potential of these bacteria. Gene expression levels of fouling and antifouling proteins under different experimental conditions (*i.e.* high-pressure water, permeate flow) can help to: 1) indicate a functional inclination to form biofilm on a reverse osmosis membrane, 2) discover how the membrane surface is colonised, and 3) determine how extracellular polysaccharides can help to initiate biofilm formation.

4. Conclusion

In conclusion, *Sphingomonas sp.* and *Pseudomonas sp.* assigned as *P. marincola*, have been identified on fouled marine reverse osmosis membranes. Culture-dependent and culture-independent approaches (clone library) showed that although the bacteria communities were not all identical, two dominant bacteria were commonly observed on the four RO membranes analysed.

Author's Contributions

P.G.J. conceived, designed and wrote the manuscript. M.C.A. conducted the phylogeny analysis. C.E.P and I.L.A. carried out microbiological assays. J.A.H.M. and J.R.B.R. analysed microbiological data. All the authors read and approved the manuscript.

Funding

This research was supported by the collaboration of Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades and from the Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. (Grant CGL2016-78442-C2-2-R, GOBESP2017-04 ULPGC) to PGJ, and co-funded by ERDF funds, INTERREG MAC 2014-2020 programme, within the DESAL+ project (MAC/1.1a/094)". M.C.A was supported by a predoctoral fellowship granted by the University of Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC2016).

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

[1] Fritzmann, C., Löwenberg, J., Wintgens, T. and Melin, T. (2007) State-of-the-Art of Reverse Osmosis Desalination. *Desalination*, **216**, 1-76. https://doi.org/10.1016/j.desal.2006.12.009

[2] Rautenbach, R. and Melin, T. (2003) Mebranverfahren: Grundlagen der Modul-und Anlagenauslegung. 2nd Edition, Springer-Verlag, Berlin.

[3] Belila, A., El-Chakhtoura, J., Otaibi, N., Muyzer, G., Gonzalez-Gil, G., Saikaly, P.E., van Loosdrecht, M.C.M. and Vrouwenvelder, J.S. (2016) Bacterial Community Structure and Variation in a Full-Scale Seawater Desalination Plant for Drinking Water Production. *Water Research*, **94**, 62-72. https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.039

[4] Naidu, G., Jeong, S., Kim, S.J., Kim, I.S. and Vigneswaran, S. (2014) Organic Fouling Behavior in Direct Contact Membrane Distillation. *Desalination*, **347**, 230-239. https://doi.org/10.1016/j.desal.2014.05.045

[5] Shen, J. and Schafer, A.I. (2015) Factors Affecting Fluoride and Natural Organic Matter (NOM) Removal from Natural Waters in Tanzania by Nanofiltration/Reverse Osmosis. *Science of the Total Environment*, **527-528**, 520-529. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.037

[6] Ding, S., Yang, Y., Li, C., Huang, H. and Hou, L.A. (2016) The Effects of Organic Fouling on the Removal of Radionuclides by Reverse Osmosis Membranes. *Water Research*, **95**, 174-184. https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.028

[7] Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K. and Nielsen, P.H. (1996) Extraction of Extracellular Polymers from Activated Sludge Using a Cation Exchange Resin. *Water Research*, **30**, 1749-1758. https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00323-1

[8] Liu, H. and Fang, H.H. (2002) Extraction of Extracellular Polymeric Substances (EPS) of Sludges. *Journal of Biotechnology*, **95**, 249-256. https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00025-1

[9] Subbiahdoss, G., Zeng, G., Aslan, H., Ege Friis, J., Iruthayaraj, J., Zelikin, A.N. and Meyer, R.L. (2019) Antifouling Properties of Layer by Layer DNA Coatings. *Biofouling*, **35**, 75-88. https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1568417

[10] Ivnitsky, H., Katz, I., Minz, D., Volvovic, G., Shimoni, E., Kesselman, E. and Dosoretz, C.G. (2007) Bacterial Community Composition and Structure of Biofilms Developing on Nanofiltration Membranes Applied to Wastewater Treatment. *Water Research*, **41**, 3924-3935. https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.05.021

[11] Bereschenko, L.A., Heilig, G.H.J., Nederlof, M.M., van Loosdrecht, M.C.M., Stams, A.J.M. and Euverink, G.J.W. (2008) Molecular Characterization of the Bacterial Communities in the Different Compartments of a Full-Scale Reverse-Osmosis Water Purification Plant. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 5297-5304. https://doi.org/10.1128/AEM.00387-08

[12] Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980) Rapid Isolation of High Molecular Weight Plant DNA. *Nucleic Acids Research*, **8**, 4321-4325. https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321

[13] Lee, J., Ren, X., Yu, H.W., Kim, S.J. and Kim, I.S. (2010) Membrane Biofouling of Seawater Reverse Osmosis Initiated by Sporogenic Bacillus Strain. *Environmental Engineering Research*, **15**, 141-147. https://doi.org/10.4491/eer.2010.15.3.141

[14] Bernbom, N., Ng, Y.Y., Kjelleberg, S., Harder, T. and Gram, L. (2011) Marine Bacteria from Danish Coastal Waters Show Antifouling Activity against the Marine Fouling Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain S91 and Zoospores of the Green Alga *Ulva australis* Independent of Bacteriocidal Activity. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**, 8557-8567. https://doi.org/10.1128/AEM.06038-11

[15] Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680. https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673

[16] Nei, M. and Kumar, S. (2000) Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.

[17] Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, **35**, 1547-1549. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096

[18] Felsenstein, J. (1985) Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, **39**, 783-791. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x

[19] Api Web, BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France. https://apiweb.biomerieux.com

[20] Bräsen, C., Esser, D., Rauch, B. and Siebers, B. (2014) Carbohydrate Metabolism in Archaea: Current Insights into Unusual Enzymes and Pathways and Their Regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **78**, 89-175. https://doi.org/10.1128/MMBR.00041-13

[21] Khambhaty, Y. and Plumb, J. (2011) Characterization of Bacterial Population Associated with a Brackish Water Desalination Membrane. *Desalination*, **269**, 35-40.

https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.10.039

[22] Ferguson, R.L., Buckley, E.N. and Palumbo, A.V. (1984) Response of Marine Bacterioplankton to Differential Filtration and Confinement. *Applied and Environmental Microbiology*, **47**, 49-55.

[23] Pollock, T.J. and Armentrout, R.W. (1999) Planktonic/Sessile Dimorphism of Polysaccharide-Encapsulated Sphingomonads. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **23**, 436-441. https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900710

[24] Stackebrandt, E. and Goebel, B.M. (1994) Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16s rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **44**, 846-849. https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-846

REFERENCIAS

Achinas, S., Charalampogiannis, N., Euverink, G.J.W., 2019. A brief recap of microbial adhesion and biofilms. Appl. Sci., 9(14), 2801.

Allison, D.G., 2010. The biofilm matrix. Biofouling. 19,139-150.

Anwar, N., Yang, L., Ma, W., Usman, H.S., Rahaman, M.S., 2020. Biofouling in RO Desalination Membranes. En *Corrosion and Fouling Control in Desalination Industry*. Eds. Saji, V.S., Meroudel, A.A., Sorour, A.A. Springer International Publishing, Alemanía, Berlín, pp. 269-283.

Azis, P.A., Al-Tisan, I., Sasikumar, N., 2001. Biofouling potential and environmental factors of seawater at a desalination plant intake. Desalination, 135(1-3), 69-82.

Bechet, M., Blondeau, R., 2003. Factors associated with the adherence and biofilm formation by Aeromonas caviae on glass surfaces. J. Appl. Microbiol., 94(6), 1072-1078.

Belila, A., El-Chakhtoura, J., Otaibi, N., Muyzer, G., Gonzalez-Gil, G., Saikaly, P.E., van Loosdrecht, M.C.M., Vrouwenvelder, J.S., 2016. Bacterial community structure and variation in a full-scale seawater desalination plant for drinking water production. Water Res., 94, 62-72.

Bereschenko, L.A., Heilig, G.H.J., Nederlof, M.M., van Loosdrecht, M.C.M., Stams, A.J.M., Euverink, G.J.W., 2008. Molecular Characterization of the Bacterial Communities in the Different Compartments of a Full-Scale Reverse-Osmosis Water Purification Plant. Appl. Environ. Microbiol., 74, 5297-5304.

Bernbom, N., Ng, Y.Y., Kjelleberg, S., Harder, T., Gram, L., 2011. Marine Bacteria from Danish Coastal Waters Show Antifouling Activity against the Marine Fouling Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain S91 and Zoospores of the Green Alga Ulva australis Independent of Bacteriocidal Activity. Appl. Environ. Microbiol., 77(24), 8557-8567.

Bouayed, N., Dietrich, N., Lafforgue, C., Lee, C.H., Guigui, C., 2016. Process-oriented review of bacterial quorum quenching for membrane biofouling mitigation in membrane bioreactors (MBRs). Membranes, 6, 52.

Branda, S.S., Chu, F., Kearns, D.B., Losick, R., Kolter, R., 2006. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. Mol. Microbiol., 59(4), 1229-1238.

Bräsen, C., Esser, D., Rauch, B., Siebers, B., 2014. Carbohydrate Metabolism in Archaea: Current Insights into Unusual Enzymes and Pathways and Their Regulation. Microbiol. Mol. Biol. R., 78, 89-175.

Buswell, C.M., Herlihy, Y.M., Marsh, P.D., Keevil, C.W., Leach, S.A., 1997. Coaggregation amongst aquatic biofilm bacteria. J. Appl. Microbiol., 83(4), 477-484.

Curtin, A.M., Thibodeau, M.C., Buckley, H.L., 2020. The Best-Practice Organism for Single-Species Studies of Antimicrobial Efficacy against Biofilms Is *Pseudomonas aeruginosa*. Membranes, 10(9), 211.

Fahs, A., Quilès, F., Jamal, D., Humbert, F., Francius, G., 2014. *In situ* analysis of bacterial extracellular polymeric substances from a *Pseudomonas fluorescens* biofilm by combined vibrational and single molecule force spectroscopies. J. Phys. Chem. B, 118(24), 6702-6713.

Fane, T., 2015. Irreversible Fouling. En *Encyclopedia of Membranes*, Eds. Drioli, E., Giorno, L., Springer, Alemania, Heidelberg, Berlín.

Fegatella, F., Cavicchioli, R., 2000. Physiological responses to starvation in the marine oligotrophic ultramicrobacterium *Sphingomonas sp*. strain RB2256. Appl. Environ. Microbiol., 66(5), 2037-2044.

Feo, J.J., 2013. Optimización de costes en líneas de producción para plantas desalinizadoras de agua de mar mediante ósmosis inversa en las Islas Canarias. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, pp. 428.

Ferguson, R.L., Buckley, E.N., Palumbo, A.V., 1984. Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. Appl. Environ. Microbiol., 47, 49-55.

Fritzmann, C., Löwenberg, J., Wintgens, T., Melin, T., 2007. State-of-the-art of reverse osmosis desalination. Desalination, 216, 1-76.

Garcia-Jimenez, P., García-Maroto, F., Garrido-Cárdenas, J.A., Ferrándiz, C., Robaina, R.R., 2009. Differential expression of the ornithine decarboxylase gene during carposporogenesis in the thallus of the red seaweed *Grateloupia imbricata* (Halymeniaceae). J. Plant Physiol., 166(16), 1745-1754.

Girones, R., Ferrus, M.A., Alonso, J.L., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., de Abreu-Correa, A., Hundesa, A., Carratala, A., Bofill-Mas, S., 2010. Molecular detection of pathogens in water the pros and cons of molecular techniques. Water Res., 44(15), 4325-4339.

Hörsch, P., Gorenflo, A., Fuder, C., Deleage, A., Frimmel, F.H., 2005. Biofouling of ultra- and nanofiltration membranes fordrinking water treatment characterized by fluorescence in situ hybridization (FISH). Desalination, 172, 41–52.

Ivnitsky, H., Katz, I., Minz, D., Volvovic, G., Shimoni, E., Kesselman, E., Dosoretz, C.G., 2007. Bacterial community composition and structure of biofilms developing on nanofiltration membranes applied to wastewater treatment. Water Res., 41, 3924-3935.

Johnsen, A.., Hausner, M., Schnell, A., Wuertz, S., 2000. Evaluation of Fluorescently Labeled Lectins for Noninvasive Localization of Extracellular Polymeric Substances in Sphingomonas Biofilms. App. Environ. Microbiol., 66(8), 3487-3491.

Khambhaty, Y., Plumb, J., 2011. Characterization of bacterial population associated with a brackish water desalination membrane. Desalination, 269, 35–40.

Kim, S.R., Oh, H.S., Jo, S.J., Yeon, K.M., Lee, C.H., Lim, D.J., Lee, C.H., Lee, J.K., 2013. Biofouling control with bead-entrapped quorum quenching bacteria in membrane bioreactors: Physical and biological effects. Environ. Sci. Technol., 47(2), 836-842.

Kochkodan, V., Hilal, N., 2015. A comprehensive review on surface modified polymer membranes for biofouling mitigation. Desalination, 356, 187-207.

Komlenic, R., 2010. Rethinking the causes of membrane biofouling. Filtr. Separat., 47(5), 26-28.

Kucera, J., 2015. Biofouling of polyamide membranes: Fouling mechanisms, current mitigation and cleaning strategies, and future prospects. Membranes, 9(9), 111.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol. Boil. Evol., 35, 1547-1549.

Lee, J., Ren, X., Yu, H.W., Kim, S.J., Kim, I.S., 2010. Membrane biofouling of seawater reverse osmosis initiated by sporogenic bacillus strain. Environ. Eng. Res., 15, 141–147.

Li, J., Ye, W., Wei, D., Ngo, H.H., Guo, W., Qiao, Y., Xu, W., Du, B., Wei, Q., 2018. System performance and microbial community succession in a partial nitrification biofilm reactor in response to salinity stress. Bioresour. Technol., 270, 512-518.

Luo, J., Zhang, J., Barnes, R.J., Tan, X., Mcdougald, D., Fane, A.G., Zhuang, G., Kjelleberg, S., Cohen, Y., Rice, S.A., 2015. The application of nitric oxide to control biofouling of membrane bioreactors. Microb. Biotechnol., 8(3), 549-560.

Ma, W., Panecka, M., Tufenkji, N., Rahaman, M.S., 2018. Bacteriophage-based strategies for biofouling control in ultrafiltration: *In situ* biofouling mitigation, biocidal additives and biofilm cleanser. J. Colloid Interface Sci., 523, 254-265.

MacNeil, J.C., Gibson, U.P., 1988. Membrane separation technologies for treatment of hazardous wastes. Crit. Rev. Env. Sci. Tec., 18(2), 91-131.

Matin, A., Khan, Z., Zaidi, S.M.J., Boyce, M.C., 2011. Biofouling in reverse osmosis membranes for seawater desalination: phenomena and prevention. Desalination, 281, 1-16.

Messing, J., 1983. New M13 vectors for cloning. Method. Enzymol., 101, 20-78.

Murray, M.G., Thompson, W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res., 8, 4321–4325.

Nagaraj, V., Skillman, L., Li, D., Ho, G., 2018. Review–Bacteria and their extracellular polymeric substances causing biofouling on seawater reverse osmosis desalination membranes. J. Environ. Manage., 223, 586-599.

Nagaraj, V., Skillman, L., Li, D., Xie, Z., Ho, G., 2019. Culturable bacteria from a full-scale desalination plant: Identification methods, bacterial diversity and selection of models based on membrane-biofilm community. Desalination, 457, 103-114.

Najjar, A., Sabri, S., Al-Gaashani, R., Atieh, M.A., Kochkodan, V., 2019. Antibiofouling performance by polyethersulfone membranes cast with oxidized multiwalled carbon nanotubes and arabic gum. Membranes, 9(2), 32.

Nguyen, T., Roddick, F.A., Fan, L., 2012. Biofouling of water treatment membranes: A review of the underlying causes, monitoring techniques and control measures. Membranes, 2(4), 804–840.

Pan, S.F., Ke, X.X., Wang, T.Y., Liu, Q., Zhong, L.B., Zheng, Y.M., 2019. Synthesis of Silver Nanoparticles Embedded Electrospun PAN Nanofiber Thin-Film Composite Forward Osmosis Membrane to Enhance Performance and Antimicrobial Activity. Ind. Eng. Chem. Res., 58(2), 984–993.

Pintar, K.D., Slawson, R.M., 2003. Effect of temperature and disinfection strategies on ammonia-oxidizing bacteria in a bench-scale drinking water distribution system. Water Res., 37(8), 1805-1817.

Pollock, T.J., Armentrout, R.W., 1999. Planktonic/sessile dimorphism of polysaccharide-encapsulated sphingomonads. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 23(4-5), 436-441.

Polman, H.J.G., Jenner, H.A., Bruijs, M.C.M., 2020. Technologies for Biofouling Control and Monitoring in Desalination. En *Corrosion and Fouling Control in Desalination Industry*. Eds. Saji, V.S., Meroufel, A.A., Sorour, A.A. Springer-Verlag., Alemania, Berlín, pp. 343-375.

Qasim, M., Badrelzaman, M., Darwish, N.N., Darwish, N. A., Hilal, N., 2019. Reverse osmosis desalination: A state-of-the-art review. Desalination, 459, 59-104.

Reasoner, D. J., Geldreich, E.E., 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. App. Environ. Microbiol., 49(1), 1-7.

Romling U, Amikam D., 2006. Cyclic di-GMP as a second messenger. Curr. Opin. Microbiol., 9(2), 218-228.

Sabri, S., Najjar, A., Manawi, Y., Eltai, N.O., Al-Thani, A., Atieh, M.A., Kochkodan, V., 2019. Antibacterial properties of polysulfone membranes blended with Arabic gum. Membranes, 9(2), 29.

Sanawar, H., Bucs, S., Pot, M.A., Zlopasa, J., Farhat, N., Witkamp, G.J., Kruithof, J.C., van Loosdrecht, M.C.M., Vrouwenvelder, J.S., 2019. Pilot-scale assessment of urea as a chemical cleaning agent for biofouling control in spiral-wound reverse osmosis membrane elements. Membranes, 9(9), 117.

Skovhus, T.L., Holmström, C., Kjelleberg, S., Dahllöf, I., 2007. Molecular investigation of the distribution, abundance and diversity of the genus *Pseudoalteromonas* in marine samples. FEMS Microbiol. Ecol., 61(2), 348-361.

Stuyfzand, P.J., Osma, J., 2019. Clogging issues with aquifer storage and recovery of reclaimed water in the brackish werribee aquifer, Melbourne, Australia. Water, 11(9), 1807.

Vatansever, C., Turetgen, I., 2018. Investigating the effects of different physical and chemical stress factors on microbial biofilm. Water, 44(2), 308–317.

Verhoef, R., de Waard, P., Schols, H.A., Rättö, M., Siika-aho, M., Voragen, A.G., 2002. Structural elucidation of the EPS of slime producing *Brevundimonas vesicularis* sp. isolated from a paper machine. Carbohydr. Res., 337(20), 1821-1831.

Vu, B., Chen, M., Crawford, R.J., Ivanova, E.P., 2009. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. Molecules, 14(7), 2535-2554.

Watnick, P., Kolter, R., 2000. Biofilm, city of Microbes. J. Bacteriol. 182(10), 2675-2679.

Wu, T.Y., Wu, X.Q., Xu, X.Q., Kong, W.L., Wu, F., 2020. Salt tolerance mechanism and species identification of the plant rhizosphere bacterium JYZ-SD2. Curr. Microbiol., 77(3), 388-395.

Xiao, Y., Zhu, W., He, M., Nie, H., Chen, W., Huang, Q., 2019. High c-di-GMP promotes expression of fpr-1 and katE involved in oxidative stress resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. App. Microbiol. Biotechnol., 103(21), 9077-9089.

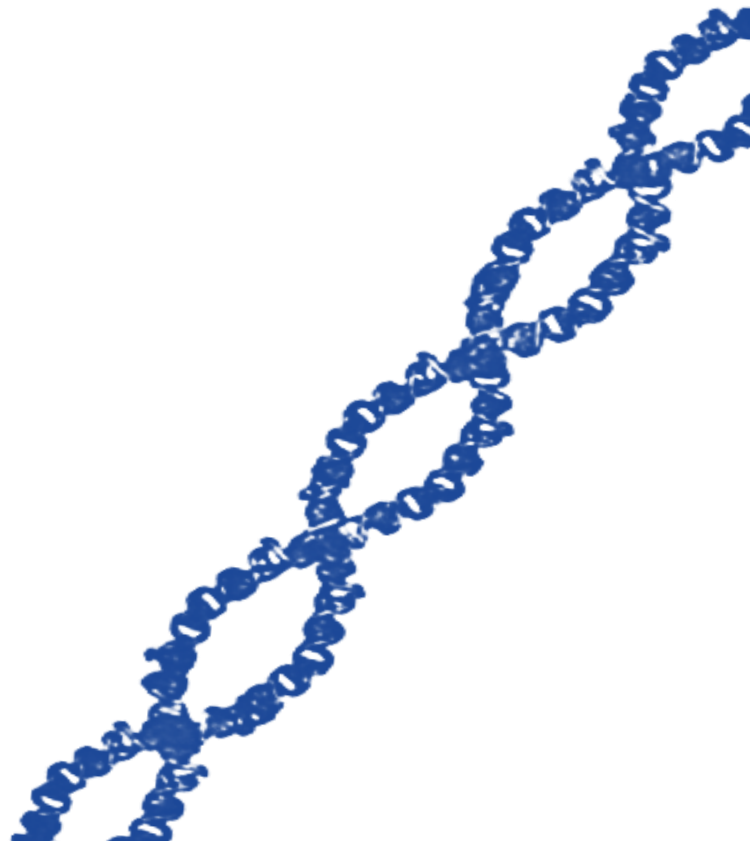
Yildiz, F.H., Visick, K.L., 2009. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. Trends Microbiol., 17(3), 109-118.

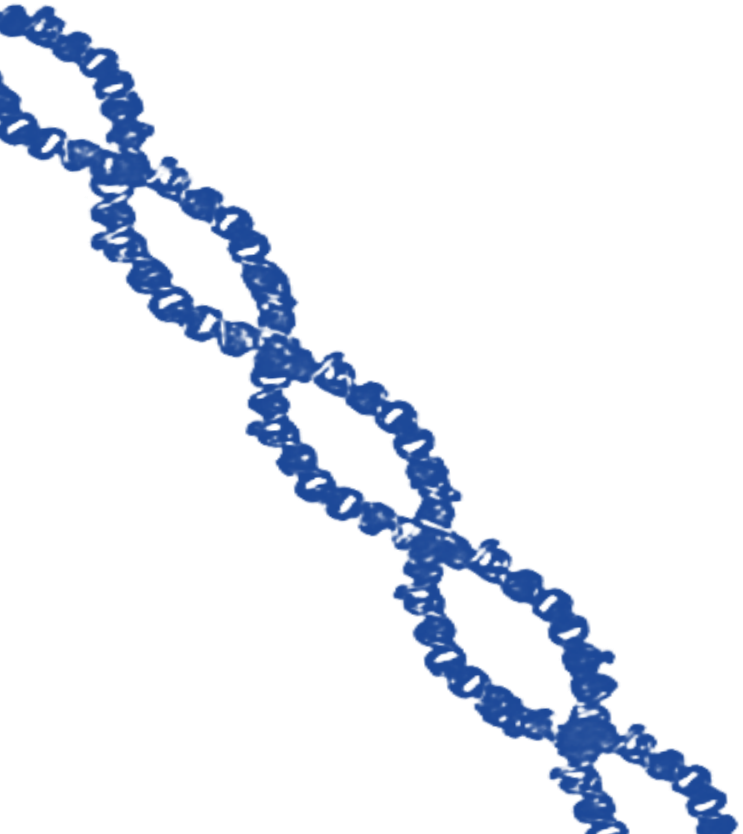
Yu, G., Lam, T.T.Y., Zhu, H., Guan, Y., 2018. Two methods for mapping and visualizing associated data on phylogeny using GGTree. Mol. Biol. Evol., 35(12), 3041–3043.

Capítulo I.2

Aplicaciones:

Identificación de *Halobacterium* en salinas de Gran Canaria (Islas Canarias, España)





Capítulo I.2

Aplicaciones:

Identificación de *Halobacterium* en salinas de Gran Canaria (Islas Canarias, España)

Halobacterium identification in saltworks of Gran Canaria (Canary Islands, Spain)

Garcia-Jimenez, P., Carrasco-Acosta, M., Hettmann, S., 2020, Journal of Fisheries Science, 2(1), 9-16.
https://doi.org/10.30564/jfsr.v2i1.1464

I.2.1 | INTRODUCCIÓN

Las salinas costeras, consisten en estanques artificiales poco profundos utilizados para la producción de sal común o halita (NaCl), situándose la gran mayoría en zonas tropicales y subtropicales alrededor de todo el mundo. De forma genérica, estas salinas se pueden definir como una serie de estanques construidos a partir de muros de piedra con fondos de barro y arcilla, en los cuales la energía solar y el viento se utilizan para concentrar sucesivamente el agua de mar y cristalizar la sal (Luengo & Marín, 1994). Esta sal se compone mayoritariamente de cloruro de sodio, y en menor medida de cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, yodo y manganeso (Oren, 2006). Además, estos sistemas de producción han tenido un gran impacto en la sociedad a lo largo de la historia, utilizándose desde los tiempos de los antiguos egipcios, griegos y latinos (Herrero-Lorenzo, 2015).

I.2.1.1 │Salinas costeras

Específicamente, las salinas costeras tradicionales consisten en varios estanques que forman el llamado sistema multiestanque (Figura I.2.1). Este sistema, se basa en el uso de estanques artificiales –en algunas salinas conectados entre sí y en otras no–, que facilitan la evaporación del agua de mar, dándose lugar la recolección o cosecha de la sal en el estanque conocido como cristalizador (Ventosa & Arahal, 2009).

El procedimiento se inicia a partir de la entrada de agua de mar al sistema, la cual es dirigida por el tubo de alimentación hacia el cocedero (Figura I.2.1, componentes nº1 y nº3, respetivamente). En él, se sedimentan los sólidos en suspensión mientras va aumentando, por evaporación, la salinidad y la temperatura. En el siguiente tramo, la salmuera pasa a un cocedero de menor dimensión, llamado lucio (Figura I.2.1, componente nº4), donde se evapora ca. 50% del agua. Pasada esta segunda etapa, la salmuera es canalizada hacia los múltiples estanques, donde a través de la evaporación continua se produce la precipitación secuencial de diferentes compuestos de acuerdo con su solubilidad (Baati *et al.*, 2010). El primer compuesto en precipitar es el carbonato cálcico ($CaCO_3$), el cual se deposita en forma de aragonito o calcita, seguido por el sulfato de calcio ($CaSO_4$), precipitando como yeso ($CaSO_4.2H_2O$), y finalmente, el cloruro de sodio (NaCl). Los cristales de NaCl, o halita, se forman cuando la concentración total de sales alcanza valores en torno a los 300 g L^{-1} (Oren, 2006) y en ese momento, ya depositados en el fondo del cristalizador, son recogidos mediante barrido y almacenados en montones para su recolección (Figura I.2.1, componente nº7).

Después de la precipitación del cloruro sódico, las salmueras concentradas que quedan, también conocidas como sales *bitterns* –constituidas principalmente por Mg^{2+}, K^+, Cl^-, y SO_4^{2+}–, se procesan para su utilización (Javor, 1989).

Aparte de la producción de sal, las salinas y su entorno, frecuentemente enclavadas en espacios marismeños, sirven como zonas de refugio para las aves migratorias (Rocha *et al.*, 2012). Además, estos hábitats embellecen el paisaje gracias a su

gama de tonalidades rojizas, otorgada por la presencia de comunidades microbianas halófilas (Oren & Rodríguez-Valera, 2001).

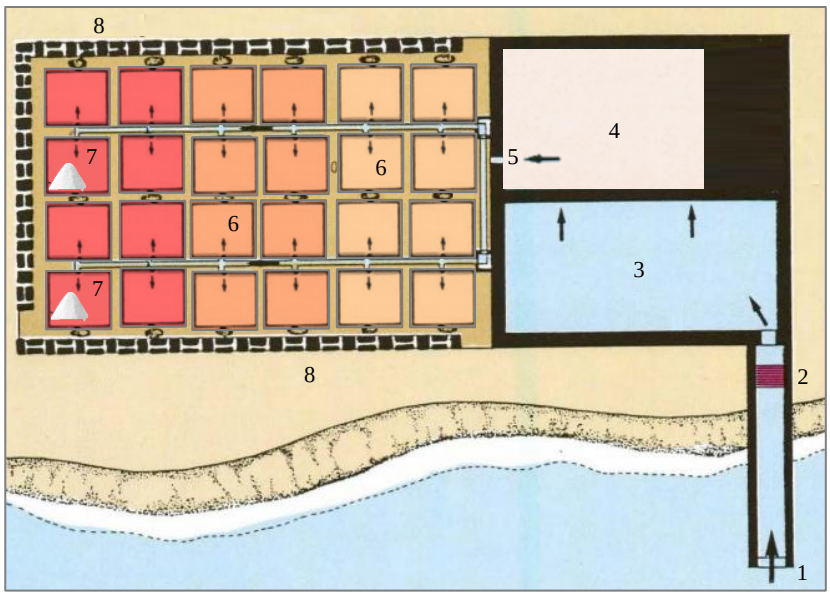


Figura I.2.1. Esquema de los componentes de las salinas costeras tradicionales de Gran Canaria, Lanzarote y Tenerife. Componentes 1: Tomadero; 2: Compuerta; 3: Cocedero-Calentador; 4: Lucio; 5: Torna-Bomba 6: Estanques o Tajos; 7: Cristalizadores; 8: Muros (adaptada de Luengo & Marín, 1994).

Las condiciones extremas que se dan en estos entornos incluyen una alta insolación y radiación UV, así como temperaturas elevadas, fluctuaciones en el pH, limitación de oxígeno y concentraciones en sales cercanas a la saturación (Oren, 2006; Mesbah & Wiegel, 2012; Jehlicka *et al.*, 2013; Mani *et al.*, 2020). Por todo ello, las salinas constituyen uno de los hábitats más singulares del planeta (Luengo & Marin, 1994; Oren & Dubinsky, 1994). Así, este tipo de hábitats solo pueden soportar ecosistemas especializados, constituidos por organismos poliextremófilos (Grant *et al.*, 1999; Bowers & Wiegel, 2011).

I.2.1.2 │Comunidades microbianas de las salinas costeras

El creciente aumento de la salinidad en estos hábitats induce a una especiación progresiva del ecosistema (Williams, 1998). De esta manera, los estanques con un contenido en sal por debajo del 10% (cocederos) presentan una microbiota similar a la del agua de mar (Oren, 2006). En estos cocedores se observa mayor diversidad de organismos eucariotas que de procariotas, encontrando entre ellos protozoos,

fanerógamas marinas, algas, hongos, diatomeas y larvas. Conforme la salinidad aumenta, ciertas especies de microalgas verdes del género *Dunaliella* spp, y el crustáceo *Artemia salina,* son prácticamente los únicos eucariotas presentes (Ventosa & Arahal, 2009). En contraposición la abundancia y diversidad de procariotas, cuando el contenido en sal es >10% (estanques iniciales, intermedios y cristalizadores), es sobresaliente. Como ejemplo de ello, en la Tabla I.2.1 se recoge la diversidad de procariotas de varias salinas costeras en diversas áreas geográficas.

La variedad de arqueas y bacterias halófilas que crecen en estos estanques, convierten a las salinas en un entorno perfecto para el estudio de estrategias adaptativas de estos microorganismos, y, por consiguiente, también son idóneas para la identificación de compuestos de alto valor biotecnológico.

De manera general, dentro del dominio Bacteria se pueden encontrar bacterias heterótrofas integrantes del filo Proteobacteria, como son los géneros *Halomonas*, *Salinimonas* o *Spiribacter*, así como algunos tipos bacterianos de los filos Firmicutes, Bacteroidetes o Verrucomicrobia. Varios de los representantes de estos filos son los géneros *Oceanobacillus* y *Halobacillus* (Firmicutes), *Psychroflexus* (Bacteroidetes), y *Puniceicoccus* (Verrucomicrobia). Además, también se encuentran bacterias fototróficas, como ciertas cianobacterias –p. ej. *Aphanothece halophytica*– que se localizan en los estanques con contenidos en sal comprendidos entre el 10% y el 16% (Oren, 1997; Oren, 2013). No obstante, a concentraciones superiores al 16%, la presencia del dominio Bacteria se limita a unos pocos géneros, siendo *Salinibacter* el más significativo (González-Torres, 2015).

La presencia del dominio Archaea en los estanques con concentraciones superiores al 10%, viene representada por miembros de la clase Halobacteria, siendo los géneros aislados más habituales, *Halobacterium*, *Haloquadratum*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Natronomonas*. Como se puede comprobar en la Tabla I.2.1, si bien la distribución de estos géneros entre las salinas es global, la abundancia de los mismos es específica a cada localización geográfica (Gómez-Villegas *et al.*, 2018; Chasanah *et al.*, 2021).

Tabla I.2.1. Diversidad de procariotas, a nivel de género y especie, de varias salinas costeras distribuidas globalmente.

	Zona geográfica	Océano Atlántico		Mar Mediterráneo					Mar Adriático
	Muestreo	Marismas del Odiel (Huelva, España)	Isla Cristina (Huelva, España)	Santa Pola (Alicante, España)			Golfo de Patras (Messolonghi, Grecia)	Sfax (Túnez)	Sečovlje (Eslovenia)
	Estaciones muestreo	Cristalizadores	Estanques intermedios	Estanques iniciales	Cristalizadores		Estanques intermedios	Cristalizadores	
	Referencia	Gomez-Villegas *et al*., 2018	Fernandez *et al*., 2014		Benlloch *et al*., 2001	Ventosa *et al*., 2014	Tsiamis *et al*., 2008	Baati *et al.*, 2010; Ghanmi *et al*., 2020	Pašić *et al*., 2005*
+ Abundancia en la comunidad -	**Dominio**								
	Archaea	*Halorubrum* *Haloquadratum* *Halonotius* *Halobellus* *Natronomonas*	*Halorubrum* *Natronomonas* *Haloquadratum*	*Halorubrum* *Haloquadratum* *Natronomonas*	*Haloforax* *Haloarcula* *Halorubrum* *Halobacterium*	*Haloquadratum* *Nanosalina* *Halorubrum* *Nanosalinarum* *Halomicrobium*	*Halobacterium* *salinarum* *Haloarcula* *Haloferax*	*Halobacterium* *salinarum* *Haloquadratum* *Haloarcula* *Natronomonas* *Halorubrum*	*Halorubrum* *Haloarcula* *Halobacterium* *Haloquadratum* *Haloferax*
	Bacteria	*Salinibacter ruber*	*Psychroflexus* *Spiribacter* *Puniceicoccus*	*Salinibacter ruber*	*Salinibacter*	*Salinibacter ruber*	*Halobacillus* *Oceanobacillus* *Salinimonas* *Halomonas*	*Salinibacter*	
	Zona geográfica	Océano Índico (Mar Arábigo)		(Mar de Java)		Océano Pacifico Sur (Mar de Coral)		Océano Pacifico Norte (Mar de Bohai)	(Costa este de EE. UU.)
	Muestreo	Goa (India)		Idramayu (Isla de Java, Indonesia)		Bajool (Queensland, Australia)		Hangu (Tianjin, China)	Bahía de San Diego (California, EE. UU.)
	Estaciones muestreo	Estanques iniciales	Cristalizadores					Estanques intermedios	
	Referencia	Mani *et al*., 2020*		Chasanah *et al*., 2021		Oh *et al*., 2010*		Deng *et al*., 2015	Klempay *et al*., 2021
+ Abundancia en la comunidad -	**Dominio**								
	Archaea	*Halococcus*	*Halorubrum* *Haloarcula* *Haloferax* *Halococcus*	*Halobacterium* *Halorubrum* *Halolamina* *Haloarcula* *Salinigranum*		*Haloquadratum walsbyi* *Halorubrum* *Halonotius* *Natronomonas*		*Halorubrum*	*Haloquadratum* *Halorubrum* *Halohasta*
	Bacteria			*Puniceicoccus* *Spiribacter*				*Halomonas* *Salinicoccus* *Oceanobacillus*	*Salinibacter*

*En estos estudios solo se consideró el dominio Archaea

I.2.1.3 │Arqueas *vs.* Bacterias en salinas costeras

La alta salinidad y la presión de selección a medida que avanza la evaporación, han promovido mecanismos metabólicos específicos que están directamente relacionados con el comportamiento halofílico de estos organismos (Litchfield, 2011), y que, a su vez, son los responsables de la mayor proliferación de unos organismos frente a otros en estos entornos. Por ejemplo, el comportamiento de las bacterias como grupo es más susceptible a las fluctuaciones de salinidad que las arqueas, haciendo que muchos géneros bacterianos sean específicos del estanque, así como de la fase de evaporación (Mani *et al.*, 2020). Además, se ha llegado a reportar que estas arqueas formarían comunidades estables a pesar de estas fluctuaciones, llegando a ser el dominio prevalente en los estanques cristalizadores (Gomez-Villegas *et al.*, 2018; Mani *et al.*, 2020).

Las estrategias metabólicas para acomodarse a la alta salinidad extracelular se pueden clasificar según el tipo de organismo. La mayoría de los eucariotas y bacterias combaten la alta salinidad acumulando o sintetizando solutos compatibles u osmolitos, como la glicina, betaína, ectoína, sacarosa, prolina, trehalosa, y otros derivados de aminoácidos y azúcares (DasSarma & Arora, 2001; Roberts, 2005; Neshich *et al.*, 2013; Oren, 2013). En cambio, las arqueas y algunas especies bacterianas halófilas –género *Salinibacter*– acumulan iones K^+ y Cl^-, mientras mantienen una baja concentración de cationes de Na^+, en respuesta a la presión osmótica externa. Este mecanismo se conoce como «salinización» o *salt-in* (DasSarma & Arora, 2001). La esquematización de este proceso se presenta en la Figura I.2.2. En la misma se muestra como los iones de potasio se acumulan internamente –hasta concentraciones elevadas de ca. de 5 mol L^{-1}–, manteniéndose este gradiente gracias a la combinación de un transporte de membrana antiporte –de iones de sodio/protones–, y otro uniporte –de iones de potasio– (DasSarma & Arora, 2001). Por su parte, los iones Cl^- son bombeados desde el exterior celular hacia el citoplasma gracias a la proteína transmembrana halorrodopsina (HR). Esta cromoproteína, cuya activación viene inducida por la luz, está unida al cofactor retinal, mediante enlace covalente, y es integrante de la familia de las rodopsinas,

las cuales juegan un papel crucial en los mecanismos fototácticos de estos procariotas.

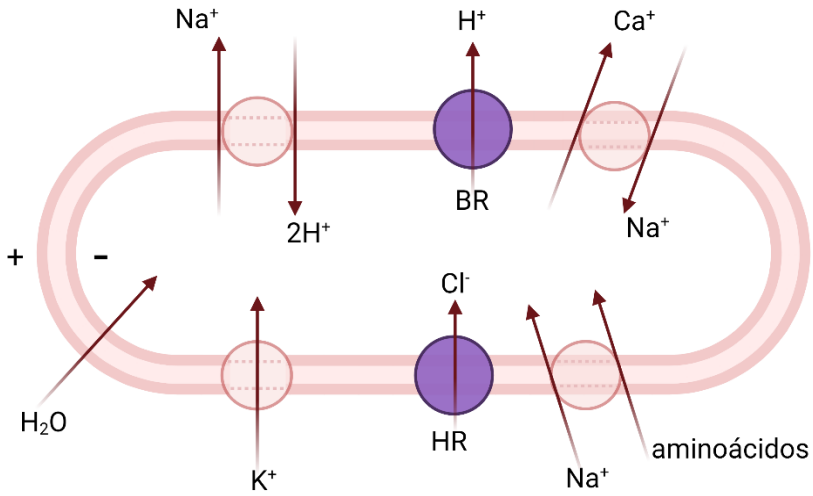


Figura I.2.2. Flujo de iones y moléculas a través de la membrana de un halobacteria tipo. Se representan en color violeta las bombas de protones y de cloruros impulsadas por la luz: la bacteriorrodopsina (BR) y la halorrodopsina (HR), respectivamente; así como los transportes de membrana antiporte (Na^+/protón y Ca^+/Na^+), uniporte (K^+), y simporte (Na^+/aminoácidos), los cuales se muestran en rosa. La direccionalidad de los iones, aminoácidos y agua se indica con flechas, y el potencial eléctrico a través de la membrana se indica con los signos + y -, a la izquierda de la figura (adaptada de DasSarma & Arora, 2001).

Estas arqueas halófilas, además, presentan una membrana compuesta por lípidos conformados por cadenas hidrocarbonadas de naturaleza isoprenoide, que se unen mediante enlace éter a una molécula de glicerol, lo que confiere a sus hábitats de un aspecto viscoso (Post & Collins, 1982; González, 2010). Otra característica única de estos procariotas es su membrana púrpura, cuya coloración viene otorgada por una red cristalina bidimensional conformada por otro tipo de cromoproteína de la familia de las rodopsinas, y conocida como bacteriorrodopsina (BR). La bacteriorrodopsina –análoga de las rodopsinas del ojo animal– actúa como una bomba de protones transmembrana dependiente de la luz (Krebs & Khorana, 1993). En concreto, la BR es inducida por dos factores: una alta intensidad de luz y una baja disponibilidad de oxígeno. A partir de esta inducción, estos microorganismos utilizan el potencial de membrana como mecanismo de resistencia, impulsando la síntesis de adenosina trifosfato (ATP), y facilitando así, un periodo de crecimiento fototrófico.

Otras rodopsinas, también juegan un rol principal en la supervivencia de estos procariotas. Estas son las rodopsinas sensoriales de tipo I y II, las cuales al igual que las anteriores, son proteínas transmembrana unidas a un retinal. Específicamente, estas actúan como receptores fototácticos, direccionando a estas arqueas hacia la intensidad de luz adecuada para su desarrollo –región naranja del espectro visible–, y a su vez, evitando la luz ultravioleta (Krah *et al.*, 1994).

Las halobacterias, además, presentan otros mecanismos adaptativos, como es la síntesis de pigmentos de la familia de los carotenoides. Las arqueas halófilas sintetizan pigmentos para protegerse de la alta radiación ultravioleta característica de estos hábitats. En concreto, varios tipos de carotenoides pueden encontrarse en estos microorganismos, siendo los más abundantes las bacteriorruberinas de 50 carbonos, y en menor medida los intermediarios biosintéticos como el β-caroteno y el licopeno (DasSarma & Arora, 2001; Dummer *et al.*, 2011).

De manera general, las características fisiológicas mencionadas correspondientes a algunos de los procariotas halófilos extremos más representativos de salinas costeras se recogen en la Tabla I.2.2.

En particular *Halorubrum*, como integrante de la familia Halorubraceae, es una de las arqueas dominantes en la comunidad procariota de estanques cristalizadores (Pašić *et al*., 2005; Gomez-Villegas *et al.*, 2018). Otra familia de arqueas, Halobacteriaceae, también ha sido descrita en condiciones de elevada salinidad, siendo el miembro más representativo *Halobacterium salinarum* (Tsiamis *et al.*,2008; Gahmi *et al.*, 2020).

En concreto, *Halobacterium salinarum* es el miembro mejor caracterizado de la familia Halobacteriaceae y juega un rol fundamental tanto en el rendimiento de producción de las salinas, como en la obtención de recursos biotecnológicos.

La mayor producción asociada a las poblaciones de *H. salinarum* viene dada por la presencia de bacteriorrodopsinas, las cuales facilitan la absorción de luz, aumentado la temperatura de la salmuera, y en consecuencia, mejorando la

evaporación del agua de mar (Oren, 2006). Además, la presencia de *Halobacterium* en las salinas se relaciona con la producción de cristales de sal de mayor tamaño y con menor contaminación por manganeso y calcio (Marihati *et al*., 2014).

Tabla I.2.2. Características fisiológicas principales de tres géneros de procariotas predominantes en salinas costeras (Oren, 2006; 2008; 2013; Mancinelli *et al*., 2015).

Características	**Procariotas halófilos identificados**		
	Halobacterium	***Halorubrum***	***Salinibacter ruber***
Sal requerida	>100 g L^{-1}	>30 g L^{-1}	>150 g L^{-1}
Crecimiento óptimo (concentración total de sales)	200-300 g L^{-1}	100-280 g L^{-1}	150-230 g L^{-1}
Soluto compatible	KCl	KCl	KCl
Carotenoides	C-50 (Bacteriorruberina)	C-50 (Bacteriorruberina)	C-40 (Salinixantina)
Rodopsinas	Bacteriorrodopsina Halorrodopsina Rodopsina sensorial	Bacteriorrodopsina Halorrodopsina Rodopsina sensorial	Xantorrodopsina Halorrodopsina Rodopsina sensorial

Por otra parte, el género bacteriano *Salinibacter* –descrito por primera vez por los autores Antón y colaboradores (1999), en las salinas de Santa Pola (Alicante)–, fisiológicamente se asemeja a las arqueas halófilas, en comparación con otros miembros del dominio Bacteria (Oren, 2008) (Tabla I.2.2).

I.2.1.4 │Interés industrial y biotecnológico de los procariotas halófilos

Las salinas tradicionales son esenciales para diversas industrias, produciendo a partir de las mismas un tercio de la sal comercializada a nivel global (Chasanah *et al.*, 2021). Su notabilidad en el terreno socioeconómico deriva de la obtención de productos primarios y secundarios de alta calidad utilizados principalmente en el ámbito gastronómico, como por ejemplo, las escamas de sal, la flor de sal, rocas

de sal, sales saborizadas, etc. También es destacable el uso por la industria química, farmacéutica, petrolera y alimentaria del cloruro potásico, obtenido a partir del procesado de las sales *bitterns* (Javor, 1989; Oren, 2006).

Además, las comunidades microbianas de las salinas costeras son una fuente de productos de alto valor biotecnológico (Oren, 2006; Dummer *et al*., 2011; Corcelli, 2014; Thombre *et al*., 2016; Amoozegar *et al*., 2017; Gomez-Villegas *et al.*, 2018). Un ejemplo claro son esas rodopsinas, y en especial las bacteriorrodopsinas, las cuales se utilizan por su gran estabilidad térmica y fotoquímica en aplicaciones como dispositivos fotónicos (técnicas holográficas), en retinas artificiales o en memorias ópticas (Litchfield, 2011; Jehlicka *et al.*, 2013; Corcelli, 2014).

Igualmente, algunos solutos compatibles acumulados o sintetizados por estos procariotas, también tienen un gran interés biotecnológico. En especial, la ectoína se ha utilizado como humectante en cosméticos (Montitsche *et al.*, 2000), así como, la trehalosa, cuya acción protege al ADN de los daños causados por la radiación UV y evita la desecación celular (Webb & DiRuggiero, 2012). Además, cabe destacar también el papel clave de ciertos exopolisacáridos, como el mannosilglicerato, el cual estabiliza varias enzimas sometidas a calentamiento o liofilización (Lamosa *et al*., 2000).

Otros compuestos bioactivos con gran interés biotecnológico son las haloexoenzimas requeridas por la industria textil y alimentaria, por su estabilidad en ambientes con alto contenido en sales (Amoozegar *et al*., 2017), y los carotenoides –p. ej. bacteriorruberinas, salinixantinas, β-caroteno, o licopeno– utilizados en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria, entre otras (DasSarma & Arora, 2001; Asker & Ohta, 2002; Fang *et al*., 2010; Dummer *et al*., 2011),

Un aspecto clave para la obtención de compuestos bioactivos es la comprensión de las rutas metabólicas. Particularmente, significativo es el interés que suscitan los carotenoides y rodopsinas sintetizados por estos organismos, por ello, destacable es la importancia del conocimiento profundo en torno a su ruta de

biosíntesis. En este sentido, se han descrito las rutas metabólicas de los carotenoides en la especie *H. salinarum* que conduce a la formación de bacteriorrodopsina, así como la vía biosintética de las bacteriorruberinas (Figura I.2.3). Como ya hemos avanzado, la bacteriorrodopsina (BR) funciona como una bomba de protones impulsada por la luz para producir ATP, cuando se limita la respiración aeróbica por niveles bajos de oxígeno en el medio. Estructuralmente, la BR es un complejo proteico-cofactor, que consiste en una única proteína, la bacterioopsina (BO), y un cofactor unido covalentemente, el retinal. *Halobacterium salinarum* sintetiza este cofactor *de novo* en un proceso de varios pasos con distintas oportunidades de regulación (Figura I.2.3) (Peck *et al.*, 2002). Los primeros pasos de la vía son compartidos con el último intermediario de la ruta biosintética de la porción hidrofóbica de los lípidos polares que componen las membranas celulares de arqueas, siendo este el geranilgeranil difosfato (GGPP) (Figura I.2.3).

En esta ruta metabólica, dos moléculas de GGPP se condensan para formar el fitoeno, de 40 carbonos, y mediante una serie de reacciones de desaturación, forman el licopeno (Kushwaha *et al.*, 1975). La ruta metabólica de la bacteriorruberina es compartida también con la vía biosinténtica de la bacteriorrodopsina.

Para la síntesis del retinal, el licopeno se cicla para sintetizar el β-caroteno, que, a su vez, se escinde para formar el cofactor retinal. Alternativamente, el licopeno puede ser también el precursor de la síntesis de las bacteriorruberinas, y de sus intermediarios (Figura I.2.3) (Kushwaha *et al.*, 1976; Tarasov *et al.*, 2008). Por lo tanto, el licopeno es un mediador clave que puede ser utilizado, a partir de su regulación génica, para la biosíntesis del retinal o de la bacteriorruberina.

Importante es el papel del gen codificante de la síntesis de la proteína bacterioopsina (gen *bop*), el cual se sobre-expresa en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno conjuntamente con la alta intensidad lumínica (Gropp & Betlach, 1994). También han sido descritos mecanismos enzimáticos inhibitorios de la síntesis de la bacteriorruberina que pueden potencialmente sobre-expresar y regular el gen *lye* (Dummer *et al.*, 2011) (Figura I.2.3). La regulación

de *lye* dentro de la síntesis de la bacteriorruberina ha sido descrita específicamente para *H. salinarum*. El interés biotecnológico de este carotenoide radica en i) la presencia de grupos terminales polares (-OH); y, ii) el tamaño molecular (C-50) frente a otros carotenoides, como aquellos sintetizados por bacterias halófilas –p. ej. salinixantinas o el β-caroteno (C-40)– (Naziri *et al.*, 2014). Estas características, por ejemplo, le aportan a la bacteriorruberina un mayor poder antioxidante frente al compuesto químico 1,1- difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) comparado con el β-caroteno (Abbes *et al*., 2013; Yatsunami *et al*., 2014).

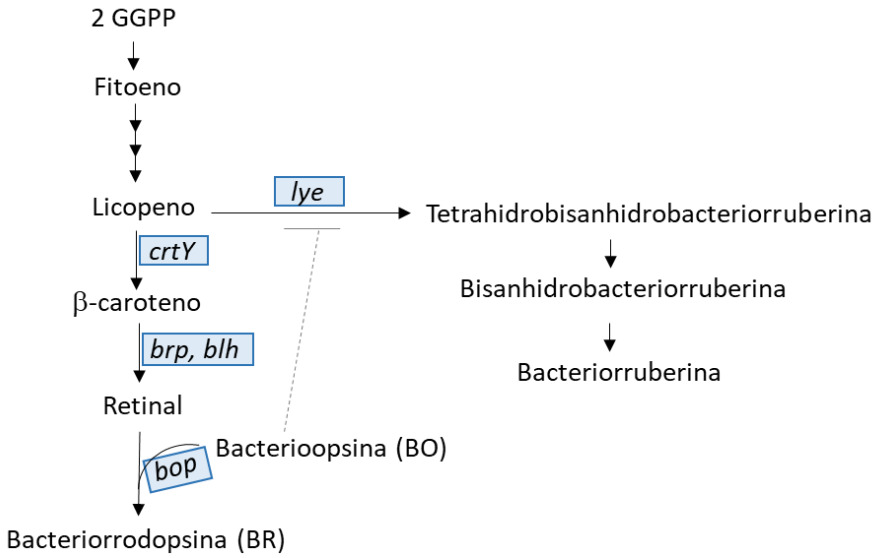


Figura I.2.3. Rutas metabólicas de los carotenoides y la bacteriorruberina en *Halobacterium salinarum*. Los genes que codifican las enzimas catalíticas se representan con un rectángulo azul. La línea gris discontinua indica el mecanismo regulador de la bacterioopsina (BO) que inhibe la síntesis de bacteriorruberina a partir de la expresión del gen *lye* (adaptada de Dummer *et al.*, 2011).

En este trabajo se identifican taxonómicamente, con técnicas moleculares basadas en la valoración del gen *16S rRNA*, las poblaciones de procariotas predominantes en los estanques y cristalizadores de dos salinas costeras de Gran Canaria (España). Asumiendo que, desde la fuente de agua –el Océano Atlántico–, así como las condiciones de viento y temperatura son casi las mismas para ambas salinas a analizar, se presume que los organismos contenidos en los estanques y cristalizadores de ambas son iguales. Además, esta caracterización permitirá en un futuro profundizar en la búsqueda de compuestos de alto valor biotecnológico sintetizados por procariotas halófilos.

I.2.2 | MATERIAL Y MÉTODOS

I.2.2.1 | Muestreo de las salinas y preparación de las muestras

Las muestras procesadas en este trabajo se recolectaron en la costa sureste de Gran Canaria (Figura I.2.4), isla que tiene una superficie de 1560 km^2, se encuentra entre 27,7°-28,2°N y 15,3°-15,9°W, y posee las condiciones idóneas para el óptimo funcionamiento de las salinas (Luque *et al*., 2014). En particular, por su localización geográfica está altamente influenciada por los vientos alisios dominantes del noreste, asociados con el anticiclón de las Azores, los cuales resultan en vientos fuertes y frecuentes. Además, la insolación en esta isla es elevada durante todo el año, lo que asegura temperaturas de moderadas a altas a lo largo del tiempo.

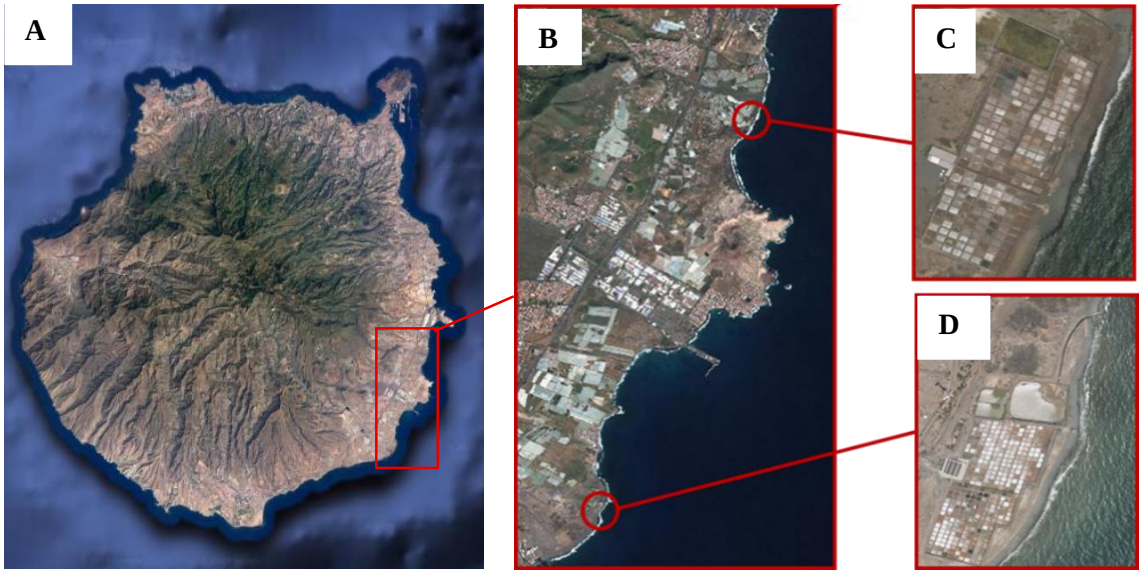


Figura I.2.4. A. Imagen de satélite de la isla de Gran Canaria; **B.** Costa sureste de la isla de Gran Canaria; **C.** Salina 1; **D.** Salina 2 (imágenes de satélite obtenidas de Google Earth, CA, EE. UU.).

Las salinas muestreadas están constituidas por una única serie de estanques sin conexión. Los estanques o cocederos se seleccionaron de acuerdo a su estado de evaporación, asumiendo que las comunidades procariotas variarían entre estanques por su distinto grado de salinidad. La selección y clasificación se llevó a cabo mediante la visualización previa y el registro fotográfico –presentado en el Anexo I.2 (Figuras A.I.2.1- A.I.2.2)–. Las estaciones de muestreo se clasificaron acorde

a su salinidad en orden creciente, y se les asignaron los siguientes códigos: estación 1 (ST1; Figura A.I.2.1A), estación 2 (ST2; Figura A.I.2.1B), y estación 3 (ST3). Esta última se subdividió en los puntos de muestreo 3.1 (ST3.1; Figura A.I.2.1C), donde se muestreó la capa de lípidos en superficie, y, 3.2 (ST3.2; Figura A.I.2.2A), de la cual se recolectó agua y lípidos superficiales. También se recolectaron muestras de los cristalizadores (C; Figura A.I.2.2B).

De cada una de las estaciones se tomó un litro de agua. Todas las muestras se recogieron en botellas y recipientes de polietileno, previamente esterilizados a 121 ºC durante 20 min, mediante autoclave (RAYPA, Barcelona, España). Las muestras se mantuvieron refrigeradas en neveras portátiles, tanto durante el muestreo como en el traslado al laboratorio y el procesado de las mismas.

En el laboratorio el volumen de muestra por cada estación se repartió en tubos de 50 mL de capacidad y se centrifugaron a 20 000 rpm durante 10 min en una centrifuga *BECKMAN Avanti™ J-25* (Beckam Coulter, CA, EE. UU.). Las estaciones se procesaron independientemente para evitar contaminaciones cruzadas. Los precipitados o *pellets*, procedentes de la misma estación, se reunieron para homogeneizar las muestras, de tal manera que se obtuvo un *pellet* por estación. A continuación, se pesaron 2 g del precipitado disponiéndose en viales, y añadiendo tampón de lisis (Tabla I.2.3) hasta un volumen final 5 mL. De esta manera, las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su posterior uso.

Tabla I.2.3. Componentes del tampón de lisis.

Reactivos (concentraciones stock)	**Volumen** (mL)
TRIS HCl (1 M)	5
EDTA (0,5 M)	1
SDS (10%)	1
TRITON X-100 (20%)	5
Volumen final [a]	100

[a] Volumen completado con agua libre de ARNasas

I.2.2.2 │Aislamiento del ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo a partir del procedimiento basado en la acción del detergente bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) adaptado por García-Jiménez y colaboradores (2009) –descrito previamente por Murray & Thompson (1980)–, y recogido en el Capítulo I (apartado I.2.2.2). El *pellet* se homogeneizó con nitrógeno líquido en un mortero de cerámica, y posteriormente, se incubaron cada una de las muestras a 65 ºC en 800 µL de tampón de extracción. Específicamente, la solución de extracción utilizada contenía 100 mM de Tris-HCl (pH 8,2), 4 M NaCl, 20 mM de EDTA, CTAB (2%, m/v), PVPP (0,1%, m/v), SDS (0,1%, m/v), y β-mercaptoetanol (2%, v/v).

El rendimiento del ADN se evaluó utilizando un espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, EE. UU.). La pureza del ADN se valoró por la ausencia de ADN fragmentado en un gel de agarosa al 0,8% (m/v).

I.2.2.3 │Amplificación del gen *16S rRNA* con cebadores específicos para los dominos Archaea y Bacteria

La amplificación del fragmento *16S rRNA* se llevó a cabo con 90-95 ng del ADN obtenido para cada estación. Los cebadores empleados definen regiones específicas para arqueas y bacterias como se muestra en la Tabla I.2.4, y como se describieron con anteriormente en la introducción general (apartado I.G.3; Tabla I.G.2). Las mezclas de reacción se prepararon para un volumen final de 50 µL. Estas contenían 10 µL de 5X *PrimerSTAR™ buffer*, 0,5 µL de *PrimerSTAR™ HS DNA Polymerase* (2,5 U μL^{-1}), 4 µL de la mezcla dNTPs (2,5 mM de cada uno), todos ellos de la casa comercial TaKaRa Shuzo Co. (Shiga, Japan), así como, 2 µL de cada uno de los *primers* (10 µM) y 5 µL de ADN *template*. La amplificación se realizó en un *GenAmp 2400 termociclador* (PerkinElmer Inc., EE. UU.) siguiendo el protocolo descrito en la Tabla I.2.5.

Tabla I.2.4. Secuencias de los *primers* específicos de los dominios Archaea y Bacteria utilizados en este estudio, con orientación *forward* (F) y orientación *reverse* (R) del gen *16S rRNA*.

Organismo	**Orientación**	***Primers***	**Secuencia** (5' → 3')	**Referencia**
Archaea	*Forward*	B22F	ATTCCGGTTGATCCTGC	Fukushima *et al.*, 2005
	Reverse	B1521R	AGGAGGTGATCCAGCCGCAG	Fukushima *et al.*, 2005
	Forward	B8F	TTGATCCTGCCGGAGGCCATTG	Deng *et al.*, 2015
	Reverse	B1462R	TCCAGCCGCAGATTCCCCTAC	Deng *et al.*, 2015
	Forward	B704F	GTAGCGGTGAAATGCGTAGA	Sy *et al.*, 2013
	Reverse	B1462R	TCCAGCCGCAGATTCCCCTAC	Deng *et al.*, 2015
Bacteria	*Forward*	B27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Deng *et al.*, 2015
	Reverse	B765R	CTGTTTGCTCCCCACGCTTTC	Ma *et al.*, 2004
	Forward	B27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Deng *et al.*, 2015
	Reverse	B1462R	TCCAGCCGCAGATTCCCCTAC	Deng *et al.*, 2015

Tabla I.2.5. Protocolo de amplificación utilizado en este estudio con los juegos de *primers* dominio-específicos de arqueas y bacterias del gen *16S rRNA*.

	Desnaturalización	**Hibridación**	**Elongación**	**Elongación final**
Ciclos		30		1
Protocolo	95 ºC; 60 s	48 ºC; 60 s	72 ºC; 90 s	72 ºC, 5 min

Los productos de amplificación obtenidos se purificaron empleando el kit *QIAEX II Gel Extraction* (Qiagen Inc., Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante (procedimiento descrito en el Capítulo I, apartado I.1.2.3). Los fragmentos de amplificación purificados se secuenciaron mediante la utilización del kit *BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing* (Thermofisher Scientific, MA, EE. UU.), y el uso de un secuenciador automatizado *ABI-310 DNA* (Applied Biosystems, CA, EE. UU.).

I.2.2.4 │Diseño de cebadores género y especie-específicos de procariotas halófilos

Las secuencias obtenidas en la sección precedente se utilizaron para el diseño de nuevos *primers* que fueron específicos a las secuencias amplificadas de acuerdo al *16S rRNA* (Tabla I.2.6). El diseño de cebadores, se llevó a cabo en la herramienta *Primer3Plus* (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi), según el procedimiento descrito en el apartado I.2.1 del Capítulo I.

Las reacciones y protocolos de amplificación se realizaron conforme a las especificaciones detallas en la Tabla I.2.5, modificando la temperatura de hibridación según la temperatura específica de los pares de cebadores diseñados (Tabla I.2.6).

Tabla I.2.6. Juegos de *primers* género- y especie-específicos de procariotas halófilos diseñados en este estudio.

Organismo	**Orientación**	***Primers***	**T_a** (°C)	**Secuencia** (5' → 3')
Halobacterium salinarum	*Forward*	BACTF	52	GTCCGGGGTAGGAGTGAAAT
	Reverse	BACTR		CCCGCCAATTCCTTTAAGTT
Halobacterium	*Forward*	HCF	51	ATTCCGGTTGATCCTGCCGGAGGTC
	Reverse	HCR		GATCCAGCCGCAGATTCCCC
Halorubrum salinum	*Forward*	HSALIF	52	GGTAGTCCTGGCCGTAAACA
	Reverse	HSALIR		AGGTCATCAACCTGGTCGTC
Salinibacter	*Forward*	SALIBF	51	CAGGAATAAGCACCGGCTAA
	Reverse	SALIBR		ACATGCTCCACCGCTTGT

[a] Ta: temperatura de hibridación (*Annealing temperature)*

Los productos de amplificación de la *nested*-PCR se validaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v), en la cual se incluyeron 5 µL del marcador de peso molecular *200 bp DNA ladder* (Omega Bio-Tek Inc, Georgia, EE. UU.). Todas las muestras se realizaron por triplicado.

I.2.2.5 │Clonación de los insertos del gen *16S rRNA*

Los amplicones validados se purificaron utilizando de nuevo el kit *QIAEX II Gel Extraction* (Qiagen Inc.). Tras la obtención de los fragmentos purificados, estos se ligaron al vector de clonación *pGEM-T Easy Vector* (Promega, Wisconsin, EE. UU.), y se clonaron en células *JM109 High Efficiency Competent Cells* (Promega), según instrucciones del fabricante e incluyendo las adaptaciones indicadas en el apartado I.1.2.3c del Capítulo I.1. Los plásmidos contenidos en las células transformadas se aislaron utilizando el kit de purificación de plásmidos *QIAGEN Plasmid Mini* (Qiagen Inc.). La comprobación del amplicón clonado en el plásmido se llevó a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa, utilizando el par de *primers* descrito por Messing (1983): M13F con orientación *forward* (5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'), y M13R con orientación *reverse* (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') (Promega). Igualmente, el procedimiento experimental acometido en la clonación de los fragmentos, la obtención de los insertos y la secuenciación de los mismos corresponde al procedimiento detallo en la sección mencionada (Capítulo I.1; apartado I.1.2.3c). Las secuencias de nucleótidos obtenidas se validaron en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), mediante la herramienta bioinformática BLAST.

I.2.2.6 │ Análisis filogenético de los insertos

Tras la validación de las secuencias de los insertos, se procedió a realizar el alineamiento múltiple de las mismas en la herramienta *ClustalX v.1.7* (Thompson *et al.*, 1994), utilizando los ajustes por defecto, y se perfeccionó aún más conjugando la inspección visual y la edición de las secuencias a través del software *BioEdit Biological Sequence Alignment Editor v 7.2* (Hall, 1999). El archivo de salida del alineamiento realizado con las secuencias ajustadas se utilizó para generar árboles filogenéticos basados en la estimación de máxima verosimilitud implementada en el software *MEGA X* (Kumar *et al.*, 2018). Los parámetros empleados correspondieron a los descritos en el Capítulo I (apartado I.2.3).

I.2.3 │RESULTADOS

I.2.3.1 │Amplificación del gen *16S rRNA* con cebadores específicos de los dominos Archaea y Bacteria

Los resultados de las amplificaciones llevadas a cabo, a partir de las combinaciones realizadas con los *primers* dominio-específicos para arqueas y bacterias (Tabla I.2.4), fueron satisfactorios para todos los juegos de cebadores utilizados (Tabla I.2.7). En la Tabla I.2.7 se recogen los resultados obtenidos para cada combinación de pares de oligos y puntos de muestreo ensayados.

Tabla I.2.7. Resultados de las amplificaciones llevadas a cabo con los cebadores específicos del dominio Archaea y Bacteria, y el ADN ambiental aislado de cada punto de muestreo.

Par de *primers*	**Dominio**	**Estación de muestreo**				
		ST1	ST2	ST3.1	ST3.2	C
		Gradiente de salinidad →				
		-				+
BF27-BR1462	Bacteria	-	-	+	+	-
BF27-B765R	Bacteria	+	-	+	+	+
B704F-BR1462	Archaea	+	+	-	+	+
B22F-B1521R	Archaea	+	-	-	-	-
B8F-B1462R	Archaea	+	+	+	-	-

ST1: estación 1(salmuera); ST2: estación 2 (salmuera); ST3.1: estación 3, punto muestreo 1 (capa de lípidos en superficie); ST3.2: estación 3, punto muestreo 2 (agua de salmuera y lípidos en suspensión); C: cristalizador.
+ Obtención de amplicones
- No se obtienen amplicones

Estas amplificaciones resultaron en fragmentos de varias longitudes (200 - 1 800 pb). Aquellas bandas entre 700 - 1 500 pb se seleccionaron y purificaron para ser utilizadas en el diseño de los pares de oligos género- y especie-específicos.

Las secuencias correspondientes a los amplicones purificados se anotaron a través de la herramienta BLAST, identificándose géneros y especies de procariotas halófilos –clon no cultivado de *Salinibacter sp.*; *Halobacterium salinarum*; *Halobacterium sp.*; y *Halorubrum salinum*– con un rango de porcentajes de identidad del 86,23 - 92,47% y un E-valor entre $6x10^{-163}$ y $1x10^{-65}$.

I.2.3.2 │Validación de cebadores género- y especie-específicos de procariotas halófilos, y clonación de los fragmentos

De las amplificaciones internas con los *primers* género- y especie-específicos resultaron 29 amplicones, los cuales fueron ligados y clonados. Mediante la clonación y secuenciación de los fragmentos se construyó una biblioteca de clones de genes *16S rRNA*, con un total de 18 amplicones. Cada secuencia se asumió como una unidad taxonómica operacional (OTU, *Operational Taxonomic Units*), cuya asignación taxonómica, obtenida mediante la herramienta BLAST, se muestra en la Tabla I.2.8.

Específicamente, del número total de fragmentos clonados (18 OTU), la especie de arquea halófila *Halobacterium salinarum* representó el 50,0% (9 OTU) y se detectó en todas las estaciones muestreadas. Asimismo, una abundancia relativa del 5,56% (1 OTU) correspondió a especies sin determinar del género *Halobacterium* (Tabla I.2.8). Por su parte, el género de arqueas halófilas *Halorubrum* estuvo presente en un 22,22% (4 OTU), no determinándose en el cristalizador. Igualmente, el género de bacterias halófilas *Salinibacter* se detectó en todas las estaciones analizados representando el 22,22% (4 OTU), sin embargo, tampoco se identificó en el cristalizador (Tabla I.2.8).

La asignación filogenética de las secuencias obtenidas del género y especie predominantes (Tabla I.2.9) incluyó un total de 24 secuencias de nucleótidos (Tabla I.2.10).

Tabla I.2.8. Anotación taxonómica de los amplicones[a] clonados del gen *16S rRNA*, mediante BLAST, procedentes de las amplificaciones realizadas con las muestras de las salinas y con los juegos de cebadores género- y especie-específicos de procariotas halófilos.

		Juegos de *primers*													
		HCF HCR					**BACTF BACTR**	**HSALIF HSALIR**				**SALIBF SALIBR**			
		Estación de muestreo													
Anotación más cercana de acuerdo a la base de datos (nº de acceso NCBI)	**Similitud** (%)	**ST1**	**ST2**	**ST3.1**	**ST3.2**	**C**	**ST3.2**	**ST1**	**ST2**	**ST3.1**	**ST3.2**	**ST1**	**ST2**	**ST3.1**	**ST3.2**
Halobacterium salinarum cepa NBRC 14715 LC556329)	91,0/98,2		+	+*	+*										
Halobacterium salinarum cepa ESD931 (MN000468)	94,8						+								
Halobacterium salinarum cepa S-6 (KY084534)	97,7/98,0		+			+*									
Halobacterium sp. cepa Gai3-17 (KY458509)	98,2	+													
Halorubrum sp. cepa Q5A (KR150746)	98,97								+		+				
Halorubrum sp. cepa TC18 (KY290145)	98,0							+		+					
Salinibacter sp. cepa CaM14 (KM257962)	99,1											+			
Salinibacter sp. cepa 7Mb1 (KY290145)	92,6												+	+	+

[a] Los amplicones obtenidos respondieron a tamaños comprendidos entre 133-223 pb.
* La anotación corresponde a dos fragmentos clonados en este punto de muestreo.
Juego de *primers* especie-específicos: HCF-HCR (organismo *target Halobacterium*); BACTF-BACTR (organismo *target Halobacterium salinarum*); y, HSALIF-HSALIR (organismo *target Halorubrum salinum*); y par de cebadores género-específico: SALIBF-SALIBR (organismo *target*: *Salinibacter*).
ST1: estación 1(salmuera); ST2: estación 2 (salmuera); ST3.1: estación 3, punto muestreo 1 (capa de lípidos en superficie); ST3.2: estación 3, punto muestreo 2 (salmuera y lípidos en suspensión); C: cristalizador.

Tabla I.2.9. Secuencias obtenidas del género y especie predominantes de arqueas halófilas en las salinas a partir de la construcción de la biblioteca de clones del gen *16S rRNA*.

Oligos	**Estación de muestreo**	**Código secuencia**	**Secuencia** (5'→3')	**Longitud** (pb)
HCF- HCR	**ST1**	ST1P	CGCGCAGGCGTCCAGCGGAAACTGCNNGGC TTGGGACCGGAAGACCTGAGGGGTACGTCC GGGGTANNAGTGAAATCCTGTAATCCTGGA CGGACCACCGGTGGCGAAAGCGCCTCAGGA GGACGGATCCGACAGTGAGGGACGAAAGCT AGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCCGGGT AGTCCTAGCTGTAAACGATGCCCGCTAGGT	213
	ST2	ST2P	AGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTAC CGTGAGGCGTCCTGTTNNGTCAGGCAACGA GCGAGACCCGCACTCCTAATTGCCAGCAGTA CCCTTTGGGTAGCTGGGTACATTAGGTGGAC TGCCNNTGCCAAAGCGGAGGAAGGAACGGG CAACGGTAGGTCACCATGCCCCGAATGGGC TGGGCAACACGCGGGCTACAATGG	211
		ST2SP	TTAAAGGAATTGGCGGGNNAGCACTACAAC CGGAGGAGCCTGCGGTTTAANTGGACTCAA CGCCGGACATCTCACCAGCCCCGACAGTNGT AATGACGGTCAGGTTNATGACCTTACCCGAG GCTACTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTC AGCTCGTACCGTGAGGCGTCCTGTTAAGTCA GGCAACGAGNNAGACCCGCACTCCTAATTG CCAGC	223
	ST3.1	ST3.1SP	GCGGAAAGCTCAGTAACACGTGGCCNNGCT ACCCTGTGGACGGGAATACTCTCNGGAAAC TGAGGCTAATCCCCGATAACGCTTTGCTCCT GGAAGNNGGCAAAGCCGGAAACGCTCCGGC GCCACAGGATGCGGCTGCGGTCGATTAGGT AG	153
	ST3.2	ST3.2P	AGGCATAGAGCCTTCACTTTTGTACACCGTA AGGTGGTGCACGNNNAAGGACTGGGCAAGA CCGNNNCCAGCCGCCGCGGTAATANNGGCA GTNCGAGTGATGGCCGATCTTATTNNGCCTA AAGCGTNCGTA	133
	C	SAL2G	TAACGCTTTGCTCCTGGAAGGGNCAAAGCC GGAAACGCTCCGGCGCCACAGGATGCGGCT GCGGTCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACG GCCCACCGTGCCCATANNCGGTACGGGCCG TGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGAATCTGA GACAAGATTCCGGGCNCTACGGGGCGCAGC AGGCGCGAAACCTTTA	196
BACTF BACTR	**ST3.2**	ST3.2	CCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTT TACACTGTACGAAAGTGCGATAANNNNACT CCGAGTGTGAAGGCATAGAGCCTTCACTNN NGTACACCGTAAGGTGGTGCACGAATAAGG ACTGNNCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGG TAA	153

Tabla I.2.10. Secuencias del género *Halobacterium* incluidas en el análisis filogenético del gen *16S rRNA* llevado a cabo en este estudio.

Especies y cepas	**Nº de acceso del gen *16S rRNA***
Euryachaeota filo	
Halobacteria clase	
Halobacteriaceae familia, *Halobacterium*	
Halobacterium jilantaiense YPL22	KX898195
Halobacterium jilantaiense RM-G15	KP076310
Halobacterium jilantaiense JCM 13558	NR 113425
Halobacterium jilantaiense JCM 13558	NR 112860
Halobacterium jilantaiense JCM 13558	AB663359
Halobacterium noricense JCM 15102	AB663360
Halobacterium noricense HmC1	KM258002
Halobacterium noricense PaM2	KM258055
Halobacterium noricense H4 DGR	JF802162
Halobacterium rubrum TGN-42-S1	NR 134743
Halobacterium rubrum TGN-42-S1	KC914879
Halobacterium salinarum HJ-6	KY084540
Halobacterium salinarum HJ-3	KY084537
Halobacterium sp. clone SFG1F101	AM947500
Halobacterium sp. NRC-1	AB663363
Halobacterium sp. BIHGY150/14	AM902591
Halobacterium sp. A1	AJ548827
Halobacterium sp. FIC146 3	EU308204
Halobacterium sp. HM11	AY232299
Halobacterium sp. P102070208-3O	FJ609943
Halobacterium sp. SP-2	KF697237
Halobacterium sp. Y12	D14127
Halobacterium sp. YI80-2	KJ917624
Otros géneros de Halobacteriaceae	
Halalkalicoccus tibetensis JCM 11890	NR 113416

En las siguientes figuras se presentan los árboles construidos. El análisis filogenético posicionó a las secuencias ST1P, ST2S, ST2P, ST3.1SP y ST3.2, ST3.2P, dentro del clado *Halobacterium sp.* (Figuras I.2.5, Figuras I.2.6A y Figuras I.2.7), y a la secuencia SAL2G la ubicó en el clado respectivo a la especie *Halobacterium salinarium* (Figura I.2.6B).

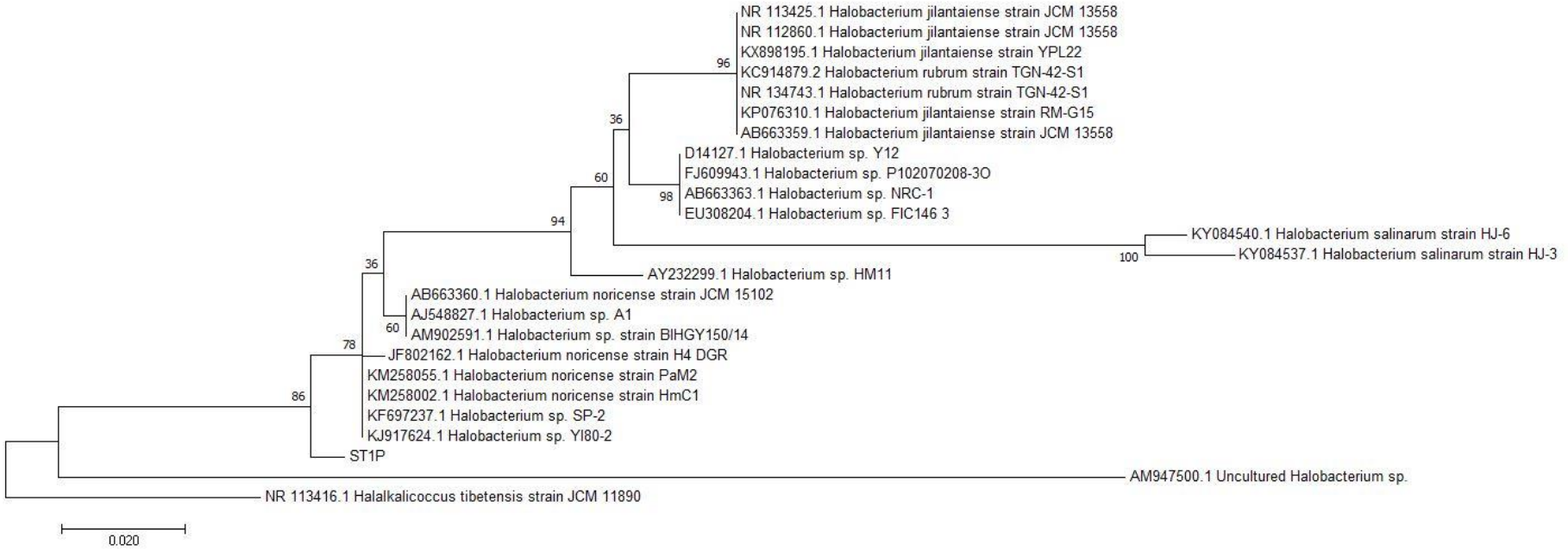


Figura I.2.5. Árbol filogenético obtenido de acuerdo a la estimación de máxima verosimilitud, utilizando el modelo de Tiempo General Reversible (GTR), y la Distribución Gamma, a partir de las secuencias del gen *16S rRNA* y la secuencia obtenida en la *nested*-PCR para las muestras de la estación ST1 (agua de salmuera) y el juego *primers* género-específico de *Halobacterium* (HCF-HCR). Árbol construido con el software *MEGA X* (Nei & Kumar, 2000), donde el número en el nodo representa los valores relativos de similitud de la secuencia. El análisis *Bootstrap* se realizó con 1 000 réplicas. El código ST1P indica la secuencia problema analizada filogenéticamente en este árbol.

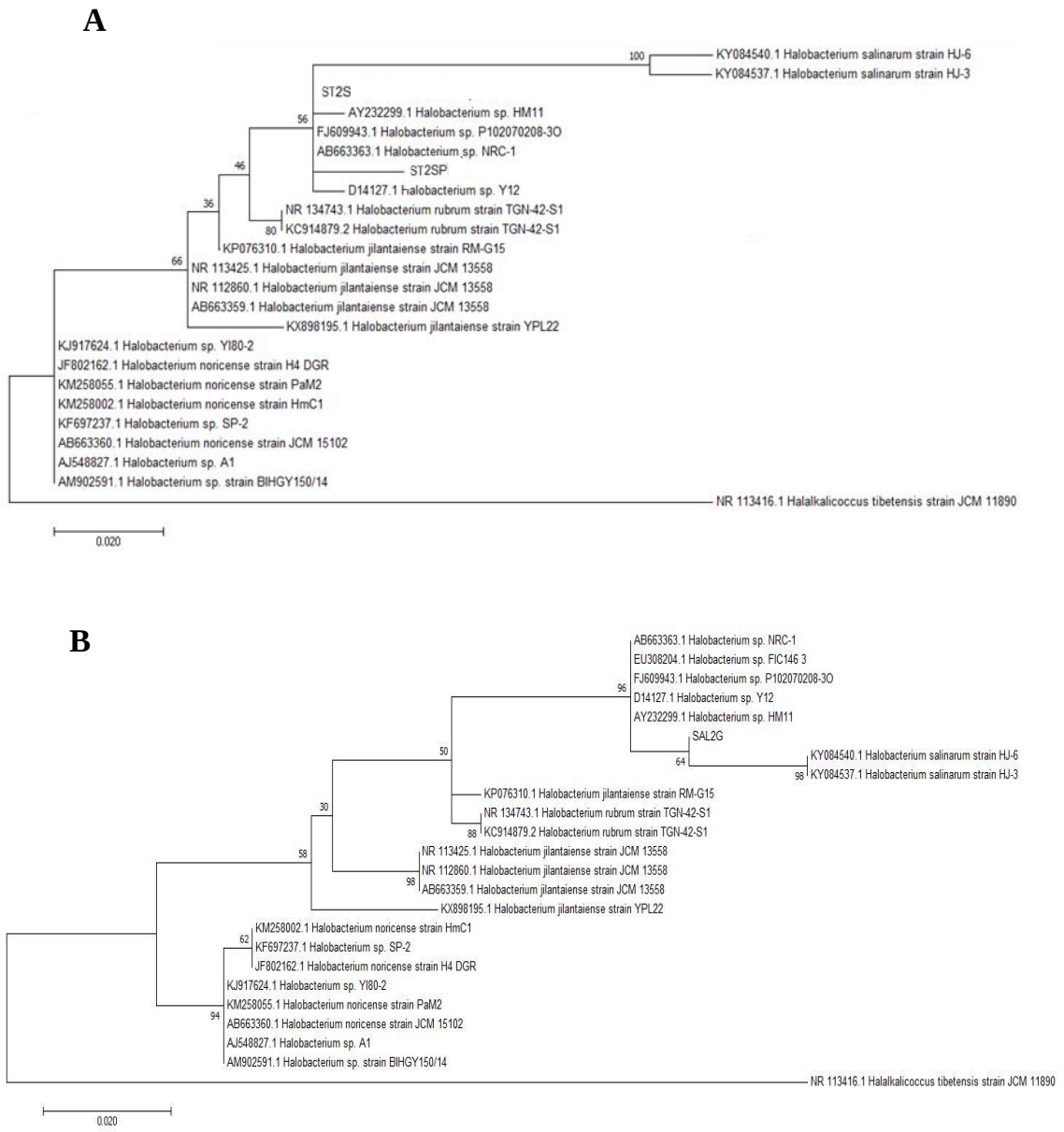


Figura I.2.6. Árboles filogenéticos obtenidos a través de la estimación de máxima verosimilitud, utilizando el modelo de Tiempo General Reversible (GTR), y la Distribución Gamma, a partir de secuencias del gen *16S rRNA* y las secuencias problema obtenidas en la *nested*-PCR con el par de cebadores género-específico de *Halobacterium* (HCF-HCR). Los árboles construidos a través del software *MEGA X* (Nei & Kumar, 2000), presenta los valores relativos de similitud de las secuencias problema en el nodo. El análisis *Bootstrap* se realizó con 1 000 réplicas. **A.** Árbol evolutivo de las secuencias obtenidas de los fragmentos clonados correspondientes a estación ST2 (agua de salmuera), representados con los códigos ST2S y ST2SP. **B.** Árbol filogenético de la secuencia obtenida de los amplicones clonados de la sal seca recolectada, cuyo código es SAL2G.

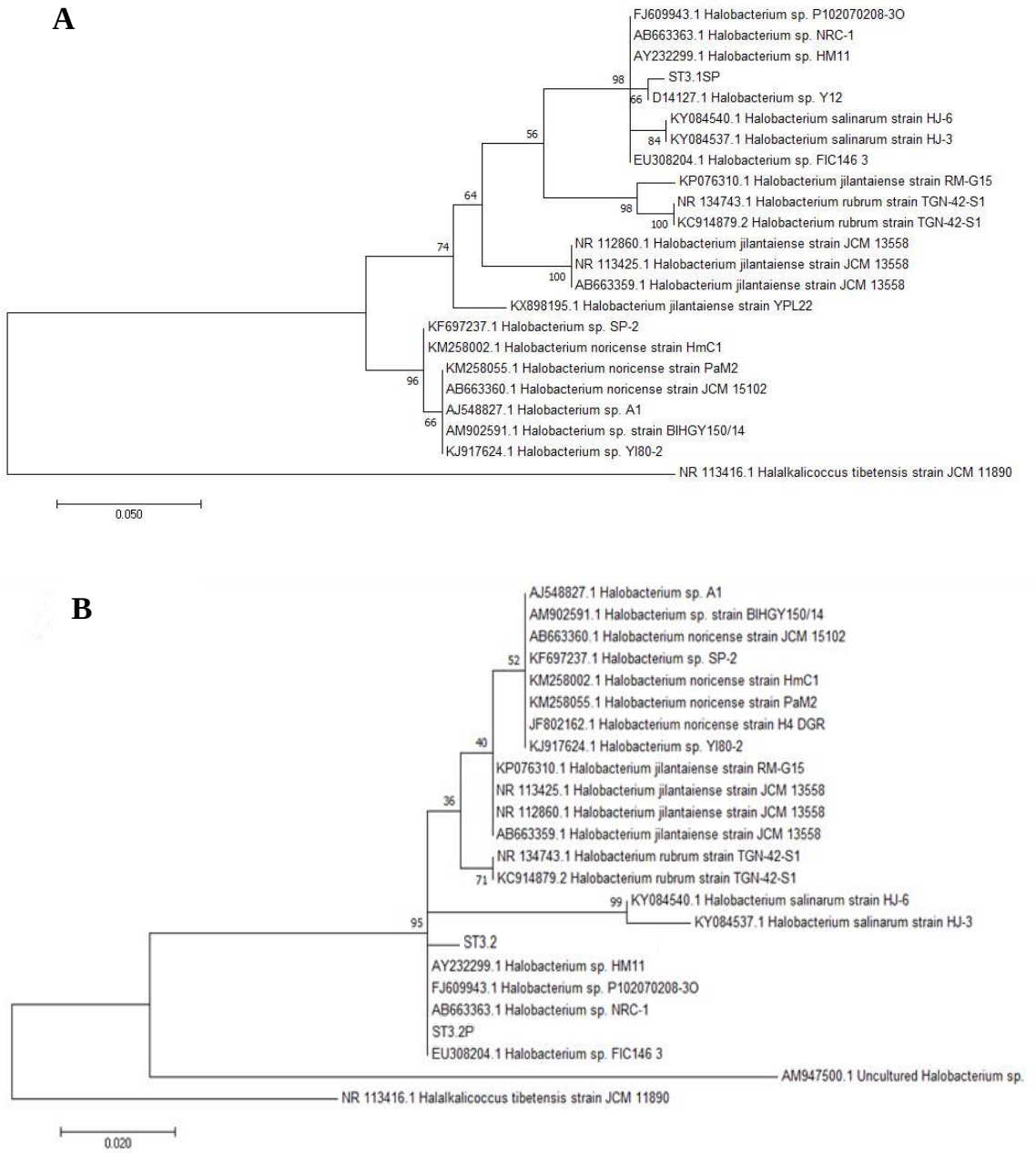


Figura I.2.7. Árboles filogenéticos obtenidos mediante la estimación de máxima verosimilitud, utilizando el modelo de Tiempo General Reversible (GTR), y la Distribución Gamma (2 categorías, a partir de secuencias del gen *16S rRNA* y las secuencias problema obtenidas en la *nested*-PCR. Los árboles construidos a través del software *MEGA X* (Nei & Kumar, 2000), presenta los valores relativos de similitud de las secuencias problema en el nodo. El análisis *Bootstrap* se realizó con 1 000 réplicas. **A.** Árbol evolutivo de la secuencia obtenida con el par de cebadores género-específico de *Halobacterium* (HCF-HCR) y las muestras de la estación ST3.1 (capa superficial de lípidos), representada con el código ST3.1SP. **B.** Árbol filogenético de las secuencias obtenidas de los amplicones clonados de la estación de muestreo ST3.2 (agua de salmuera y lípidos) con los pares de oligos género-específico de *Halobacterium* (HCF-HCR), cuyo código es ST3.2P; y los juegos de *primers* especie-específico de *Halobacterium salinarum* (BACTF-BACTR), cuyo código es ST3.2.

Halobacterium identification in saltworks of Gran Canaria (Canary Islands, Spain)

Garcia-Jimenez, P., Carrasco-Acosta, M., Hettmann, S., 2020, Journal of Fisheries Science, 2(1), 9-16.
https://doi.org/10.30564/jfsr.v2i1.1464

Journal of Fisheries Science | Volume 02 | Issue 01 | March 2020

BILINGUAL PUBLISHING CO.
Pioneer of Global Academics Since 1984

Journal of Fisheries Science
https://ojs.bilpublishing.com/index.php/jfs



ARTICLE

Halobacterium Identification in Saltworks of Gran Canaria (Canary Islands, Spain)

Pilar Garcia-Jimenez* **Marina Carrasco-Acosta** **Sascha Hettmann**

Department of Biology, Instituto Universitario de Investigación en Estudios Ambientales y Recursos Naturales i-UNAT, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Campus de Tafira, Las Palmas de Gran Canaria 35017, Las Palmas

ARTICLE INFO

Article history
Received: 11 November 2019
Accepted: 31 December 2019
Published Online: 28 February 2020

Keywords:
Bacteria
16S rDNA
Halobacteria
Halobacterium
Solar Saltern Pond

ABSTRACT

This work analyzes bacterial communities present in evaporation ponds of solar salterns of Gran Canaria and reveals specific organisms through molecular techniques. Solar salterns are protected areas in Canary Islands where salt is produced from sea water by solarand windpowered evaporation. Salt was an important product for ancient islanders who used it for a broad field of purposes, but also has a great importance in recent time for its implications in the island economy. Based on amplifications with specific primers for 16S ribosomal DNA (16S rDNA) and subsequent nested-PCR approaches, different amplicons were obtained, and analyzed in silico. A taxonomic classification was carried out through phylogenetic trees. Results revealed different bacteria according to the evaporation grade of crystallizer ponds in saline works. It is worthstanding the presence of the genus *Halobacterium* in all crystallizer ponds. This opens an interesting framework for further studies and continuative molecular characterization approaches of bacterial communities in solar salterns of Gran Canaria.

1. Introduction

Traditional solar salterns still have a high socioeconomic impact due to their primary and secondary products. There are numerous ways of extracting salt from seawater, however this work is focusing on salt extraction from seawater using multipond solar salterns (salt works or salterns). This process involves the selective recovery of pure NaCl, whilst seawater is evaporated in artificial pond systems through natural evaporation driven by insolation and wind.

Multipond salterns create a gradient of salt concentrations which has an impact on the environment and their microbial population [1]. Ponds not only serve as refuge zones for migratory birds, but also host the halophilic unicellular green algae *Dunaliella* grown as a source of valuable chemicals [2]. There have been various studies regarding the microbial populations of crystallizer ponds around the world [3-5], the contribution of halobacterial pigments to the color of the water of crystallizer ponds [6,7] and the interrelationships between *Dunaliella* and halophilic prokaryotes in saltern crystallizer ponds [8], just to mention a few of them.

Furthermore the increase in salinity in different ponds is accompanied by a decrease in prokaryotic diversity, from the marine biota to the dense populations of halo-

*Corresponding Author:
Pilar Garcia-Jimenez,
Department of Biology, Instituto Universitario de Investigación en Estudios Ambientales y Recursos Naturales i-UNAT, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Campus de Tafira, Las Palmas de Gran Canaria 35017, Las Palmas;
Email: pilar.garcia@ulpgc.es

Distributed under creative commons license 4.0 DOI: https://doi.org/10.30564/jfsr.v2i1.1464

Journal of Fisheries Science | Volume 02 | Issue 01 | March 2020

philic Archaea and bacteria [5]. High salinity and long-term selection pressure, as a result of evaporation, have resulted in specific metabolic mechanisms that render biologically active substances which are directly related to their halophilic behavior [9]. Halophilic bacteria and archaea are, for instance, useful biological sources of carotenoid pigments [10,11].

Evaporation of seawater also leads to crystallization of salts contained, process based on their varying solubility. The thin layer on the surface of the salt tide only forms in traditional salt works during the continuous evaporation and has to be harvested daily by hand. Provision of salt for consumption to the marketplace, "flower of salt" can be obtained from this thin layer. Even more, it is highly valuable and offers wealth and work to the local population.

Moreover, secondary salts, so called bitterns, which are used for chemical industry can be obtained and betacarotenes and glycerol can be extracted from microalgae and halobacteria inhabiting pond systems [2]. Red bacteria of the *Halobacterium – Haloferax – Haloarcula* group contribute to the red color of saltern crystallizer ponds which increases light absorption by the brine. This leads to an increase of temperature and enhances the salt production process so that the microbial composition is of interest for operating solar salterns. Even purely aesthetic considerations make it interesting to study the highly diverse communities of microorganisms in salterns, since the broad range of red shades beautify the landscape and attracts tourism [2,7].

No screening of the bacterial community in solar saltworks of Gran Canaria (Spain) has been conducted until now. The hypothesis of this work is that halophilic bacteria can be characterized in order to thereupon isolate and identify specific species with biotechnological methods. Since the source of water, the Atlantic Ocean, as well as the conditions of wind and temperature are nearly the same for both solar salterns, it is presumed that the organisms contained in the crystallizer ponds of Vargas and Tenefé are equal. The aim of this work is to screen bacteria from crystallizer ponds featuring different salinities, fatty layers, and dried salt in order to characterize specific bacteria.

2. Methodology and Methods

2.1 Solar Salterns on Gran Canaria

The Canary Islands are located in the southeastern sector of the North Atlantic Ocean, approximately between 27 ° to 29 °N and 14 ° to 18 °W and are closed to the occidental African coast. They are highly influenced by the dominant northeast trade winds associated with the Azores High Pressure Area resulting in strong and frequent wind and a high number of hours of sunshine. Gran Canaria Island (Figure 1A), with its area of 1560 km^2, is located between 27.7°28.2°N and 15.3°15.9°W and features perfect conditions for solar salterns [12]. Samples processed in this work were taken on Gran Canaria southeast coast (Figure 1B) at the solar salterns of Vargas (Figure 1C) and Tenefé (Figure 1D).

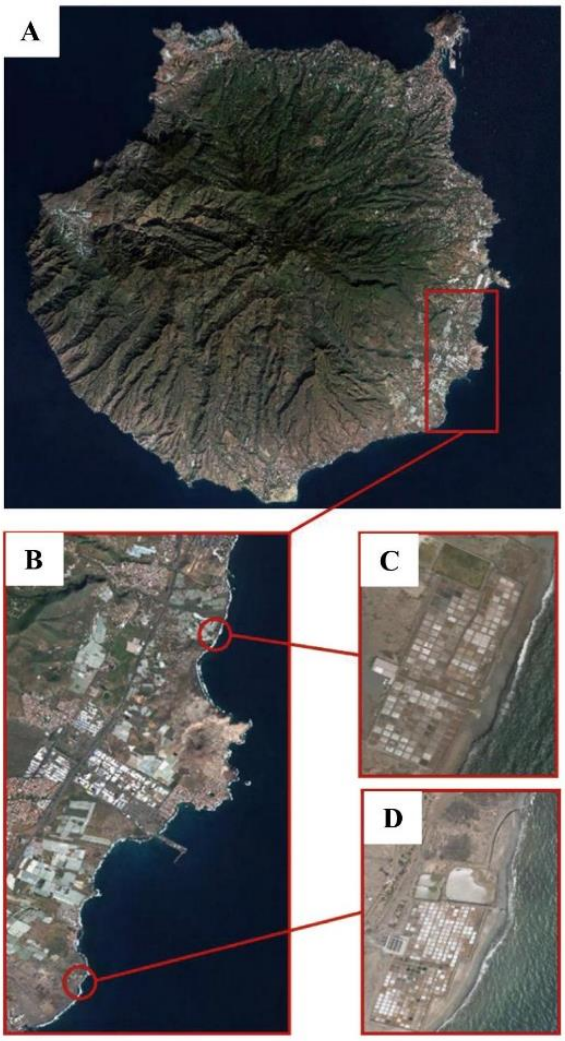


Figure 1. (A) Satellite images of Gran Canaria Island; (B) Southeast coast Gran Canaria Island; (C) The solar salterns of Vargas; (D) The solar salterns of Tenefé

2.2 Collection of Samples in Local Saltworks

Solar saltworks consist of a single series unconnected ponds. Ponds were selected according to their progress of

Distributed under creative commons license 4.0
DOI: https://doi.org/10.30564/jfsr.v2i1.1464

Journal of Fisheries Science | Volume 02 | Issue 01 | March 2020

evaporation, representing habitats of different specificity due to the changing salt concentrations. The selection and classification were carried out through previous visualization and photographic recording. These were ordered by increasing salinity and denoted as station 1 (ST1; Supplementary Figure 1A), station 2 (ST2; Supplementary Figure 1B), and station 3 (ST3). The latter was subdivided into station 3.1 (ST3.1; Supplementary Figure 1C) representing lipid layers on the surface and station 3.2 (ST3.2; Supplementary Figure 1D) representing water and lipids from the crystallizer pond. Moreover dried salt was also analyzed (SAL2; Supplementary Figure 1E)

One liter of water was taken at each sampling site and subsequently centrifuged (BECKMAN Avanti™ J-25) at 20000 rpm for 10 min. Pellets were then pooled and two grams (c.a.) were put into a 5 ml screw cap tube, filled up with lysis buffer (50 mM TRIS HCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS and 1% TRITON X-100) and afterwards stored at -20 °C until use.

2.3 Isolation of DNA

DNA extraction was performed following the previously described in Garcia-Jimenez et al. [13]. DNA from each of sampling site were separately isolated. This way, water was centrifuged and resulting pellet was homogenised in liquid nitrogen and then incubated in 800 µl of isolation solution containing 100 mM Tris-HCl (pH 8.2), 4 M NaCl, 20 mM EDTA, CTAB (2%, w/v), PVPP (0.1%, w/v), SDS (0.1%, w/v) and mercaptoethanol (2%) in a water bath at 65 ºC for 1 h. A volume of chloroform:isoamyl alcohol solution (24:1 v/v) was added and the samples were gently mixed by inversion at intervals of 20 s. The mixture was then centrifuged for 10 min at 3000 rpm in a Beckman Coulter Allegra X-22R centrifuge (Beckman Coulter Inc. Brea, CA USA). Successive washings with chloroform:isoamyl alcohol (24:1 v/v) solution were performed. The supernatant was then placed in a fresh tube and an equal volume of n-propanol (-20 °C) was added, mixed gently and centrifuged at 13000 g for 30 min. The resulting pellet, containing DNA, was washed with ethanol (80%, v/v, molecular grade), dried and suspended in sterile deionised water. DNA yield were assessed using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA). All samples were in triplicate. Purity DNA was valued by smear absence migrating on a 0.8% (w/v) agarose gel.

2.4 Amplification with 16S rRNA and Specific Primers

DNA (90-95 ng) was amplified using oligonucleotide pairs, 16S rRNA-F as a forward primer, and 16S rRNA-R as a reverse primer (Table 1).

Table 1. Sequences of the forward (F) and reverse (R) primers, for 16S rRNA gene

Target	Direction	Primer Pair	Nucleotide Sequence 5' → 3'	Reference
Archaea	Forward	BF27	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	[14]
	Reverse	BR1462	TCCAGCCGCAGATTCCCCTAC	
Bacteria	Forward	BF27	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	[14]
	Reverse	B765R	CTGTTTGCTCCCCACGCTTTC	[15]
Archaea	Forward	B704F	GTAGCGGTGAAATGCGTAGA	[15]
	Reverse	BR1462	TCCAGCCGCAGATTCCCCTAC	[14]
Bacteria	Forward	B22F	ATTCCGGTTGATCCTGC	[15]
	Reverse	B1521R	AGGAGGTGATCCAGCCGCAG	
Archaea	Forward	BF8	TTGATCCTGCCGGAGGC-CATTG	[14]
	Reverse	BR1462	TCCAGCCGCAGATTCCCCTAC	

Amplification was performed in a GenAmp 2400 thermal cycler (PerkinElmer Inc., USA) with 30 cycles consisting at 95 °C for 1 min, 48 °C for 1 min, and 72 °C for 1.5 min, followed by a final extension step of 5 min at 72 °C. Each PCR reaction mixture contained 0.5 U Takara Ex Taq DNA polymerase (TaKaRa Shuzo Co., Shiga, Japan), 2.5 mM dNTP, 10 µl Takara Ex Taq PCR buffer with MgCl2, 10 µM each forward and reverse primers and DNA template.

Amplification products corresponding to 16S rRNA were purified through QIAEX agarose gel extraction kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) according to manufacturer. Sequences were used for designing new primer pair for nested PCR. The specific primer pairs used and annealing temperatures, including putative bacterial species associated, are shown in Table 2.

Table 2. Specific Primer Pairs design in this study with correlating Bacterial Species

Target	Direction	Primer Pair	Tm [°C]	Ta [°C]	Sequence 5' - 3'
Halobacterium salinibacter	Forward	BACTF	60,5	52	GTCCGGGGTAGGAGTGAAAT
	Reverse	BACTR	56,4		CCCGCCAATTCCTTTAAGTT
Halobacterium cutirubrum	Forward	HCF	70,7	51	ATTCCGGTTGATCCTGCCGGAGGTC
	Reverse	HCR	64,6		GATCCAGCCGCAGATTCCCC
Halorubrum salinum	Forward	HSALIF	60,5	52	GGTAGTCCTGGCCGTAAACA
	Reverse	HSALIR	60,5		AGGTCATCAACCTGGTCGTC
Salinobacter	Forward	SALIBF	58,4	51	CAGGAATAAGCACCGGCTAA
	Reverse	SALIBR	56,1		ACATGCTCCACCGCTTGT

PCR products were visualised by agarose gel electro-

Distributed under creative commons license 4.0 DOI: https://doi.org/10.30564/jfsr.v2i1.1464

Journal of Fisheries Science | Volume 02 | Issue 01 | March 2020

phoresis. In addition, amplification products were obtained and purified using the QIAEX agarose gel extraction kit. The fragments were then ligated to the pGEM-T-easy cloning vector (Promega, Wisconsin, USA) and cloned in JM109 cells according to the manufacturer's instructions (Promega). Plasmids were isolated using a plasmid purification kit (Qiagen Inc.). The insert in the plasmid was checked by PCR using primers M13F and M13R (Promega). The insert was then sequenced on both strands using an ABI-310 DNA automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and BigDye Terminator v3.1. Nucleotide sequences were submitted to NCBI GenBank BLAST search and identified through similarity values. Alignment of sequences was performed with ClustalX v.1.7 [16] using the default settings and was further refined by visual inspection. The alignment output was used to generate a phylogenetic tree based on the Maximum Likelihood method and General Time Reversibility model [17] as implemented in MEGA X [18]. The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates is taken to represent the evolutionary history of the taxa analysed [19]. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% of the bootstrap replicates collapse. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches [19]. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbour-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. A discrete gamma distribution was used to model evolutionary rate differences between sites (2 categories (+G, parameter = 0.1000)).

3. Results and Discussion

The saline waters of the solar salterns in Gran Canaria have a marine origin with a gradient of salt concentrations according to evaporation. The appearance of salt produced in Vargas and Tenefé (Gran Canaria) ranged from a pink color gradient to strong intense pink in relation to the salinity increment in different ponds. It has also been observed those ponds, whose color intensity is high, brine become oily and viscous.

Despite diverse microbial groups inhabit multi-pond solar saltworks, in which a gradient of salinities ranges from seawater to NaCl precipitation, little is known about bacterial communities in saltworks. Thus an approach to characterize them via 16S rDNA gene sequencing method was conducted. In order to determine the bacteria population in different ponds, we identified bacteria through 16S DNA-molecular technique. It is worth be aiming that the objective was only a 16S DNA-bacteria screening. An approach to study structure of microbial communities and biodiversity cultivation is needed onwards.

Amplified 16S rDNA gene sequences with a molecular size of approximately 1500 bp serve as genetic marker and can be used to study bacterial phylogeny and taxonomy by further processing combined with biocomputing analysis [20]. Universal primers (Table 1) have been validated for high-salinity bacteria on isolated DNA derived from crystallizer ponds in different stages of evaporation. Different universal primers match different positions of the genome, identifying different areas of the 16S region [21-23]. Since a broad range of primer combinations was already tested, successful results were obtained with all primer pairs in different sampling stations. In general, bacteria biodiversity detected in ponds is quite similar although a bacteria genus is remarkable over others.

Furthermore internal-PCR amplifications were conducted as consequence of combinations of sequences obtained by universal PCR and different specie-specific primer pairs (Table 2). Twenty-nine sequences of internal-amplifications were obtained and 18 out of them allowed successfully identifying. 16S rDNA-internal sequences ranged from 133 to 223 bp were most closely annotated to three genera namely *Halobacterium sp*., *Halorubrum sp*., and *Salinobacter sp*. All of three genus have been described as extremely halophilic bacteria that grows in saturated sodium chloride [24].

Bacterial community fluctuated depending on the progress of evaporation and concomitant change in salinity and environmental conditions. Moreover, the increasing salinity leads to a progressive specification of species being uninhabitable for unspecified organisms [25]. *Halobacterium* genus was always reported in all crystallizer ponds and salt whilst *Halorubrum sp*. and *Salinobacter sp*. were unreported in solid salt. *Halobacterium sp*. species get benefits from increasing salinity.

As this *Halobacterium* species have a cell membrane red-color [26], presumably the red shade in ponds comes from cell membrane. Additionally, since the red color is correlated to the presence of these kind of halophilic bacteria, an increasing habitability and improvement of living conditions can be assumed [6].

Other authors have also shown that *Halobacterium* imparts red coloration to the brine and favor evaporation of brine [27]. Likewise viscosity levels promote the formation of larger salt crystals and thereby improve the salt quality [27,28].

The phylogenetic analysis positioned the *Halobacterium* sequences in a clade within *Halobacterium salinarium* and *Halobacterium sp*. (Figure 2). Evolutionary analysis

Distributed under creative commons license 4.0
DOI: https://doi.org/10.30564/jfsr.v2i1.1464

Journal of Fisheries Science | Volume 02 | Issue 01 | March 2020

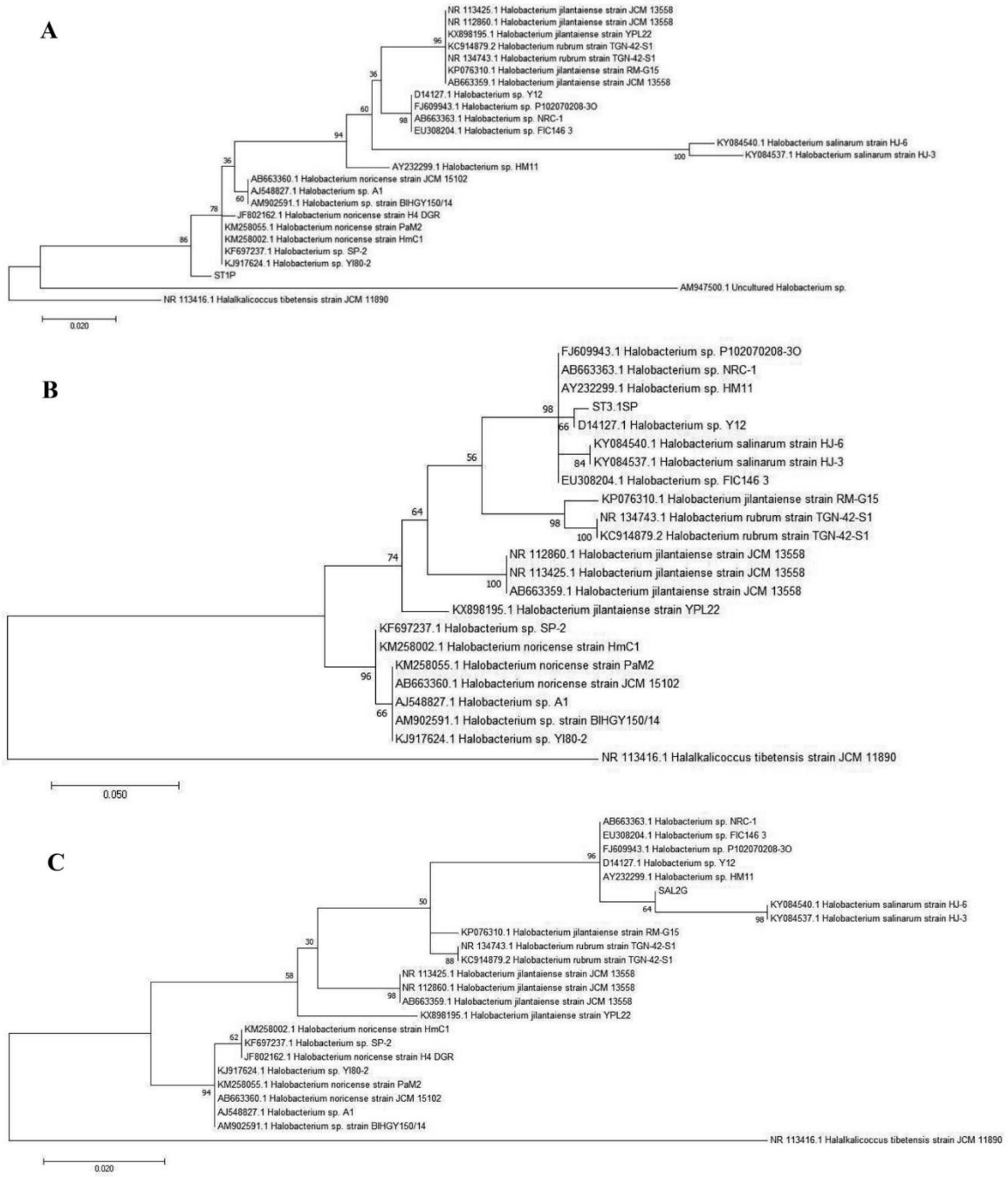


Figure 2. Phylogenetic trees created with MEGA X for nested PCR amplicon sequences. (A) ST1P; (B) ST3.1SP; (C) SAL2G

Note: The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the General Time Reversible model, with the percentage of trees in which the associated taxa clustered together shown next to the branches [17]. The trees are drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site.

Distributed under creative commons license 4.0 DOI: https://doi.org/10.30564/jfsr.v2i1.1464

Journal of Fisheries Science | Volume 02 | Issue 01 | March 2020

using Maximum Likelihood method involved 24 nucleotide sequences (Table 3).

Table 3. Sequences retrieved from NCBI database to design phylogeny tree of *Halobacterium*

Species	Strain	Accesion Number
Halalkalicoccus tibetensis	JCM 11890	NR 113416.1
Halobacterium jilantaiense	YPL22	KX898195.1
	RM-G15	KP076310.1
	JCM 13558	NR 113425.1
	JCM 13558	NR 112860.1
	JCM 13558	AB663359.1
Halobacterium noricense	JCM 15102	AB663360.1
	HmC1	KM258002.1
	PaM2	KM258055.1
	H4 DGR	JF802162.1
Halobacterium rubrum	TGN-42-S1	NR 134743.1
	TGN-42-S1	KC914879.2
Halobacterium salinarum	HJ-6	KY084540.1
	HJ-3	KY084537.1
Halobacterium sp.	Uncultured	AM947500.1
	NRC-1	AB663363.1
	BIIIGY150/14	AM902591.1
	A1	AJ548827.1
	FIC146 3	EU308204.1
	HM11	AY232299.1
	P102070208-3O	FJ609943.1
	SP-2	KF697237.1
	Y12	D14127.1
	YI80-2	KJ917624.1

All in all, assuming the criterion for differentiating bacteria with a 16S rDNA gene sequence similarity value of over 85% [29], the phylogenetic trees of *Halobacterium* were consistent with the molecular characterization and their affiliations to the respective genus.

In conclusion, Vargas and Tenefé saltworks are only such biotope in Gran Canaria, which is done only for salt production, but there is unlimited scope for commercial exploitation of salts.

Nonetheless knowledge acquired in this work opens up an interesting framework for further biotechnological studies concerning revealed bacteria and the composition of the bacterial community, as well as for studies investigating hypersaline habitats of crystallizer ponds from Gran Canaria solar salterns. The commercial exploitation of putative bacterial rhodopsin could lead to value added by product.

Acknowledgements

This research was supported by the collaboration of Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, and from the Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (Grant CGL2016-78442-C2-2-R, GOBESP2017-04 ULPGC) and co-funded by INTERREG MAC 2014-2020 programme, within the MacBio Blue project (MAC/1.1b/086).

M.C.A was supported by a predoctoral fellowship of University of Las Palmas de Gran Canaria. S.H. was supported with an Erasmus + fellowship for student mobility for traineeships

Author's contributions

P.G.J. conceived, designed and wrote the manuscript. M.C.A. conducted the phylogeny analysis. S.H. carried out microbiological assays. All the authors read and approved the manuscript.

Supplementary Figure



Pink color of the liquid phase
Salt in suspension



Orange/red color of the liquid phase
Beginning of salt precipitation without fats



Fatty supernatant on the surface

Distributed under creative commons license 4.0
DOI: https://doi.org/10.30564/jfsr.v2i1.1464

Journal of Fisheries Science | Volume 02 | Issue 01 | March 2020



Fatty supernatant including water of the crystallizer



Dry salt from the corner of the crystallizer Pink color

Supplementary Figure 1. Sampling sites order by increasing salinity and their properties

Note: A) Station 1 (ST1); Station 2 (ST2); Station 3 with fatty supernatant on the surface (ST3.1); Station 3 with fatty supernatant including water of the crystallizer (ST3.2); Dry salt (SAL2).

References

[1] Rodriguez-Valera F Ventosa A Juez G Imhoff JF. Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern[J]. Microbial Ecology, 1985, 11: 107-115.

[2] Rocha RDM Costa DF Lucena-Filho MA Bezerra RM Medeiros DH Azevedo-Silva AM Araújo CN Xavier-Filho L. Brazilian solar saltworks-ancient uses and future possibilities[J]. Aquatic biosystems, 2012, 8: 8.

[3] Gómez-Villegas P Viagra J Léon R. Characterization of the Microbial Population Inhabiting a Solar Saltern Pond of the Odiel Marshlands (SW Spain)[J]. Marine Drugs, 2018, 16: 332.

[4] Benlloch S López-López A Casamayor EO Øvreås L Goddard V Daae FL Smerdon G Massana R Joint I Thingstad F. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern[J]. Environmental Microbiology, 2002, 4: 349-360.

[5] Antón J Llobet-Brossa E Rodríguez-Valera F Amann R. Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds[J]. Environmental Microbiology, 1999, 1: 517-523.

[6] Oren A Rodríguez-Valera F. The contribution of halophilic Bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 36: 123-130.

[7] Oren A Dubinsky Z. On the red coloration of saltern crystallizer ponds. II. Additional evidence for the contribution of halobacterial pigments[J]. International Journal of Salt Lake Research, 1994, 3: 9-13.

[8] Bardavid RE Khristo P Oren A. Interrelationships between Dunaliella and halophilic prokaryotes in saltern crystallizer ponds[J]. Extremophiles, 2008, 12: 5-14.

[9] Litchfield CD. Potential for industrial products from the halophilic Archaea[J]. Journal Industrial Microbiology and Biotechnology, 2011, 38(10): 1 635-1 647.

[10] Fang CJ Ku KL Lee MH Su NW. Influence of nutritive factors on C50 carotenoids production by Haloferax mediterranei ATCC 33500 with two-stage cultivation[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(16): 6 487-6 493.

[11] Asker D Ohta Y. Haloferax alexandrinus sp. nov., an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon from a solar saltern in Alexandria (Egypt)[J]. Journal Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52(3): 729-738.

[12] Luque A Martín JL Dorta P Mayer P. Temperature trends on Gran Canaria (Canary Islands). An example of global warming over the subtropical Northeastern Atlantic[J]. Atmospheric and Climate Sciences, 2014, 4: 20-28.

[13] Garcia-Jimenez P Carrasco-Acosta M Enriquc-Payá C Alemán-López I Betancort-Rodriguez JR. Herrera-Melián JA. Composition and molecular identification of bacterial community in seawater desalination plants [J]. Advances in Microbiology, 2019, 9: 863-876.

[14] Deng Y Xu G Sui L. Isolation and characterization of halophilic bacteria and archaea from salt ponds in Hangu Saltworks, Tianjin, China[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2015, 33(4): 862-868.

[15] Barghouthi SA. A universal method for the identification of bacteria based on general PCR primers. Indian Journal of Microbiology, 2011, 51: 430-444.

[16] Thompson JD Higgins DG Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix

Distributed under creative commons license 4.0 DOI: https://doi.org/10.30564/jfsr.v2i1.1464

Journal of Fisheries Science | Volume 02 | Issue 01 | March 2020

Choice[J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22: 4673-4680.

[17] Nei M Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics[B]. Oxford University Press, New York, 2000.

[18] Kumar S Stecher G Li M Knyaz C Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms[J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35: 1547-1549.

[19] Felsenstein J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39: 783-791.

[20] Janda JM Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45: 2761-2764.

[21] Fredriksson NJ Hermansson M Wilén BM. The choice of PCR primers has great impact on assessments of bacterial community diversity and dynamics in a wastewater treatment plant[J]. PLoS One, 2013, 8: e76431.

[22] Rohban R Amoozegar MA Ventosa A. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009, 36: 333-340.

[23] Martínez-Cánovas MJ Quesada E Llamas I Béjar V. Halomonas ventosae sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54: 733-737.

[24] Bayley S Kushner D. The ribosomes of the extremely halophilic bacterium, Halobacterium cutirubrum[J]. Journal of Molecular Biology, 1964, 9: 654IN3-669IN4.

[25] Williams WD. Salinity as a determinant of the structure of biological communities in salt lakes[J]. Hydrobiologia, 1998, 381: 191-201.

[26] Kushwaha S Kates M Martin W. Characterization and composition of the purple and red membrane from Halobacterium cutirubrum[J]. Canadian Journal of Biochemistry, 1975, 53: 284-292.

[27] Haxby RE Tackaert W. Workshop report, Role of Artemia in salt operations: 291-293. In: Artemia research and its applications [R]. Sorgeloos P Bengtson DA Decleir W Jaspers E (Eds), Universa, Press, Wettern, Belgium, 1987, 3(556).

[28] Sorgeloos P. Brine shrimp Artemia in coastal salt works hydrobiological key to improved slat production, and inexpensive source of food for vertically integrated aquaculture[R]. International meeting Salt work Conversion for Aquaculture, Trapane, Italy, May 9-11. In Artemia Newsletter, 1986, 3: 50-53.

[29] Stackebrandt E and Goebel BM. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16s rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44: 846-849.

Distributed under creative commons license 4.0

DOI: https://doi.org/10.30564/jfsr.v2i1.1464

REFERENCIAS

Abbes, M., Baati, H., Guermazi, S., Messina, C., Santulli, A., Gharsallah, N., Ammar, E., 2013. BMC Complement. Altern. Med., 13(1), 255.

Amoozegar, M.A., Siroosi, M., Atashgahi, S., Smidt, H., Ventosa, A., 2017. Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes. Microbiol., 163(5), 623-645.

Antón, J., Llobet-Brossa, E., Rodríguez-Valera, F., Amann, R., 1999. Fluorescence *in situ* hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. Environ. Microbiol., 1(6), 517-523.

Asker, D., Ohta, Y., 2002. *Haloferax alexandrinus* sp. nov., an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon from a solar saltern in Alexandria (Egypt). Int. J. Syst. Evol. Micr., 52(3), 729-738.

Baati, H., Guermazi, S., Gharsallah, N., Sghir, A., Ammar, E., 2010. Microbial community of salt crystals processed from Mediterranean seawater based *on 16S rRNA* analysis. Can. J. Microbiol., 56(1), 44-51.

Benlloch, S., López-López, A., Casamayor, E.O., Øvreås, L., Goddard, V., Daae, F.L., Smerdon, G., Massana, R., Joint, I., Thingstad, F., 2002. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. Environ. Microbiol., 4(6),349-360.

Bowers, K. J., Wiegel, J., 2011. Temperature and pH optima of extremely halophilic archaea: a mini-review. Extremophiles, 15(2), 119-128.

Chasanah, E., Marraskuranto, E., Pratitis, A., Nursid, M., 2021. Comparative diversity analysis of halophiles at two polar saltern systems in Indramayu, West Java, Indonesia. Lett. Appl. Microbiol., 72(2), 157-166.

Corcelli, A., 2014. Biotechnological potential of solar salt works: focus on Squarebop I bacteriorhodopsin. En *Solar salt works & the economic value of biodiversity_Proceedings of the international conference*, Ed. Lauret, S., pp. 9-12.

DasSarma, S., Arora, P., 2001. Halophiles. Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing Group, Londres, 1-9.

Deng, Y., Xu, G., Sui., L., 2015. Isolation and characterization of halophilic bacteria and archaea from salt ponds in Hangu Saltworks, Tianjin, China. Chin. J. Oceanol. Limn., 33(4). 862-868.

Dummer, A.M., Bonsall, J.C., Cihla, J.B., Lawry, S.M., Johnson, G.C., Peck, R.F., 2011. Bacterioopsin-mediated regulation of bacterioruberin biosynthesis in *Halobacterium salinarum*. J. Bacteriol., 193(20), 5658-5667.

Fang, C.J., Ku, K.L., Lee, M.H., Su, N.W., 2010. Influence of nutritive factors on C50 carotenoids production by *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 with two-stage cultivation. Bioresour. Technol., 101(16), 6 487-6 493.

Fernández, A.B., Vera-Gargallo, B., Sánchez-Porro, C., Ghai, R., Papke, R.T., Rodriguez-Valera, F., Ventosa, A., 2014. Comparison of prokaryotic community structure from Mediterranean and Atlantic saltern concentrator ponds by a metagenomic approach. Front. Microbiol., 5, 196.

Fukushima, T., Mizuki, T., Echigo, A., Inoue, A., Usami, R., 2005. Organic solvent tolerance of halophilic α-amylase from a Haloarchaeon, *Haloarcula sp*. strain S-1. Extremophiles, 9(1), 85-89.

Garcia-Jimenez, P., García-Maroto, F., Garrido-Cárdenas, J.A., Ferrándiz, C., Robaina, R.R., 2009. Differential expression of the ornithine decarboxylase gene during carposporogenesis in the thallus of the red seaweed *Grateloupia imbricata* (Halymeniaceae). J. Plant Physiol., 166(16), 1745-1754.

Ghanmi, F., Carré-Mlouka, A., Zarai, Z., Mejdoub, H., Peduzzi, J., Maalej, S., Rebuffat, S., 2020. The extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* ETD5 from the solar saltern of Sfax (Tunisia) produces multiple halocins. Res. Microbiol., 171(2), 80-90.

Gómez-Villegas, P., Viagra, J., Léon, R., 2018. Characterization of the Microbial Population Inhabiting a Solar Saltern Pond of the Odiel Marshlands (SW Spain). Mar. Drugs, 16, 332.

González, A., 2010. Lípidos polares de arqueas halófilas: elaboración y estudio de arqueosomas como sistema de vehiculización de antioxidantes naturales obtenidos de alpeorujo. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, pp. 212.

González-Torres, P.I., 2015. Estudio de los mecanismos de diversificación intraespecífica de *Salinibacter ruber*. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante, pp. 310.

Grant, S., Grant, W.D., Jones, B.E., Kato, C., Li, L., 1999. Novel archaeal phylotypes from an East African alkaline saltern. Extremophiles, 3(2), 139-145.

Gropp, F., Betlach, M.C., 1994. The *bat* gene of *Halobacterium halobium* encodes a trans-acting oxygen inducibility factor. Proc. Natl. Acad. Sci., 91(12), 5475-5479.

Hall, T.A., 1999, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser., Information Retrieval Ltd., Londres, pp. 95-98.

Herrero Lorenzo, M.P., 2015. Estudio de las salinas de la bahía gaditana. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, pp. 708.

Javor, B., 1989. Hypersaline Environments. Springer, Heidelberg, Berlín, pp. 319.

Jehlička, J., Edwards, H.G.M., Oren, A., 2013. Bacterioruberin and salinixanthin carotenoids of extremely halophilic Archaea and Bacteria: a Raman spectroscopic study. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc., 106, 99-103.

Klempay, B., Arandia-Gorostidi, N., Dekas, A.E., Bartlett, D.H., Carr, C.E., Doran, P.T., Dutta, A., Erazo, N., Fisher, L.A., Glass, J.B., Pontefract, A., Som, A.M., Wilson, J.M., Schmidt, B.E., Bowman, J.S., 2021. Microbial diversity and activity in Southern California salterns and bitterns: analogues for remnant ocean worlds. Environ. Microbiol., 00, 00-00.

Krah, M., Marwan, W., Vermeglio, A., Oesterhelt, D., 1994. Phototaxis of *Halobacterium salinarium* requires a signalling complex of sensory rhodopsin I and its methyl-accepting transducer HtrI. EMBO J., 13(9), 2150-2155.

Krebs, M.P., Khorana, H.G., 1993. Mechanism of light-dependent proton translocation by bacteriorhodopsin. J. Bacteriol., 175(6), 1555-1560.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol. Boil. Evol., 35, 1547-1549.

Kushwaha, S., Kates, M., Martin, W., 1975. Characterization and composition of the purple and red membrane from *Halobacterium cutirubrum*. Can. J. Biochem., 53, 284-292.

Kushwaha, S.C., Kates, M., Porter, J. W., 1976. Enzymatic synthesis of C40 carotenes by cell-free preparation from *Halobacterium cutirubrum*. Can. J. Biochem. 54(9),816–823

Lamosa, P., Burke, A., Peist, R., Huber, R., Liu, M.Y., Silva, G., Rodrigues-Pousada, R., Le Gall, J., Maycock, C., Santos, H., 2000. Thermostabilization of proteins by diglycerol phosphate, a new compatible solute from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. Appl. Environ. Microbiol. 66(5), 1974-1979.

Litchfield, C.D., 2011 Potential for industrial products from the halophilic Archaea. J. Ind. Microbiol. Biot., 38(10), 1635-1647.

Luengo, A., Marín, C., 1994. El jardín de la sal. Santa Cruz de Tenerife: Ecotopía Ediciones Tenydea, SL., pp. 249.

Luque, A., Martín, J.L., Dorta, P., Mayer, P., 2014. Temperature trends on Gran Canaria (Canary Islands). An example of global warming over the subtropical Northeastern Atlantic. Atmos. Climate Sci., 4, 20-28.

Ma, Y., Zhang, W., Xue, Y., Zhou, P., Ventosa, A., Grant, W.D., 2004. Bacterial diversity of the Inner Mongolian Baer Soda Lake as revealed by *16S rRNA* gene sequence analyses. Extremophiles, 8(1), 45-51.

Mancinelli, R.L., Horneck, G., Panitz, C., Martins, Z., 2015. The affect of the space environment on the survival of *Halorubrum chaoviator* and *Synechococcus* (Nägeli): data from the Space Experiment OSMO on EXPOSE-R. Int. J. Astrobiol., 14(1), 123.

Mani, K., Taïb, N., Hugoni, M., Bronner, G., Bragança, J.M., Debroas, D., 2020. Transient Dynamics of Archaea and Bacteria in Sediments and Brine Across a Salinity Gradient in a Solar Saltern of Goa, India. Front. Microbiol., 11, 1891.

Marihati, Harihastuti, N., Muryati, N., Eddy, S. Danny, W.H., 2014. The use halophilic bacteria as biocatalisator to improve the quality and productivity of NaCl salt in crystalization pond. J. Indust. Res., 8, 191-196.

Mesbah, N.M., Wiegel, J., 2012. Life under multiple extreme conditions: diversity and physiology of the halophilic alkalithermophiles. Appl. Environ. Microbiol., 78(12), 4074-4082.

Messing, J., 1983. New M13 vectors for cloning. Method. Enzymol., 101, 20-78.

Montitsche, L., Driller, H., Galinski, E., 2000. EE. UU. Patente Nº 060071. Ectoine and ectoine derivatives as moisturizers in cosmetics.

Murray, M.G., Thompson, W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res., 8, 4321-4325.

Naziri, D., Hamidi, M., Hassanzadeh, S., Tarhriz, V., Zanjani, B.M., Hossein, N., Hejazi, M.A., Hejazi, M.S., 2014. Analysis of carotenoid production by *Halorubrum sp*. TBZ126; an extremely halophilic archeon from Urmia Lake. Adv. Pharm. Bull., 4(1), 61.

Nei, M., Kumar, S., 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, Nueva York, pp. 329.

Neshich, I.A., Kiyota, E., Arruda, P., 2013. Genome-wide analysis of lysine catabolism in bacteria reveals new connections with osmotic stress resistance. ISME J., 7(12), 2400-2410.

Oh, D., Porter, K., Russ, B., Burns, D., Dyall-Smith, M., 2010. Diversity of *Haloquadratum* and other haloarchaea in three, geographically distant, Australian saltern crystallizer ponds. Extremophiles, 14(2), 161-169.

Oren, A., 1997. Mycosporine-like amino acids as osmotic solutes in a community of halophilic cyanobacteria. Geomicrobiol. J., 14(3), 231-240.

Oren, A., 2006. Biotechnological applications and potentials of halophilic microorganisms. En *Halophilic Microorganisms and their Environments*, Ed. Oren, A. Springer Science & Business Media, Berlín, pp. 357-388.

Oren, A., 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. Saline Syst., 4(1), 1-13.

Oren, A., 2013. Salinibacter: an extremely halophilic bacterium with archaeal properties. FEMS Microbiol. Lett., 342(1), 1-9.

Oren, A., Dubinsky, Z., 1994. On the red coloration of saltern crystallizer ponds. II. Additional evidence for the contribution of halobacterial pigments. J. Salt Lake Res., 3(1), 9-13.

Oren, A., Rodríguez-Valera, F., 2001. The contribution of halophilic Bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds. FEMS Microbiol. Ecol., 36,123-130.

Pašić, L., Bartual, S.G., Ulrih, N. P., Grabnar, M., Velikonja, B.H., 2005. Diversity of halophilic archaea in the crystallizers of an Adriatic solar saltern. FEMS Microbiol. Ecol., 54(3), 491-498.

Peck, R.F., Johnson, E. A., Krebs., M. P., 2002. Identification of a lycopene -cyclase required for bacteriorhodopsin biogenesis in the archaeon *Halobacterium salinarum*. J. Bacteriol. 184, 2889–2897.

Post, F.J., Collins, N.F., 1982. A preliminary investigation of the membrane lipid of *Halobacterium halobium* as a food additive. J. Food Biochem., 6(1), 25-38.

Roberts, M.F., 2005. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. Saline Syst., 1(1), 1-30.

Rocha, R.D.M., Costa, D.F., Lucena-Filho, M.A., Bezerra, R.M., Medeiros, D.H., Azevedo-Silva, A.M., Araújo, C.N., Xavier-Filho, L., 2012. Brazilian solar saltworks-ancient uses and future possibilities. Aquat. Biosyst., 8,8.

Sy, J., Kumar, A., Shouche, Y.S., Sulochana, M.B., 2013. Culturable diversity of extremely halophilic bacteria from west coast of karnataka, india jayachandra sy, anil kumar s, shouche ys 2 and sulochana mb. Int. J. Biol. Pharm. Allied Sci., 2(2), 391-405.

Tarasov, V.Y., Besir, H., Schwaiger, R., Klee, K., Furtwängler, K., Pfeiffer, F., Oesterhelt, D., 2008. A small protein from the bop–brp intergenic region of *Halobacterium salinarum* contains a zinc finger motif and regulates *bop* and *crtB1* transcription. Mol. Microbiol., 67(4), 772-780.

Thombre, R.S., Shinde, V.D., Oke, R.S., Dhar, S.K., Shouche, Y.S., 2016. Biology and survival of extremely halophilic archaeon *Haloarcula marismortui* RR12 isolated from Mumbai salterns, India in response to salinity stress. Sci. Rep., 6(1), 1-10.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res., 22(22), 4673-4680.

Tsiamis, G., Katsaveli, K., Ntougias, S., Kyrpides, N., Andersen, G., Piceno, Y., Bourtzis, K, 2008. Prokaryotic community profiles at different operational stages of a Greek solar saltern. Res. Microbiol., 159(9-10), 609-627.

Ventosa, A., Arahal, D.R., 2009. Physico-chemical characteristics of hypersaline environments and their biodiversity. Extremophiles, 2, 247-262.

Ventosa, A., Fernández, A.B., León, M.J., Sánchez-Porro, C., Rodriguez-Valera, F., 2014. The Santa Pola saltern as a model for studying the microbiota of hypersaline environments. Extremophiles, 18(5), 811-824.

Webb, K.M., DiRuggiero, J., 2012. Role of Mn^{2+} and compatible solutes in the radiation resistance of thermophilic bacteria and archaea. Archaea, pp.1-11.

Williams, W.D., 1998. Salinity as a determinant of the structure of biological communities in salt lakes. Hydrobiologia, 381(1), 191-201.

Yatsunami, R., Ando, A., Yang, Y., Takaichi, S., Kohno, M., Matsumura, Y., Ikeda, H., Fukui, T., Nakasone, K., Fujita, N., Sekine, m., Takashina, T., Nakamura, S., 2014. Identification of carotenoids from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. Front. Microbiol. 5, 100.

ANEXO I.2

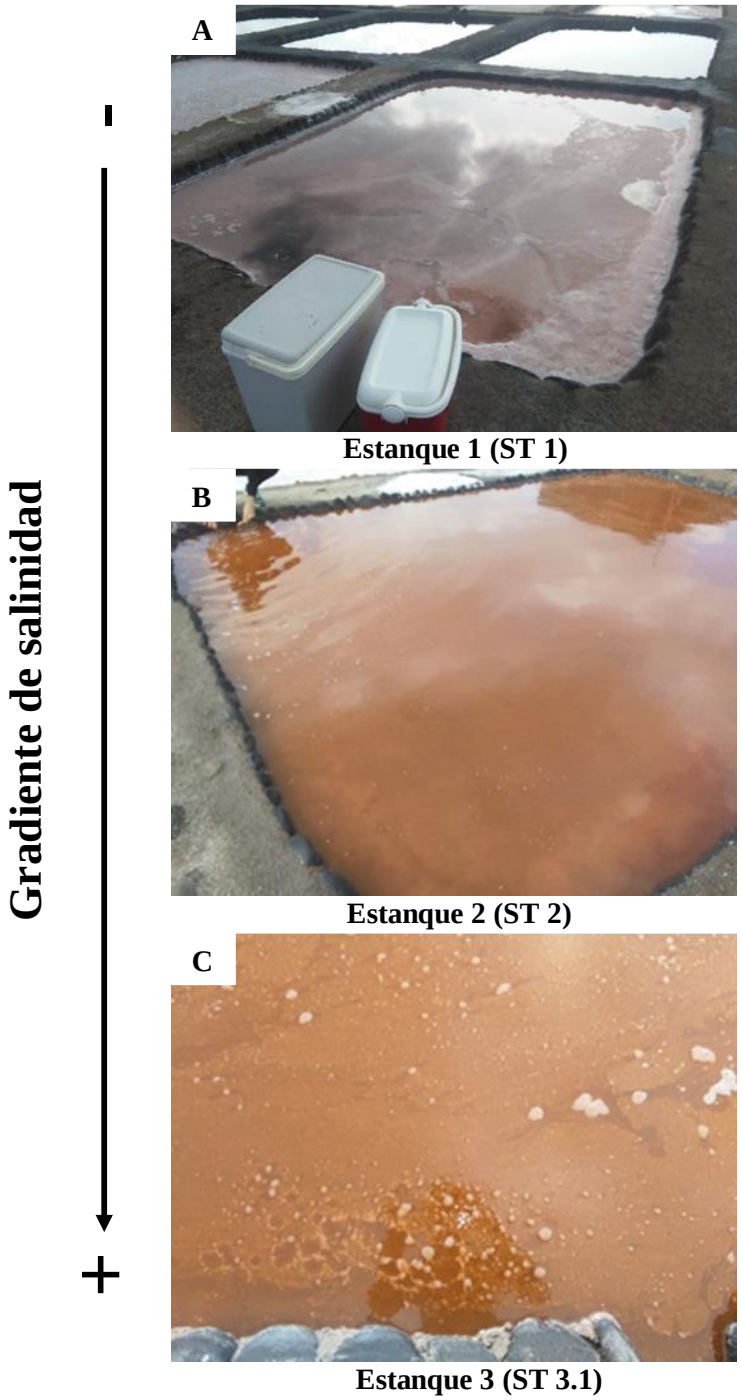


Figura A.I.2.1. Puntos de muestreo ordenados acorde al incremento de salinidad. **A.** Estanque 1 (ST1) caracterizado por el color rosácea de las aguas de salmuera con fase líquida y sal en suspensión; **B.** Estanque 2 (ST2), caracterizado por aguas salinas de color naranja/rojo con una fase líquida presentando la precipitación de sal inicial sin presencia de capa lipídica; **C.** Estanque 3 (ST3.1) presentando capa lipídica superficial.

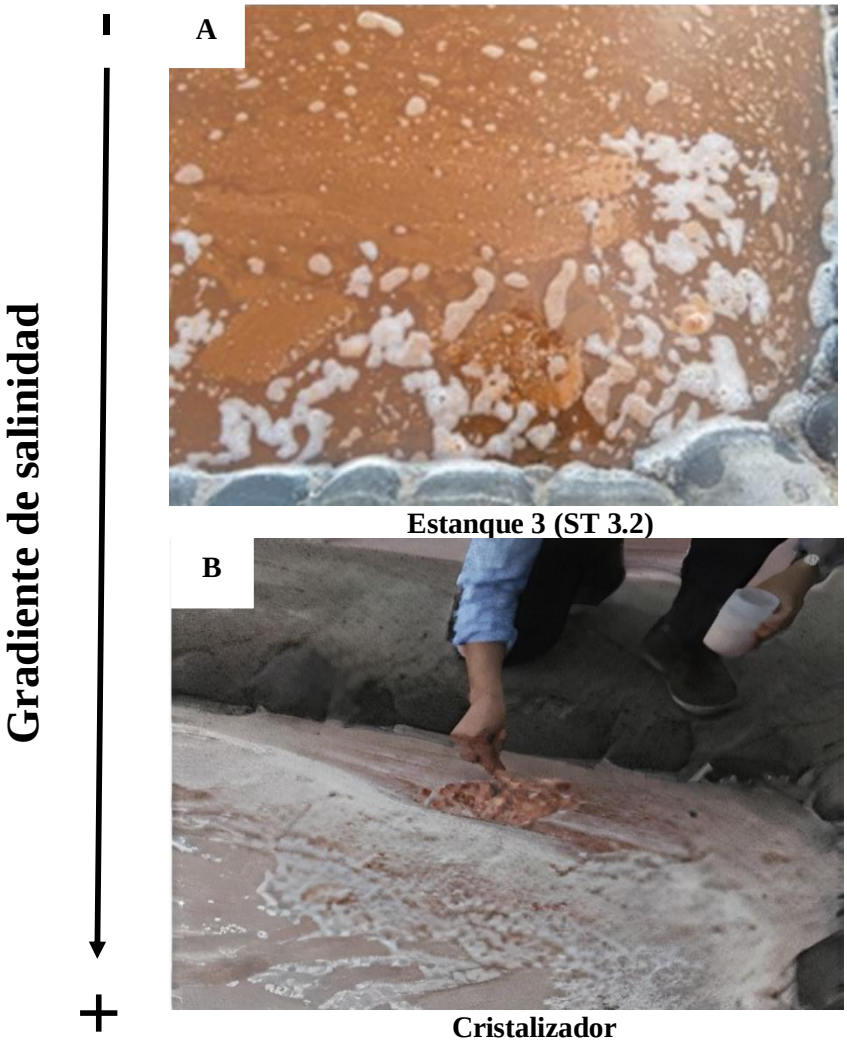
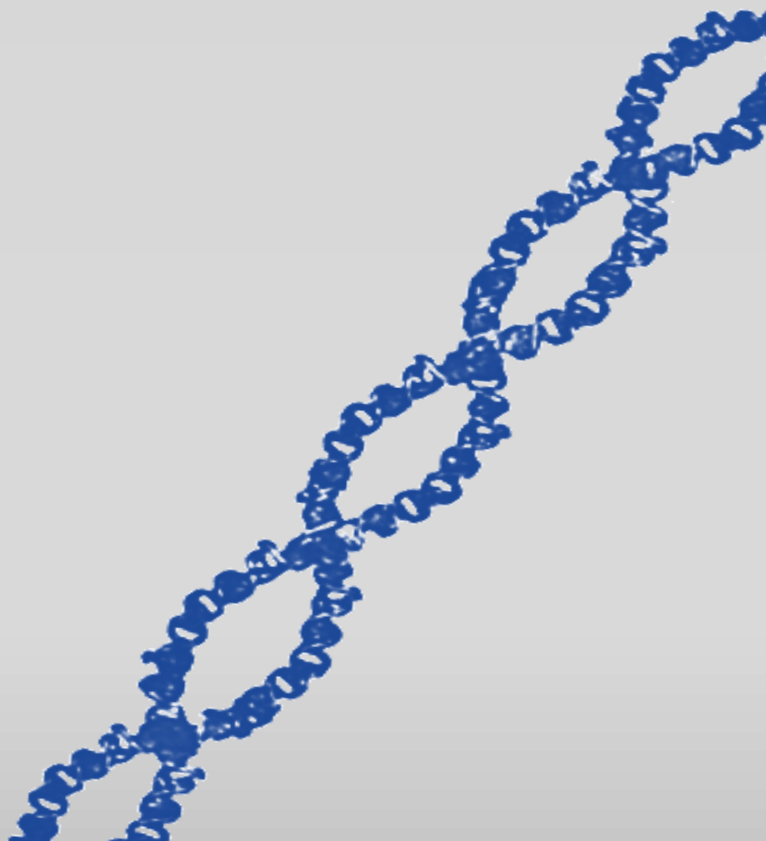
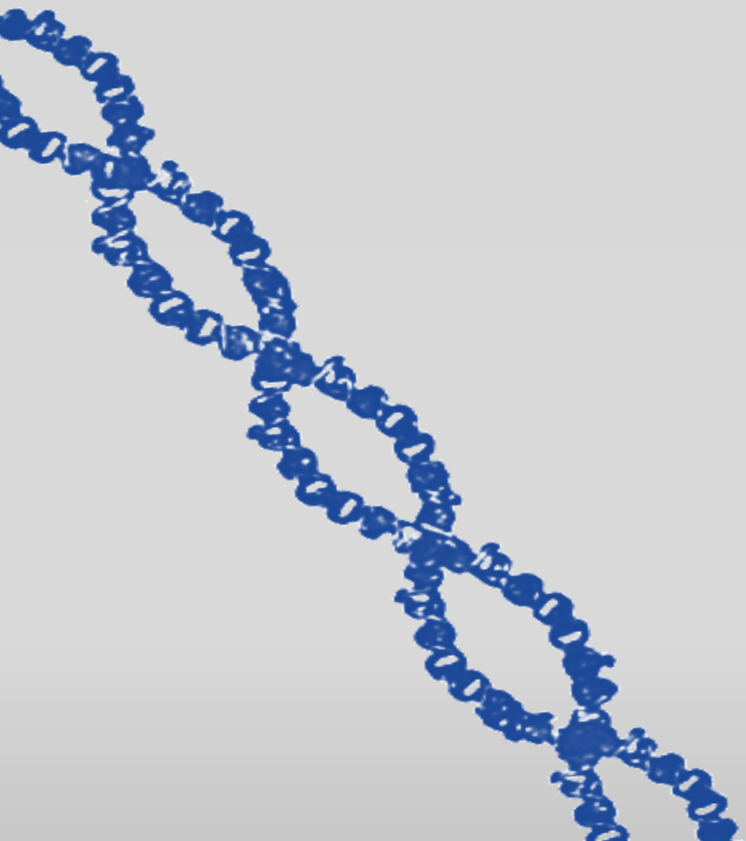


Figura A.I.2.2. Puntos de muestreo ordenados acorde al incremento de salinidad. **A.** Estanque 3 (ST3.2) presencia de una capa lipídica y agua de salmuera; **B.** Muestreo cristalizador (C).

CAPÍTULO II

Estudio de la estructura de las comunidades bacterianas de un humedal artificial de base orgánica de tratamiento de aguas residuales domésticas





Capítulo II

Estudio de la estructura de las comunidades bacterianas de un humedal artificial de base orgánica de tratamiento de aguas residuales domésticas

Palm tree mulch as substrate for primary treatment wetlands processing high strength urban wastewater. Journal of environmental management.

Herrera-Melián, J.A., González-Bordón, A., Martín-González, M.A., García-Jiménez, P., Carrasco-Acosta, M., Araña, J., 2014. Journal of environmental management, 139, 22-31

The Effect of Plants on Pollutant Removal, Clogging, and Bacterial Community Structure in Palm Mulch-Based Vertical Flow Constructed Wetlands.

Carrasco-Acosta, M., Garcia-Jimenez, P., Melián, J. A.H., Peñate-Castellano, N., Rivero-Rosales, A. 2019, Sustainability, 11(3), 632.

Multistage Horizontal Subsurface Flow vs. Hybrid Constructed Wetlands for the Treatment of Raw Urban Wastewater.

Herrera-Melián, J.A., Mendoza-Aguiar, M., Alonso-Guedes, R., García-Jiménez, P., Carrasco-Acosta, M., Ranieri, E., 2020.Sustainability, 12(12), 5102.

II.1 | INTRODUCCIÓN

Las bacterias se agrupan en comunidades altamente dinámicas tanto en el tiempo como en el espacio, y gracias a la diversidad metabólica de las especies que las configuran son capaces de adaptarse a condiciones ambientales cambiantes (Le Borgne & Avitia, 2014). El estudio de estas comunidades tiene como principales objetivos conocer i) la diversidad bacteriana y entender cómo interactúan diferentes grupos de estos microorganismos en una comunidad; ii) las funciones de estos procariotas en la comunidad y el ecosistema en diferentes ambientes (p. ej. aire, suelo, agua, o ambientes extremos); y, iii) aplicar estos conocimientos en beneficio de la sociedad (Maier *et al.*, 2009).

Para este fin pueden implementarse una amplia variedad de técnicas, tanto dependientes como independientes de cultivo, siendo algunas de ellas las presentadas en la Figura II.1. Dentro de estas metodologías, destacan las técnicas

moleculares que, a diferencia de aquellas de cultivo, son idóneos para la valoración de la estructura de la comunidad bacteriana de diversos ambientes (Li *et al.*, 2015; Brower *et al.*, 2017; Hua *et al.*, 2018; Kadam *et al.*, 2018). Esta idoneidad viene dada por la sensibilidad y especificidad que estos métodos moleculares ofrecen.

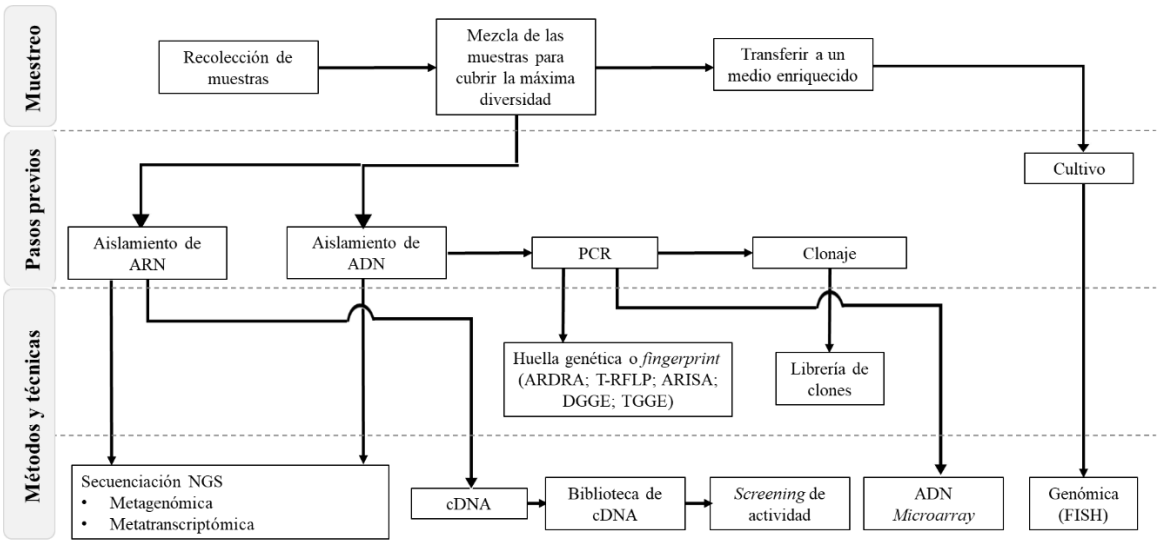


Figura II.1. Esquema resumen de las metodologías de estudio de la diversidad y funciones de los microorganismos en la comunidad, considerando metodologías y técnicas tanto dependiente como independiente del cultivo (adaptada de Mukherjee & Reddy, 2020).

El desarrollo en los últimos años de la denominada tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS, *Next Generation Sequencing*), permite obtener millones de secuencias de ácidos nucleicos a una velocidad sin precedentes. En concreto, dentro de la microbiología ambiental, esta tecnología desempeña un papel crucial en el análisis eficiente de perfiles génicos bacterianos complejos. A rasgos generales, la NGS permite comparar el genoma completo de una comunidad y distinguir los genes que podrán estar presentes en ese acervo genético (Le Borgne & Avitia, 2014; Ren *et al*., 2016; Tsilimigras & Fodor, 2016; Fan *et al*., 2018).

Asimismo, otros métodos derivados como la metatranscriptómica, la metaproteómica y la metabolómica han permitido ahondar en el conocimiento de las comunidades microbianas con un papel relevante, como por ejemplo, en el estudio de la biorremediación de los contaminantes ambientales (Shekhar *et al*., 2020).

Sin embargo, cabe destacar que, aunque este tipo de tecnologías de nueva generación están permitiendo la consecución de grandes logros en el campo de la microbiología, es destacable que existen desventajas inherentes a estas. La principal, es que las mismas requieren de un conocimiento bioinformático profundo, no solo para establecer las conocidas como *pipelines* de trabajo –rutas bioinformáticas creadas para segmentar datos e incrementar el rendimiento del sistema de análisis–, sino también para otorgar el significado biológico a los resultados, siendo en ocasiones inabordable por la mayoría de laboratorios (Rezasoltani *et al.*, 2020).

Otras de las técnicas más utilizadas para el estudio de las comunidades bacterianas son las llamadas técnicas de huella génica. Entre ellas nos encontramos i) la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE); ii) la electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE); iii) el análisis del espaciador intergénico ribosómico automatizado (ARISA); iv) el polimorfismo de conformación de una sola hebra (SSCP); v) el análisis de restricción del ADN ribosómico amplificado (ARDRA); y vi) el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP), entre otras.

Estas técnicas de valoración rápida de las dinámicas de la comunidad bacteriana –también conocidas como perfiles genéticos, huellas dactilares o *fingerprinting*–, aprovechan las diferentes propiedades del material genético obtenido, como por ejemplo la longitud de la secuencia, la presencia o ausencia de sitios de restricción, o el comportamiento de desnaturalización de los fragmentos (Llames, 2011). Así, la comparación e interpretación de los perfiles de huella genética entre comunidades bacterianas permite identificar y valorar los cambios acontecidos en la microbiota e inferir los factores que dieron lugar a los mismos. Las más relevantes se detallan a continuación.

La técnica de **DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)** permite mediante el estudio de las secuencias obtenidas identificar los miembros dominantes en la comunidad, convirtiéndose esta característica en su principal

aplicación en el mundo de la microbiología ambiental (Lindström & Leskinen, 2002).

El procedimiento experimental de esta técnica consiste en amplificar los genes *16S rRNA* presentes en el ADN ambiental. Una vez obtenidos los fragmentos, estos son separados de acuerdo a su punto de desnaturalización, o *melting point*, en un gel de acrilamida que dispone de un gradiente desnaturalizante generado mediante una concentración optimizada de formamida y urea (Figura II.2).

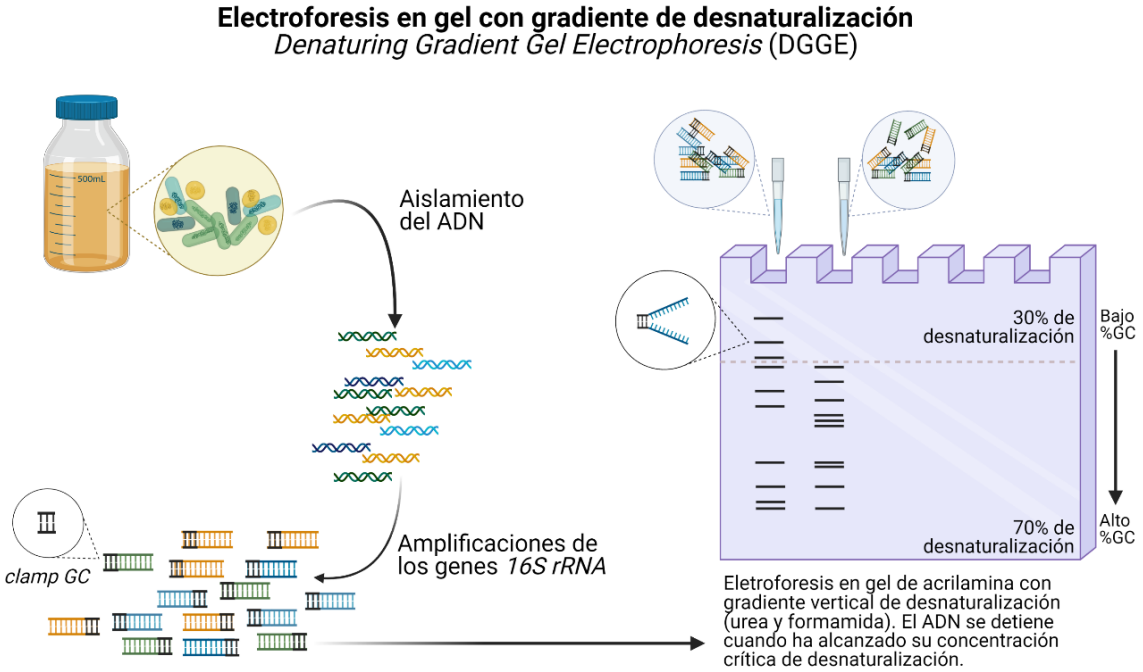


Figura II.2. Procedimiento experimental del método de huella genética Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE, *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (adaptada de Crump *et al.*, 2004).

A partir del gradiente desnaturalizante se separan los fragmentos de ADN cuya longitud es similar, pero su secuencia de nucleótidos es diferente. La separación adecuada de los productos de amplificación desnaturalizados se lleva a cabo gracias a una pinza GC o *clamp GC* (Figura II.2) –secuencia de nucleótidos con un alto contenido de guaninas y citosinas–, la cual se adhiere fuertemente a su secuencia complementaria. Estas pinzas GC son difíciles de desnaturalizar por el gradiente creado en el gel de acrilamida. De esta manera, las secuencias *clamp* GC permiten la correcta desnaturalización de la doble hebra de los fragmentos *target*

en el gel de acrilamida. Además, el método DGGE se caracteriza por permitir la escisión de las bandas de interés del gel de acrilamida, para su clonación y correspondiente secuenciación.

Por otro lado, el método de huella genética **ARISA (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*)** se caracteriza por ser rápido y efectivo, resultando especialmente útil en aquellos estudios de ecología bacteriana que requieren de una alta resolución espacial y temporal en el análisis (Llames, 2011). Además, este método brinda la oportunidad de identificar aquellas bacterias donde la valoración, a nivel de género o especie, a partir del gen *16S rRNA* se hace difícil por la baja variabilidad entre sus regiones hipervariables (Scheinert *et al.*, 1996; Saro *et al.*, 2018). Para valorar las poblaciones bacterianas, esta técnica utiliza los cambios tanto en la longitud como en la secuencia de nucleótidos del espacio intergénico comprendido entre las subunidades pequeña y grande del ribosoma de procariotas (16S rRNA y 23S rRNA, respectivamente). Concretamente, la heterogeneidad de este espacio intergénico (ITS, *Internal Transcribed Spacer*) entre las especies bacterianas viene dada principalmente por la ausencia, en las bacterias Gram +, de secuencias que codifican para el ARN de transferencia (ARNt), que en el caso de las Gram - se localizada en estos ITS (Liao, 2000).

Respecto al procedimiento experimental, como se presenta en la Figura II.3, se pueden realizar dos rutas, a partir de las cuales se obtendrán dos tipos de perfiles. Ambas se inician con la extracción del ADN y la amplificación con cebadores específicos de la región intergénica objetivo. En la primera de ellas (Ruta 1, Figura II.3), los resultados se valorarán en una electroforesis horizontal de gel de agarosa, la cual permite la escisión de las bandas del mismo. Por el contrario, en la segunda vía (Ruta 2, Figura II.3), la evaluación de los fragmentos se llevará a cabo mediante el marcaje de los oligos con fluoróforos y la posterior electroforesis capilar realizada en un secuenciador automático, que resultará en un electroferograma (Figura II.3). Estos oligos marcados con fluoróforos, que emiten fluorescencia a longitudes de onda concretas cuando son excitados con luz, permitirán realizar una

separación más precisa de los fragmentos en comparación con la primera ruta (Figura II.3).

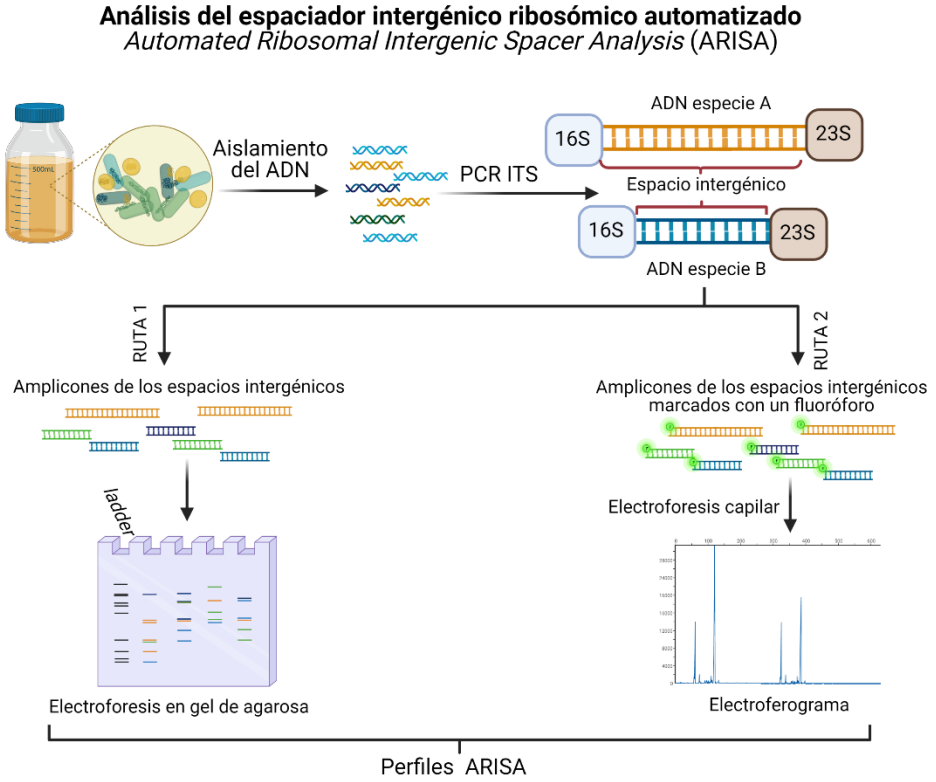


Figura II.3. Procedimiento experimental del método Análisis del Espaciador Intergénico Ribosómico Automatizado (ARISA, *Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) (adaptada de Panigrahi *et al*., 2018).

Otro de los métodos es el análisis **ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*)**. Mediante este método se pueden caracterizar comunidades bacterianas de diferentes ambientes sin grandes costes de tiempo (Pukall *et al*., 1998). Ejemplos de ello son los estudios reportados por Cho y colaboradores (2003), en ecosistemas acuáticos de aguas subterráneas, y, por Masseret y Sukenik (2008), donde analizaron los cambios en la estructura de las comunidades bacterianas en el agua de mar.

En concreto, como se observa en la Figura II.4, esta técnica consiste en la generación de patrones de bandas, o huella genética, a partir de la digestión con endonucleasas de restricción de productos amplificados del gen *16s rRNA*, seguida de una electroforesis en gel de mezcla de agarosas (Mukherjee & Reddy, 2020).

Cabe destacar que, el principal uso de esta técnica consiste en la identificación de grupos bacterianos específicos. De ahí que, la técnica ARDRA

se utilizara por primera vez para identificar bacterias de importancia clínica, centrándose estas investigaciones en un sólo grupo bacteriano (Vaneechoutte *et al*., 1993).

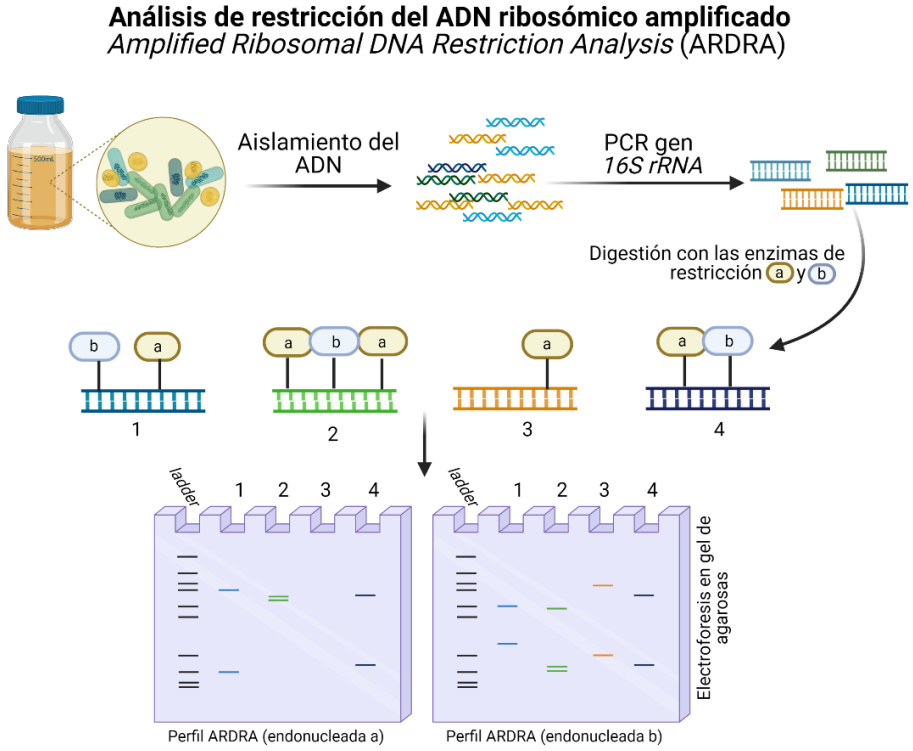


Figura II.4. Procedimiento experimental del método huella genética de Análisis de Restricción del ADN Ribosómico Amplificado (ARDRA, *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) (adaptada de Panigrahi *et al*., 2018).

Respecto al método *fingerprint* **T-RFLP** (***Terminal-Restriction Fragments Length Polymorphism*)**, como su nombre indica, mide el polimorfismo de tamaño de los fragmentos de restricción terminales de un marcador molecular amplificado mediante PCR (Marsh, 1999). La versatilidad de este método es amplia, siendo uno de los métodos más utilizados para el estudio de comunidades microbianas en ambientes acuáticos, como por ejemplo, de comunidades bacterioplanctónicas en aguas marinas (Moeseneder *et al*., 1999), de comunidades bacterianas de aguas de desecho de bodegas de vino (Ramod *et al*., 2013), de comunidades acuáticas en marismas (Kim *et al*., 2020), así como de comunidades de aguas residuales domésticas regeneradas (Cui *et al.*, 2018).

Como la mayoría de los métodos de huella genética mencionados anteriormente, el T-RFLP se basa en la amplificación del gen *16S rRNA*. Su

procedimiento experimental (Figura II.5) se inicia con el aislamiento del ADN ambiental y la amplificación, en este caso, mediante uno de los *primers* del juego de cebadores marcado con un fluoróforo en el extremo 5'.

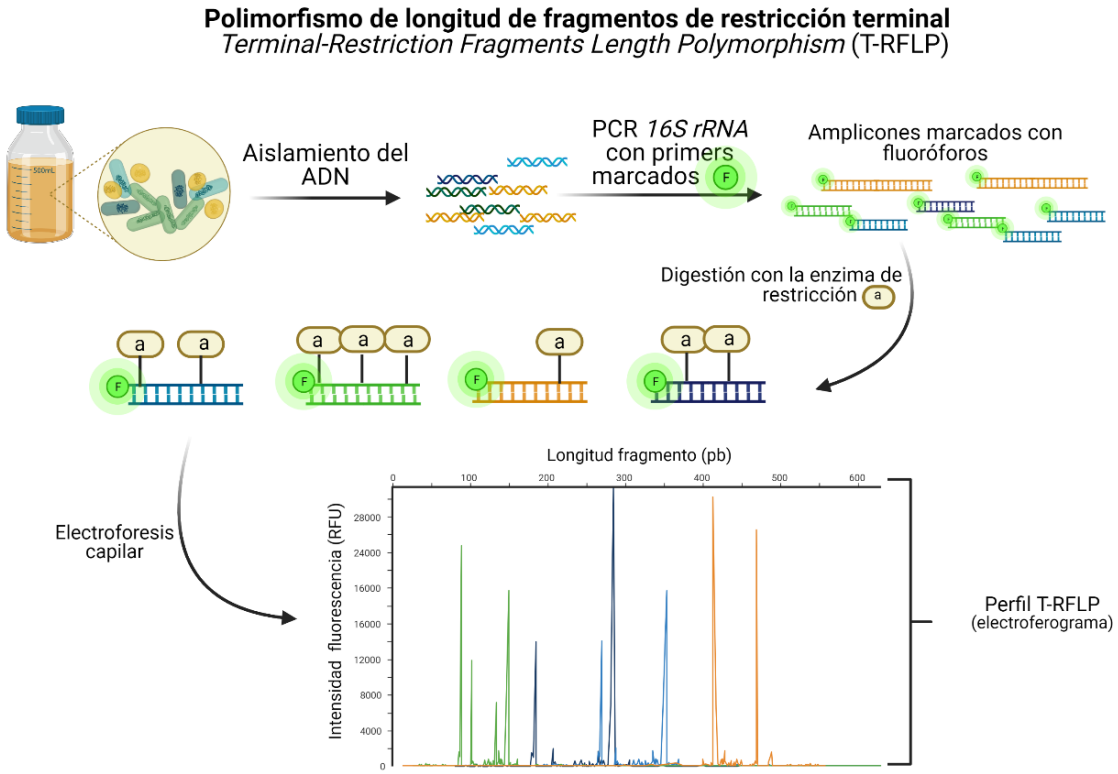


Figura II.5. Procedimiento experimental del método *fingerprint* de Análisis de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Terminales de Restricción (T-RFLP, *Terminal-Restriction Fragments Length Polymorphism*).

Posteriormente, el producto de amplificación marcado es digerido con enzimas de restricción, creando así, un patrón de bandas único y característico de cada comunidad bacteriana. Como resultado, se obtiene la huella genética o patrón de fragmentos de restricción terminales (T-RFs, *Terminal-Restriction Fragments*). Este perfil se conforma por medio de la separación de los T-RFs a partir de una electroforesis capilar realizada en un secuenciador automático. Finalmente, de la visualización, del tratamiento de los datos y del estudio estadístico de los patrones de T-RFs, se obtiene el análisis T-RFLP, a través del cual se valora la diversidad y la dinámica de las comunidades bacterianas.

ARDRA y T-RFLP requieren cebadores específicos de los organismos de interés, siendo el gen *16S rRNA* el más utilizado para este fin. Además, en este trabajo

introducimos otro gen de análisis: el gen codificante de la enzima β-galactosidasa (*lacZ*), descrito en *E. coli*. Metabólicamente, esta enzima transforma la lactosa en su isómero alolactosa, y escinde este disacárido en glucosa y galactosa, para que la célula pueda utilizar estos monosacáridos como fuente de energía (Watson *et al.*, 2006).

La utilización del gen *lacZ* en este trabajo, permite ahondar en la adquisición de conocimiento en torno al comportamiento de *E. coli* en la comunidad, a través de la valoración del grupo coliformes, siendo esta especie su mayor representante (Bej *et al.*, 1990). En concreto, la efectividad de la valoración del grupo coliformes a través del gen *lacZ*, viene dada en el fundamento bioquímico de las determinaciones dependientes de cultivo de coliformes basadas en la detección de la actividad de la enzima β-galactosidasa producida por estas bacterias. Los medios de cultivo cromogénicos selectivos de *E. coli* y coliformes, utilizados de forma rutinaria, como por ejemplo el *Chromocult® Coliform Agar* (utilizado en el Capítulo I), identifican al grupo coliformes a partir de la escisión del sustrato cromogénico *Salmon-GAL* por la acción de la enzima β-galactosidasa (Maheux *et al.*, 2017). Por lo que, la utilización de este gen es una alternativa excelente para la valoración de la dinámica de coliformes, y por consiguiente de *Escherichia coli* en la comunidad bacteriana (Ruqaya *et al.*, 2018).

El gen *lacZ*, tiene una longitud de ca. 3 000 pb (Müller-Hill & Oehler, 1996), y se ubica en el operón lac (Figura II.6). Este gen codifica la enzima β-galactosidasa, implicada, como ya hemos comentado, en la degradación de la lactosa cuando ésta se encuentra en el medio extracelular. Específicamente, el operón lac se conforma por el gen *lacZ* y otros dos genes más, *lacY*, que codifica la galactósido permeasa responsable del transporte de lactosa al interior celular, a través de un mecanismo de transporte simporte de protones y lactosa; y, *lacA*, gen codificante de la enzima galactósido O-acetiltransferasa, la cual aparentemente no es esencial para el catabolismo de la lactosa, pero si es necesaria para eliminar productos tóxicos contenidos en la célula que pueden entrar por la acción de la galactósido permeasa (Watson *et al.*, 2006). Este operón también está compuesto por los operadores lacl^{1}, lacl^{4} y lacl^{12}, –los cuales reprimen la expresión del operón

cuando se dan las condiciones específicas–, y por cuatro promotores (lacZp1, lacZp2, lacZp3 y lacZp4) situados en la región anterior del gen *lacZ* (Figura II.6).



Figura II.6. Estructura del operón lac. Los tres genes ***lacZ***-*lacY*-*lacA* se transcriben como un solo mRNA desde el promotor lacZp1 (según indica la flecha). Los operadores $lacI^{1}$, $lacI^{4}$ y $lacI^{12}$, se representan en gris dentro de un rectángulo de mismo color. La línea gruesa representa el fragmento de la secuencia en el genoma. La dirección de lectura y extensión de los genes se representan por flechas abiertas y la enumeración en su interior (adaptado de la base de datos de la red reguladora de la expresión génica en la cepa K-12 de *Escherichia coli*, http://regulondb.ccg.unam.mx/; Watson *et al.*, 2006).

La amplia mayoría de estas metodologías de huella genética, tiene en común el empleo del concepto de unidad taxonómica operativa (OTU, *Operational Taxonomic Unit*). La OTU es la unidad biológica fundamental de diversidad bacteriana, y concretamente, en el caso de las metodologías *fingerprint*, una OTU se corresponde con las bandas o secuencias del gen separadas en las electroforesis o los picos identificados en los electroferogramas (Pedrós-Alió, 2006; Llames, 2011).

Dentro de la literatura científica uno de los ámbitos de aplicación más recurrente de las metodologías de huella génica es la recuperación o regeneración de aguas residuales (Agrawal & Verma, 2021). La regeneración de aguas residuales y la calidad de las mismas, como discutimos en el Capítulo I, debe hacerse atendiendo a los parámetros y normativas pertinentes a este ámbito. En esta línea del discurso debemos recordar que, en el contexto estatal, la normativa a seguir es el Real Decreto 1620/2007, el cual establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. Específicamente, el parámetro microbiológico común a todas las

aguas catalogadas en esta legislación —p. ej. aguas regeneradas destinadas a i) la limpieza en la industria alimentaria; ii) la refrigeración de torres; o, iii) el riego de zonas verde urbanas—, es el bioindicador *Escherichia coli*. En este trabajo se ha estimado, también, la inclusión del bioindicador *Enterococcus* spp en la valoración microbiológica de las aguas a analizar.

La recuperación de aguas a través de sistema naturales, como son los humedales artificiales o también conocidos como humedales construidos, es particularmente interesante para el tratamiento de aguas residuales domésticas en pequeñas comunidades con densidades poblacionales de < 2 000 p. ej. (personas equivalentes). Estos sistemas ofrecen múltiples ventajas como su bajo coste, fácil mantenimiento, alta eficiencia de tratamiento y atractivo visual (Carvalho *et al*., 2017). Además, son sostenibles si los comparamos con los tratamientos convencionales de aguas residuales, tales como los lodos activos (ElZein *et al*., 2016; Samsó *et al*., 2016; Casas-Ledónet *et al.*, 2017).

A grandes rasgos, estos sistemas naturales abiertos están conformados por reactores poco profundos compuestos básicamente de una capa impermeable, un sustrato inorgánico (generalmente grava o arena), helófitos, agua a tratar y las comunidades microbianas asociadas. De acuerdo con el flujo de agua, los humedales artificiales pueden ser clasificados como humedales de flujo horizontal (HFH) o flujo vertical (HFV).

Una de las principales limitaciones de los humedales artificiales es su gran demanda de superficie, generalmente de 3 a 5 m^2 por persona equivalente (Peñate-Castellano, 2016). No obstante, si se comparan los humedales de flujo horizontal y vertical, estos últimos exigen una menor superficie. Asimismo, los HFV suelen incluir sustratos de menor tamaño, como la arena, para lograr una óptima distribución del influjo superficial, favoreciendo así, tiempos de retención hidráulica adecuados, lo que los convierten en sistemas más eficientes que los HFH, debido a la mayor aireación de sus sustratos (Saeed & Sun, 2017).

Sin embargo, el uso de estos sustratos acarrea otra de las principales limitaciones asociadas a este tipo de sistemas, como es el riesgo de obstrucción (Knowles *et al*., 2011). Además, la arena también implica una parte significativa del impacto ambiental de los humedales artificiales en su fase de construcción, tanto por los volúmenes requeridos, como por su transporte desde la región de extracción hasta su destino, así como por la extracción en sí misma. Concretamente, un HFV convencional para 200 personas o habitantes equivalentes –por ejemplo, con unas dimensiones de 3 m^2 y una profundidad de 80 cm, por habitante equivalente– requiere de 480 m^3 de grava y/o arena (Saeed & Sun, 2017). Asimismo, el uso de arena como sustrato plantea serias amenazas para el medioambiente en términos de erosión, pérdida de tierras y de diversidad biológica, limitaciones de la oferta debido a la sobreexplotación de este recurso destinado a la construcción, así como problemas socioeconómicos para los civiles residentes en los países de extracción (Ioannidou *et al*., 2017; Farahani & Bayazidi, 2018). Dentro del contexto de la zona de estudio (isla de Gran Canaria), se añaden los problemas derivados tanto de la escasez de este recurso, como de lejanía a las regiones de extracción. En particular, en las Islas Canarias, la mayor parte de la arena es utilizada en el sector de la construcción y la regeneración de playas, y tiene serios problemas legales, ambientales y económicos (Campos-Serrano & Rodríguez-Esteban, 2017).

Por esta razón en la última década muchos estudios han analizado sustratos rentables para aumentar la eficiencia del tratamiento y/o minimizar la obstrucción de los humedales artificiales (Yang *et al.*, 2018). Para soslayar los inconvenientes asociados al uso de materiales como la arena, autores como Fuchs y colaboradores (2011), reportaron que esta problemática podría verse significativamente reducida mediante el uso de materiales locales. Asimismo, con el transcurso del tiempo, se han buscado recursos que pudieran minimizar el potencial impacto medioambiental que puedan suponer los sistemas de tratamiento de aguas, y por ello, se propuso reemplazar casi en su totalidad los materiales inorgánicos por recursos locales de desecho, principalmente procedentes de la construcción y la agricultura. Diferentes materiales, como los residuos de construcción, los lodos de

alumbre deshidratados residuales del tratamiento de aguas de consumo (Zhao *et al.*, 2009), el bambú (Zanella *et al.*, 2010), el picado de palmera (Herrera-Melián *et al*., 2014, 2018, 2020), o la fibra de arrozal (Cao *et al.*, 2016), han sido probados.

Respecto a la inclusión de plantas en los humedales construidos se ha visto que estas ayudan a estabilizar la superficie del lecho, previenen la obstrucción y canalizan el flujo, así como ayudan a eliminar contaminantes –p. ej. nitrógeno, fósforo, metales pesados y organismos patógenos– (Thomas *et al*., 2017). Asimismo, las raíces de estas plantas, pueden promover microambientes aeróbicos y anaeróbicos alternativos para las comunidades microbianas, y en especial, bacterianas (Calhoun & King, 1997). Además, la presencia de las plantas en los humedales artificiales i) vehicula la creación de un hábitat que alberga vida silvestre; ii) facilita el enfriamiento a través de la evapotranspiración; iii) constituye una zona recreativa; y, iv) mejora el paisaje por su alto valor ornamental (Arunbabu *et al.*, 2015; Masi *et al.*, 2018; Herrera-Melián, 2020).

El estudio de las comunidades bacterianas va a contribuir al conocimiento sobre qué está cambiando y cómo ocurren estos cambios dentro de la comunidad. Más aun, además de identificar la presencia y ausencia de los bioindicadores, este conocimiento permite acometer medidas efectivas para diseñar un sistema natural óptimo de tratamiento de aguas.

En este estudio, se plantea la hipótesis que las comunidades bacterianas pueden verse afectadas por la presencia de plantas. A su vez, estos cambios en la comunidad pueden revelar información sobre la eficiencia de los humedales artificiales de tratamiento de aguas residuales domésticas. El objetivo de este trabajo es estudiar los cambios en la comunidad bacteriana mediante los perfiles de restricción de los genes *16S rRNA* y *lacZ*, a través de las técnicas ARDRA y T-RFLP, en un humedal artificial de flujo vertical de base orgánica de tratamiento de aguas residuales domésticas.

II.2 │Material y Métodos

II.2.1 │Localización y diseño del humedal artificial de base orgánica

El humedal artificial, de base orgánica (en adelante humedal), se diseñó con el fin de tratar aguas residuales domésticas procedentes de una comunidad de cuatro viviendas independientes integradas en una misma edificación que comparten acometidas de luz y agua, y, a su vez, el sistema de evacuación de aguas negras. La población residente en este conjunto de viviendas fluctúa a lo largo de la semana, teniendo una población permanente de cinco personas e incrementándose hasta quince habitantes durante los fines de semana y las épocas vacacionales. El consumo total de agua corresponde a su uso en las cuatro viviendas, así como al riego de un pequeño huerto de 215 m^2.

Geográficamente, el humedal se ubica en el barrio de Santa Cristina, en el término municipal de Santa María de Guía en Gran Canaria (España), el cual se localiza en la cara norte de la isla a 650 m sobre el nivel del mar.

El sistema de humedal estaba configurado por un pozo negro, un reactor o humedal de flujo vertical con plantas (HFV 1p), y otro humedal de flujo vertical sin plantas (HFV 1np) (Figura II.7). El pozo negro, o también llamado pozo ciego, funcionaba como decantador y homogeneizador de las aguas residuales de las viviendas a modo de tratamiento primario. Concretamente, el agua se descarga directamente en el pozo ciego de 36 m^3, donde el tiempo de retención hidráulica era de aproximadamente un día y medio. La recirculación del agua, dentro del pozo, se llevaba a cabo con dos bombas centrífugas sumergibles automatizadas para aguas sucias de 700 W (Figura II.7). Estas bombas se controlaban a partir de temporizadores programados para funcionar durante un minuto cada hora. Los volúmenes recirculados de agua doméstica parcialmente decantada eran de entre 15-20 L en cada pulso, y los mismos se utilizaron como influentes de los humedales verticales.

Los humedales de flujo vertical se construyeron a partir de dos recipientes de plástico de sección rectangular de 900 x 1 200 mm y 1 000 mm de altura, con

una capacidad de 1 080 L cada uno. La composición del lecho de ambos humedales de flujo vertical o reactores, *ad hoc* HFV 1p y HFV 1np, se constituyó con una capa espesa de sustrato orgánico y con un fondo de sustrato inorgánico.

El sustrato orgánico (Figura II.7), de naturaleza vegetal, se obtuvo a partir del picado de ramas secas de palmera canaria (*Phoenix canariensis*, Figura II.8C). La capa de picado de palmera tenía un espesor de 105 cm, la cual se dispuso directamente encima del fondo inorgánico, representando entre el 87,5-91,3% del total del espesor del lecho.

El sustrato inorgánico (Figura II.7), compuesto en su totalidad por grava lavada de 1 cm de Ø de promedio, se distribuyó por el fondo de los reactores formando una capa de 10-15 cm de espesor, representando la misma entre el 8,7-12,5% del total del espesor del lecho. La grava se dispuso en el fondo del reactor para evitar la obturación de la salida del efluente, provocada por el material desprendido del sustrato orgánico.

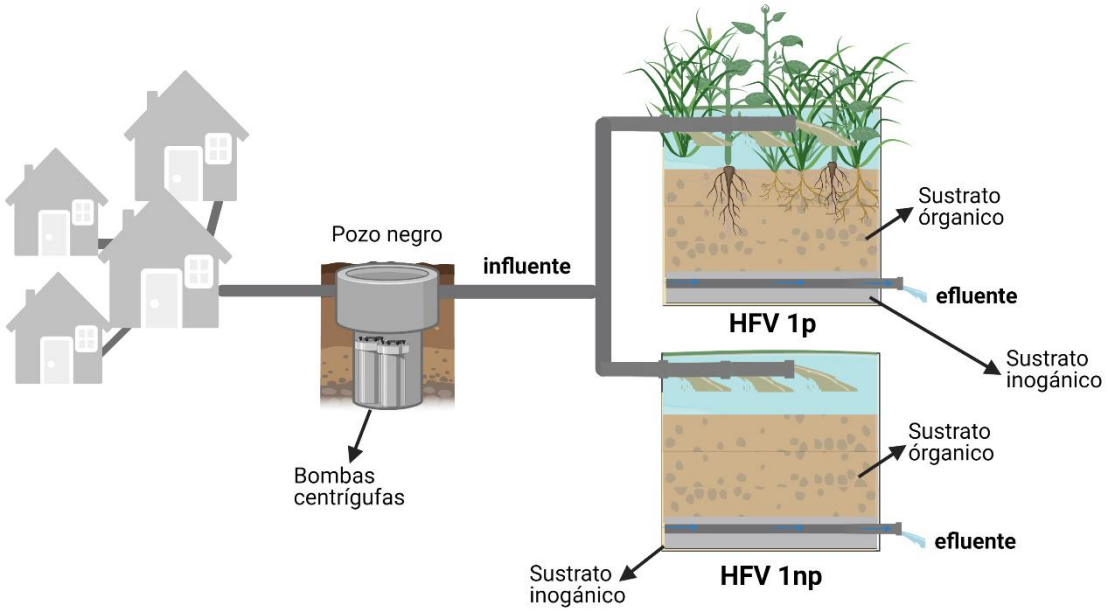


Figura II.7. Diseño del humedal artificial de estudio. HFV 1p: humedal o reactor de flujo vertical de base orgánica con plantas; y, HFV 1np: humedal o reactor de flujo vertical de base orgánica sin plantas. Sustrato orgánico (picado de palmera, *Phoenix canariensis*); sustrato inorgánico (grava); plantas (*Canna indica* y *Xanthosoma sp*.).

Las plantas empleadas en el reactor HFV 1p fueron *Canna indica* y *Xanthosoma sp.* –esta última también conocida como ñamera de barranco–, caracterizadas por raíces gruesas y tubérculos, respectivamente (Figura II.8).

El sistema del humedal funcionaba con el agua residual parcialmente decantada del pozo negro (influente) que se impulsaba a cada uno de los reactores verticales (con plantas, HFV 1p; y, sin plantas, HFV 1np). El control del volumen del influente se realizó por medio de dos caudalímetros, ubicados en la entrada de cada uno de los reactores, así como de diferentes válvulas. El agua del influente se distribuía por toda la superficie de los reactores mediante cinco tubos perforados dispuestos en paralelo a la sección más alargada de los recipientes rectangulares que configuran HFV 1p y HFV 1np. Esta agua percolaba por el lecho de cada uno, y de esta manera, la misma fluía hacia el exterior (efluente), filtrándose por el lecho de picado de palmera y grava, hasta las salidas ubicadas a 5 cm del fondo de los reactores (Figura II.7).

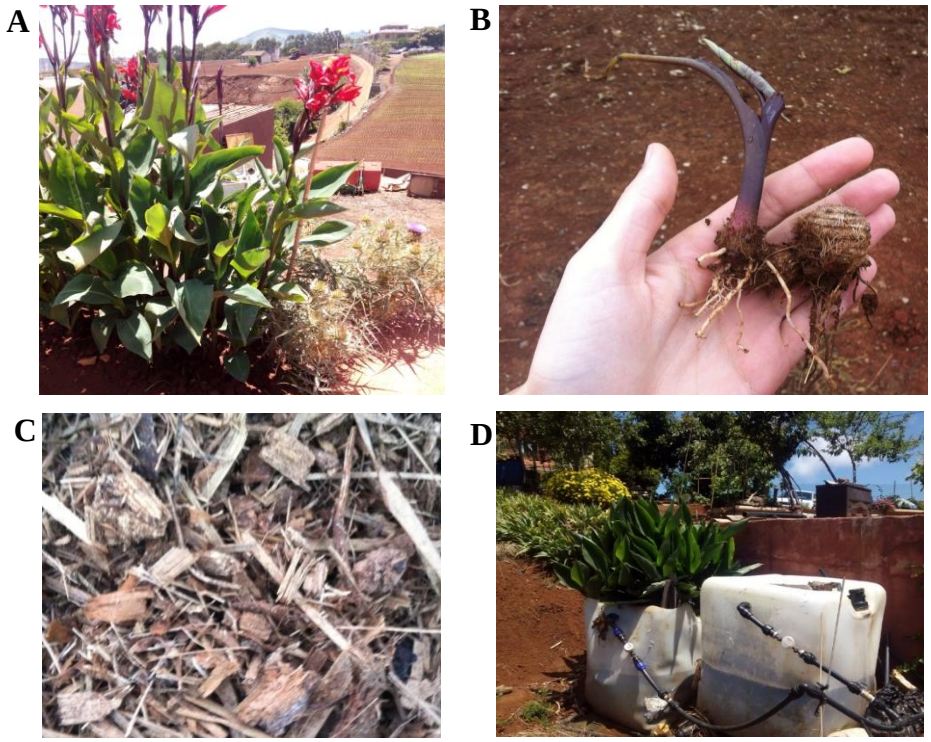


Figura II.8. Detalle de los reactores, sustrato orgánico y plantas utilizados en este estudio. **A.** *Canna indica*; **B.** *Xanthosoma sp.* o ñamera de barranco; **C.** Picado de palmera canaria (*Phoenix canariensis*) utilizado en la construcción del humedal artificial; **D.** Humedales de flujo vertical con plantas, HFV 1p; y, sin plantas, HFV 1np. (adaptada de Peñate-Castellano, 2016).

El humedal empezó a operar cuando el lecho de los reactores se compactó, debido a la propia naturaleza orgánica del picado de palmera, llegando a disminuir hasta

una altura de 40 cm. La compactación tuvo lugar durante 8 meses, comprendidos entre los periodos de construcción e inicio del estudio del humedal.

II.2.2 │Muestreo del humedal artificial y preparación de las matrices

Para muestrear las comunidades bacterianas en el sistema de humedal mencionado, se recolectó agua de tres puntos i) influente (I) común a los dos reactores; ii) efluente del humedal plantado (E; HFV 1p); y, iii) efluente del humedal desprovisto de plantas (E; HFV 1np). Cada una de estas fuentes de muestreo, se asumen a partir de ahora como matrices.

Para la recolección de cada una de las matrices se usaron botellas de 1 L de capacidad. Los recipientes se esterilizaron previamente en autoclave (RAYPA, Barcelona, España) durante 20 minutos a 121 ºC. Todos los muestreos se llevaron a cabo a las 8:00 h de la mañana, coincidiendo con la puesta en marcha de las bombas centrífugas del humedal. Una vez recogidas las muestras, estas se transportaron en hielo hasta el laboratorio y se analizaron inmediatamente, o se mantuvieron a 4 ºC y en oscuridad hasta su utilización. El tiempo de almacenamiento no superó las 24 horas.

Para analizar molecularmente las comunidades bacterianas y valorar sus cambios en la estructura, se muestreó mensualmente cada uno de los reactores durante 8 meses, donde específicamente se compararon las condiciones de una obstrucción leve (en adelante OL) y una obstrucción severa (en adelante OS).

Para el estudio de cada una de las matrices, se tomó un litro de agua y se dispensó en tubos de 50 mL de capacidad, concentrándose mediante centrifugación a 25 000 rpm durante 10 min en una centrifuga *Beckman AvantiTM J-25n* (Beckman Coulter, California, EEUU). De la centrifugación se obtuvieron precipitados en cada uno de los tubos. Mediante la eliminación del sobrenadante, la reunificación de los precipitados de cada tubo y una nueva centrifugación en las mismas condiciones experimentales, se obtuvo un único *pellet* de 2,4-3,6 g por cada matriz

a analizar. Con el fin de evitar contaminación cruzada entre las matrices, estas se procesaron separadamente en el tiempo.

II.2.3 │Valoración de la estructura de las comunidades bacterianas. Diseño experimental

La estructura de la comunidad bacteriana se valoró utilizando el método ARDRA como primera aproximación, y el método T-RFLP, a través del análisis de los bioindicadores *Enterococcus y E. coli*, en los dos periodos indicados (OL y OS). Ambos métodos requirieron i) la obtención de un ADN ambiental de alta calidad; ii) la amplificación de los genes *16S rRNA* y *lacZ*; y, iii) la generación de la huella genética a partir de la digestión con endonucleasas de restricción de los productos amplificados.

II.2.3.1 Aislamiento del ADN ambiental

Debido a la naturaleza de las matrices problema se precisó un protocolo de aislamiento del ADN ambiental como el optimizado en el Capítulo I (apartado I.2.2.2). Así, para el aislamiento del ADN se usó el procedimiento manual de extracción de ADN basado en la acción del detergente CTAB modificado por García-Jiménez y colaboradores (2009), y, descrito previamente por Murray y Thompson (1980). En concreto, en este estudio, el protocolo partió de 800 mg del *pellet* resultante de cada una de las muestras, obtenido según lo descrito anteriormente. Estas cantidades se dispusieron de forma individual en microtubos de 2 mL de capacidad y se procedió a llevar a cabo la extracción según lo descrito en el Capítulo I.

Los aislamientos de ADN ambiental de todas las matrices se llevaron a cabo por triplicado, y se trataron como muestras independientes. La valoración de la calidad del ADN se determinó mediante la evaluación de su integridad, a partir de su visualización en gel de agarosa al 0,8% (m/v). La ausencia de ADN fragmentado o *smear* confirmó la integridad de las muestras de ADN.

La cuantificación, así como la pureza del ADN, se determinaron por espectrofotometría con *NanoDrop* (ThermoFisher Scientific, MA, EE. UU.),

siendo calculada la pureza con la ratio A260/A280. A continuación, el ADN obtenido se almacenó a 4 ºC, hasta su posterior uso. Las muestras cuya concentración de ADN fuera inferior a 20 ng μL^{-1} (Meijering *et al.*, 2007), o presentaran *smear*, fueron descartadas.

II.2.3.2 Amplificación de los genes 16S rRNA y lacZ

Los juegos de *primers* de los genes *16S rRNA* y *lacZ*, recogidos en la Tabla II.1, se pusieron a punto apoyándonos en la experiencia y desarrollo mostrado en el Capítulo I.

Tabla II.1. Pares de oligos utilizadas en los métodos *fingerprint* ARDRA y T-RFLP.

Organismo	**Gen**	**Oligo**	**Secuencia** (5'→3')	**Tamaño esperado** (pb)
Enterococcus	*16S rRNA*	E1 E2	TCAACCGGGGAGGGT ATTACTAGCGATTCCGG	733
E. coli	*lacZ*	ZL-1675 ZR-2548	ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC CACCATGCCGTGGGTTTCAATATT	876

Las amplificaciones se realizaron a partir de reacciones en cadena de la polimerasa con 20–50 ng de ADN. La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 50 µL, para cada muestra, conteniendo 10 µL de *5X PrimerSTAR™ buffer*, 0,5 µL de *PrimerSTAR™ HS DNA Polymerase* (2,5 U μL^{-1}), 4 µL de la mezcla dNTPs (2,5 mM de cada uno), todos ellos de la casa comercial TaKaRa Shuzo Co. (Shiga, Japan), así como, 2 µL de cada uno de los *primers* (10 µM) y 5 µL de ADN *template*.

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en un termociclador *MyCycler™* (BioRad, California, EE. UU.), con una desnaturalización inicial a 96 ºC durante 4 min, seguido de 40 ciclos a 94 ºC durante 1 min, 45 ºC durante 1 min, y 72 ºC durante 5 min. La elongación final se realizó con un único ciclo a 72 ºC durante 10 min. Las muestras amplificadas se conservaron a -20 ºC hasta su posterior utilización.

Se establecieron un control negativo (agua libre de ARNasas) y un control (ADN de la cepa pura de los bioindicadores *E. coli* WDCM 00012 o *Enterococcus faecalis* WDCM 00009, según correspondiera). Las amplificaciones se realizaron por triplicado.

La visualización de los amplicones (5 µL) se llevó a cabo mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v). Se incluyó el marcador de peso molecular *100 bp DNA ladder* (Omega Bio-Tek Inc., Georgia, EE. UU.), el cual constaba de diez fragmentos que variaban en tamaño desde 100 pb hasta 1 000 pb en incrementos de 100 pb. Los productos de amplificación validados se purificaron con el kit *Quantum Prep™ Freese 'N DNA Gel Extraction Spin Columns* (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante y acorde con las modificaciones recogidas en el apartado I.2.1.4 del Capítulo I. El volumen de elución final fue de ca. 30 µL.

II.2.3.3 ARDRA

La obtención de digestos de cada uno de los fragmentos génicos amplificados (*lacZ* y *16S rRNA*), se realizó con seis enzimas de restricción previamente seleccionadas. Estas enzimas se extrajeron de la herramienta genómica *Webcutter 2.0* (http://heimanlab.com/cut2.html), la cual permite reconocer aquellas enzimas que cortan dentro del fragmento e informa, a su vez, del número de sitios de reconocimiento. Con esta aproximación *in silico*, las endonucleasas seleccionadas fueron *Alu* I, *Hae* III, *Hha* I, *Mse* I, *Msp* I y *Taq* I, cuyas características se recogen en la Tabla II.2.

La amplificación de los fragmentos génicos se llevó a cabo a partir del ADN de la matriz del influente. Las condiciones experimentales de las digestiones se realizaron atendiendo a las especificaciones de las casas comerciales (Tabla II.2). La digestión se llevó a cabo a partir de 250 ng de producto de amplificación purificado y una concentración final de enzima de 10 U μL^{-1}. Cada una de ellas se realizó de forma individual en microtubos estériles de 1,5 mL de capacidad, haciendo uso de un bloque térmico o *heatblock* (VWR International Eurolab, Barcelona, España).

Tabla II.2. Enzimas de restricción empleadas en el método de huella genética ARDRA.

Enzima	**Secuencia de reconocimiento**	**Tª de digestión** (ºC)	**Tª de inactivación** (ºC)	**Casa comercial**
Alu I	AG^CT	37	65	Takara Bio Inc.
Hae III	GG^CT	37	65	Takara Bio Inc.
Hha I	GCG^C	37	65	Takara Bio Inc.
Mse I	T^TAA	37	65	New England Biolabs
Msp I	C^CGG	37	65	Takara Bio Inc.
Taq I	T^CGA	65	80	Takara Bio Inc.

El protocolo de digestión tuvo una duración de 3 horas, y se llevó a cabo a la temperatura establecida para cada endonucleasa de restricción (Tabla II.2). Las mezclas de reacción de las digestiones se realizaron en un volumen final de 20 µL, acorde a las especificaciones recogidas en la Tabla II.3. Tras la digestión, las enzimas se inactivaron durante 20 minutos a la temperatura indicada por la casa comercial (Tabla II.2).

Tabla II.3. Mezcla de reacción de digestión con las enzimas de restricción *Alu* I, *Hae* III, *Hha* I, *Mse* I, *Msp* I y *Taq* I.

Reactivo	**Cantidad**
Enzima	1 µL
Buffer 10X (específico de cada enzima)	2 µL
ADN	≤ 1 µg
Albúmina de suero bovino al 0,1%[a] (BSA, *Bovine Serum Albumin*)	2 µL
Agua libre de ARNasas	hasta 20 µL

[a] La BSA se incluyó solo en las mezclas de reacción de la digestión realizadas con de las enzimas *Mse* I, *Msp* I y *Taq* I.

Los patrones de bandas o perfiles ARDRA, resultantes de la digestión, se visualizaron en gel de agarosa. La correcta visualización del amplio rango de tamaños de los fragmentos obtenidos precisó de varios tipos de agarosas y concentraciones, cuyas características se describen en la Tabla II.4.

Tabla II.4. Características de las agarosas empleadas en el método ARDRA.

Agarosa	**Rango concentración** % (m/v)	**Indicaciones**
Metaphor (Lonza, Basilea, Suiza)	0,5-2	Alta resolución en la separación de fragmentos de ADN de bajo peso molecular (20-800 pb).
D1 Low EEO (Conda Laboratories, Madrid, España)	1-2,5	Utilizada en aplicaciones regulares y transferencia o *blotting*, por su baja electroendosmosis, pudiendo separar fragmentos de ADN/ARN de ≥ 1 000 pb.
D5 (Conda Laboratories, Madrid, España)	0,5-2	Permite, a bajas concentraciones, separar ácidos nucleicos de alto peso molecular. Asimismo, proporciona estructura al gel confiriendo una mayor resistencia, por su elevado peso molecular.

De igual modo, para una mejor resolución de los digestos se usó un *Mini-Sub® Cell GT System* de 7 x 7 cm, con un volumen de *buffer* TAE al 1X de ca. 40 mL y a 75 V, y el sistema *Wide Mini-Sub® Cell GT* de 15 x 7 cm, realizando un gel de agarosa con 300 mL de *buffer* TAE 1X, y a 200 V. Ambos sistemas son de BioRad (California, EE.UU.).

II.2.3.4 T-RFLP

El método T-RFLP requirió del marcaje de los cebadores específicos de los bioindicadores de interés (Tabla II.1). El marcaje se realizó con fluoróforos en la posición 5' de cada uno de los cebadores con orientación *forward* y emitiendo en distintas longitudes de onda. De acuerdo a la Tabla II.1 para el gen *16S rRNA* de *Enterococcus* se usó el fluoróforo HEX™ (*Hexachloro-Fluorescein-CE Phosphoramidite*), quedando el diseño de la siguiente manera, E1: 5'-HEX-TCA ACC GGG GAG GGT-3', y para *E. coli*, ZL-1675, marcado en la posición 5' con el fluoróforo 6-FAM™ (6-Carboxyfluorescein): 5'-6FAM-ATG AAA GCT GGC TAC AGG AAG GCC- 3'.

La amplificación se llevó a cabo tal y como se describe en el epígrafe II.2.3.2, a excepción de la cantidad de ADN de partida (40-100 ng). Para evitar la degradación de los fluoróforos, las preparaciones de las reacciones de amplificación se llevaron a cabo con luz tenue. Los patrones de digestos se

obtuvieron con la endonucleasa de restricción *Mse* I (New England Biolabs, Ipswich, EE. UU.). La digestión con *Mse* I, sigue lo expuesto anteriormente en las Tablas II.2 y II.3, partiendo en este caso de 100 ng de producto de amplificación purificado. Los controles fueron los ya descritos para el método ARDRA. Asimismo, todas las muestras se realizaron por triplicado a partir del ADN extraído de los efluentes de los reactores plantados y sin plantar.

La secuenciación de los fragmentos de restricción se realizó en un secuenciador automático *ABI 3730* (Life Technologies, Carlsbad, EEUU), en Secugen (Madrid, España). Para ello se requirió de la muestra sin diluir y de diluciones seriadas de las muestras (1/2, 1/5, 1/10 y 1/20), todas por triplicado. Se utilizó como marcador de peso molecular el *GeneScan™ 600 LIZ™ dye Size Standard* (ThermoFisher Scientific, Waltham, EE. UU.), el cual tiene un rango de tamaños de 20-600 pb.

II.2.3.5 Análisis T-RFLP

a. Patrones de restricción T-RFLP

El análisis T-RFLP se inició a partir de la obtención de los electroferogramas en formato .fsa. Los electroferogramas, donde se representaba el tamaño de los los fragmentos de restricción (T-RFs) *vs.* las unidades relativas de fluorescencia (RFU, *Relative Fluorescence Units*), se visualizaron y trataron con el software genómico *GeneMarker v1.85* (SoftGenetics, State College, EE. UU.). El análisis de los T-RFs requirió de una normalización previa de los datos. Así, solo se tuvieron en cuenta los T-RFs que eran altamente reproducibles. La fracción de T-RFs comprendida entre 0-100 pb se excluyó del análisis, dado que los mismos se consideraron artefactos. Además, se asumió que los picos inequívocos estaban comprendidos en un rango de tamaños de 101 a 850 pb, en el caso del análisis de *Escherichia coli*, y de 101 a 725 pb para el estudio del género *Enterococcus*.

De igual forma, el análisis se llevó a cabo atendiendo a la altura de los picos que corresponde a la intensidad de fluorescencia detectada por el secuenciador. De acuerdo a este criterio, los T-RFs con una intensidad de fluorescencia <1% se catalogaron como ruido o interferencias de fondo generadas por el secuenciador,

por lo que, también se descartaron del análisis. A continuación, se recalcularon las alturas (abundancias relativas, RFU) y áreas de los picos.

Como resultado del tratamiento de los electroferogramas, se obtuvieron matrices de datos (en adelante perfiles T-RFLP) donde se relacionaba el tamaño de los T-RFs o picos (pb) y la intensidad de fluorescencia (RFU) o área de los picos (%).

El análisis comparativo de las huellas genéticas T-RFLP de las diferentes matrices, se realizó a través de un alineamiento previo con cada uno de los perfiles T-RFLP de esas matrices. Este alineamiento se llevó a cabo con la herramienta bioinformática *T-Align* (Smith *et al*., 2005), con un intervalo de confianza de 0,5. Específicamente, el software *T-Align* permite comparar los perfiles T-RFLP de los replicados de una muestra, generando un perfil consenso, a partir de aquellos fragmentos comunes entre los perfiles T-RFLP.

Los perfiles consenso obtenidos de cada una de las diferentes matrices se compararon posteriormente para generar una tabla de datos, llamada perfil comparativo, que contiene la lista de todos los T-RFs de cada uno de esos perfiles. Tras el alineamiento del perfil comparativo con la herramienta *T-Align*, se generó una matriz binaria –presencia/ausencia de T-RFs–, y una matriz de abundancias recogiendo las abundancias relativas de cada uno de esos fragmentos. La sumatoria de las abundancias relativas resultó en la abundancia relativa total (N) de cada matriz.

b. Valoración cualitativa de los perfiles T-RFLP

Con el propósito de realizar la valoración cualitativa de los perfiles T-RFLP, el número de picos o T-RFs de los perfiles comparativos se interpretaron como unidades taxonómicas operacionales (OTUs). La comparación del número de OTUs se realizó empleando el software estadístico *R v3.4.4* (https://www.r-project.org), utilizando las matrices binarias obtenidas con la herramienta *T-Align* como archivo de entrada. La detección de diferencias significativas ($p \leq 0,1$) entre las matrices se determinó mediante el modelo de ANOVA unidireccional, seguido de los test *post hoc* Tukey (HSD) y Dunnett T3. También, se generaron diagramas

de Venn con la herramienta *Venn Diagram Plotter* (Integrative Omics, Pacific Northwest National Laboratory), con el objetivo de representar las OTUs compartidas entre las comunidades bacterianas presentes en los reactores con plantas (HFV 1p) y sin plantas (HFV 1np).

c. Diversidad bacteriana

Con el fin de valorar la diversidad bacteriana de las matrices problema, se calcularon el índice de diversidad de Shannon-Weaver (*H'*), el índice de igualdad u homogeneidad (*evenness*) de Pielou (*J'*); y, el índice de riqueza de especies de Margalef (D_{Mg}), según las ecuaciones Ec. 1, 2 y 3, respectivamente.

$$H' = \sum_{i=1}^{S} P_i \ln P_i \qquad \text{(Ec.1)}$$

donde:

P_i= abundancia relativa del T-RF *i*

$$J' = \frac{H'}{\ln S} \qquad \text{(Ec.2)}$$

donde:

H'= índice de Shannon-Weaver
S= número de T-RFs

$$D_{Mg} = \frac{S-1}{\ln N} \qquad \text{(Ec.3)}$$

donde:

S= número de T-RFs
N= abundancia relativa total

Los valores P_i, S y N son reportados desde las matrices de abundancias. El cálculo de cada uno de los índices se realizó a partir de las matrices de abundancias con el software *Primer-E v7* (Clarke & Gorley, 2015). Las diferencias ($p \leq 0,05$) entre los índices de diversidad, homogeneidad y riqueza, se determinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA).

Un esquema del flujo de trabajo del análisis T-RFLP se presenta en la Figura II.9.

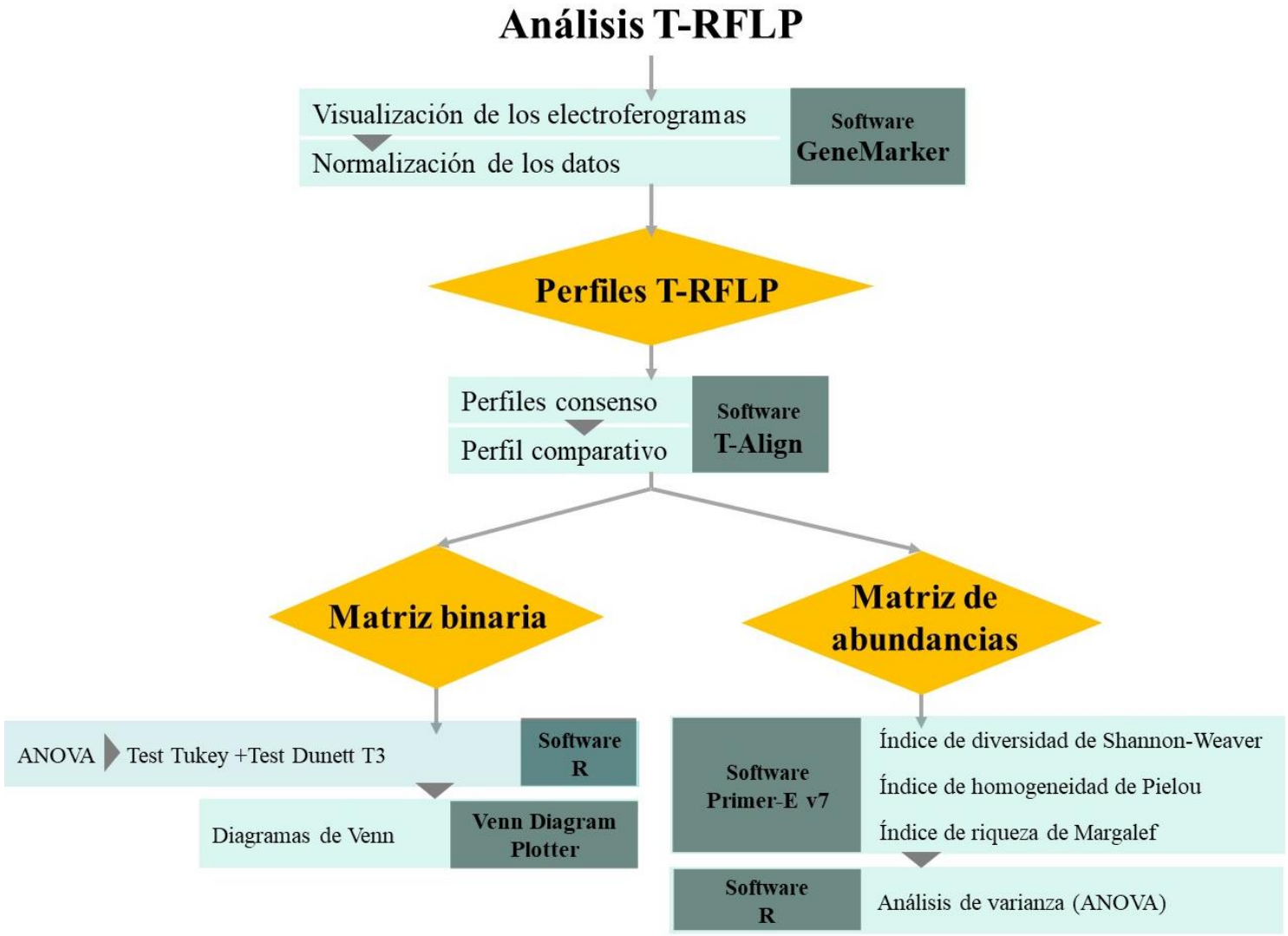


Figura II.9. Flujo de trabajo del análisis T-RFLP.

II.3 | RESULTADOS

Dado que en el Capítulo I se han establecido los procedimientos para validar los juegos de *primers*, en este trabajo mostramos los resultados correspondientes a los cebadores usados en este estudio, como evidencia de su correcta asignación.

El aislamiento del ADN mediante el método CTAB modificado (Garcia-Jimenez *et al.*, 2009), resultó obtener rendimientos óptimos y un ADN íntegro (Figura II.10), es decir, sin ADN fragmentado. Además, las concentraciones de ADN resultantes (30-120 ng μL^{-1}) fueron adecuadas para la utilización de este como *template* en los métodos de huella genética empleados.

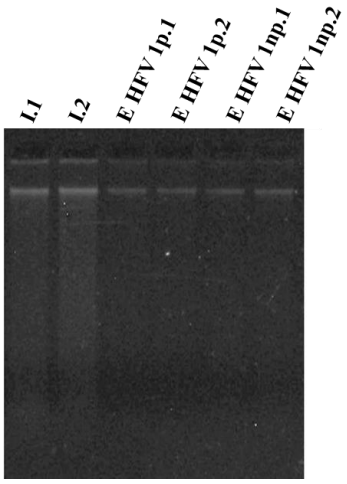


Figura II.10. Electroforesis de control del aislamiento del ADN ambiental de las muestras recogidas en el humedal artificial de base orgánica extraído con el método modificado CTAB (Garcia-Jimenez *et al.*, 2009). I: influente; E HVF 1p: efluente reactor de flujo vertical con plantas; E HVF 1np: Efluente reactor de flujo vertical sin plantas. 1 y 2 corresponden a duplicados de las muestras.

Los juegos de *primers* del gen *16S rRNA* específicos del género *Enterococcus* y del gen *lacZ* de *E. coli* quedaron validados con la obtención de bandas únicas en las amplificaciones llevadas a cabo (Figura II.11), y con la asignación acorde a la taxonomía a través de BLAST, así como con los análisis filogenéticos realizados.

En concreto, las secuencias revelaron, a través de la herramienta BLAST, un ajuste correcto a los grupos bacterianos esperados (*Enterococcus* y *Escherichia coli*), así como, los genes amplificados (*16S rRNA* y *lacZ*, respectivamente), con E-valores del 0,0 y porcentajes de identidad del 99,8% y 97,2%, respectivamente.

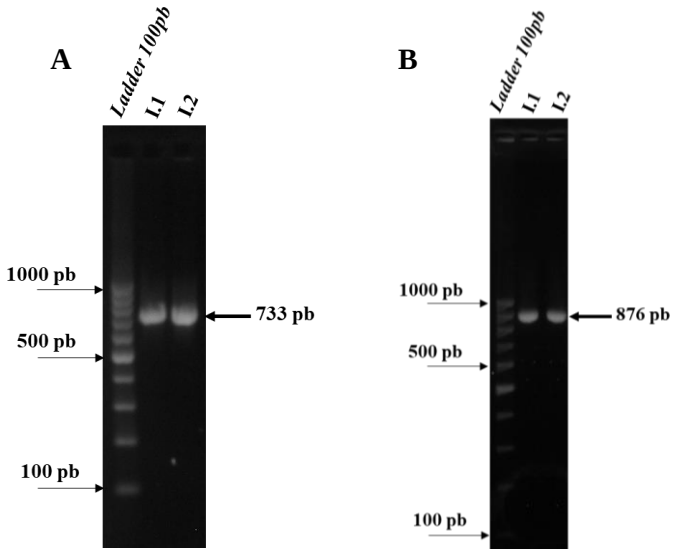


Figura II.11. Electroforesis de control del influente del humedal artificial de base orgánica (I: influente). **A.** Amplicones obtenidos en la amplificación con los juegos de *primers* E1 y E2 de *Enterococcus*. **B.** Productos de amplificación resultantes de la PCR realizada con el juego de *primers* ZL-1675 - ZR-2548. La escalera de peso molecular utilizada fue *100 bp DNA ladder* (Omega Bio-Tek Inc), la cual consta 10 bandas con tamaños desde 100 pb hasta 1 000 pb, en incrementos de 100 pb. 1 y 2 corresponden a duplicados de las muestras.

El análisis evolutivo realizado con la secuencia obtenida para *Enterococcus* del gen *16S rRNA*, mediante el método de *maximum likelihood* (ML), abarcó 19 secuencias (Tabla II.5) con un total de 936 posiciones en el conjunto de datos final. El análisis ubicó a la secuencia (EF16S_I) dentro del clado de la especie *Enterococcus faecalis* con un valor *bootstrap* del 98% (Figura II.12).

Respecto al análisis filogenético realizado con la secuencia resultante de la amplificación del gen *lacZ* de *E. coli*, comprendió 24 secuencias de nucleótidos (Tabla II.6) con un total de 905 posiciones en el conjunto de datos final. Este análisis posicionó la secuencia de *Escherichia* (EClacZ_I) en un clado dentro de *Escherichia coli*, con un porcentaje *bootstrap* 96% (Figura II.13).

Tras la validación de los pares de cebadores se llevaron a cabo las amplificaciones correspondientes a los métodos de huella genética obteniendo bandas únicas, de los tamaños de fragmento esperados, en todos los casos (*Enterococcus*: 733 pb, y, *E. coli*: 876 pb).

Tabla II.5. Secuencias del gen *16S rRNA* del bioindicador *Enterococcus* incluidas en el análisis filogenético realizado en este trabajo.

Especies y cepas	**Nº de acceso NCBI**
Firmicutes filo	
Bacilli clase	
Entecococcaceae familia, *Enterococcus* género	
Enterococcus faecalis cepa Pb10	KJ395379
Enterococcus faecalis cepa E548N	GU372697
Enterococcus faecalis cepa Na15	HQ831381
Enterococcus faecalis cepa YY71	HM776203
Enterococcus faecalis cepa 3198O2	KF598895
Enterococcus faecalis cepa 3126O2	KF598938
Enterococcus faecalis cepa HBUAS54268	MH817719
Enterococcus faecalis cepa ABRIINW.N7	EU895512
Enterococcus faecium cepa GM12	KC213481
Enterococcus faecium cepa KLDS.60642	FJ861092
Enterococcus faecium cepa Ce5-1	AB512765
Enterococcus faecium cepa IMAU32723	KF149389
Enterococcus durans cepa KLDS.60618	FJ607264
Enterococcus durans cepa PON12	KF147885
Enterococcus hirae cepa NRIC0101	AB362590
Enterococcus hirae cepa Au28	KF767990
Enterococcus hirae cepa Au31	KF767993
Otros géneros de Enterococcaceae	
Catellicoccus marimammalium cepa M35/04/3	NR_042357

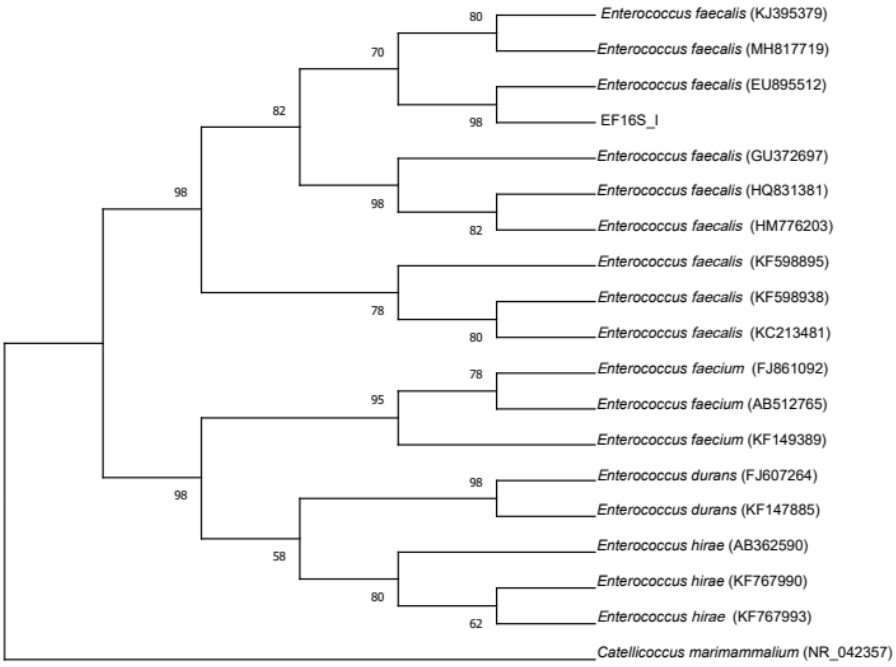


Figura II.12. Árbol *maximum likelihood* (ML) de *Enterococcus* construido a partir de secuencias del gen *16S rRNA* calculado mediante el modelo Tiempo General Reversible (GTR) y la Distribución Gamma (G) (2 categorías (+G, parámetro = 0,1380)). El número en el nodo representa el porcentaje *bootstrap*. La evaluación de la fiabilidad del árbol se comprobó realizando 1 000 réplicas a partir del método estadístico *Bootstrapping*. El código de la secuencia problema (EF16S_I) corresponde a la secuencia obtenida de la amplificación realizado con los *primers* E1-E2 y el ADN ambiental del humedal.

Tabla II.6. Secuencias del gen *lacZ* del bioindicador *Escherichia coli* incluidas en el análisis filogenético llevado a cabo en este estudio.

Especies y cepas	Nº de acceso NCBI
Proteobacteria filo	
γ-Proteobacteria clase	
Enterobacteriaceae familia, *Escherichia* género	
Escherichia coli cepa 493/89	EU905520
Escherichia coli cepa TW14359	EU905524
Escherichia coli cepa 87-14	EU905522
Escherichia coli cepa 86-24	EU905521
Escherichia coli cepa TB182A	EU905523
Escherichia coli cepa 93/89	EU895510
Escherichia coli cepa TW14359	EU895514
Escherichia coli cepa 87-14	EU895512
Escherichia coli cepa 86-24	EU895511
Escherichia coli cepa TB182A	EU895513
Escherichia coli cepa EC03	GU063700
Escherichia coli cepa EC02	GU063701
Escherichia coli cepa EC05	GU063699
Escherichia coli cepa EC04	GU063697
Escherichia coli cepa EC06	GU063698
Escherichia coli cepa 562	V00296
Escherichia coli cepa ATCC 9637	FJ404781
Escherichia coli cepa SWG.EC.GJ.UDL.PK.2013.01	KF924755
Escherichia coli cepa UV5	J01636
Escherichia coli cepa pMH11	AJ308295
Escherichia vulneris cepa ATCC 29943	AY746951
Escherichia vulneris cepa ATCC 33821	AY746949
Otros géneros de Enterobacteriaceae	
Klebsiella pneumoniae cepa 285	HQ324709

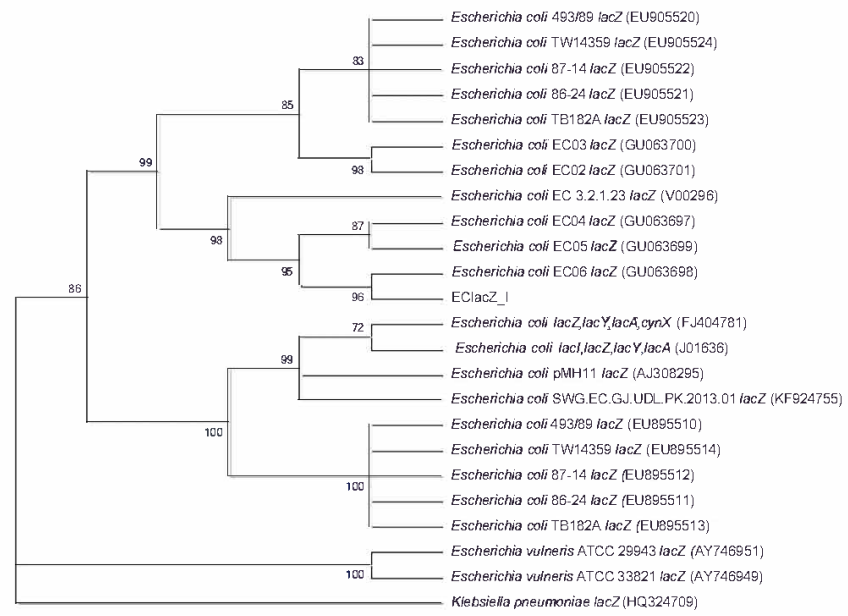


Figura II.13. Árbol ML de *E. coli* construido a partir de las secuencias del gen *lacZ* calculado mediante el modelo GTR y la Distribución Gamma (2 categorías (+G, parámetro = 0,1156)). El número en el nodo representa el valor *bootstrap*. La evaluación de la fiabilidad del árbol se comprobó realizando 1 000 réplicas a partir del método estadístico *Bootstrapping*. El código de la secuencia problema (EClacZ_I) corresponde a la secuencia obtenida de la amplificación realizado con los *primers* ZL-1675 - ZR-2548 y el ADN ambiental del humedal.

II.3.1 │ Valoración de la estructura de las comunidades bacterianas. ARDRA

Los resultados obtenidos tras la digestión *in silico* se recogen en la Tabla II.7. La tabla muestra las seis endonucleasas seleccionadas para obtener los digestos con el gen *16S rRNA* (*Alu* I, *Hae* III, *Hha* I, *Mse* I, *Msp* I y *Taq* I) y las tres con el gen *lacZ* (*Alu* I, *Hae* III y *Msp* I) (Tabla II.7). Además, se recogen el número de sitios de reconocimiento y el tamaño de los fragmentos resultantes.

Tabla II.7. Resultados de la aproximación *in silico* del método ARDRA, llevada a cabo con la herramienta genómica *Webcutter 2.0* (http://heimanlab.com/cut2.html).

Secuencia / **Enzima**	***Enterococcus* (*16S rRNA*)**		***Escherichia coli* (*lacZ*)**	
	Nº de sitios de reconocimiento [a]	Localización [b]	Nº de sitios de reconocimiento [a]	Localización [b]
Alu I	4	363; 410; 631; 681	-	-
Hae III	2	271; 682	-	-
Hha I	2	450; 683	7	97; 109; 143; 286; 390; 481; 737
Mse I	5	212; 298; 432; 626; 681	3	266; 635; 725
Msp I	4	502; 513; 676; 681	-	-
Taq I	3	104; 303; 681	3	410; 458; 627

a Número de sitios de reconocimiento de la enzima de restricción.
b Localización en la secuencia de los sitios de reconocimiento de la endonucleasa.

Los patrones de fragmentos separados por la mezcla de agarosas (Tabla II.8) fueron diferentes, tanto en número como en tamaño (Figura II.14).

Tabla II.8. Características de las electroforesis en gel de agarosa realizado para el análisis de los patrones de bandas ARDRA.

Tipo de agarosa (concentración en %(m/v))			**Sistema de electroforesis**		**Resultados**
Metaphor	D1 Low EEO	D5	Mini-Sub® Cell GT System[a]	Wide Mini-Sub Cell GT System[b]	
0,5	2,5	2	+	NE	La resolución de los fragmentos de bajo peso molecular no es la adecuada.
0,5	2,5	2	NE	+	La separación de las bandas no es óptima.
0,5	2,5	-	+	NE	La resolución del bandeado no es óptima.
-	3	-	+	NE	La resolución del bandeado no es óptima.
2	1	0,5	+	NE	La resolución y separación de los fragmentos es óptima y la visualización de los mismos permite la lectura del patrón ARDRA.

[a] Los geles de agarosa utilizados en el sistema de electroforesis *Mini-Sub® Cell GT* (BioRad, California, EE. UU.) se llevaron a cabo en un volumen de 40 mL de *buffer* TAE 1X, con un tamaño de 7 x 7 cm. La electroforesis se realizó a 75 V.

[b] El gel de agarosa utilizado en el sistema de electroforesis *Wide Mini-Sub Cell GT* (BioRad, California, EE. UU.) se realizaron en un volumen de 300 mL de *buffer* TAE 1X, con un tamaño de 15 x 7 cm. La electroforesis se realizó a 200 V.

NE: No Ensayado

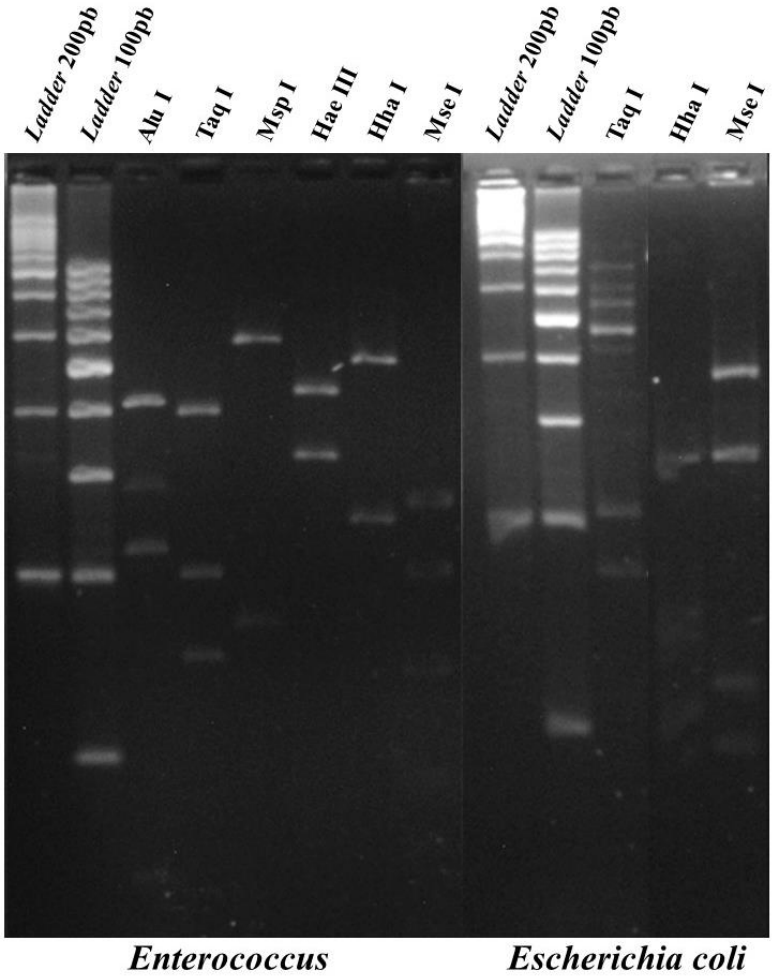


Figura II.14. Huella genética ARDRA obtenida de la digestión de los productos de amplificación resultantes de las reacciones en cadena de la polimerasa realizadas con los juegos de *primers* del gen *16S rRNA* (E1-E2) específicos de *Enterococcus*, y el par de cebadores del gen *lacZ* (ZL-1675-ZR-2548) de *E. coli*, con el ADN aislado de la matriz influente del humedal artificial de base orgánica analizado (I). Las endonucleasas empleadas fueron: *Alu* I, *Hae* III, *Hha* I, *Mse* I, *Msp* I y *Taq* I. La electroforesis se realizó en gel de mixtura de agarosas (Metaphor al 2%, D1 Low EEO al 1%, y, D5 al 0,5%), con las condiciones de resolución 7 x 7 cm en un sistema *Mini-Sub® Cell GT* (BioRad, California, EE. UU.). Las escaleras o *ladders* usadas fueron*: 200 bp DNA ladder* y *100 bp DNA ladder* (Omega Bio-Tek Inc.). La primera de ellas consta de 11 bandas con tamaños desde 200 pb hasta 2 000 pb en incrementos de 200 pb, incluyendo un fragmento de 3 000 pb. La segunda consta de 10 bandas con tamaños desde 100 pb hasta 1 000 pb, en incrementos de 100 pb.

II.3.2 │ Valoración de la estructura de las comunidades bacterianas. T-RFLP

La estructura de la comunidad bacteriana, en los dos reactores (HFV 1p y HFV 1np), y la dinámica temporal, considerando la obturación leve (OL) y la severa (OS), se estimó a partir del número de T-RFs. En la Tabla II.9 se muestra la

presencia/ausencia de las bandas en cada una de las matrices y periodos analizados en relación al patrón de bandas obtenido mediante la aproximación *in silico*.

Tabla II.9. Presencia/ausencia de las bandas obtenidas según la huella genética T-RFLP, tomando como referencia el gen *16S rRNA* para *Enterococcus* y el gen *lacZ* para *E. coli*, en los reactores verticales plantados (HFV 1p) y no plantados (HFV 1np) y periodos de análisis (obturación leve, OL, y obturación severa, OS), de acuerdo a los digestos* obtenidos *in silico* (longitud pb).

Reactor y periodo / **Bioindicador**	**HFV 1p OL**	**HFV 1p OS**	**HFV 1np OL**	**HFV 1np OS**	**Longitud** [a] (pb)
Enterococcus	+	+	+	-	212
	-	+	+	-	298
	+	+	-	+	432
	-	+	-	-	626
	+	-	+	-	681
Escherichia coli	+	+	+	+	266
	+	+	-	-	635
	+	-	-	-	725

*Digestiones realizadas con la enzima *Mse* I.
[a] Longitudes de las bandas obtenidas tras la digestión *in silico* con la enzima de restricción *Mse* I realizada en la herramienta *Webcutter 2.0* (http://heimanlab.com/cut2.html).

Experimentalmente, la reproducibilidad de los perfiles de cada matriz se observó en todas las muestras procesadas, tanto diluidas como sin diluir, siendo los electroferogramas de estas últimas los utilizados para el análisis T-RFLP de la comunidad (Anexo II; Figuras A.II.1 y A.II.2). El rango de tamaños de los fragmentos de restricción terminales (T-RFs), variaron de 115,3 a 713,9 pb para *Enterococcus* y de 116,7 a 803,2 pb para *Escherichia coli*, como muestran las matrices de abundancias de cada bioindicador (Anexo II; Tablas A.II.1 y A.II.2, respectivamente).

La distribución relativa de los T-RFs en los distintos reactores, calculada como la sumatoria de T-RFs para cada uno de los bioindicadores, mostró un mayor ($p \leq 0,1$) número de T-RFs o unidades taxonómicas operacionales (OTUs), en los

humedales sin plantas, y significativamente ($p \leq 0,01$) en el periodo previo a la obturación severa (Figura II.15). El número total de OTUs para *Enterococcus* es de 115 y para *E. coli* de 198. No obstante, una excepción ha sido reportada para el bioindicador *Enterococcus* en las condiciones de obturación severa para el reactor no plantado (HFV 1np, 9,57%; Figura II.15B).

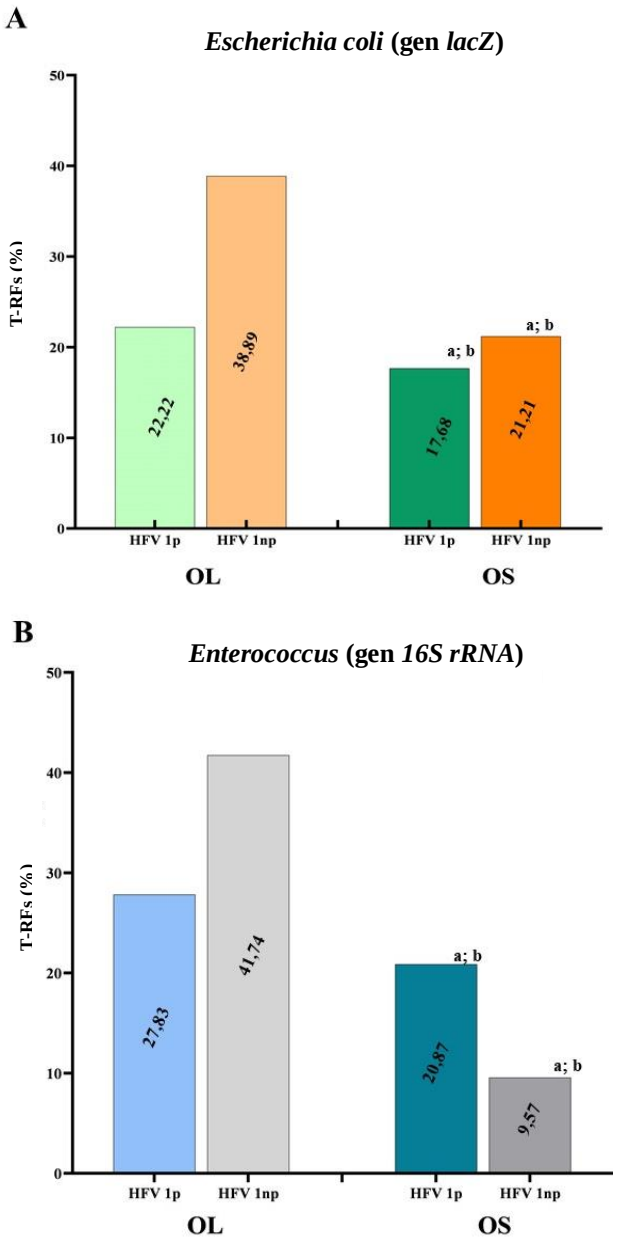


Figura II.15. Fragmentos terminales de restricción (T-RFs, %) en los periodos de obstrucción leve (OL) y severa (OS) para los reactores HFV 1p y HFV 1np. **A.** Resultados del bioindicador *Escherichia coli*. El 100% se asumió como el ∑T-RFs (198 T-RFs) obtenidos para ambos reactores HFV (1p y 1np) y ambas etapas (OL Y OS); **B**. Resultados del bioindicador *Enterococcus*. El 100% se asumió como ∑T-RFs (115 T-RFs) obtenidos para ambos reactores (HFV 1p y HFV 1np), y en ambas etapas (OL y OS). **a:** indica diferencias significativas respecto al tiempo; **b:** indica diferencias significativas acorde al tipo de reactor.

Las OTUs compartidas entre reactores se identifican a partir de los diagramas de Venn. En estos diagramas se observa que los reactores con y sin plantas compartieron 31 T-RFs para el biondicador *E. coli*, y, 19 para el bioindicador *Enterococcus* (Figura II.16). En una escala temporal (OL *vs.* OS), en la situación de obturación leve se presenta un mayor número de OTUs (Figura II.17). Asimismo, el reactor sin plantas compartió un número mayor de OTUs (13,1% para *Escherichia coli;* 7,8% para *Enterococcus*), comparados con aquel con plantas (Figura II.17).

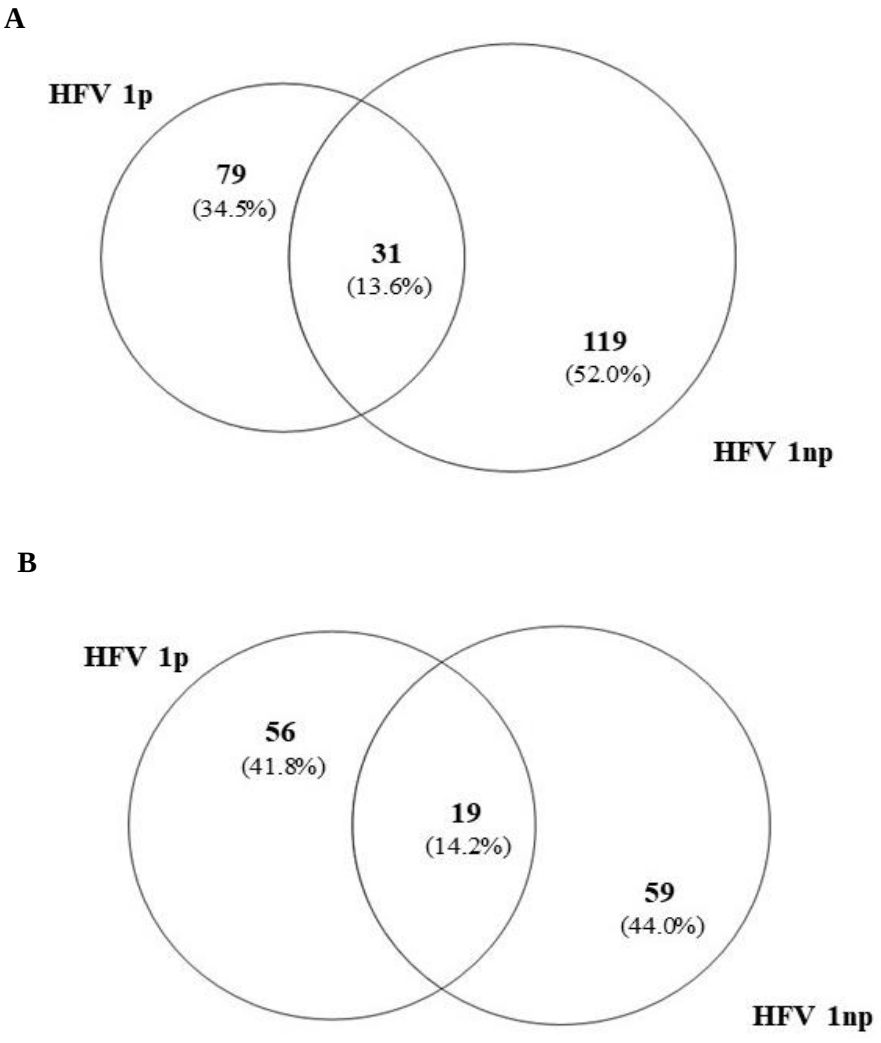


Figura II.16.A. Diagrama de Venn de las OTUs del bioindicador *Escherichia coli* compartidas entre las comunidades bacterianas de los reactores HFV 1p y HFV 1np (con plantas y sin plantas, respectivamente). **B.** Diagrama de Venn de las OTUs compartidas entre los reactores HFV 1p y HFV 1np de bioindicador *Enterococcus*.

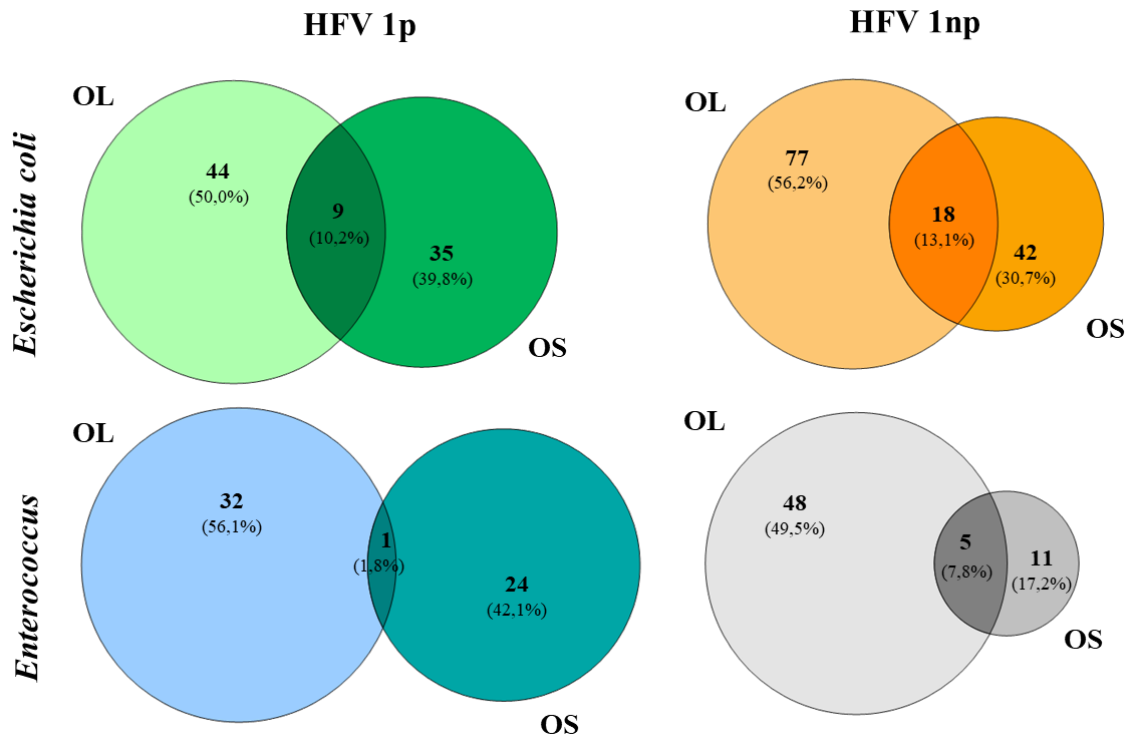


Figura II.17. Diagramas de Venn correspondientes a las OTUs compartidas de los bioindicadores *Escherichia coli* y *Enterococcus* obtenidas para cada uno de los reactores (HFV 1p y HFV 1np, con y sin plantas respectivamente) en los periodos de obstrucción leve (OL) y obstrucción severa (OS).

La diversidad bacteriana, en términos de riqueza (D_{Mg}), diversidad (H') y homogeneidad (J'), muestra diferencias significativas entre los tres índices analizados ($p<0,05$) de los reactores y periodos de muestreo (Tabla II.10). Significativa es la reducción del índice de homogeneidad del bioindicador *Enterococcus* en el reactor HFV 1np (0,70±0,02; $p\leq0,05$) en condiciones de obturación severa, coincidente con la reducción de OTUs para este mismo bioindicador (Tabla II.10). Esta Tabla II.10, también muestra el valor medio de fragmentos de restricción (S) y la abundancia relativa total (N), ambos requeridos para el cálculo de esos índices, como se indicó en el material y métodos.

Tabla II.10. Número de fragmentos de restricción terminales (T-RFs), valores de abundancias totales (N), e índices de riqueza de Margalef (D_{Mg}), de diversidad de Shannon-Weaver (*H'*) y de homogeneidad de Pielou (*J'*), calculados a partir de los datos generados por los perfiles de T-RFLP del producto de amplificación del gen *16S rRNA* para *Enterococcus*, y del gen *lacZ* para *Escherichia coli* de los efluentes de los reactores con plantas (HFV 1p) y sin plantas (HFV 1np) en los dos periodos muestreados (OL y OS). Los datos se expresan como la media ± desviación estándar.

Bioindicador	**Reactor**	**Periodo muestreo**	**Nº T-RFs** (S)	**Abundancia relativa total** (N)	**Índice de Margalef** (D_{Mg})	**Índice de Shannon-Weaver (*H'*)**	**Índice de Pielou (*J'*)**
Enterococcus	HFV 1p	OL	32 ± 0,00	8038,81 ± 3875,67	3,45 ± 0,21 **a; b**	2,78 ± 0,11 **a**	0,80 ± 0,03 **a**
		OS	24 ± 1,15	33610,98 ± 4532,74	2,21 ± 0,13 **a**	2,60 ± 0,06 **a**	0,82 ± 0,01 **a**
	HFV 1np	OL	48 ± 1,15	49246,24 ± 8899,83	4,35 ± 0,24 **b**	3,32 ± 0,02 **b**	0,86 ± 0,01 **b**
		OS	11 ± 1,00	10225,57 ± 606,60	1,08 ± 0,24	1,67 ± 0,11	0,70 ± 0,02
Escherichia coli	HFV 1p	OL	44 ± 2,52	30267,50 ± 9645,12	4,17 ± 0,04 **c; d**	2,91 ± 0,07 **c**	0,77 ± 0,03 **c; d**
		OS	35 ± 1,73	11809,50 ± 4120,71	3,63 ± 0,30 **c**	2,58 ± 0,21 **c**	0,84 ± 0,01
	HFV 1np	OL	77 ± 6,56	266,31,72 ± 1478,91	7,46 ± 0,25 **d**	3,69 ± 0,08 **d**	0,85 ± 0,00
		OS	42 ± 3,46	7221,16 ± 976,28	4,62 ± 0,06	3,18 ± 0,02	0,85 ± 0,01

a: Indica diferencias significativas para el bioindicador *Enterococcus* respecto a tipo de reactor (HFV 1p y HFV 1np) ($p \leq 0,05$)
b: Indica diferencias significativas para el bioindicador *Enterococcus* respecto a periodo de muestreo (OL y OS) ($p \leq 0,05$)
c: Indica diferencias significativas para el bioindicador *E. coli* respecto a tipo de reactor (HFV 1p y HFV 1np) ($p \leq 0,05$)
d: Indica diferencias significativas para el bioindicador *E. coli* respecto a periodo de muestreo (OL y OS) ($p \leq 0,05$)

II.4 │DISCUSIÓN

El estudio de las comunidades bacterianas, como acercamiento a la determinación de la eficiencia de sistemas de tratamientos de aguas residuales, ha sido abordado en varios trabajos a través de métodos de huella génica, tales como las técnicas ARDRA (Gich *et al.*, 2000), DGGE (Piterina & Pembroke, 2013), ARISA (Duarte *et al.*, 2019), o, T-RFLP (Xiang *et al*., 2020). Como previamente hemos avanzado, este tipo de metodologías se basan en la valoración del gen *16S rRNA*, o, los espacios intergénicos (ITS, *Internal Transcribed Spacer*) localizados entre la subunidad grande (23S rRNA) y la subunidad pequeña (16S rRNA) del ribosoma procariota.

De manera específica, en este capítulo se ha llevado a cabo el análisis de la estructura de las comunidades bacterianas de los efluentes de un humedal artificial mediante las dos metodologías de huella genética ARDRA y T-RFLP. Estas dos metodologías se basan en la amplificación por PCR de un segmento génico, seguida de la digestión de los amplicones con una endonucleasa de restricción, y la posterior comparación de los distintos patrones de bandas de restricción obtenidos (Rodas *et al*., 2006). Concretamente, en este estudio, el análisis de los perfiles de huella génica o *fingerprint* se realizó con el gen *16S rRNA*, para el género *Enterococcus*, y, el gen codificante de la β-galactosidasa (*lacZ*) de *Escherichia coli*.

La literatura científica reporta al segmento completo del gen *16S rRNA* como marcador molecular a utilizar en los dos métodos *fingerprint* empleados en este estudio. Así, Cui y colaboradores (2018) analizaron, mediante perfiles T-RFLP, la estructura de la comunidad bacteriana presente en aguas residuales domésticas regeneradas, con objeto de reutilizarlas para la irrigación de campos de cultivo. También, Sakamoto y colaboradores (2003), llevaron a cabo análisis de perfiles de huella del gen *16S rRNA* mediante el empleo de *primers* género-específicos, llegando a diferenciar especie de bacterias pertenecientes al género *Bifidobacterium*, constituyentes de la comunidad bacteriana de muestras de

materia fecal humana. Por tanto, independientemente del estudio y de su enfoque, lo destacable es el uso de cebadores, los cuales no solo deben ser específicos sino también suficientemente generales para que puedan amplificar todas las poblaciones bacterianas de interés (Schütte *et al*., 2008).

Más aun, en métodos *fingerprint* es aceptable usar cualquier marcador genético, mientras otorgue información sobre la población objetivo, y siempre que contenga dominios de secuencia conservados apropiados para el diseño de cebadores (Madigan *et al.*, 1997; Marsh, 1999). Este es el caso del gen marcador *lacZ,* cuyo empleo en este trabajo ha proporcionado información en torno a la valoración del grupo coliformes y específicamente tomando como referencia la especie *E. coli*. Así, en esta tesis, la valoración del gen *lacZ* para la población constituida predominante por *E. coli,* representó una optimización de los métodos de huella génica a desarrollar. La validación de los juegos de cebadores del gen *lacZ* (ZL-1675/ZR-2548) mediante amplificación, secuenciación y análisis filogenético –donde se forma un clado para la especie *E. coli* con un valor *bootstrap* del 96% (Figura II.13)–, corroboró la validez de los mismos.

Los patrones de restricción obtenidos de acuerdo a la técnica ARDRA son reproducibles y presentan resoluciones óptimas (Figura II.14). En este sentido, ARDRA es un método válido para la caracterización de comunidades ambientales, debido a su capacidad de comparación rápida de las poblaciones microbianas presentes en diferentes ecosistemas (Pukall *et al*., 1998). No obstante, en varios estudios, se han sugerido las limitaciones del método *fingerprint* ARDRA, desatacándose en los mismos que i) carece de sensibilidad en la detección de miembros no dominantes; ii) presenta una escasa resolución según el tamaño de la banda; iii) carece de información cuantitativa; y, iv) sólo muestra una diversidad relativa. Todo lo anterior, junto con la resolución limitada para identificar un grupo filogenético específico dentro de una comunidad compleja (Cho *et al*., 2003; Fan *et al*., 2018), hace que la implementación de ARDRA haya servido como punto de partida para el T-RFLP.

El polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP) es una herramienta molecular rápida, altamente reproducible y robusta para el estudio de la estructura de la comunidad bacteriana (Thies, 2007; Kadam *et al*., 2018). Esto significa la posibilidad de determinar con cierta confianza los cambios espaciales y temporales de esas estructuras comunitarias. La reproducibilidad de los patrones de restricción permite que los análisis sean precisos y verificables (Behr *et al*., 1999), e imprime una ventaja significativa con respecto a otros métodos de elaboración de perfiles de la comunidad bacteriana como el ya mencionado ARDRA, o el método DGGE, cuyo análisis se basa en geles de acrilamida.

Los fragmentos de restricción que configuran un perfil, se entienden también, como unidades taxonómicas operacionales (OTUs) (Pedrós-Alió, 2006; Llames, 2011). Las diferencias de esos perfiles, tanto del gen *16S rRNA* (*Enterococcus*), como del *lacZ* (*E. coli*), se revelan, por tanto, como alteraciones en la composición poblacional de los mismos (Kitts, 2001; Schütte *et al.*, 2008).

Metodológicamente, la comparación poblacional entre matrices requiere una serie de ajustes de los perfiles T-RFLP, ya que, durante la electroforesis capilar se presentan variaciones en la migración de las bandas. A pesar de que en varios trabajos se utilizaron tanto el agrupamiento manual de las bandas (Blackwood *et al.*, 2003; Rodrigues *et al*., 2015), así como el redondeo al entero más próximo de los pares de bases (Blackwood *et al.*, 2007), en este trabajo los ajustes se hicieron basados en una agrupación estadística, tal y como han sugerido diversos autores (Dunbar *et al.*, 2001; Abdo *et al.*, 2006; Ruan *et al*., 2006; Nishi *et al.*, 2015; Erdiansyah *et al.*, 2021). Una de las herramientas que permiten este acercamiento del ajuste de la migración de las bandas –fijando un umbral y obteniendo así perfiles T-RFLP consenso de los triplicados llevados a cabo para cada una de las matrices– es el software *T-Align* (Smith *et al*., 2005). Además, esta herramienta permite obtener las matrices binarias (presencia/ausencia) y matrices de abundancias para la determinación cuantitativa de los índices de diversidad bacteriana.

El análisis de las OTUs en el humedal artificial objeto de estudio, llevado a cabo a través de los patrones derivados de los efluentes de los reactores plantados y sin plantar, evidenció los cambios poblacionales mediante las comparaciones entre los diferentes perfiles de T-RFs. Como se ha demostrado, las comunidades bacterianas son afectadas no solo por las propiedades fisicoquímicas, sino también por la presencia o la ausencia de plantas (Lazzaro *et al*., 2008; Bru *et al*., 2011). Particularmente, la retención de las cargas bacterianas en el sustrato –en el entorno de la rizosfera– implicará una mejora en la calidad del agua regenerada.

La mayor o menor retención de las poblaciones bacterianas en este sustrato es resultado de la presencia de *Canna indica* y *Xanthosoma sp.*, y/o de la obstrucción progresiva del lecho. Así, en el reactor no plantado, comparado con aquel plantado, se recogió un mayor número de OTUs para *Enterococcus* (41,74%) y *E. coli* (38,89%) en condiciones de obturación leve (Figura II.15). Igualmente, en condiciones de obturación severa, este porcentaje para *E. coli* fue de 21,21% comparado con el 17,88% obtenido para el reactor plantado (Figura II.15). Estos resultados están en consonancia con aquellos recogidos por Kadam y colaboradores (2018), los cuales también reportaron una reducción de OTUs en los reactores plantados. Esta disminución puede explicarse por la retención de poblaciones bacterianas en el entorno de la rizosfera, lo que podría correlacionarse con la función de biorremediación que ejercen las plantas y su microbiota.

Una excepción a esta distribución se reportó para *Enterococcus*, en condiciones de obturación severa, donde la tendencia fue a la inversa (9,57% no plantado *vs.* 20,87% plantado) (Figura II.15B). Se ha visto que especies de *Enterococcus* son capaces de formar biopelículas (Fioriti *et al.*, 2021), lo que potencialmente interferiría en el número de OTUs determinado para la matriz agua. Estas biopelículas se forman en los intersticios de los sedimentos, pudiéndose, además, adsorber a partículas en suspensión (Reichert *et al*., 2021). En aguas residuales las especies generalmente descritas han sido *E. faecalis* y *E. faecium*, las cuales además, como también se ha visto en este trabajo de tesis, son claves en aguas contaminadas con materia fecal (Fioriti *et al.*, 2021; Reichert *et al*., 2021).

Esta diferencia entre los reactores plantado y no plantado también puede observarse cuando se valora el número de OTUs compartidas a lo largo de todo el periodo de muestreo. Como se presenta en la Figura II.17, en los sistemas con plantas se puede inferir una posible especiación de un grupo de *E. coli* (9 OTUs compartidas en el reactor HFV 1p), mientras que para *Enterococcus,* se ahonda no solo en esta posible especiación, sino también, en la mencionada retención derivada de la capacidad de *Enterococcus* para formar biopelículas (1 OTU compartida en el reactor HFV 1p).

Estos resultados estarían también en consonancia con aquellos derivados de esas matrices de abundancias que nos permiten el cálculo de los diferentes indicadores de diversidad bacteriana –índice de riqueza (D_{Mg}), de diversidad (H') y de homogeneidad (J')–. Por un lado, a rasgos generales, el índice de riqueza es bajo (Tabla II.10), lo que se asociaría con comunidades bacterianas constituidas de promedio por ca. 50 OTUs, y definidas como comunidades de riqueza baja o intermedia (Moyer *et al*., 1996; Engebretson & Moyer, 2003; Schütte *et al*., 2008). Por otro lado, los índices de homogeneidad son relativamente altos, indicando que las poblaciones de *Enterococcus* y *E. coli* se distribuyen de igual manera dentro de la comunidad. Así, las abundancias de los tipos bacterianos están equitativamente distribuidas en la población. De manera significativa el índice de diversidad disminuye nuevamente en aquellos sistemas sin plantas, lo que coincidiría con un mecanismo de especiación. En este sentido, se ha reportado que la obstrucción de los reactores del humedal favorece la reducción de la diversidad bacteriana en beneficio de las especies predominantes (Hua *et al*., 2018).

En este trabajo el uso de bioindicadores no solo ha permitido analizar los cambios en la comunidad bacteriana, sino también, en su vertiente más aplicada, reconocer la eficiencia de retención bacteriana por parte de estos sistemas de regeneración de aguas, y la adecuación de estas aguas tratadas acorde a sus usos.

Palm Tree Mulch as Substrate for Primary Treatment Wetlands Processing High Strength Urban Wasterwater

Herrera-Melián, J.A., González-Bordón, A., Martín-González, M.A., García-Jiménez, P., Carrasco-Acosta, M., Araña, J. 2014, Journal of Environmental Management, 139 (2014), 22-31.
https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.11.051

Journal of Environmental Management 139 (2014) 22–31

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Environmental Management

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jenvman

Palm tree mulch as substrate for primary treatment wetlands processing high strength urban wastewater

J.A. Herrera-Melián [a,b,*], A. González-Bordón [a], M.A. Martín-González [b], P. García-Jiménez [c], M. Carrasco [c], J. Araña [a,b]

[a] Dpto. de Química, Campus Universitario de Tafira, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35017 Canary Islands, Spain
[b] CIDIA, Campus Universitario de Tafira, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35017 Canary Islands, Spain
[c] Dpto. de Biología, Campus Universitario de Tafira, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35017 Canary Islands, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 26 July 2013
Received in revised form
4 November 2013
Accepted 9 November 2013
Available online 26 March 2014

Keywords:
Treatment wetland
Clogging
Organic substrate
Palm tree
Giant reed

ABSTRACT

The life span of subsurface flow treatment wetlands is determined by the clogging of the substrate. Thus, the influent should undergo primary treatment to reduce loadings of suspended solids and dissolved organic matter. An-organic based substrate should be less prone to clogging because of its remarkably higher porosity and plasticity. Mulch obtained from branches of the Canarian palm tree (*Phoenix canariensis*) has been tested as substrate for mixed flow, intermittently fed treatment wetland mesocosms processing high strength urban wastewater. The effect of the presence of plants (*Phragmites* and *Cyperus*), influent pressure and hydraulic loading rate was studied. The best removals (SS: 89%, COD: 77%, turbidity: 82%) have been obtained with planted reactors treating highly concentrated influents at the lower hydraulic loading rates tested. The palm tree mulch units achieved similar removals of SS, COD and turbidity to one having gravel as substrate and planted with common reed. Mulch obtained from stems of giant reed (*Arundo donax*) provided similar removals of SS and turbidity but that of COD was lower. The combination of organic-based TWs with gravel-based ones provided high removals (SS: 95%, COD: 78%, turbidity: 95%) while the risk of clogging was strongly reduced.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The basic components of treatment wetlands (TWs) are the substrate (usually gravel), biofilm, plants and water. In the particular case of subsurface flow TWs, their performance and life span greatly depend on the substrate, clogging being one of the most important problems of this wastewater treatment technology. In this sense, the concentration of suspended solids (SS) in the influent is a key parameter to be controlled as high SS loading rates would lead to faster clogging by means of the physical filling of the substrate pores. It is also known that most solids are settled near the inlet zone of TWs (Caselles-Osorio et al., 2007). For high-strength wastewaters, a pre-treatment aimed at reducing the concentration of SS should be employed before treatment with subsurface flow TW. However, low SS alone does not prevent clogging as biodegradable organic matter can help to develop biofilm clogging (Caselles-Osorio and García, 2006). Thus, in addition to SS loading rate, that of COD should also be low enough to control the development of biofilm. Clogging problems in vertical flow treatment wetlands (VF) seemed to be minimized with COD and TSS loading rates below 20 g/m^{2}d and 5 g/m^{2}d, respectively (Winter and Goetz, 2003).

Gravels of different diameters have usually been employed as substrate of TWs. This or any other mineral medium has a fixed "hosting capacity" for solids which is determined by its porosity. An alternative substrate material with a reduced clogging risk would be one made of mulch. Within the limits of the Campus of Tafira (Gran Canaria, Canary Islands, Spain) there is a well preserved Canarian palm tree (*Phoenix canariensis*) forest. This species is present in all the Canary Islands and it has been introduced as an ornamental plant in many places around the world. However, as the palms grow, dry branches fall down and accumulate around the tree trunks increasing the risk of fire, particularly in the long, dry summers of the Archipelago. Once triturated, the dry branches (mulch) have been successfully employed as soil amendment and in the production of compost. In addition to this, the giant reed (*Arundo donax*) has become an environmental concern in the

* Corresponding author. Dpto. de Química, Campus Universitario de Tafira, 35017, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Canary Islands, Spain.
E-mail address: jherrera@dqui.ulpgc.es (J.A. Herrera-Melián).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.11.051
0301-4797/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Canary Islands because of its invasive character and ability to propagate forest fires (Arévalo et al., 2005). To find a new application for these forest wastes, the performance of TW mesocosms using palm tree and giant reed mulches as substrates was studied with the main goal of removing SS, as they are considered to be the first cause of clogging of TWs (Knowles et al., 2011). Some of the potential advantages of using these organic substrates instead of a mineral one (gravel) are the following:

- Regarding environmental aspects, the mulch is obtained from a waste that must be periodically removed to reduce the risk of fire in palm forests, while using the mineral substrate (gravel) implies mining activity with an associated environmental impact. In addition to this, the organic substrate is renewable, locally available and abundant.
- Regarding wastewater treatment in TWs, organic substrates can enhance plant settlement and growth, adsorb organic pollutants more efficiently and host a larger amount of SS before becoming clogged due to their greater porosity. Thus, using an organic-based TW previously to a mineral-based TW can enlarge the life span of the latter.

However, considering the potential advantages of organic-based TWs the existing literature on their use for wastewater treatment is still scarce. For instance, Aslam et al. (2007) compared gravel and compost-based VFs for the treatment of refinery wastewaters and found that the compost-based TW provided better BOD and COD removals. Tee et al. (2009) compared rice husk and gravel-based TWs and the effect of plants on the removal of nitrogen and phenol. The presence of plants and the organic substrate improved the elimination of phenol. These authors attributed these results to the larger mass of rhizomes developed by the plants in the organic substrates. Saeed and Sun (2011) compared three hybrid systems (vertical-horizontal) containing wood mulch, gravel and a mixture of both. The VFs with mulch removed more ammonia, total nitrogen, total phosphorus and BOD. Nevertheless, the horizontal flow TWs (HFs) with gravel worked better than the corresponding ones with mulch because the former released organic matter, phosphorus and SS to the effluent. Wang et al. (2010) employed an organic-based VFs for the treatment of liquid sludge. Their goal was to determine if the designed TW could be used to treat sludge and the role of plants on the quality of the effluent. The results showed the feasibility of using the TW for the treatment of sludge containing high concentrations of organic matter. No clogging problems appeared during the experimental time and the presence of the plants, particularly *Phragmites* improved treatment.

The goals of the present study were to explore the feasibility of using palm tree and giant reed mulches as substrates in TWs as pretreatment of high strength urban wastewaters, to determine the effect of the presence of plants, influent pressure and hydraulic loading rate on the performance of organic-based TWs and to compare the performance of palm tree mulch TWs to that of conventional gravel-based ones.

2. Material and methods

2.1. Analysis of water and palm tree mulch

Water quality parameters (BOD_5, COD, SS and turbidity) were measured in unfiltered, homogenized samples as described by standard methods (APHA, 2005). Hence, total BOD_5 and COD were measured. BOD_5 (henceforth BOD) can include nitrification as no inhibitor was added. NH_4^+-N was determined with a selective electrode from Crison (Barcelona, Spain). PO_4^{3-}–P was determined as molybdate-reactive phosphate (Murphy and Riley, 1958).

The elemental composition of the palm tree mulch was determined after sterilization in autoclave, drying (110 °C for one week), trituration and sieving. The fraction with particle size between 106 and 250 ìm was washed with milli-Q water in a vacuum filtration system to remove color and other impurities. Then, the so-treated material was dried again at 100 °C for 24 h. The elemental analysis was performed with a 1112, FlashEA Elemental Analyzer (Thermo Electron Corporation, Milan, Italy).

2.2. Description of the TWs

The TWs employed in this study were 275-L polypropylene recipients (length: 1.17-m, height: 0.48-m, width: 0.49-m) from Progarden (Italy). The water flow used was mixed, i.e. the inlet was located at the top of the recipient and the outlet at the bottom of the opposite side (Table 1). According to the substrate and plant used, the following nomenclature was used:

- **PM+r**: palm tree mulch with common reed (*Phragmites*).
- **PM**: only palm tree mulch without plant as a control.
- **PM+C**: palm tree mulch with *Cyperus*.
- **AdM**: substrate obtained from giant reed (*Arundo donax*) without plant. This substrate was prepared by manually cutting fragments of giant reed stems, thus the resulting fragments (3–10 cm long) were notably larger than those of palm tree mulch.
- **Gravel**: basaltic gravel (gravel: 99.8%, sand: 0.1%) with an average diameter of 6.5-mm and d10-d60: 4.11–5.51 mm, planted with common reed. This unit was used as control for comparison purposes. The total surface area of the reactor bed was calculated to be 128.5 m^2 according to Lyew and Sheppard (1997).

The porosity of the substrates was determined directly with water. The porosity of the gravel was 49%, that of the wet palm tree mulch was 56% and that of giant reed mulch was 83%.

The height of the palm tree and giant reed mulch substrates was 25-cm while that of gravel was 40-cm. Organic-based TWs were shallower than gravel-based ones because the former were thought to be used as a primary treatment of high-loaded urban wastewater. Considering that SS are retained mainly on the surface of palm tree mulch, it was decided to provide an accumulation zone for SS. The reactors were prepared at the beginning of August, 2011. During August and September, wastewater from the Campus was intermittently added to wash the substrate, to allow the plants to develop their rhizomes and the bacterial population to colonize the substrate. During this period the mulch volume was reduced by one third approximately because of the compacting effect of water. Hence, more mulch was added to achieve the required substrate height.

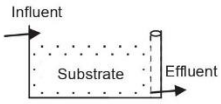
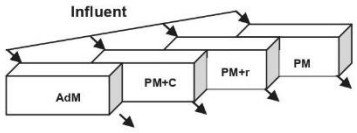
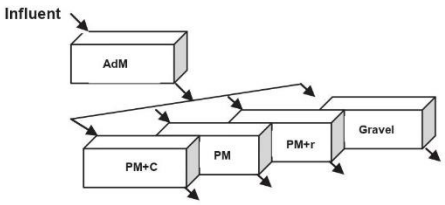
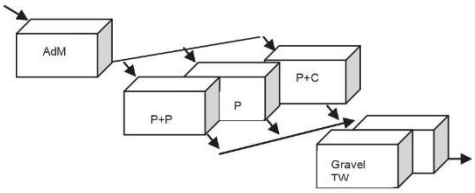
2.3. Measurement of daily inflows and hydraulic loading rates

The influent was collected from a 17-m^3 tank with a timer-controlled triturating pump. Daily inflows were measured for each reactor by collecting the effluent in recipients located below them. With the help of a pump and a flow-meter, the volume of water was measured and referred to the collection time and reactor surface. Hydraulic loading rates (HLR) values are provided in L/m^2d.

2.4. Experimental periods

The experiments were performed outdoors in the Campus of Tafira, (University of Las Palmas de Gran Canaria, Canary Islands, Spain). The preliminary experimental period of this work (Table 1) was designed to determine if it was possible to substitute septic and

Table 1
Experimental periods and reactors arrangements.

Experimental period	Reactors arrangement
Preliminar: testing different reactor configurations and substrates. A mixed flow reactor is selected.	
1st period: testing the effect of plants and comparing the palm tree mulch to that of giant reed. Direct influent, pump program: 2 min every 2 h (high HLR).	
2nd period: indirect influent (reduced energy). Pump program: 2 min each 2 h (high HLR). **3rd period:** indirect influent, reduced hydraulic loading rate. Pump program: 1 min every 2 h (low HLR).	
4th period: combination of organic and mineral-based TWs.	

Imhoff tanks with a TW acting as an aerobic high strength wastewater pre-treatment. Such a TW should be equally or more efficient than the tanks, at least at SS removal and not become clogged for a long time. After a preliminary phase in which different substrates, flow regimes and reactor configurations were tested, a mixed flow, organic-based TW with intermittent influent was selected as the best option. Under these conditions, the oxygenation of the substrate would be maximized. As a consequence, the organic matter that is retained in the substrate might be more readily degraded than under anaerobic conditions and the substrate clogging prevented (Knowles et al., 2011). In addition to this, under prevailing aerobic conditions the emission of greenhouse gases would also be reduced (Maltais-Landry et al., 2009).

Then, a first experimental period (September, October and November 2011) was established to determine the effect of the presence of plants on the efficiency of the mesocosm TWs containing palm tree mulch as substrate and to compare this substrate to one prepared with giant reed mulch. The influent was pumped directly into reactors PM + C, PM, PM + r and AdM for 2 min every 2 h (high HLR) to alternate fill-and-drain periods.

The 2nd and 3rd experimental periods were devoted to comparing the reactors with palm tree mulch as substrate with and without plants (PM + r, PM and PM + C) to one with gravel planted with common reed (gravel) under high HLR but reduced influent pressure (2nd period: from December, 2011 to February, 2012) and combined reduced influent pressure with reduced hydraulic loading rate (3rd period: from February to March, 2012). To reduce the influent pressure for both the 2nd and 3rd periods, the influent from the 17-m^3 tank was directed to the reactor with giant reed mulch (AdM) from which it flowed down by gravity to those with palm mulch and the one with gravel. In addition to this, during the 3rd period the pump was operated for 1 min periods every 2 h (low HLR).

The 4th experimental period of this work (May, June and July 2012) was aimed at studying the performance of the combined organic-based TWs (AdM, PM, PM + r and PM + C) as primary treatment of two subsurface horizontal flow gravel-based TWs in series.

2.5. Statistics

The more conservative average removals were used instead of those obtained from average concentrations. Both values may not coincide.

The statistical treatment of the data was performed with the free program R-Commander which is developed under R environment and allows the application of the most usual statistic tests (http://www.r-project.org). The initial treatment consisted of detecting and removing outliers by means of a box-and-whiskers plot. To compare the efficiency of the reactors under the indicated experimental conditions, the average removals of the different parameters were contrasted in each case. A one-way ANOVA was routinely used if the data were normally distributed and homocedastic. To determine the normality of the data the Shapiro–Wilk test was used and that of Bartlett for homocedasticity. The ANOVA was also applied if the data were homocedastic and their log transformed values were normally distributed. If the log transformation did not work, the non parametric Kruskal–Wallis test was used. The significance level used was 0.05, i.e., if p-value >0.05 the null hypothesis of no difference between means was accepted. Regarding correlation, the Pearson test was used if the data were homocedastic and normally distributed. Otherwise, the Spearman's rank correlation test was

employed. Correlation was accepted as significant when p-value <0.01.

3. Results and discussion

The elemental analysis of the organic substrate revealed a high content of carbon (41.57%), low contents of sulfur (0.37%) and nitrogen (2.55%). The concentration of hydrogen was 4.52% and that of oxygen (50.99%) was obtained by subtraction from the total and the sum of the other elements.

3.1. Description of the influent

The influent was raw wastewater from the Campus of Tafira (Gran Canaria, Canary Islands, Spain). The average concentrations (±standard deviation, n° of data) of the influent were BOD: 629 (±268, 12) mg/L, COD: 813 (±272, 43) mg/L, SS: 243 (±106, 43) mg/L and turbidity: 240 (±186, 48) NTU. According to the characteristics of the three standardized types of wastewater (high loaded, moderate loaded and low loaded) (Metcalf and Eddy, 2003; Molinos-Senante et al., 2012), the influent can be considered to be high loaded for BOD (>450 mg/L), between high (>1250 mg/L) and moderate loaded (>750 mg/L) for COD and moderate loaded (>350 mg/L) for SS. These high values and their strong variations in concentrations are characteristic of the effluents of small communities (Salas et al., 2008). Hence, the results obtained in this study could be reasonably extrapolated.

3.2. Hydraulic loading rates

To determine the effect of variables such as the substrate, the presence of plants and the influent pressure, the removals achieved by the different reactors were compared. Yet, for a congruent comparison among the removals obtained by the different reactors studied it is necessary that the loading rates (hydraulic and those of COD, SS and turbidity) applied to each reactor inside each experimental period were statistically similar. The average HLR applied to the reactors during the first three experimental periods are shown in Table 2.

The statistical analysis of the HLR indicated that there were no significant differences for this parameter among the corresponding four reactors inside each experimental period (p-values > 0.2). The HLR employed in this study were in the upper range of those found in the literature. For instance, Herrera Melián et al. (2010) applied HLR between 40 and 100 L/m^{2}d to a VF mesocosm and Fountoulakis et al. (2009) applied HLR ranging between 65 and 227 L/m^{2}d to different TWs in small communities in Greece.

3.3. Concentrations, surface loading rates and removals

Table 3 shows the concentrations and surface loading rates applied and the removals achieved of SS, COD and turbidity for every experimental period and unit.

Table 2
Average (±std. dev., number of data) hydraulic loading rates (L/m^{2}d) applied to the reactors during the three experimental periods.

Reactor → period ↓	PM + r	PM	PM + C	AdM
1st direct influent, high HLR Gravel	135 ± 35, 7	135 ± 33, 7	133 ± 12, 6	121 ± 16, 4
2nd indirect influent, high HLR	191 ± 101, 11	160 ± 49, 12	196 ± 80, 11	207 ± 83, 11
3rd indirect influent, low HLR	81 ± 21, 18	90 ± 23, 23	95 ± 35, 23	100 ± 42, 16

SS are the principal but not the only cause of clogging in TWs as they physically fill the pores of the substrate (Knowles et al., 2011). Thus, a primary treatment must be particularly efficient at SS removal to minimize clogging of the subsequent treatment units. Additionally, if the treated wastewater is intended to be used for irrigation, it must be taken into account that high concentrations of SS in water impede irrigation by drippers and sprinklers and also affect the quality of crops produced (Pescod, 1992; Liu and Huan, 2009). Sedimentation of SS can be a valuable disinfection mechanism in TWs as high SS removals have been correlated to those of viruses (Kadlec and Knight, 1996). In this study, the average concentrations and loading rates of SS in the influent were highly variable as shown by the high standard deviations obtained. This was caused by the natural variability in composition of the samples, the difficulty of achieving similar inflows in the different reactors and sometimes by obstructions in the influent tubes.

The USEPA recommends turbidity levels below 2 NTU and WHO proposes concentrations of suspended solids of less than 50 mg/L for water to be used for unrestricted irrigation (USEPA, 2004; Ayers and Westcot, 1985). In Spain, the Royal Decree (RD) 1620/2007 of December 7th establishes the legal framework for reuse of treated wastewaters. For irrigation purposes the maximum limits of SS and turbidity are 20 mg/L and 10 NTU, respectively.

The loading rates of COD of this study (Table 3) are in the upper range of those found in the literature. For instance, Fountoulakis et al. (2009) applied COD loading rates as high as 133 g/m^{2}d to a subsurface flow TW that were 1.75 times higher than those designed for the system. Herrera Melián et al. (2010) applied an average COD loading rate of 93 g/m^{2}d to VFs, while the average COD loading rate applied to four VFs in Spain were 48.8 g/m^{2}d (Puigagut et al., 2007).

Winter and Goetz (2003) found a positive correlation between clogging and loading rates of SS and COD in 21 VFs in Germany. They observed that those that received SS and COD loading rates below 5 and 20 g/m^{2}d, respectively did not experiment clogging problems. If this SS loading rate of 5 g/m^{2}d is taken as a reference, it can be said that the SS loading rates applied in this study, with average values ranging between 29 and 83 g/m^{2}d were remarkably high.

3.4. Mulch-based TWs as primary wastewater treatment

Septic and Imhoff tanks are commonly used for wastewater pretreatment and SS settling in small communities (Barros et al., 2008). These systems provide good removal efficiencies of SS (septic tanks: 50–60%, Imhoff tanks: 60–70%) but lower ones in the case of organic matter (BOD, septic tanks: 20–30%, Imhoff tanks: 30–40%), (Salas et al., 2008). As shown in Table 3, SS removal for the organic-based TWs ranged between 66% for the reactor with palm tree mulch and *Cyperus* (PM + C) and 74% for the one with common reed (PM + r). These results are better than those obtained by septic tanks and similar to those of Imhoff tanks. In addition to this, upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors have also been proposed as a pre-treatment of TWs. Barros et al. (2008) have shown that UASB reactors can remove 64–66% of total COD at a surface loading rate of 441–475 g/m^{2}d and 82–91% of SS at 223–346 g/m^{2}d. These results are comparable to those obtained in this work during the 2nd and 3rd periods with even greater COD removals at higher organic loading rates. Additionally, the hydraulic retention time (HRT) of the UASB was 2.2–2.3 days, while those of the palm mulch-based wetlands used in this study were lower than 3 h.

Nevertheless, during the first weeks, the TWs with palm tree mulch released color to the water. This color was most probably caused by the partial leaching of lignin from the organic substrate

Table 3
Average (±standard deviation, number of data) values of concentrations (mg/L) and loading rates (g/m^{2}d) of SS, COD and turbidity for each reactor and experimental period and the obtained average removals (%).

	Gravel Concentration Loading rate Removal	**PM+r** Concentration Loading rate Removal	**PM** Concentration Loading rate Removal	**PM+C** Concentration Loading rate Removal	**AdM** Concentration Loading rate Removal
SS					
1st period	–	229 (±173, 12)	269 (±234, 12)	262 (±219, 12)	200 (±112, 12)
direct influent	–	34 (±26, 7)	45 (±34, 7)	51(±33, 6)	29 (±11, 4)
high HLR	–	74	70	66	72
2nd period	253 (±132, 11)	234 (±221, 11)	207 (±187, 11)	266 (±218, 11)	–
indirect influent	55 (±52, 5)	77 (±79, 7)	36 (±28, 9)	48 (±49, 8)	–
high HLR	83	76	75	80	–
3rd period	322 (±210, 11)	780 (±573, 11)	662 (±482, 11)	725 (±399, 11)	–
indirect influent	30 ± 20, 10)	83 (±59, 8)	51 (±40, 10)	51 (±29, 10)	–
low HLR	78	89	78	83	–
COD					
1st period	–	820 (±358, 12)	834 (±236, 12)	869 (±248, 10)	736 (±231, 11)
direct influent	–	122 (±59, 7)	112 (±35, 6)	129 (±37, 5)	96 (±22, 4)
high HLR	–	59	53	59	40
2nd period	609 (±155, 11)	618 (±289, 11)	620 (±205, 11)	717 (±325, 11)	–
indirect influent	128 (±86, 7)	101(±68, 7)	98 (±56, 9)	135 (±93, 8)	–
high HLR	62	61	63	68	–
3rd period	620 (±142, 11)	1174 (±447, 11)	1296 (±435, 11)	1253 (±418, 11)	–
indirect influent	62 (±16, 10)	103 (±26, 7)	93 (±37, 9)	103 (±82,10	–
low HLR	65	77	73	73	–
Turbidity					
1st period	–	237 (±113, 19)	257 (±106, 19)	266 (±96, 17)	213 (±108, 18)
direct influent,	–	33 (±18, 8)	35 (±14, 8)	38 (±13, 6)	25 (±9, 5)
high HLR	–	65	58	62	65
2nd period	235 (±85, 11)	199 (±88, 11)	227 (±104, 11)	244 (±117, 11)	–
indirect influent	43 (±22, 6)	35 (±21, 7)	37 (±17, 7)	42 (±41, 6)	–
high HLR	72	62	61	70	–
3rd period	239 (±73, 16)	347 (±131, 17)	363 (±145, 17)	373 (±143, 17)	–
indirect influent	22 (±10, 13)	32 (±15, 12)	29 (±11, 14)	37 (±20, 15)	–
low HLR	73	82	70	79	–

(Namasivayam et al., 1998). Saeed and Sun (2011) found that subsurface horizontal flow TWs with organic substrate released organic matter, phosphorus and SS to the effluent and consequently they advised against the use of organic substrates in this case. Nevertheless, the behavior of an organic substrate in a TW will depend not only on the water flow (HF or VF) but also on its chemical composition (relative concentration of cellulose, lignin, etc.) and fragment size (smaller fragments can release more color). During these experiments it was observed that dry giant reed fragments could be submerged in water and little color was released because they did not become rotten easily. Since the idea was to find an organic substrate that would release little or no color and that it would be obtained from abundant forest waste in the region, stems of giant reed (*Arundo donax*) were also tested. This invasive plant is Mediterranean in origin (Puértolas et al., 2010) but it can be found throughout the Canary Islands where it has been widely used in agriculture. However, during the last decades this activity has rapidly decreased and giant reed has become an environmental concern because of its invasive character and ability to propagate forest fires. This is why giant reed mulch was also tested and compared to that of palm tree as substrate for primary TWs. After using this reactor for two weeks it was evident that its effluent color was clearly less intense than that of the palm tree mulch. Thus, it was decided to study and compare its efficiency to those of the former ones for the 1st experimental period.

For the 1st period, the SS loading rates applied to the four reactors were statistically similar (p-value: 0.756) and so were the SS removals achieved by them (Table 3, PM + r: 74%, PM: 70%, PM + C: 66%, AdM: 72%, p-value: 0.5765). Although the COD loading rates for the 1st period were statistically similar for all the reactors (p-value: 0.687) regarding removal, the obtained results were different from those of SS. The reactor with giant reed mulch (AdM) obtained the lowest COD reduction (40%), lower than those with palm tree mulch (PM + r: 59%, PM: 53% and PM + C: 59%, Table 3). The COD removals achieved by AdM and PM were statistically similar and lower than that of PM + r. As observed for SS, turbidity loading rates (p-value: 0.52) and removals (Table 3, AdM: 65%, PM + r: 65%, PM: 58%, PM + C: 62%) were not significantly different for the 1st period.

The reactor with giant reed mulch (AdM) provided similar removals of SS and turbidity to those of the reactors with palm tree mulch. Nevertheless, the latter achieved better COD removals than the reactors with palm tree mulch and plants (PM + r and PM + C). This result can be explained by considering the larger size of the giant reed mulch fragments with respect to those of the palm mulch. Thus, the giant reed mulch is much more porous and would host a notably lower concentration of bacteria per volume unit and the retention and/or degradation of dissolved organic matter would also be lower. However, the higher porosity of the giant reed mulch allows efficient retention of SS with a lower clogging risk. Thus, it seems reasonable to place this substrate close to the TW inlet where SS settlement is more intense.

Consequently, it can be concluded that a mixed flow, intermittently fed, mulch-based TW can be a good alternative to anaerobic reactors (septic and Imhoff tanks and UASB reactors) as a primary treatment of urban wastewater in small communities.

3.5. The effect of concentration and surface loading rates on removal

During the analysis of the samples it seemed that the highest removals were achieved for the most concentrated ones. Thus, the

obtained results were analyzed for possible correlations between influent concentrations, loading rates (hydraulic and those of COD, SS and turbidity) with removals for the reactors with palm tree mulch. In this way, a general idea of the effect of these variables on removal could be ascertained. Since the results from the other reactors are quite similar only those of PM + r will be shown. Fig. 1 illustrates the removals of SS, COD and turbidity for PM + r *versus* their influent concentrations, surface loading rates and HLR, respectively.

As can be observed, there was a positive, in most cases significant (p-values < 0.01) correlation between the concentrations of the parameters analyzed and their removal (Fig. 1(a), (d) and (g)). Nevertheless, weak or nil correlations (with p-values > 0.01 in all cases) were obtained between removals and organic loading rates (Fig. 1(b), (e), (h)). Although correlations between removal and HLR were weak and not significant in all cases (p-values > 0.01), the effect of HLR was negative (Fig. 1(c), (f) and (i)). Nevertheless, correlations between HLR and removals of SS, COD and turbidity for the reactor with gravel were also weak but not negative, most probably because of the higher physical resistance of gravel in comparison to that of the organic substrate. The fact that in almost cases correlations were logarithmic (highest R^2 values) may

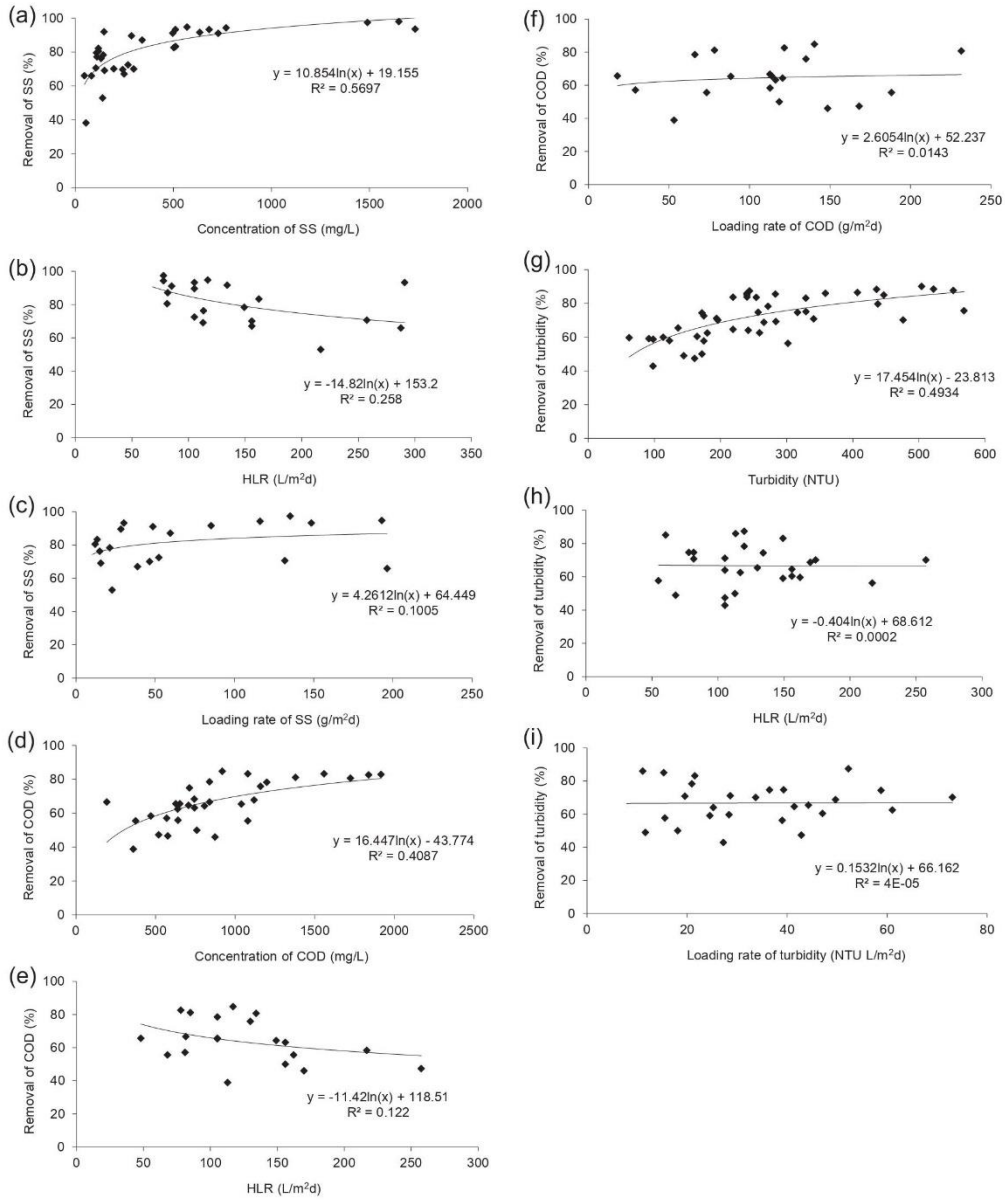


Fig. 1. Removals (%) of SS (a, b, c), COD (d, e, f) and turbidity (g, h, i) for PM + r *versus* influent concentrations, surface loading rates and HLR, respectively.

indicate that with the concentrations and loading rates of the experiments the reactors could be close to their performance limit. These results indicate that under the experimental conditions employed in this study the palm tree mulch TWs will achieve the best removals with high strength wastewaters, as those typically found in small communities (Salas et al., 2008) but applying short influent pulses.

3.6. The effect of the plants

To many authors plants are inherent to TWs as they intervene in many processes that affect removal efficiency (Taylor et al., 2011). For example, plants reduce water inflow rate helping to settle suspended solids, remove nutrients and organic pollutants, release dissolved oxygen and exudates through their roots and affect diversity and activity of microbial communities (Brix, 1997; Tanner, 2001; Stottmeister et al., 2003; Faulwetter et al., 2009). To determine the effect of plants on the reactor studied, performances of reactors with palm tree mulch with plant (PM + r and PM + C) were compared to that of the reactor with the same substrate without plant (PM) for the three research periods.

3.6.1. The effect of the plants on SS removal

The units with mulch and plants (PM + C and PM + r) were compared to the unplanted one (PM) for the three experimental periods for SS loading rates and removals. For the three reactors and each period, no significant differences among SS loading rates were observed (p-values > 0.2). Though SS removal was better for the planted units for the 2nd and 3rd periods (Table 3), the differences were not significant (p-values > 0.2).

3.6.2. The effect of the plants on turbidity removal

Turbidity loading rates for PM, PM + C and PM + r within the three experimental periods were statistically similar (p-values > 0.0577). Turbidity removals were also similar for the 1st (p-value: 0.694) and 2nd period (p-value: 0.1221). Nevertheless, for the 3rd period turbidity removals achieved by the planted units, PM + r (82%) and PM + C (79%) were similar (p-value: 0.3348) and better than that of PM (70%) (p-value: 0.0367).

3.6.3. The effect of the plants on COD removal

COD loading rates for the 1st period were similar (p-value: 0.687) for the three reactors. The planted units PM + C and PM + r achieved the same COD removal (59%). This value is significantly higher than that of PM (53%, p-value: 0.029) but not different to that of PM + C (p-value: 0.0797). Thus, though the planted units performed better in terms of COD removal, the difference for this period was not significant. For the 2nd period a similar result was observed. COD loading rates were similar for the three reactors (p-value: 0.915), but the efficiencies of PM (61%) and PM + r (63%) were similar but not significantly lower than that of PM + C (68%) (p-value: 0.363). Thus, the effect of the presence of the plants was neither remarkable. For the 3rd period, COD loading rates were not significantly different (p-value: 0.054) but in this case, PM and PM + C reduced COD by 73%, PM + r being better (77%) than the former ones but not significantly (p-value: 0.2414). As a conclusion, it can be said that the presence of the plants improved COD removal but not significantly.

The results obtained in this study regarding the positive effect of plants on the performance of palm tree mulch TWs are not conclusive. However, several authors have indicated that plants can mitigate the surface flow associated to surface clogging by means of the wind-induced sway of emergent shoots and stems that disturb the surface sludge layer and create macro-pores through to the subsurface (Brix, 1994; Molle et al., 2006; Knowles et al., 2011). In fact, the surface sludge layer emerges as a new soil for plant colonization than can improve wastewater treatment by SS retention and bacteria settlement. Thus, in terms of performance and clogging prevention the presence of plants in palm tree mulch TWs can be recommended.

3.7. The effect of temperature and influent pressure

The experiments described in this work were performed outdoors in the Campus of Tafira, (Las Palmas de Gran Canaria, Canary Islands, Spain). The average temperatures (°C, measured around 10 h a.m.) were 19.7 ± 1.6 in the 1st period (Sept–Nov), 15.4 ± 1.5 in the 2nd period (December–February) and 16.1 ± 1.8 in the 3rd period (February–March). As can be observed, the temperature was very stable with similar values in the different experimental periods. The effect of temperature on the removal of SS and turbidity is expected to be nil but the case of COD can be different. Nevertheless, if the average temperatures are compared to the removals of COD achieved by the organic-based reactors for the three periods (Table 3) it is obvious that the highest removals were not achieved during September–November with the highest average temperatures. In fact, PM and PM + C achieved similar performances in December–February with the "lowest" temperatures in comparison to those of the warmer period of September–November. Thus, it can be concluded that in these experiments temperature was constant enough to allow the comparison of the removals achieved in the different experimental periods.

In addition to this, in organic-based substrates the influent pressure or energy at the TW inlet can have a remarkable effect on performance because of their lower physical consistency. Consequently, a reduced influent pressure could minimize shortcutting and improve hydraulic performance in mulch-based TWs. To reduce the influent pressure, the direct influent of the 1st period was changed to indirect during the 2nd and 3rd periods by directing it to the AdM reactor from which it flowed down by gravity to the reactors with palm tree mulch and gravel (Table 1). The effect of influent pressure can be ascertained by comparing the efficiencies achieved by each reactor for the 1st and 2nd periods. The obtained results (Table 3) indicate that with the exception of turbidity for PM + r, the removals of SS, turbidity and COD were improved by reducing the influent pressure for PM + r, PM + C and PM. However, such improvements were small and not statistically significant. Only in the case of PM was COD removal significantly improved.

3.8. The effect of hydraulic loading rate

Similarly to the 2nd experimental period, during the 3rd one the influent was indirect but the pump operating time was reduced from 2 min down to 1 min every 2 h to decrease the hydraulic loading rate. However, during the 3rd period the influent was found to be much more concentrated. Thus, the lower HLR was compensated with higher concentrations to provide similar loading rates for SS, COD and turbidity. For instance, in the case of PM + r, the average HLR was significantly reduced from 160 L/m^{2}d down to 97 L/m^{2}d (p-value: 0.0045), but the concentration of SS was notably and significantly increased from 234 mg/L up to 780 mg/L (p-value: 0.0221). As a consequence, the resulting SS loading rates (2nd period: 77 g/m^{2}d, 3rd period: 83 g/m^{2}d) were not significantly different (p-value: 0.168). Similar results were obtained by the other reactors regarding COD and turbidity loading rates.

When the removals of COD, SS and turbidity of the 2nd and 3rd periods are compared for the mulch-based TWs, it is evident that reduced HLR provided better performance, being significant for the

unit planted with common reed (PM + r) for COD, SS and turbidity and the unplanted PM for COD.

3.9. The effect of combining reduced influent pressure and HLR

For PM + r, the removals of SS, COD and turbidity of the 1st period in comparison to the 3rd one were significantly increased (p-values < 0.00553) from 74% to 89%, from 59% to 77% and from 65% to 82%, respectively. The loading rate of SS for the 1st period (34 g/m^{2}d) was lower (p-value: 0.0298) than for the 3rd one (83 g/m^{2}d). The loading rates of COD and turbidity were not significantly different for both periods (p-value > 0.44).

In the case of the unplanted unit PM, the removal of SS of the 1st period (70%) was incremented up to 78% in the 3rd one, that of COD (53%) was also significantly improved (73%, p-value: 0.000716) and that of turbidity (58%) was increased up to 70%. The loading rates of SS, COD and turbidity between the 1st and 3rd periods were not significantly different (p-value > 0.262) and neither were the removals of SS and turbidity for both periods (p-values > 0.131).

The performance of the unit planted with Cyperus, PM + C was also improved by the combination of reduced HLR and influent pressure. In this case, SS removal was increased from 66% in the 1st period to 83% in the 3rd one, COD removal from 59% to 73% and that of turbidity was significantly improved from 62% to 79% (p-value: 0.00268). The loading rates of SS, COD and turbidity between the 1st and 3rd periods were similar (p-values > 0.261).

3.10. Gravel versus palm tree mulch as substrate for treatment wetlands

The foregoing results have shown that TWs containing palm tree mulch as substrate can provide remarkable removals of SS, turbidity and COD with medium to high strength wastewaters. Thus, an organic-based TW used as pre-treatment of a conventional (gravel-based) TW can minimize clogging in the latter. Nevertheless, one of the questions to be answered with this study was whether an organic-based TW could perform as well as a conventional (gravel-based) one. For this reason, a gravel-based reactor was compared for the 2nd and 3rd periods to those having palm tree mulch (PM + C, PM and PM + r) for the three parameters studied.

Regarding SS, during the 2nd period the gravel unit removed more SS (83%) than those with the organic substrate (PM: 75%, PM + C: 80%, PM + r: 76%) but not significantly (p-value: 0.12). For the 3rd period, PM (78%) and PM + C (83%) provided similar removals (p-value: 0.725) to that of the gravel (78%) but the unit with organic substrate and reed (PM + r, 89%) was better than the one with gravel (p-value: 0.005379).

For the 2nd period, turbidity loading rates were similar for all the reactors (p-value: 0.949). The reactor with gravel (72%) was as good as PM + C (70%) at removing turbidity. Though PM + r (62%) and PM (61%) were apparently worse, the differences among the four reactors were not significant. For the 3rd period, the reactor with gravel provided a removal (73%) that was among those of the organic-based reactors (PM + r: 82%, PM + C: 79% and PM: 70%) without significant differences (p-value: 0.8099).

For the 2nd period, COD loading rates (p-value: 0.915) and removals (PM + r: 61%, PM: 63%, PM + C: 68%, Gravel: 62%) were similar for the reactors with gravel and palm tree mulch (p-value: 0.363). For the 3rd period, the removals obtained by the reactors with gravel and mulch (PM + r: 77%, PM: 73%, PM + C: 73%, gravel: 65%) were also similar (p-value: 0.2414). Nonetheless, though the COD loading rate for the reactor with gravel was apparently much lower (62 g/m^{2}d) than those of the other reactors (PM + r: 103, PM: 93 and PM + C: 103 g/m^{2}d) the p-value obtained (p-value: 0.05405) was slightly greater than 0.05, indicating that it is not clear that the COD loading rates were similar.

These results indicate that palm tree mulch TWs, operated under the experimental conditions of this study, i.e. intermittent influent and mixed flow can perform as well as conventional, gravel-based TWs in terms of removals of SS, turbidity and COD. Furthermore, the use of palm tree and giant reed mulch as substrate of TWs provides an additional value to a waste that if not properly managed promotes forest fires. Additionally, the mulch can reduce the risk of clogging while achieving similar treatment performance. Additionally, the organic nature of the mulch can make it more efficient than gravel to remove organic pollutants such as pesticides and emerging pollutants from wastewater by sorption.

There are still many interesting points to be answered regarding the use of organic substrates in TWs. The degradation of the organic substrate can be counteracted by the accumulation of SS and this will change its physical properties and porosity. The evolution of plants and roots is expected to be different from that in a mineral substrate because all the volume of the organic substrate is virtually available for root development. These and other factors will affect the substrate porosity, the risk of clogging and the long-term treatment efficiency of the organic-based TWs.

3.11. Performance of the combination of organic-based and mineral-based TWs

The 4th experimental period of this work (May, June and July 2012) was devoted to studying the performance of the combined organic-based TWs (AdM, PM, PM + r and PM + C) as a primary treatment of a subsurface horizontal flow gravel-based TW composed of two tanks connected in series (Table 1). The overall HLR and surface loading rates of BOD, COD and SS rates were 68 L/m^{2}d, and 51, 58.7 and 21.5 g/m^{2}d, respectively. The obtained results are illustrated in Fig. 2.

In these experiments, the influent BOD was reduced from 758 mg/L to 245 mg/L (average removal: 53%) by the organic-based TW and to 40 mg/L by the mineral-based TW (global reduction: 85%). The average COD concentration of the influent (881 mg/L) was reduced down to 264 mg/L (average removal: 62%) by the organic-based TW and to 131 mg/L (average removal: 38%) by the gravel-based TW. The global COD reduction was 78%. The average concentration of SS of the influent (322 mg/L) was reduced to 50 mg/L (removal: 78%) in the organic-based TW and to 17 mg/L (removal: 70%) in the mineral-based TW, the global removal being 95%.

The European limits for organic matter and SS concentrations in treated wastewaters intended to be discharged into the environment are set for BOD (25 mg/L), COD (125 mg/L) and SS (35 mg/L) by the EU Directive 91/271 (Council of the European Union, 1991). In this study, the concentration of SS of the effluent was below the established limit that of COD (131 mg/L) was close to the limit while that of BOD (40 mg/L) was still too high. However, it must be considered that the surface loadings of COD and SS were much higher than the values taken as reference to avoid clogging (COD: 20 g/m^{2}d, TSS: 5 g/m^{2}d) according to Winter and Goetz (2003). In fact, if the surface used in these experiments is calculated by dividing 60 g BOD/he by the BOD surface loading rate (51 g/m^{2}d) a remarkably low value (1.2 m^2/he) is obtained. Thus, for wastewaters with such high concentrations the surface employed should be increased if those legal limits are to be met. Regarding turbidity, that of the influent (437 NTU) was reduced to 60 NTU (removal: 75%) in the organic-based TW and to 11 NTU (removal: 80%) in the mineral-based TW. The overall removal was 95%. If the treated water is intended to be used for crop irrigation, the maximum limits of SS and turbidity set by the Spanish RD 1620/2007 (20 mg/L

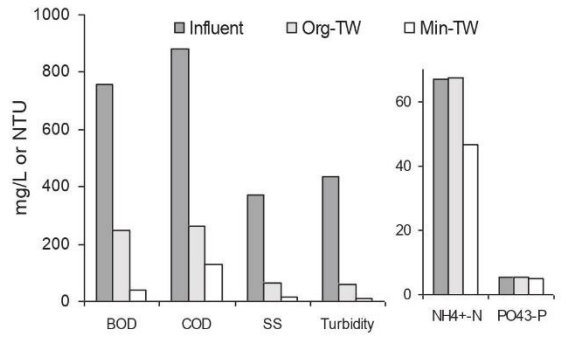


Fig. 2. Average values of BOD, COD, SS, turbidity, NH_4^+–N and PO_4^{3-}–P in the influent (■), effluent of the organic-based TW (■, Org-TW) and effluent of the mineral-based TW (□, Min-TW).

and 10 NTU, respectively) were met for SS (17 mg/L for SS) and almost for turbidity (11 NTU).

In addition to this, by using the organic-based TW the corresponding surface required for the subsequent TW can be drastically reduced. Barros et al. (2008) considered that the required area for a TW processing the effluent of a UASB can be reduced in the same percentage as the BOD percentage reduction achieved by the pretreatment method. Thus, according to the results of this study (Table 3), the subsequent TW area could be reduced by 53% which is the BOD removal achieved. Additionally, the authors considered this approach to be conservative because if the average SS removal is taken into account (73% in the present study), the possible surface area reduction would be greater. In addition to this, the risk of clogging of the mineral-based TW was strongly reduced by means of the high removals of SS and COD achieved by the organic-based TW. In this sense, it is interesting to note that this combination of organic and mineral based TW is still in operation without any clogging problem.

The organic-based TWs were not able to reduce the concentrations of NH_4^+–N and PO_4^{3-}–P. The average concentration of NH_4^+–N in the influent (67 mg/L) was slightly and not significantly increased to 68 mg/L by the organic-based TWs. The mineral TW was able to reduce that concentration to 47 mg/L. In this sense, the strong reduction of the concentration of organic matter (BOD and COD) achieved by the organic-based TWs would help the mineral TWs in reducing the concentration of ammonia. Although the fill-and-dry regime was able to significantly reduce BOD and COD, the high surface loading rates applied would not result in high enough dissolved oxygen for nitrification. The elimination of PO_4^{3-}–P was negligible. The average concentration of the influent, organic-based TW and mineral-based TW effluents (5.37, 5.5 and 5.1 mg/L, respectively) clearly reveal that the adsorbing ability of the mulch and mineral substrates was nil, as was the removal performed by the plants. Nevertheless, if the treated water is intended to be reused for irrigation the preservation of nutrients (N and P) is a valuable feature of this system.

4. Conclusions

According to the obtained results, the following conclusions can be drawn:

- A mixed flow TW using palm tree or giant reed mulch as substrate can perform better than septic and Imhoff tanks as primary treatment of high strength wastewaters.
- The reactor with giant reed mulch released notably less color and provided comparable removals of SS and turbidity than those with palm tree mulch.
- In general, the efficiency of the reactors with palm tree mulch was higher with more concentrated influents, it did not depend on the loading rates of COD, SS and turbidity and it was reduced with higher hydraulic loading rates. The combination of high concentrations and lower hydraulic loading rates provided the best performances.
- The presence of plants improved the efficiency of the reactors with palm tree mulch though not always significantly.
- The reactors with palm tree mulch achieved similar performances to the one with gravel and plant. Thus, palm tree mulch could replace gravel as substrate in mixed flow TWs or at least be used as a primary treatment to achieve very high treatment performance with a remarkable reduction of the risk of clogging.
- A palm mulch-based TW coupled with a mineral-based HF can meet the Spanish government limits for crop irrigation regarding SS and turbidity.

Acknowledgments

We thank Colm Sullivan for reviewing the English of this manuscript and José Manuel Afonso for his help in the laboratory.

References

APHA, AWWA, WEF, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Washington D.C).
Arévalo, J.R., Delgado, J.D., Otto, R., Naranjo, A., Salas, M., Fernández-Palacios, J.M., 2005. Distribution of alien vs. native plant species in roadside communities along an altitudinal gradient in Tenerife and Gran Canaria (Canary Islands). Perspect. Plant. Ecol. 7, 185–202.
Aslam, M.M., Malik, M., Baig, M.A., Qazi, I.A., Iqbal, J., 2007. Treatment performances of compost-based and gravel-based vertical flow wetlands operated identically for refinery wastewater treatment in Pakistan. Ecol. Eng. 30, 34–42.
Ayers, R.S., Westcot, D.W., 1985. Water Quality for Agriculture. In: Irrigation and Drainage Paper, vol. 29. FAO, Rome.
Barros, P., Ruiz, I., Soto, M., 2008. Performance of an anaerobic digester-constructed wetland system for a small community. Ecol. Eng. 33, 142–149.
Brix, H., 1994. Functions of macrophytes in constructed wetlands. Water Sci. Technol. 29, 71–78.
Brix, H., 1997. Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands? Water Sci. Technol. 35, 11–17.
Caselles-Osorio, A., García, J., 2006. Performance of experimental horizontal subsurface flow constructed wetlands fed with dissolved or particulate organic matter. Water Res. 40, 3603–3611.
Caselles-Osorio, A., Puigagut, J., Segú, E., Vaello, N., Granés, F., García, D., García, J., 2007. Solids accumulation in six full-scale subsurface flow constructed wetlands. Water Res. 41, 1388–1398.
Council Directive 91/271/EEC, 1991. Council directive concerning urban waste-water treatment. Official J. Eur. Commun. L135, 40–52.
Faulwetter, J.L., Gagnon, V., Sundberg, C., Chazarenc, F., Burr, M.D., Brisson, J., Camper, A.K., Stein, O.R., 2009. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: a review. Ecol. Eng. 35, 987–1004.
Fountoulakis, M.S., Terzakis, S., Chatzinotas, A., Brix, H., Kalogerakis, N., Manios, T., 2009. Pilot-scale comparison of constructed wetlands operated under high hydraulic loading rates and attached biofilm reactors for domestic wastewater treatment. Sci. Total Environ. 407, 2996–3003.
Herrera Melián, J.A., Martín Rodríguez, A.J., Arana, J., González Díaz, O., González Henríquez, J.J., 2010. Hybrid constructed wetlands for wastewater treatment and reuse in the Canary Islands. Ecol. Eng. 36, 891–899.
Kadlec, R.H., Knight, R.L., 1996. Treatment Wetlands. Lewis Publishers Inc, Florida.
Knowles, P., Dotro, G., Nivala, J., García, J., 2011. Clogging in subsurface-flow treatment wetlands: occurrence and contributing factors. Rev. Ecol. Eng. 37, 99–112.
Liu, H., Huan, G., 2009. Laboratory experiment on drip emitter clogging with fresh water and treated sewage effluent. Agr. Water Manage. 96, 745–756.
Lyew, D., Sheppard, J.D., 1997. Effects of physical parameters of a gravel bed on the activity of sulphate-reducing bacteria in the presence of acid mine drainage. J. Chem. Technol. Biotechnol. 70, 223–230.
Maltais-Landry, G., Maranger, R., Brisson, J., Chazarenc, F., 2009. Greenhouse gas production and efficiency of planted and artificially aerated constructed wetlands. Environ. Pollut. 157, 748–754.
Metcalf, Eddy, I., 2003. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. McGraw-Hill, New York.

Molinos-Senante, M., Garrido-Baserba, M., Reif, R., Hernández-Sancho, F., Poch, M., 2012. Assessment of wastewater treatment plant design for small communities: environmental and economic aspects. Sci. Total Environ. 427, 11–18.
Molle, P., Lienard, A., Grasmick, A., Iwema, A., 2006. Effect of reeds and feeding operations on hydraulic behaviour of vertical flow constructed wetlands under hydraulic overloads. Water Res. 40, 606–612.
Murphy, J., Riley, J., 1958. A single solution method for the determination of soluble phosphate in sea water. J. Mar. Biol. Assoc. UK 37, 9–14.
Namasivayam, C., Prahba, D., Kumutha, M., 1998. Removal of direct red and acid brilliant blue by adsorption on to banana pith. Bioresour. Technol. 64, 77–79.
Pescod, M.B., 1992. Wastewater Treatment and Use in Agriculture. In: Irrigation and Drainage Paper, vol .47. FAO, Rome.
Puértolas, L., Damásio, J., Barata, C., Soares, A., Prat, N., 2010. Evaluation of side-effects of glyphosate mediated control of giant reed (*Arundo donax*) on the structure and function of a nearby Mediterranean river ecosystem. Environ. Res. 110, 556–564.
Puigagut, J., Villaseñor, J., Salas, J.J., Becarés, E., García, J., 2007. Subsurface-flow constructed wetlands in Spain for the sanitation of small communities; a comparative study. Ecol. Eng. 30, 312–319.
Spanish Royal Decree 1620/2007, 7 December 2007. Spanish Regulations for Water Reuse. Real Decreto 1620/2007.
Saeed, T., Sun, G., 2011. A comparative study on the removal of nutrients and organic matter in wetland reactors employing organic media. Chem. Eng. J. 171, 439–447.
Salas, J.J., Martel, G., Vera, L., Sardón, N., 2008. Fundamentos de los sistemas de depuración natural (SDN). Tecnologías disponibles. In: Gestión sostenible del agua residual en entornos rurales. PROYECTO DEPURANAT, NETBIBLO, La Coruña.
Stottmeister, U., Wiesner, A., Kuschk, P., Kappelmeyer, U., Kastner, M., Bederski, O., Muller, R.A., Moormann, H., 2003. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. Biotechnol. Adv. 22, 93–117.
Tanner, C.C., 2001. Plants as ecosystem engineers in subsurface-flow treatment wetlands. Water Sci. Technol. 44, 9–17.
Taylor, C.R., Hook, P.B., Stein, O.R., Zabinski, C.A., 2011. Seasonal effects of 19 plant species on COD removal in subsurface treatment wetland microcosms. Ecol. Eng. 37, 703–710.
Tee, H.C., Seng, C.E., Noor, A.Md, Lim, P.E., 2009. Performance comparison of constructed wetlands with gravel- and rice husk-based media for phenol and nitrogen removal. Sci. Total Environ. 407, 3563–3571.
USEPA, 2004. Guidelines for Water Reuse. Municipal Support Division Office of Wastewater Management Office of Water, Washington D.C.
Wang, R., Korboulewsky, N., Prudent, P., Domeizel, M., Rolando, C., Bonin, G., 2010. Feasibility of using an organic substrate in a wetland system treating sewage sludge: impact of plant species. Bioresour. Technol. 101, 51–57.
Winter, K.J., Goetz, D., 2003. The impact of sewage composition on the soil clogging phenomena of vertical flow constructed wetlands. Water Sci. Technol. 48, 9–14.

The Effect of Plants on Pollutant Removal, Clogging, and Bacterial Community Structure in Palm Mulch-Based Vertical Flow Constructed Wetlands

Carrasco-Acosta, M., Garcia-Jimenez, P., Melián, J. A.H., Peñate-Castellano, N., Rivero-Rosales, A. 2019, Sustainability, 11(3), 632.
https://doi.org/10.3390/su11030632

sustainability

MDPI

Article

The Effects of Plants on Pollutant Removal, Clogging, and Bacterial Community Structure in Palm Mulch-Based Vertical Flow Constructed Wetlands

Marina Carrasco-Acosta [1], Pilar Garcia-Jimenez [1], José Alberto Herrera-Melián [2,*], Néstor Peñate-Castellano [2] and Argimiro Rivero-Rosales [3]

[1] Department of Biology, Instituto Universitario de Investigación en Estudios Ambientales y Recursos Naturales i-UNAT, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Campus de Tafira, Las Palmas de Gran Canaria 35017, Las Palmas, Spain; marina.carrasco@ulpgc.es (M.C.-A.); pilar.garcia@ulpgc.es (P.G.-J.)

[2] Department of Chemistry, Instituto Universitario de Investigación en Estudios Ambientales y Recursos Naturales i-UNAT, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Campus de Tafira, Las Palmas de Gran Canaria 35017, Las Palmas, Spain; nestorp1990@gmail.com

[3] Department of Chemistry, Instituto de Oceanografía y Cambio Global IOCAG, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Campus de Tafira, Las Palmas de Gran Canaria 35017, Las Palmas, Spain; argimiro.rivero@ulpgc.es

* Correspondence: josealberto.herrera@ulpgc.es

Received: 27 December 2018; Accepted: 23 January 2019; Published: 25 January 2019

check for updates

Abstract: In this study, the effects of plants on the performance and bacterial community structure of palm mulch-based vertical flow constructed wetlands was studied. The wetlands were built in August 2013; one of them was planted with *Canna indica* and *Xanthosoma* sp., and the other one was not planted and used as a control. The experimental period started in September 2014 and finished in June 2015. The influent was domestic wastewater, and the average hydraulic surface loading was 208 L/m^{2}d, and those of COD, BOD, and TSS were 77, 57, and 19 g/m^{2}d, respectively. Although the bed without plants initially performed better, the first symptoms of clogging appeared in December 2014, and then, its performance started to fail. Afterwards, the wetland with plants provided better removals. The terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of *Enterococci* and *Escherichia coli* in the effluents suggests that a reduction in their biodiversity was caused by the presence of the plants. Thus, it can be concluded that the plants helped achieve better removals, delay clogging, and reduce *Enterococci* and *E. coli* biodiversity in the effluents.

Keywords: Constructed wetland; mulch-based substrate; clogging; plants; T-RFLP

1. Introduction

Constructed wetlands (CWs) are particularly well suited for wastewater treatment in small communities, i.e., those with a <2.000 p.e. (person equivalent) because of their low cost, easy maintenance, high treatment efficiency, and visual appeal [1]. Similarly, CWs are environmentally friendly and a real alternative for the treatment of different types of wastewaters [2]. CWs are open, shallow reactors composed basically of an impervious layer, a mineral substrate (usually gravel or sand), helophytes, water, and the associated microbes. According to the water flow, CWs can be classified as horizontal flow (HF) or vertical flow (VF) and surface or subsurface flow. One of the main constraints of CWs is their high surface area, usually 3–5 m^2/p.e. VF CWs demand less surface and are more efficient than HFs because of the higher aeration of the substrates [3]. However, VF CWs usually include smaller-sized substrates, such as sand, to achieve a good surface influent distribution

and appropriate hydraulic retention times. One of the main problems associated with the use of sand in VF CWs is the risk of clogging [4]. A remarkable exception is the so-called "French system", which can treat raw domestic wastewater without primary settling [5].

CWs are considered to be more sustainable than conventional wastewater treatments, such as activated sludge [6,7]. However, a relevant proportion of the environmental impact of CWs is associated with the construction phase and, particularly, the use of gravel and/or sand as porous media. A conventional VF for 200 p.e. (3 m^2/p.e. with depth: 80 cm) would require 480 m^3 of gravel and/or sand Fuchs et al. [8] claimed that the construction phase impact could be significantly reduced by using local materials to minimize transport. Sand extraction poses serious threats to the environment in terms of erosion, loss of land and biological diversity, and the increase of poverty among people [9]. Additionally, some regions face supply constraints due to the overexploitation of natural aggregates in construction [10]. In the particular case of the Canary Islands, most of the sand used in the construction sector and beach regeneration has serious legal, environmental, economic, and political implications, because it is imported from the near Western Sahara in the African coast. This region, a former Spanish colonial territory, is still in disputes with Morocco and the Polisario Front [11]. The volume of sand and gravel devoted to the construction of CWs is a small proportion of the total amount extracted, but the point is to understand how sustainable CWs should be, ideally.

Over the last decade, many studies have been devoted to finding cost-effective substrates to increase the treatment efficiency of and/or minimize clogging in CWs [12]. The environmental impact of CWs can be drastically reduced by using wastes as substrates. Different materials, such as construction wastes, dewatered alum sludge [13], bamboo rings [14], palm tree mulch [15,16], and rice straw [17], have been tested.

Plants are considered to be an essential part of CWs. They help stabilize the bed surface, prevent clogging and channeled flow [18], and remove pollutants (N, P, heavy metals, etc.). Another important role of plants in CWs is their ornamental value [19] and the improvement of the CW's ecological significance, including wildlife habitat creation, cooling by means of evapotranspiration, recreation, and landscaping [20]. Additionally, plants can accelerate the development of microbial communities by promoting alternate aerobic and anaerobic micro-environments in roots [21]. Thus, not only the presence of plants, but also plant biodiversity plays a key role in the microbial communities and the CW's ability to remove pollutants.

The study of the bacterial communities allows us to analyze the contribution of these organisms to CWs and, to a large extent, to understand CWs work appropriately. Similarly, the study of bacterial communities could determine how different substrates, in combination with the presence of plants, affect the efficiency of CWs. From myriad of bacteria, fecal indicator bacteria (FIB) are the most commonly analyzed as a consequence of their involvement in European regulations and their impact on human wellness. FIB are represented by *Escherichia coli* and *Enterococci* [22,23]. The understanding of the whole bacterial community requires a detailed screening to unveil their diversity and distribution. Unlike bacteria culture methods, culture-independent methods based on molecular markers, such as 16s rRNA, and analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP) are an excellent approach to studying the bacterial community structure of CWs [24–27]. The analysis of T-RFLP patterns from different CWs and the comparison among them allows us to unveil to what extent a bacterial community can change and how far experimental conditions (flow, substrate type, presence of plants) would increase the performance of CWs.

The main goal of this work was to study the effect of plants on the performance of palm mulch-based VF CWs treating domestic wastewater. The role of plants was analyzed through both chemical and microbiological parameters. Furthermore, we aimed to compare the evolution over time of the structure of bacterial communities in the effluents of planted and unplanted mulch-based VF CWs.

2. Material and Methods

2.1. Location of Constructed Wetland and Sampling

The studied CW was designed to treat raw wastewater from a group of 4 households located in a rural zone of the Island of Gran Canaria, Spain. The households have a permanent population of 5 people, which is increased to 15 people during holidays and weekends.

Wastewater was discharged directly into a partially clogged, non-waterproofed, 36 m^3 seepage pit (Figure 1) with an approximate hydraulic retention time of 1.5 days. Two submergible, 700-W pumps, which were timer-controlled to function for 1 min each hour, were installed. Influent pulses were of approximately 15–20 L. The pit was supposed to provide partial sedimentation and homogenization. Thus, the influent can be considered to be partially decanted domestic wastewater.

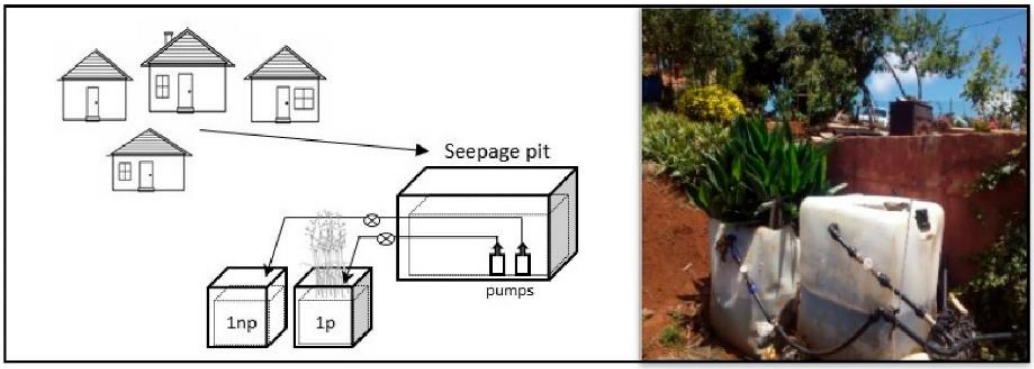


Figure 1. Layout and photograph of the constructed wetlands (CWs). 1p: planted vertical flow (VF) CW; and 1np: unplanted VF CW.

The CW was placed at 650 m above sea level. The average temperature is 18 °C, with January being the coldest month with an average temperature of 12 °C and August the warmest month with an average temperature of 23 °C. The average relative air moisture is 80% and the predominant wind direction is NNE. The average pluviosity is 485 mm/year, with the rainy season being between October and March.

The two VF CWs were constructed with 1.080-L plastic, cubic-like recipients. A layer of washed gravel with a height of 10–15 cm and an average diameter of 1 cm was deposited at the bottom of the recipients. The organic substrate was placed directly above the gravel and consisted of approximately 1-m-high mulch made of dry branches of Canarian palm tree (*Phoenix canariensis*). Additionally, two flow meters and valves were placed at the inlet of each reactor to measure and control the inflow. The influent was distributed on the surface of the VF CWs by means of 5 perforated tubes with a 12-mm diameter.

In order to value the contribution of the plants, one VF CW was planted with *Canna indica* and *Xanthosoma* sp. and compared with another VF CW (the control), which was not planted. These species of plant are characterized by large roots and big tubers, respectively. The analyses were started one year after the construction of the VF CWs, because the mulch substrate had been reduced by degradation and compaction.

Chemical and microbiological analyses were completed in unfiltered and homogenized samples of the influent and the effluents of the planted (1p) and unplanted (1np) VF CWs.

2.2. Analytical Methods

2.2.1. Water Analysis

Sampling was performed in the morning at 08:00 h, coinciding with when the pumps started a working period. The influent sample was taken during pumping from the influent outlet. The volume sampled was 1 L for each sampling point. The sampling recipients were 1-L plastic bottles for standard parameters, sterilized 50-mL glass bottles for *E. coli* and total *E. coli* enumeration, and sterilized 1-L amber glass bottles for DNA studies.

The water quality parameters were measured according to standard methods (APHA, 2005). BOD_5 (Biological Oxygen Demand, henceforth BOD) and Chemical Oxygen Demand (COD) were measured in homogenized, unfiltered samples. Ammonia-N and Na ions were determined with selective electrodes from Crison (Spain). Ca^{2+} and Mg^{2+} ions were determined by the EDTA titrimetric method. Anions ($PO_4{}^{3-}$, Cl^-, F^-, $NO_2{}^-$, $NO_3{}^-$, and $SO_4{}^{2-}$) were analyzed with a 792 Basic IC ionic chromatograph from Metrohm, equipped with a Metrosep A sup 4 column. The mobile phase and suppression solutions were 1.8 mM Na_2CO_3/1.7 mM $NaHCO_3$ buffer and 20 mM H_2SO_4, respectively.

The concentrations of *Escherichia coli* and total coliforms (TC) were determined by the membrane filter method with incubation at 37 °C for 24 h with a chromogenic agar (Panreac, Spain). *E. coli* displayed dark blue to violet colonies, while TC were assumed to be the sum of the *E. coli* colonies plus the salmon-red colonies.

2.2.2. Molecular Method

In order to analyze molecularly the bacterial community structure, a terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis was carried out in the effluents of both CWs. The analyses were performed in December 2014, when the initial clogging symptoms were observed in 1np (light clogging), and in May 2015, when the clogging in 1 np was severe (severe clogging).

DNA Isolation

First, 1 liter of water of each sample was centrifuged, and pellets pooled to extract genomic DNA. The DNA isolation was performed according to the CTAB method described by Murray and Thompson [28]. In detail, CTAB was made of CTAB 0.1% (w/v), PVPP 0.1% (w/v), TRIS-HCl pH 8.6, SDS 10, EDTA 0.5M pH 8, NaCl 4M, and β-Mercaptoethanol 2% (v/v). To obtain bacterial samples, 800-µg pellets were introduced into microtubes. Then, an extraction buffer (800 µL) was added to a microtube containing the source of the DNA template. The sample was held for 1 h in a bath at 65 °C, and mixed gently by inversion approximately every 20 min. Later, 800 µL of CIA (chloroform: isoamyl alcohol, 24:1 v/v) was added and centrifuged for 20 min at 3000 rpm in a Beckman centrifuge.

Successive washes in CIA and centrifugations were carried out until the supernatant became whitish. To continue, 2/3 of isopropyl alcohol at −20 °C was added, and a centrifugation for 30 min at 15,000× g was carried out. Afterwards, the isopropyl alcohol was removed, and 20 µL of ethanol (80%) was added. Finally, the samples were centrifuged for 5 min at 15,000× g. The supernatant was then discarded, and the pellets were resuspended in 15 µL of H_2O and stored at 4 °C until used.

The yield and purity of genomic DNA were calculated from the A260/A280 ratio measured using a NanoDrop spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). For each VF CW type and date, an assay was repeated three times with two replicates of each one.

T-RFLP Analysis

The bacterial 16s rRNA gene of genus-specific *Enterococcus* sp. [29] was amplified by using a HEX fluorescent-labeled forward primer E1 (5′-TCA ACC GGG GAG GGT-3′) and an unlabeled reverse primer E2 (5′-ATT ACT AGC GAT TCC GG-3′). The sequence encoding *lacZ* for *E. coli* [30] was amplified using a fluorescent-labeled 6 FAM forward primer ZL-1675 (5′-ATG AAA GCT GGC TAC AGG AAG GCC-3′). The corresponding unlabeled reverse primer sequence was ZR-2548

(5′-CAC CAT GCC GTG GGT TTC AAT ATT-3′). DNA (5 µL) was thus amplified in a PCR reaction mix (50 µL of total volume) containing 10 µL of the 5X PrimeSTAR^{TM} buffer (Takara Bio Inc), 0.5 µL of PrimeSTAR^{TM} HS DNA Polymerase (2.5 U/µL) (Takara Bio Inc), 4 µL of dNTPs mix (2.5 mM each one, Takara Bio Inc), and 2 µL of each oligonucleotide (10 µM).

The amplifications were performed in a thermocycler MyCyclerTM (Biorad, Hercules, CA, USA), with an initial denaturation at 96 °C for 4 min followed by 40 cycles at 94 °C for 1 min, 45 °C for 1 min, and 72 °C for 5 min. The final elongation was carried out at 72 °C for 10 min. The PCR-amplification products were checked by agarose (1%) electrophoresis at 75 V, resulting in gene fragments of 733 pb and 876 pb for *Enterococcus* sp. and *E. coli*, respectively. The amplifications were carried out by triplicate.

PCR-amplification products were separately purified using a Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison WI, USA). Purified products from *E. coli* and *Enterococcus* sp. were checked by electrophoresis on a 2% agarose gel. The concentrations were estimated as previously mentioned.

T-RFLP analysis was carried out based on the previous enzyme digestion assay. The NEBcutter v2.0 (New England BioLabs) software program was used to estimate a range of terminal restriction fragments (T-RFs) of varying sizes in silico. The restriction enzyme MseI (New England BioLabs) was selected in silico according to the yielded T-RFs of the respective PCR amplicons for *E. coli* and *Enterococcus* sp.

Enzyme digestion was performed with 100 ng of purified PCR amplicon for 3 h at 37 °C and inactivated at 65 °C for 20 min. Amplicon was then cut with 0.5 U of the restriction enzyme MseI (recognition site: T′TAA) according to the manufacturer's instructions (BioLabs, New England BioLabs). Restriction digestion was carried out 3 times for the *E. coli* and *Enterococcus* sp., respectively.

Sequencing was carried out on an ABI 3730 capillary sequencer (Life Technologies) by Secugen (Madrid, Spain), and the resulting sequences were analyzed using GeneMarker v1.85 (SoftGenetics). Optimizing was performed with different dilutions according to Secugen.

2.3. Statistics

2.3.1. Chemical and Microbiological Analysis

Average values of concentrations, surface loadings, and removals were compared by means of ANOVA if the data were homoscedastic (Bartlett test) and normally distributed (Shapiro–Wilk test). If these conditions were not met, the Kruskal–Wallis non-parametric test was used. In all cases, a significance level of 95% (p-value > 0.05) was utilized.

2.3.2. T-RFLP Analysis

The T-RFLP fragment sequences were obtained in .fsa format and GeneMarker software (SoftGenetics) was used for data scoring. The analyses of the polymorphic bands were only scored when they were highly reproducible and according to the peak height. Thus, small T-RFs ranging from 0 to 100 bp were excluded from the analysis, as they were considered to be PCR artifacts. Moreover, those T-RFs with intensities lower than 1% florescence, regarded as background interference, were also excluded from the matrices. Next, relative peak areas were recalculated according to the removal of artifactual peaks. The relative abundance of T-RFs was determined by calculating the ratio between the peak height of each peak and the total peak height of all the peaks within 1 sample and assuming that unambiguous T-RFs ranged in size from 100 to 850 bp.

For a comparative analysis of T-RFLP profiles, alignment was carried out through T-Align software with a default value threshold of 0.5 [31]. This software allowed for the compiling of peak profiles of different electropherograms, which corresponded to separate sampling days and sampling sites. In addition, the resulting consensus profile (henceforth overall consensus electropherogram) valued the presence or absence of T-RFs through a binary matrix by comparing with the other consensus profile of each of the other sites. For the purposes of qualitative valuation, the number of peaks in the consensus electropherograms was interpreted to be the operational taxonomic units (OTUs) [27], although

non-sequencing was carried out. Statistical comparisons of a number of T-RFs were performed using R software [32]. A one-way ANOVA followed by post hoc Tukey HSD and Dunnett T3 tests was used to detect significant differences ($p \leq 0.1$) between 1p and 1np under light and severe clogging. Additionally, Venn diagrams were performed with Venn Diagram Plotter (Integrative Omics, Pacific Northwest National Laboratory) [33].

3. Results and Discussion

3.1. Features of the Influent

As mentioned above, wastewater from the households was discharged directly into the seepage pit. The pit acted as a primary settler, making the influent more stable and reducing the concentration of the total suspended solids (TSS) as compared with other systems without a primary settler [16]. Table 1 shows the chemical and microbiological parameters of the influent. The number of data points changes for each parameter because only analytically valid data and non-outliers are included. Other parameters such as Na, electrical conductivity, and Sodium Absorption Ratio (SAR)were analyzed less frequently with the goal to obtain the agronomic quality of the effluents. As can be observed, the biodegradability (BOD/COD) ratio was 71% and turbidity was 521 NTU. With these traits, the influent can be considered to range from medium to high strength for organic matter (COD and BOD), low strength for TSS, and medium strength for nutrients N and P [34].

Table 1. Chemical and microbiological parameters, expressed as average value ± SD, associated with influent from September 2014 to May 2015.

Parameter	Average ± Std. Dev.	Max–Min, Number of Data Points	Units
COD	390 ± 114	783–260, 26	mg/L
BOD	279 ± 89	470–140, 22	mg/L
Total Suspended Solids	94 ± 27	137–48, 26	mg/L
Turbidity	521 ± 132	723–266, 26	NTU
N-ammonia	31.1 ± 6.2	42.8–20.2, 25	mg/L
Escherichia coli	1.5 (± 0.92) × 10^6	3.0 × 10^6–3.6 × 10^5, 23	CFU/100 mL
Total coliforms	3.1 (± 2.1) × 10^6	8.0 × 10^6–8.0 × 10^5, 23	CFU/100 mL
Na^+	114 ± 39	157–41, 9	mg/L
Hardness ($Ca^{2+}Mg^{2+}$)	3.0 ± 1.5	5.4–1.6, 10	meq/L
Sodium Absorption Ratio	6.2 ± 2.9	10.7–2.5, 9	
Electrical Conductivity	1945 ± 169	2190–1304, 25	µS/cm
pH	7,8 ± 0	8.0–7.5, 25	
N-Nitrites	0.09 ± 0.4	1.6–0.0, 17	mg/L
N-Nitrates	1.1 ± 0.83	2.6–0.0, 17	mg/L
P-Phosphates	10.4 ± 3.9	14.7–2.0, 17	mg/L
Sulfates	14 ± 17	76–4, 16	mg/L
Cl^-	99 ± 11	122–83, 17	mg/L
F^-	7.9 ± 1.2	10.23–6.27, 17	mg/L

3.2. Average Surface Loading Rates and Removals

The hydraulic loading rate (HLR) and organic loading rates (OLR) are represented in Table 2. The average BOD-LRs applied in the present study were 51 and 70 g/m^2d, for 1np and 1p, respectively. These values fall in the upper range of those found in the literature. For instance, the OLR applied to the French System's first stage ranged between 40 and 50 g BOD/m^2d [5].

The average HLR of 1p (233 L/m^2d) was significantly higher (p: 0.026) than that of 1np (189 L/m^2d). The same result was obtained for the BOD-LR (1p: 70 g/m^2d, 1np: 51 g/m^2d, p: 0.0233) and ammonia-N (1p: 9 g/m^2d, 1np: 7 g/m^2d, p: 0.0212). Non-significant differences were reported for the COD-LR (1p: 90 g/m^2d and 1np: 70 g/m^2d, p: 0.0965) and TSS-LR (1p: 22 g/m^2d and 1np: 18 g/m^2d, p: 0.129). Considering that in the cases of dissimilarity, the p-values were close to 0.05

(HLR, COD, and ammonia-N) and that there was no difference for COD and TSS, it can be concluded that both VF CWs received almost similar surface loadings and their differences in removal can be mainly ascribed to the presence of plants.

Table 2. Hydraulic loading rate (HLR, L/m^2d) and organic loading rates (OLR, g/m^2d) for 1p and 1np.

Parameters	Average ± Std. Dev. Max–Min	
	1p	**1np**
HLR	233 ± 54 323–146	189 ± 78 349–44
COD	90 ± 29 137–46	74 ± 40 171–18
BOD	70 ± 29 126–24	51 ± 23 98–6
TSS	22 ± 9 40–8	18 ± 10 41–4
Ammonia-N	9 ± 3 18–5	7 ± 3 16–1

Although for some parameters, 1p received higher surface loadings, its performance was equal to or better than 1np (Table 3). The removals were slightly higher for 1p, although not significantly ($p > 0.1$) for COD (1p: 58%, 1np: 50%), BOD (1p: 62%, 1np: 59%), TSS (1p: 77%, 1np: 72%), *E. coli* (1p: 79%, 1np: 73%), and TC (1p: 82%, 1np: 74%). The exception was turbidity removal (1p: 90%, 1np: 73%, p: 0.005) for which the presence of plants improved clearly. This result is of interest, because according to Spanish legislation, turbidity is a basic parameter for the reuse of treated wastewater [35].

Table 3. Average removals ± standard deviation, expressed as %, and range of maximum and minimum values.

Parameters	Average ± Std. Dev. Max–Min	
	1p	**1np**
COD	58 ± 17 77–8	50 ± 17 86–27
BOD	62 ± 28 97–(−3)	59 ± 30 92–(−34)
Turbidity	90 ± 10 98–62	73 ± 19 99–46
TSS	77 ± 20 99–20	72 ± 15 99–39
Ammonia-N	−39 ± 50 55–(−123)	−53 ± 59 48–(−192)
Phosphate-P	−38 ± 169 39–(−666)	−46 ± 163 36–(−675)
Sulfate	−297 ± 282 86–(−1071)	−175 ± 239 61–(−777)
E. coli	79 ± 26 99.9–11	73 ± 28 99.8–(−8)
Total coliforms	82 ± 26 99.6–(−20)	74 ± 25 99.9–5.5

The removals of ammonia-N, phosphate-P, and sulfate were negative in all cases. The increased concentrations of the ions can only come from the substrate, because it is an organic material and from the accumulated sludge. As mentioned above, high surface loadings were applied, and no rest periods were allowed. Additionally, the reactors were very efficient in removing TSS, which were retained

as sludge, mainly on the surface of the CWs. The negative removals of ammonia-N, phosphate, and sulfate ions are more likely to come from the leaching or degradation of the accumulated sludge, rather than from the mulch, which had been in operation for 1 year. In other works (e.g., [16]) with palm mulch, we have observed good physical and chemical stability of the substrate, both in vertical and horizontal CWs, once it became stabilized, after 2–3 months in operation. However, under the stringent conditions imposed to the reactors, a further degradation of the substrate cannot be rejected.

It can be thought that because the substrate was mainly of an organic nature, the release of these nutrients can be caused by its decomposition. In fact, Saeed and Sun [36] observed that HF CWs, which employed wood mulch and gravel-mulch media, released organic matter, phosphorus, and TSS. This behavior was not observed in the VF CWs tested in our study. Additionally, in the present research, the substrate height was reduced by 40% by compaction and degradation during the first few months of operation. However, the analyses were initiated 1 year after construction. Thus, it seems more probable that the released ions came from the fast mineralization of the particulate matter retained on the surface of the VF CWs under the appropriate conditions of temperature, moisture, and aeration.

3.3. Performance Evolution of the Wetlands

The evolution of parameters such as COD, BOD, turbidity, TSS, ammonia-N, *E. coli*, and TC are represented for the influent and the effluents of 1p and 1np (Figure 2). Missing points have been removed after the statistical analysis of outliers.

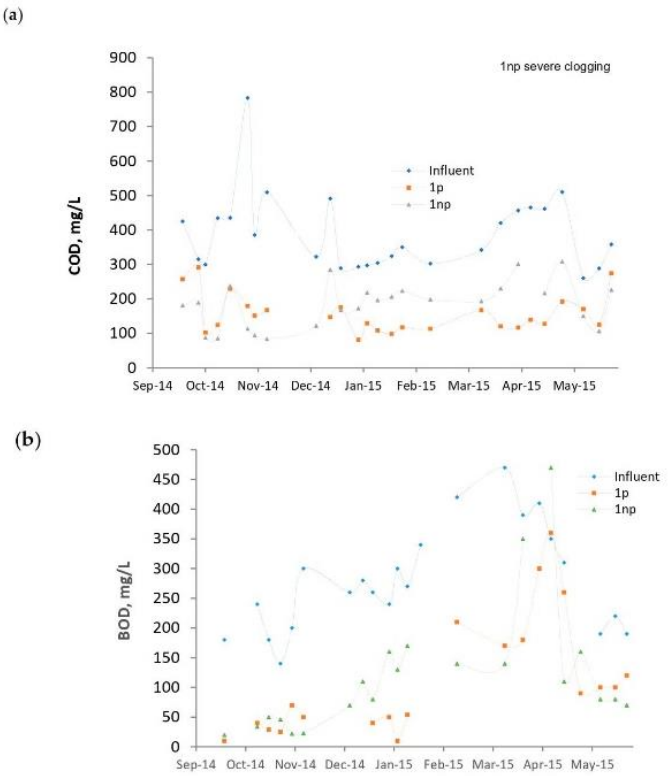
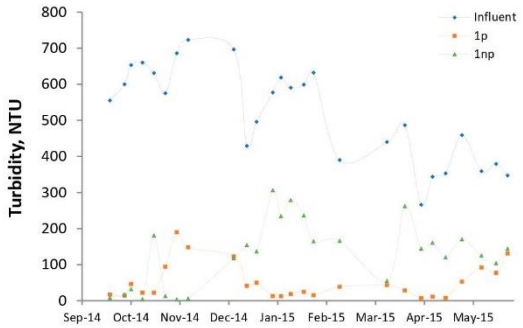
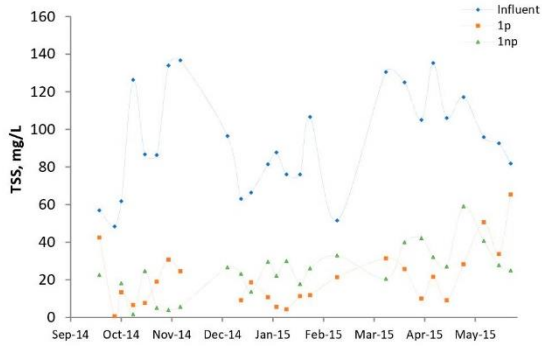


Figure 2. *Cont.*

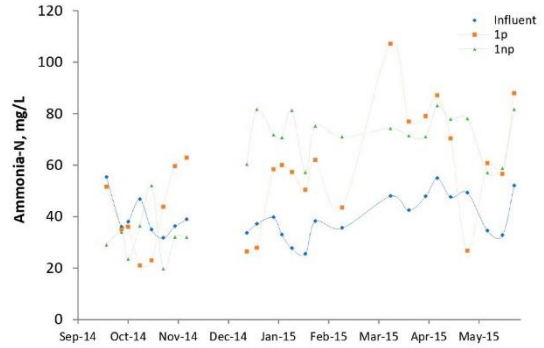
(**c**)



(**d**)



(**e**)



(**f**)

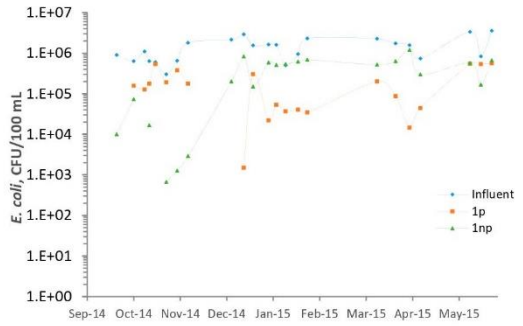


Figure 2. *Cont*.

(g)

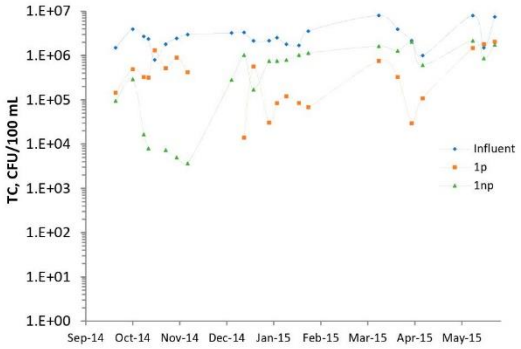
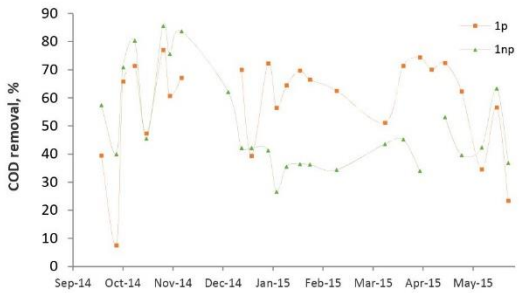


Figure 2. Concentrations in the influent (-♦-) and effluents of 1p (-■-) and 1np (-▲-) of (**a**) COD, (**b**) BOD, (**c**) turbidity, (**d**) TSS, (**e**) ammonia-N, (**f**) *E. coli*, and (**g**) TC.

Figure 3 shows the timeline of removals. During December 2014, the first clogging symptoms were observed in 1np. After that, the relative performance of the wetlands changed dramatically. Table 4 shows the average removals of chemical and microbiological parameters before and after clogging. Before clogging, 1np performed better than 1p with respect to turbidity (1np: 95% and 1p: 90%; p: 0.028), *E. coli* (1p: 59%, 1np: 97%, p: 0.007), and TC (1p: 82%, 1np:98 %, p: 0.001). Nevertheless, the removals of BOD (1p: 83%, 1np: 85%), COD (1p: 64%, 1np: 62%), and TSS (1p: 84%, 1np: 80%) were similar ($p > 0.288$). After clogging, 1np performance was significantly damaged ($p < 0.006$) for COD, BOD, turbidity, *E. coli*, and TC, while that of 1p was improved or remained unaltered.

(a)



(b)

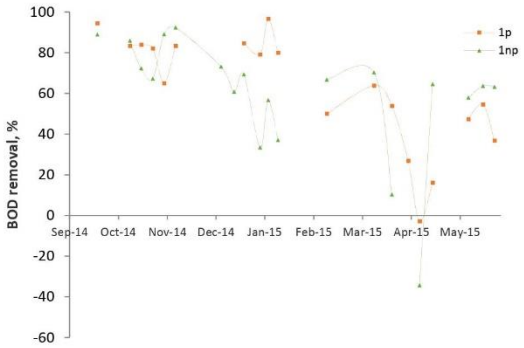
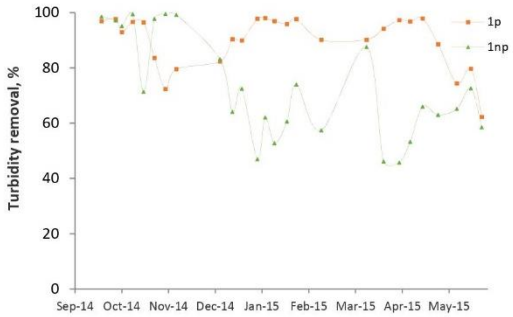
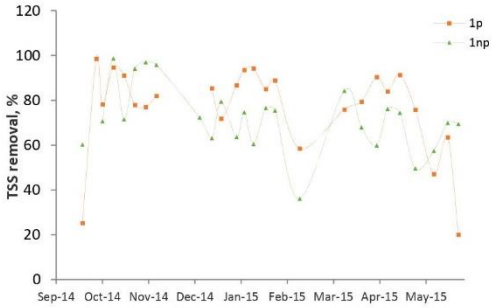


Figure 3. *Cont.*

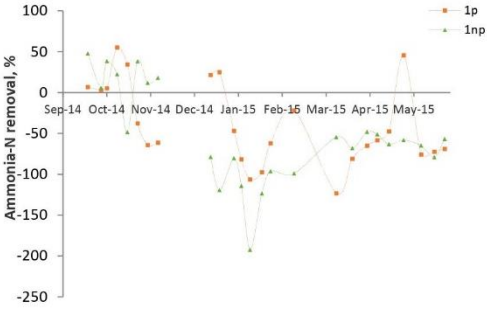
(c)



(d)



(e)



(f)

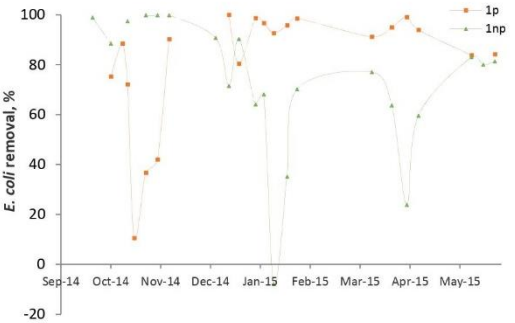


Figure 3. *Cont*.

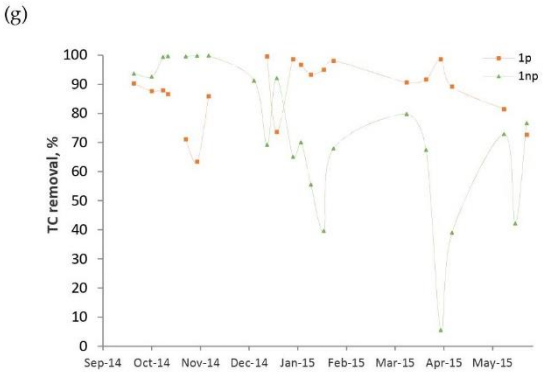


Figure 3. Evolution of the removal of (**a**) COD, (**b**) BOD, (**c**) turbidity, (**d**) TSS, (**e**) ammonia-N, (**f**) *E. coli*, and (**g**) TC for 1p (-■-) and 1np (-▲-).

The better performance of 1np before clogging can be explained by the stronger media compaction in the absence of plants and the consequent increase in the hydraulic retention time (HRT). In 1p, plant roots would be able to keep the media unclogged and, as a consequence, reduce the HRT and removal efficiency. In fact, it was observed that the effluent of 1np exited more slowly than that of 1p. Torrens et al. [37] observed a similar behavior in planted VF CWs, because the effluent from the first batches flowed through the beds more quickly than through unplanted ones. The authors claimed that the plant rhizomes could create preferential pathways. The preventing effect of plant roots regarding clogging has been discussed for a long time. Some studies have suggested that plants can make the substrate more porous [38], while others, such as Teixeira et al., [39] found a reduction in the porosity of the medium of HF CWs caused by the development of roots of Vetiver and Tifton 85 grasses. Yet, they considered that the low root volume, only 3.07% and 4.11% of the total pore space, could not have a great influence on clogging. However, Hua et al. [40] claimed that the role of plants varied throughout the clogging process. In the early stages, plant roots restricted water flow, while in the later stages, growing roots opened new pore spaces in the substrate. Our results are in agreement with those of Hua et al. [40] for the later stage but are the opposite for the early stages. This illustrates the complexity of the clogging process and the role of plant rhizomes.

Table 4. Average removals (%) achieved by 1p and 1np, before and after the light clogging of 1np.

	Wetland	Before	After
COD	1p	55	63
	1np	67	40
BOD	1p	82	85
	1np	83	55
Turbidity	1p	90	94
	1np	95	65
TSS	1p	75	87
	1np	84	71
Ammonia-N	1p	−7	−50
	1np	17	−115
E. coli	1p	59	95
	1np	97	60
Total coliforms	1p	82	94
	1np	98	69

The fact that 1np became clogged in such a short time, after about two years in operation, was unexpected. Additionally, in the case of 1p, a negative trend in performance along time can be observed, particularly for BOD (Figure 3). To understand these results, the following must be considered:

(i) The mulch employed was not fully stable. Although the analyses were made 1 year after the construction of the beds, the results indicate that the substrate was not fully stabilized. The palm branch is basically composed of a central rachis on which leaflets and spines are inserted. Once the branch is dead, the leaflets degrade relatively fast and release color, organic matter, and ions. Hence, their presence in palm mulch for CW substrate should be minimized.

(ii) The average surface loadings were relatively high (BOD: 59–62 g/m^2d, TSS: 18–22 g/m^2d, Table 2).

(iii) The reactors were in continuous operation without any rest period. In a survey of 169 full-scale VF CWs treating raw domestic wastewater, Paing et al. [5] claimed that the nominal BOD load calculated on the first stage was generally 40–50 g/m^2d, which is a similar value to that applied in this study. However, the success of the French system is partially justified by the good aeration of the substrate. This was achieved by different measures that include the application of rest periods, allowing the sludge accumulated on the surface to become mineralized.

The reduction in the performance of 1np caused by clogging underlines the importance of the substrate aeration. Regarding pathogen removal, Headley et al. [41] observed that aeration improved *E. coli* removal in horizontal flow wetlands. The better performance of 1p could be caused by the accumulation of sludge on the bed surface and the consequent HRT increase. At the same time, the presence of the roots would keep the substrate unclogged.

These results show that the effect of plants in mulch-based VF CWs was not univocal. In the early stages of the CWs, the presence of the plants reduced the efficiency of the removal of pollutants by augmenting the substrate porosity with their roots. However, in the long term, they helped to retard clogging and, as a consequence, to achieve better removals.

3.4. Analysis of T-RFLP

Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) is a rapid, highly reproducible, and robust molecular tool for the study of bacterial community structure [27,42]. It is known that bacteria communities are affected by several factors, such as physicochemical properties, climate conditions, and the presence of plants [43,44]. Hence, bacterial communities of 1p and 1np were analyzed via T-RFLP in order to ascertain the effects of the presence of plants.

Bacterial diversity, as estimated by the number of T-RFs, showed reproducible patterns across the MseI enzyme. In addition, the size distribution of the T-RFs generated by the restriction enzyme was consistent with that of the T-RFs derived from in silico digestion.

Interestingly, shifts in the sizes of the T-RFs occurred as a result of two different factors: the presence of plants and the progressive clogging of the substrate, as can be inferred from the analysis of the operational taxonomic units (OTUs). The two VF CWs shared 31 T-RFs for *E. coli* and 19 for *Enterococcus* sp. (Figure 4). The shared T-RFs indicate the presence of a common bacteria population regardless of the presence of plants (Figure 4). Furthermore, the size of the T-RFs ranged from 117 to 810 bp for *E. coli* and from 115 to 714 bp for *Enterococcus* sp.

In addition, 1np showed a significant increase ($p < 0.1$) in T-RFs compared with that of 1p for both *E. coli* and *Enterococcus* sp. (Figure 5).

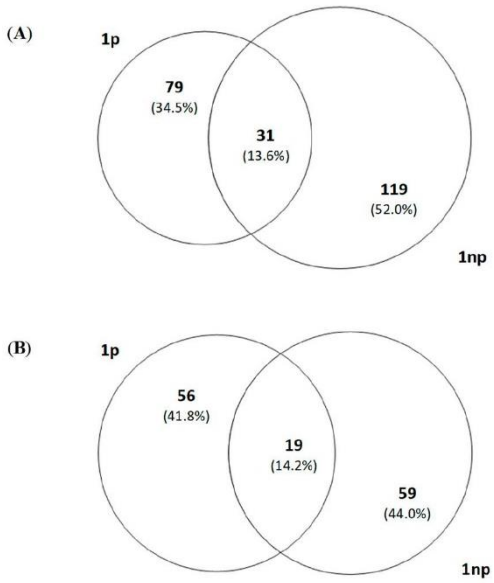


Figure 4. (**a**) Venn diagram of the size of the *Escherichia coli* terminal restriction fragments (T-RFs) shared between 1p and 1np. The number of T-RFs of 1p = 79; the number of T-RFs of 1np = 119; common number of T-RFs shared between both VF CWs = 31; (**b**) Venn diagram of the size of the *Enterococcus* sp. T-RFs shared between 1p and 1np. The number of T-RFs of 1p = 56; the number of T-RFs of 1np = 59; the number of T-RFs shared between both VF CWs = 19.

In addition, the results from the light and severe clogging periods showed that 1p reported a significant diminution ($p < 0.1$) in the T-RFs of *E. coli* over time (22.22% in light clogging versus 17.68% severe clogging). This behavior was also shown for 1np (38.89% light clogging versus 21.21% severe clogging; Figure 5a). This difference was more significant ($p < 0.01$) when relative abundance of T-RFs in 1np (38.89%) were compared to that in 1p (22.22%) at light clogging (Figure 5a). This result may infer that 1np was slightly clogged in December 2014 and continued to clog over time. In this sense, the chemical parameters sustain the T-RFs results (Table 4).

Additionally, the same trend in relative abundance of T-RFs was reported for *Enterococcus* sp., although the lower biodiversity of 1np under severe clogging was unexpected (Figure 5b). Hua et al. [26] claimed that clogging reduced bacterial diversity. Hence, an approach to explain low diversity in 1np was attempted by comparing shared T-RFs in 1p and 1np over time (Figure 6). Venn diagrams showed that 1np shared a major number of T-RFs between two sampled periods (1.8% light clogging versus 7.8% severe clogging). The presence of low shared-T-RFs, namely OTUs, in 1p would highlight the role of plant roots in combination with palm mulch substrate at retaining FIB bacteria. Kadam et al. [27] argued that the diminution of T-RFs in the planted VF CWs was committed to the diminution of genetic features, which could be correlated with the presence of root-associated microbiota. In addition, we assumed that root presence and microfauna might affect 1p performance.

The results obtained in this work indicate that plants increase the substrate porosity, but the results can be quite different depending on the level of substrate clogging. During the early stage of the experimental period, when the substrate was far from being clogged, the effect was negative as the CW with plants demonstrated worse pollutant removal. In this case, an increase in porosity led to shorter HRT. The sludge accumulated on the substrate would help to increase the HRT and thus the removals. However, later, when the sludge accumulation becomes excessive and clogging starts to develop, the consequences were very positive, because the plants were able to notably delay clogging by increasing the substrate porosity.

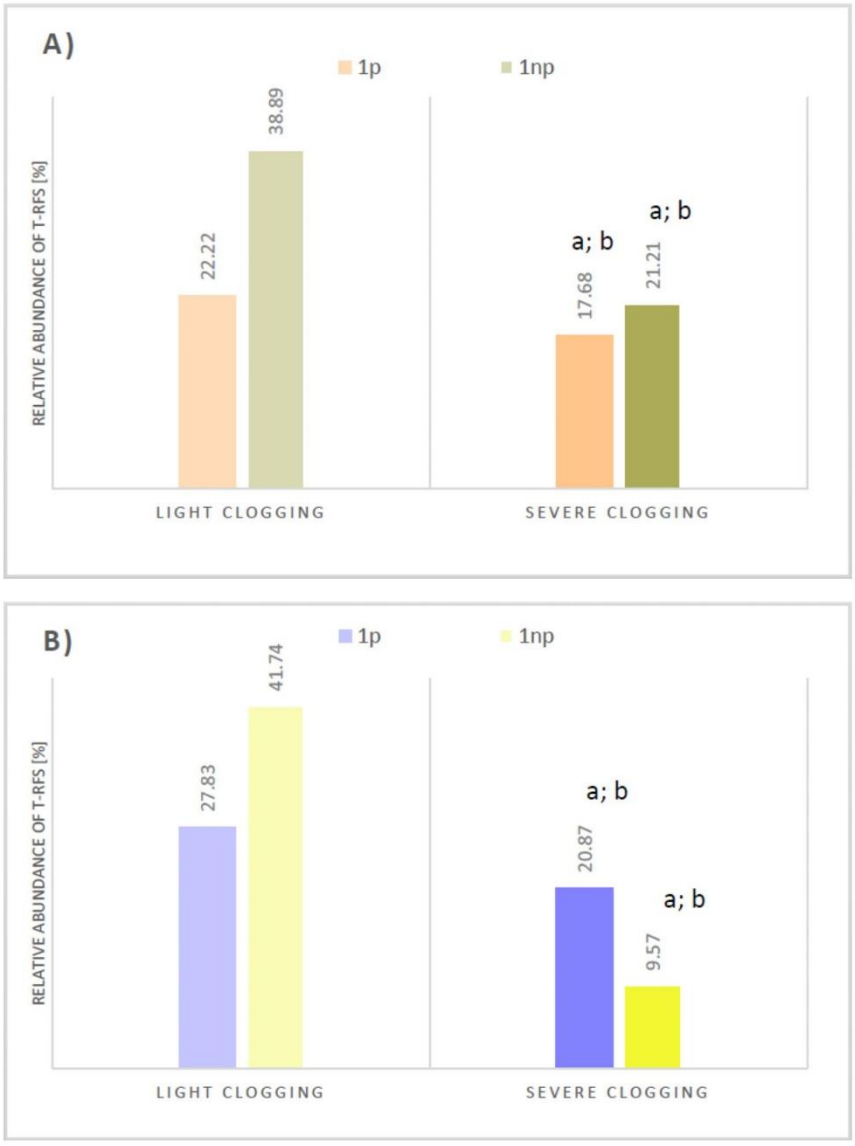


Figure 5. Relative abundance (%) of T-RFs at light and severe clogging for 1p and 1np. (**a**) Corresponds to the relative abundance of *Escherichia coli*. The 100% was assumed as the ∑ T-RFs (198 T-RFs) obtained for both VF CWs (1p and 1np) and both stages (light and severe clogging); (**b**) Corresponds to the relative abundance *Enterococcus* sp. The 100% was assumed as the ∑ T-RFs (114 T-RFs) obtained for both VF CWs (1p and 1np), and both stages (light and severe clogging); [a] indicates differences over time; [b] indicates differences between 1p and 1np.

The strong reduction of the palm mulch during the first year of operation indicates the importance of the substrate selection. The application of rest periods is highly recommended to delay clogging and improve the pollutant removals and the accumulated sludge mineralization. Similarly, the constructed wetland performance was optimized by the presence of plants as the reduction in the number of OTUs demonstrated.

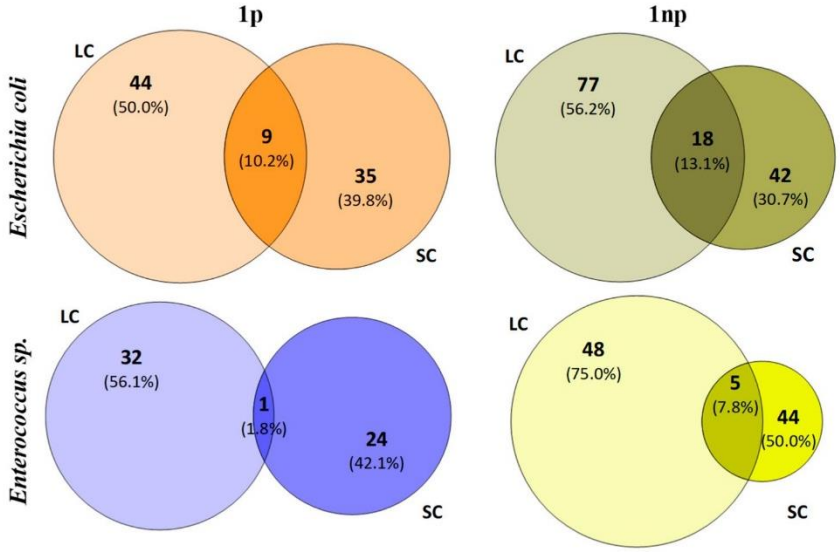


Figure 6. Venn diagrams showing the numbers of *Escherichia coli* T-RFs and *Enterococcus* sp. T-RFs in light and severe clogging and the number of T-RFs shared between both stages in each case. LC = light clogging; and SC = severe clogging.

Author Contributions: J.A.H.-M. designed the research and wrote part of the manuscript, N.P.-C. built the reactors and performed chemical and bacterial analyses, A.R.-R. performed chemical analyses, and M.C.-A. and P.G.-J. designed and analyzed the T-RFLP assays and wrote part of the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

Funding: This research was funded by a grant from la Consejería de Economía, Industria, Comercio y Conocimiento del Gobierno de Canarias to P.G-J. (CGL2016-78442-C2-2-R; GOB-ESP2017-04 ULPGC). M.C.A. was supported by a predoctoral fellowship granted by la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC-2016).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Carvalho, P.N.; Arias, C.A.; Brix, H. Constructed wetlands for water treatment: New developments. *Water* **2017**, *9*, 397. [CrossRef]
2. Samsó, R.; García, J.; Molle, P.; Forquet, N. Modelling bioclogging in variably saturated porous media and the interactions between surface/subsurface flows: Application to Constructed Wetlands. *J. Environ. Manag.* **2016**, *165*, 271–279. [CrossRef]
3. Saeed, T.; Sun, G. Pollutant removals employing unsaturated and partially saturated vertical flow wetlands: A comparative study. *Chem. Eng. J.* **2017**, *325*, 332–341. [CrossRef]
4. Knowles, P.; Dotro, G.; Nivala, J.; García, J. Clogging in subsurface-flow treatment wetlands: Occurrence and contributing factors. *Ecol. Eng.* **2011**, *37*, 99–112. [CrossRef]
5. Paing, J.; Guilbert, A.; Gagnon, V.; Chazarenc, F. Effect of climate, wastewater composition, loading rates, system age and design on performances of French vertical flow constructed wetlands: A survey based on 169 full scale systems. *Ecol. Eng.* **2015**, *80*, 46–52. [CrossRef]
6. ElZein, Z.; Abdou, A.; Abd ElGawad, I. Constructed wetland as a sustainable wastewater treatment method in communities. *Procedia Environ. Sci.* **2016**, *34*, 605–617. [CrossRef]
7. Casas Ledón, Y.; Rivas, A.; López, D.; Vidal, G. Life-cycle greenhouse gas emissions assessment and extended exergy accounting of a horizontal-flow constructed wetland for municipal wastewater treatment: A case study in Chile. *Ecol. Indicators* **2017**, *74*, 130–139. [CrossRef]
8. Fuchs, V.J.; Mihelcic, J.R.; Gierke, J.S. Life cycle assessment of vertical and horizontal flow constructed wetlands for wastewater treatment considering nitrogen and carbon greenhouse gas emissions. *Water Res.* **2011**, *45*, 2073–2081. [CrossRef]

9. Farahani, H.; Bayazidi, S. Modeling the assessment of socio-economical and environmental impacts of sand mining on local communities: A case study of Villages Tatao River Bank in North-western part of Iran. *Resour. Policy* **2018**, *55*, 87–95. [CrossRef]
10. Ioannidou, D.; Meylan, G.; Sonnemann, G.; Haberte, G. Is gravel becoming scarce? Evaluating the local criticality of construction aggregates. *Resour. Conserv. Recycle* **2017**, *126*, 25–33. [CrossRef]
11. Campos-Serrano, A.; Rodríguez-Esteban, J.A. Imagined territories and histories in conflict during the struggles for Western Sahara, 1956–1979. *J. Hist. Geogr.* **2017**, *55*, 44–59. [CrossRef]
12. Yang, Y.; Zhao, Y.; Liu, R.; Morgan, D. Global development of various emerged substrates utilized in constructed wetlands. *Bioresour. Technol.* **2018**, *261*, 441–452. [CrossRef]
13. Zhao, Y.Q.; Zhao, X.H.; Babatunde, A.O. Use of dewatered alum sludge as main substrate in treatment reed bed receiving agricultural wastewater: Long-term trial. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 644–648. [CrossRef]
14. Zanella, L.; Nour, E.; Roston, D. Use of bamboo rings as substrate in subsuperficial constructed wetland system in Brazil. In Proceedings of the 12th International Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control, Venice, Italy, 3–6 October 2010.
15. Herrera-Melián, J.A.; González-Bordón, A.; Martín-González, M.A.; García-Jiménez, P.; Carrasco, M.; Araña, J. Palm tree mulch as substrate for primary treatment wetlands processing high strength urban wastewater. *J. Environ. Manag.* **2014**, *139*, 22–31. [CrossRef]
16. Herrera-Melián, J.A.; Borreguero-Fabelo, A.; Araña, J.; Peñate-Castellano, N.; Ortega-Méndez, J.A. Effect of Substrate, Feeding Mode and Number of Stages on the Performance of Hybrid Constructed Wetland Systems. *Water* **2018**, *10*, 39. [CrossRef]
17. Cao, W.; Wang, Y.; Sun, L.; Jiang, J.; Zhang, Y. Removal of nitrogenous compounds from polluted river water by floating constructed wetlands using rice straw and ceramsite as substrates under low temperature conditions. *Ecol. Eng.* **2016**, *88*, 77–81. [CrossRef]
18. Thomas, R.; Gough, R.; Freeman, C. Linear alkylbenzene sulfonate (LAS) removal in constructed wetlands: The role of plants in the treatment of a typical pharmaceutical and personal care product. *Ecol. Eng.* **2017**, *106*, 415–422. [CrossRef]
19. Arunbabu, V.; Sruthy, S.; Antony, I.; Ramasamy, E.V. Sustainable greywater management with *Axonopus compressus* (broadleaf carpet grass) planted in sub surface flow constructed wetlands. *J. Water Process Eng.* **2015**, *7*, 153–160. [CrossRef]
20. Masi, F.; Rizzo, A.; Regelsberger, M. The role of constructed wetlands in a new circular economy, resource oriented, and ecosystem services paradigm. *J. Environ. Manag.* **2018**, *216*, 275–284. [CrossRef]
21. Calhoun, A.; King, G.M. Regulation of root-associated methanotrophy by oxygen availability in the rhizosphere of two aquatic macrophytes. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 3051–3058.
22. Schriewer, A.; Miller, W.A.; Byrne, B.A.; Miller, M.A.; Oates, S.; Conrad, P.A.; Hardin, D.; Yang, H.; Chouicha, N.; Melli, A.; et al. Presence of Bacteroidales as a Predictor of Pathogens in Surface Waters of the Central California Coast? *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 5802–5814. [CrossRef]
23. Wang, D.; Farnleitner, A.H.; Field, K.G.; Green, H.C.; Shanksd, O.C.; Boehma, A.B. *Enterococcus* and *Escherichia coli* fecal source apportionment with microbial source tracking genetic markers—Is it feasible? *Water Res.* **2013**, *47*, 6849–6861. [CrossRef]
24. Li, Y.; Wang, C.; Zhang, W.; Wang, P.; Niu, L.; Hou, J.; Wang, J.; Wang, L. Modeling the Effects of Hydrodynamic Regimes on Microbial Communities within Fluvial Biofilms: Combining Deterministic and Stochastic Processes. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 12869–12878. [CrossRef]
25. Brower, S.; Leff, L.; Mou, X. Effects of Short and Long-Term Hydrological Regimes on the Composition and Function of Denitrifying Bacteria in Experimental Wetlands. *Wetlands* **2017**, *37*, 573–583. [CrossRef]
26. Hua, G.; Chenga, Y.; Kongb, J.; Li, M.; Zhao, Z. High-throughput sequencing analysis of bacterial community spatiotemporal distribution in response to clogging in vertical flow constructed wetlands. *Bioresour. Technol.* **2018**, *248*, 104–112. [CrossRef]
27. Kadam, S.K.; Chandanshivea, V.V.; Raneb, N.R.; Patilb, S.M.; Gholaved, A.R.; Khandareb, R.V.; Bhosalee, A.R.; Jeonf, B.H.; Govindwar, S.P. Phytobeds with Fimbristylis dichotoma and Ammannia baccifera for treatment of real textile effluent: An in situ treatment, anatomical studies and toxicity evaluation. *Environ. Res.* **2018**, *160*, 1–11. [CrossRef]
28. Murray, M.G.; Thompson, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8*, 4321–4325. [CrossRef]

29. Deasy, B.M.; Rea, M.C.; Fitzgerald, G.F.; Cogan, T.M.; Beresford, T.P. A Rapid PCR Based Method to Distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *System. Appl. Microbiol.* **2000**, *23*, 510–522. [CrossRef]
30. Bej, A.K.; Steffan, R.J.; DiCesare, J.; Haff, L.; Atlas, R.M. Detection of Coliform Bacteria in Water by Polymoerase Chain Reaction and Gene Probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, *56*, 307–314.
31. Smith, C.J.; Danilowicz, B.S.; Clear, A.K.; Costello, F.J.; Wilson, B.; Meijer, W.G. T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profile. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2005**, *54*, 375–380. [CrossRef]
32. The R Project for Statistical Computing. Available online: https://www.r-project.org/ (accessed on 26 February 2018).
33. Integrative Omics, Pacific Northwest National Laboratory. Venn Diagram Plotter. Available online: https://omics.pnl.gov/software/venn-diagram-plotter (accessed on 8 October 2018).
34. Tchobanoglous, G.; Burton, F.L.; Stensel, H.D. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, 4th ed.; McGraw Hill Book Co.: New York, NY, USA, 2003.
35. *Royal Decree 1620, 2007, That Stablishes the Legislative Frame for the Reuse of Recovered Wastewater*; Official Bulletin of the State: Madrid, Spain, 7 December 2007.
36. Saeed, T.; Sun, G. A comparative study on the removal of nutrients and organic matter in wetland reactors employing organic media. *Chem. Eng. J.* **2011**, *171*, 439–447. [CrossRef]
37. Torrens, A.; Molle, P.; Boutin, C.; Salgot, M. Impact of design and operation variables on the performance of vertical-flow constructed wetlands and intermittent sand filters treating pond effluent. *Water Res.* **2009**, *43*, 1851–1858. [CrossRef]
38. Brix, H. Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands? *Water Sci. Technol.* **1997**, *35*, 11–17. [CrossRef]
39. Teixeira, D.L.; Teixeira de Matos, A.; Pimentel de Matos, M.; Pires Vieira, D.; Dias Araújo, E.; Aparecida Ferraz, L. The influence of plant roots on the clogging process and the extractive capacity of nutrients/pollutants in horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Ecol. Eng.* **2018**, *120*, 54–60. [CrossRef]
40. Hua, G.F.; Zhao, Z.W.; Kong, J.; Guo, R.; Zeng, Y.T.; Zhao, L.F.; Zhu, Q.D. Effects of plant roots on the hydraulic performance during the clogging process in mesocosm vertical flow constructed wetlands. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2014**, *21*, 13017–13026. [CrossRef]
41. Headley, T.; Nivala, J.; Kassaa, K.; Olsson, L.; Wallace, S.; Brix, H.; Afferden, M.; Müller, R. *Escherichia coli* removal and internal dynamics in subsurface flow ecotechnologies: Effects of design and plants. *Ecol. Eng.* **2013**, *61*, 564–574. [CrossRef]
42. Thies, J.E. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorphisms. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2007**, *71*, 579–591. [CrossRef]
43. Lazzaro, A.; Widmer, F.; Sperisen, C.; Frey, B. Identification of dominant bacterial phylotypes in a cadmium-treated forest soil. *FEMS Microbial. Ecol.* **2008**, *63*, 143–155. [CrossRef]
44. Bru, D.; Ramette, A.; Saby, N.P.; Dequiedt, S.; Ranjard, L.; Jolivet, C.; Arrouays, D.; Philippot, L. Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. *ISME J.* **2011**, *5*, 532–542. [CrossRef]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Multistage Horizontal Subsurface Flow vs. Hybrid Constructed Wetlands for the Treatment of Raw Urban Wastewater

Herrera-Melián, J.A., Mendoza-Aguiar, M., Guedes-Alonso, R. García-Jiménez, P., Carrasco-Acosta, M., Ranieri, E., 2020, Sustainability, 12(12), 5102.
https://doi.org/10.3390/su12125102

sustainability

MDPI

Article

Multistage Horizontal Subsurface Flow vs. Hybrid Constructed Wetlands for the Treatment of Raw Urban Wastewater

José Alberto Herrera-Melián [1,*], Mónica Mendoza-Aguiar [2], Rayco Guedes-Alonso [1], Pilar García-Jiménez [3], Marina Carrasco-Acosta [3] and Ezio Ranieri [4]

[1] Department of Chemistry, Institute of Environmental Studies and Natural Resources (i-UNAT), University of Las Palmas de Gran Canaria, 35017 Las Palmas, Spain; rayco.guedes@ulpgc.es
[2] School of Civil and Industrial Engineering, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35017 Las Palmas, Spain; monica.mendoza101@alu.ulpgc.es
[3] Department of Biology, Institute of Environmental Studies and Natural Resources (i-UNAT), University of Las Palmas de Gran Canaria, 35017 Las Palmas, Spain; pilar.garcia@ulpgc.es (P.G.-J.); marina.carrasco@ulpgc.es (M.C.-A.)
[4] Department of Biology, University of Bari, 70125 Bari, Italy; ezio.ranieri@uniba.it
* Correspondence: josealberto.herrera@ulpgc.es

Received: 1 May 2020; Accepted: 19 June 2020; Published: 23 June 2020



Abstract: In this study, pilot-scale hybrid constructed wetlands (CWs) and multistage horizontal subsurface flow CWs (HF CWs) have been studied and compared for the treatment of raw urban wastewater. In the hybrid CWs, the first stage was a mulch-based horizontal subsurface flow CW and the second stage was a vertical subsurface flow CW (VF CW). The VF CWs were used to determine if sand could improve the performance of the hybrid CW with respect to the mulch. In the multistage HFs, mulch, gravel and sand were used as substrates. The effect of water height (HF10: 10 cm vs. HF40: 40 cm) and surface loading rate (SLR: 12 vs. 24 g Chemical Oxygen Demand (COD)/m^2d) has been studied. The results show that the use of sand in the vertical flow stage of the hybrid CW did not improve the average performance. Additionally, the sand became clogged, while the mulch did not. The effect of water height on average pollutant removal was not determined but HF10 performed better regarding compliance with legal regulations. With a SLR of 12 g COD/m^2d, removals of HF10 were: 79% for COD, 75% for NH_4^+-N, 53% for dissolved molybdate-reactive phosphate-P (DRP), 99% for turbidity and 99.998% for *E. coli* and total coliforms. When SLR was doubled, removals decreased for NH_4^+-N: 49%, DRP: −20%, E coli and total coliforms: 99.5–99.9%, but not for COD (85%) and turbidity (99%). Considering the obtained results and the simplicity of the construction and operation of HFs, HF10 would be the most suitable choice for the treatment of raw urban wastewater without clogging problems.

Keywords: wastewater; shallow constructed wetland; horizontal flow; substrate; organic mulch; gravel; sand

1. Introduction

Constructed wetlands (CWs) are natural, low-cost reactors, particularly adequate for wastewater treatment and reuse in small communities. Molinos-Senante et al. [1] collected the opinions of 29 international experts from the academic, research and industrial fields about the most suitable wastewater treatment technology for small communities. CWs (24%) and ponds (23%) were the most preferred alternatives, while extended aeration and membrane bioreactors were the least preferred ones. Considering the water flow, CWs can be classified as horizontal flow or vertical flow and surface flow or

subsurface flow CWs. Horizontal subsurface flow CWs (HF CWs) are easily designed and constructed. Additionally, their operation and maintenance is simple and inexpensive. However, their efficacy regarding nitrification and total N removal is usually low. Consequently, vertical subsurface flow CWs (VF CWs) and hybrid CWs (combinations of HF CWs and VF CWs) have been successfully tested [2]. Nevertheless, two important drawbacks of VF CWs when compared with HF CWs are achieving a homogeneous distribution of the influent over the bed, and the higher clogging risk because of the finer substrate material used.

The porous media is a basic CW component since it supports biofilm and plants. Gravel and sand are the conventional components of porous media, but these materials are being extracted faster from the environment than they can be replaced. Sand and gravel are the most extracted group of materials worldwide, exceeding both fossil fuels and biomass [3]. The environmental impact of sand extraction includes coastal and river erosion, coral reef degradation, biodiversity loss and the spread of invasive species. These environmental impacts have a profound effect on the local human population in terms of seawater intrusion in coastal aquifers, thus affecting domestic water supply and increasing salinization of cultivated land, the increase in potential breeding sites for malaria-transmitting mosquitoes, etc. All these effects can result in social and political conflicts [4], particularly in developing countries [5]. Thus, more sustainable materials for CW beds should be found.

In recent decades, many different alternative materials such as industrial wastes and agricultural and forest byproducts have been tested in an attempt to improve CW performance and/or environmental sustainability [6,7]. Organic substrates obtained from agro-forest wastes can be more environmentally friendly than gravel and sand since local material would be used and the impacts of mining and transport would be minimized. In this regard, Wang et al. [8] obtained good results with an organic substrate composed of peat/crushed pine bark. Additionally, rice husk and organic mulch have been successfully employed in the removal of total nitrogen [9–11]. Moreover, organic substrates can increase the removal of micro-pollutants by sorption [12,13]. Denitrifying bioreactors are a particular case of organic-based CWS that have been used to reduce the nitrate concentration of different effluents. The carbon-rich media promotes nitrate reduction to N_2 gas under anaerobic conditions. However, recent studies have shown their long term performance regarding the removal of fecal indicators [14].

The typical substrate depth of subsurface flow CWs is 0.5 m, but several authors have found that shallow constructed wetlands (SCWs) can improve the removal of nitrogen, organic matter [15,16] and estrogenic disruptors by a more efficient dissolved oxygen transfer to the media [17]. Additionally, a SCWs require fewer building materials, and consequently a lower cost of construction, operation and maintenance [18]. Holland et al. [19] studied the effect of wetland depth and flow rate on residence time distribution (RTD) characteristics. They used two different average depth settings: 16.6 cm for low water level and 39.8 cm for high water level. The obtained results indicated that flow rates did not have a significant effect on RTD characteristics, but all the parameters indicating hydraulic efficiency exhibited lower efficiency for the higher water levels.

In the literature, there are studies on the comparison of horizontal and hybrid CWs, but few consider the use of agro-forest residues as substrates of CWs, and particularly the possibility of substituting gravel and sand by agro-forest wastes in VF CWs. In our opinion, using locally abundant and available wastes as CW substrates can greatly improve their economic and environmental sustainability. Thus, the main goal of this work was to compare a multistage HF CW with hybrid CWs for the treatment of raw wastewater without clogging. Thus, the hybrid CWs were used to test the effect of the age of the mulch-based substrate in the HF stage and to compare sand with mulch substrates for VF CWs. With the multistage HF CWs, the effects of water height, surface loading rate (SLR), and hydraulic loading rate (HLR) were studied.

2. Experimental

The pilot-scale CWs were constructed in September 2015. Monitoring started in November 2015 and ended in July 2016. The CWs were located outdoors and the influent was wastewater from the

Campus of Tafira of the University of Las Palmas de Gran Canaria (Canary Islands, Spain). The inflow was collected in a 17-m^3 pit and controlled with a timer-controlled triturating pump located at the bottom of the pit. The pump was programmed to work for 3 min every 2 h during the whole day, seven days a week, during all the experimental period. No sampling was performed during rainy days and during the university vacation periods of Christmas, summer and Easter. Figure 1 illustrates the CWs employed. The multistage HF CWs and the HF stage of the hybrid CW were built with plastic recipients, each with a volume of 265 L, a height of 50 cm, width of 55 cm, length of 125 cm, and a surface area of 0.7 m^2. As can be seen in Figure 1, four treatment lines were designed to study:

- The effect of water depth and SLR on the multistage HF CWs. For this, two lines composed of four recipients each were built. The first two units had a mulch substrate, the third one had gravel and the last one had sand. The plastic recipients were perforated at the bottom to be connected in series with plastic tubes of 5 cm in diameter. The holes were covered with a 0.02-m gravel layer to avoid the clogging of the tubes by the mulch. The purpose of this substrate sequence (mulch–gravel–sand) was to minimize the clogging of the porous media, which is usually stronger near the inlet [20]. Additionally, the first unit was located above the other ones to favor the aerobic degradation of the retained solids and to minimize clogging and ponding [21]. The palm mulch allows for significant loads of Total Suspended Solids (TSS) and Chemical Oxygen Demand (COD), without clogging [22]. The mulch was obtained by trituration of dry branches of the Canarian palm tree (*Phoenix canariensis*) which is very abundant in the zone. The mulch had a porosity of 54% and a hygroscopicity of about 10%. The gravel was basaltic with 49% porosity and average diameter of 6.5 mm. The last unit of the HF was built with sand (45.5% carbonate, porosity: 42%, average diameter: 0.32 mm) in an attempt to provide a final polishing of the water, for the improved removal of pathogens [23], and to reduce the water flow speed. These lines were used to determine the efficiency of a HF in which gravel has been partially replaced by mulch, as well as the effect of water height. Thus, a line was built with a water height of about 10 cm (HF10), as well as a second line with a 40 cm height (HF40). The CWs were planted with Phragmites, Cyperus and Canna, with the exception of the final sand-based units that were not unplanted. In addition to the influent and effluent, an intermediate sampling point was included in the HF CW systems to determine the contribution of the first (HF40-1, HF10-1) and second stages (HF40-2, HF10-2) of the removals.
- The hybrid CWs were built with an organic-based HF CW followed by a VF CW. The HF stage had mulch and the VF stages were plastic cylindrical recipients with a surface area of 0.1 m^2 and depth of 70 cm. The hybrid CWs were used to: (i) compare them with the multistage HF CW, and (ii) compare sand with mulch in the vertical flow stage. A 10-cm-high layer of gravel was used at the bottom of the VF stages to avoid the outlet clogging. The effluents of the HF stages were directed by gravity to the VF stages. The hybrid CWs were not planted in order to minimize the number of variables to be considered.

2.1. Water Analysis

All the parameters were analyzed according to standard methods [24] in un-filtered samples. N and P species have been determined photometrically with a Zuzi Uv-vis spectrophotometer 4201/50 (Auxilab, Spain). Total N (TN) and P (TP) were determined after alkaline peroxydisulfate digestion at 120 °C for 90 min. After digestion, TN was determined as nitrites and TP as molybdate-reactive phosphates. Dissolved molybdate-reactive phosphate-P (DRP) was measured directly without digestion. Nitrite ions were measured photometrically after the formation of a pink diazo dye with sulfanilamide and N N-(1-naphthyl)-ethylene-diamine. Nitrate ions were analyzed as nitrites after reduction with hydrazine-Cu-Zn solution. *E. coli* and total coliforms were enumerated with membrane filtration and cultivation at 37 °C for 24 h with a selective chromogenic agar (Panreac, Spain). Chemical Oxygen Demand (COD) was determined by open reflux digestion with dichromate and titration and a ferrous standard. Biochemical Oxygen Demand (BOD_5) was measured with the manometric

method with nitrification inhibition (Velp, Italy). TSS was determined gravimetrically. Turbidity was determined with a portable nephelometer (Velp, Italy). Sulfate ions were determined nephelometrically after precipitation with $BaCl_2$. Ammonium-N (NH_4^+-N) was determined with a selective electrode (Metrohm, Switzerland). COD, turbidity, NH_4^+-N, DRP, *E. coli* and total coliforms have been routinely measured to determine the effect of the selected design parameters.

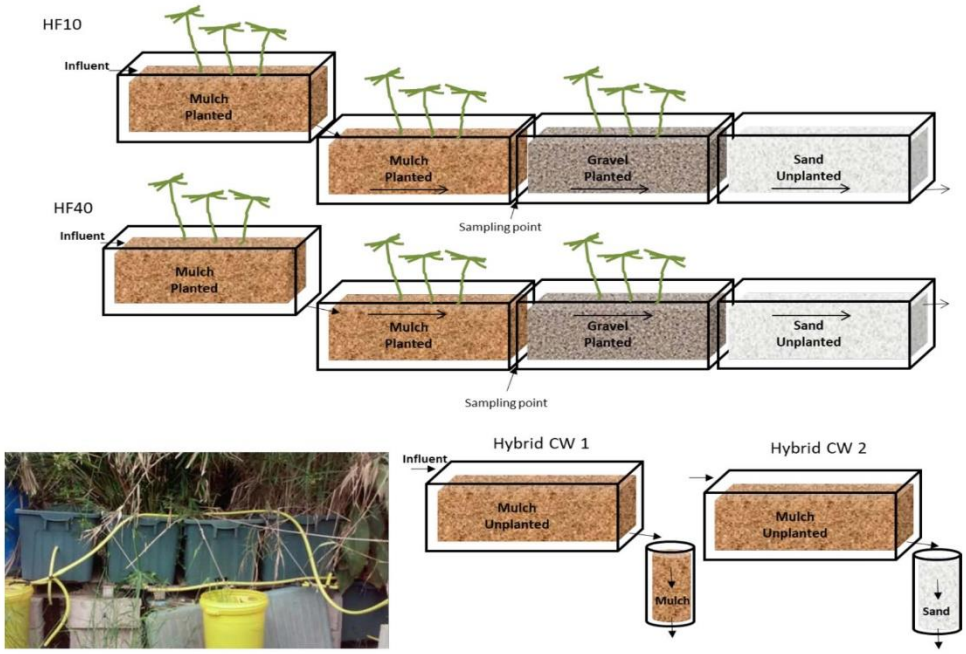


Figure 1. Scheme of the constructed wetland (CW) mesocosms employed in the study: multistage horizontal subsurface flow CWs (HF CWs) with water heights of 10 cm (HF10) and 40 cm (HF40); hybrid CWs with mulch-based HF CW followed by vertical subsurface flow (VF) with mulch (Hybrid CW 1) and sand (Hybrid CW 2). The photograph shows the hybrid CWs and the first unit of the multistage HF CWs.

2.2. Statistics

Removals, surface loading rates and removal rates have been determined according to the following expressions:

- Removal: $100 \times (C_{inf} - C_{eff})/C_{eff}$
- SLR: $C_{inf} \times Q \times 10^{-3}/S$
- Removal rate: $(C_{inf} - C_{eff}) \times Q \times 10^{-3}/S$

where C_{inf}: concentration (mg/L) in the influent; C_{eff}: concentration (mg/L) in the effluent; Q: inflow (L/d), S: surface area of the reactor (m^2).

A simple ANOVA test was used for statistical analysis to determine significant statistical differences in the performance of wastewater treatments. The analyses were carried out with the R-Commander program from the free R software package. When data were not homoscedastic (Bartlett test) or normally distributed (Shapiro–Wilks test), the non-parametric Kruskal–Wallis test was employed. A significance level of $p = 0.05$ was used.

3. Results and Discussion

3.1. Characteristics of the Influent and Surface Loading Rates

The influent can be considered as medium strength [25] for almost all the parameters, with the exception of TN and NH_4^+-N, which were closer to high strength (Table 1). As expected, the concentrations of NO_x^- (nitrates + nitrites) in the influent were always lower than 1 ppm, being undetectable in most samples. The average concentration of TN (70 mg/L) was dominated by that of NH_4^+-N (57 mg/L). The high NH_4^+-N/TN ratio (81%) may be due to the particular characteristics of the campus, in which the urine proportion in wastewater can be higher than those of other N sources. Similar concentrations and NH_4^+-N/TN ratio were found for a schoolhouse in Estonia [26].

Table 1. Average concentrations (±standard deviation) and number of data of the measured parameter. The units are mg/L except turbidity (NTU) and pathogen indicators (CFU/100 mL).

	Average ± Std. Dev., Number of Data
COD	497 ± 197, 32
BOD	259 ± 57, 13
TSS	170 ± 121, 14
Turbidity	180 ± 105, 23
pH	7.5 ± 0.22, 14
Sulfate	62 ± 37, 10
NH_4^+-N	57 ± 20, 37
(NO_2^- + NO_3^-)-N	0.4 ± 0.82, 24
TN	70 ± 22, 11
DRP	7.4 ± 3.4, 25
TP	10 ± 4, 12
E. coli	5.4 ± 8.2 (× 10^6), 16
Total coliforms	8.1 ± 10 (× 10^6), 15

Similarly, the average concentration of DRP was about 74% of that of TP.

The HF CWs and the hybrid CWs were fed with 144 L/d and 44 L/d, respectively, of raw wastewater from the campus. Table 2 shows the average SLRs for the multistage HF CWs and hybrid CWs. The surface loadings of this study (HLR: 41–54 L/m^2d and COD-LR: 20–25 g/m^2d, Table 2) were not statistically different enough to be able to compare their removals and were above those reported by other authors. For example, Vymazal found an average value of 13.9 g COD/m^2d in the Czech Republic, where the unsatisfactory removal of NH_4^+-N or P was achieved [2].

Table 2. Average surface loading rate (SLR) (±standard deviation) of the HF CWs and the hybrid CWs.

	HF CWs	**Hybrid CWs**
HLR, L/m^2d	41 ± 14	HF: 61 ± 14, VF: 426 ± 102, HF-VF: 54 ± 13
COD-LR, g/m^2d	20 ± 11	HF: 30 ± 14, VF: 60 ± 49, HF-VF: 25 ± 11
TSS-LR, g/m^2d	6 ± 3	HF: 10 ± 6, VF: 6 ± 4, HF-VF: 9 ± 5

3.2. Multistage HF CWs

3.2.1. Effect of the Water Level Height

The conventional depth of HF CWs is 50–60 cm. However, different authors have observed that shallow HFs (<27 cm deep) achieved better removals of COD, BOD_5, NH_4^+-N and DRP. The better

performance of shallower HF CWs could be explained by considering that: (i) water can be forced to go through the rooting zone of the plants, and (ii) shallower substrates displayed higher redox potential and slightly higher dissolved oxygen concentrations [15,27]. Thus, the effect of water height was considered a key parameter in this study. According to the results for the entire experimental period (Table 3), HF10 was, in general, more efficient than HF40, and was significantly better for turbidity.

Table 3. Average removal (%) (±standard deviation) of HF40 and HF10 for entire experimental period.

	HF40	**HF10**
COD	77 ± 10	82 ± 9
BOD	96 ± 4	96 ± 5
TSS	92 ± 7	99 ± 1
Turbidity	95 ± 4	99 ± 1
TN	63 ± 25	53 ± 26
NH_4^+-N	57 ± 26	61 ± 29
TP	20 ± 31	37 ± 25
DRP	18 ± 55	14 ± 64
E. coli	99.7 ± 0.6	99.9 ± 0.2
Total coliforms	99.6 ± 0.6	99.95 ± 0.1

As can be observed, both treatment lines were very efficient at the removal of organic matter (BOD_5 and COD), turbidity and TSS. The average removals of (HF40: 63%, HF10: 53%) and NH_4^+-N (HF40: 57%, HF10: 61%) for all the experimental period fall in the upper limit of the range provided for CWs (40–60%) by Vymazal [28]. Those of TP (20–37%) and DRP (18–14%) were clearly lower. However, the removals of NH_4^+-N and DRP were strongly affected by HLR, as will be discussed in the following section.

The effect of a design parameter on the performance of CWs is usually measured by comparing the obtained average removals [29], but the high dispersion of the data can obscure the results and lead to ambiguous conclusions [27]. Another way to compare the efficiencies of HF40 and HF10 is to determine their capability to meet the legislation by measuring the percentage of samples with concentrations below the legal limits. Table 4 shows the degree of compliance with the Spanish National Regulation as the percentage of samples with values below those established by the Royal Decrees that regulate the limits for: (i) COD regarding the discharge of treated wastewater into the environment [30] and (ii) TSS, turbidity and *E. coli*, considering the possible reuse (urban, agricultural, industrial, recreational and environmental) of treated wastewater [31].

Table 4. Degree of compliance with the Spanish National Regulation measured as percentage of samples (%) with values below the legal limits for discharging treated wastewater into the environment [30] and re-use [31]. Units of Chemical Oxygen Demand (COD), TSS, turbidity and *E. coli* are mg COD/L, mg/L, NTU and CFU/100 mL, respectively.

	HF40 (%)	**HF10 (%)**	**Legal Limit**	**Legal Regulation**
COD	73	90	125	R.D. 509/1996
TSS	54	100	10	
Turbidity	25 83	61 100	2 10	R.D. 1620/2007
E. coli	33 40 80	33 53 93	102 103 104	R.D. 1620/2007

As can be seen, the degree of compliance of HF10 was higher than that of HF40 for COD (90% vs. 73%), TSS (54% vs. 100%), turbidity (2 NTU: 61% vs. 25%, 10 NTU: 100% vs. 83%).

3.2.2. Effect of HLR

To determine the effect of SLR on the efficiency of the HF CWs, the influent pump working time was doubled on 30 March 2016. Thus, two different periods can be regarded. Table 3 summarizes the SLRs of HF10 and HF40 for the periods of high and low SLRs.

As can be observed in Table 5, the SLRs of both treatment lines were quite similar ($p > 0.05$) for each period and the removals can be compared. Figure 2 illustrates the removals of COD, NH_4^+-N, DRP, turbidity, *E. coli* and total coliforms in HF40 and HF10 and Table 6 summarizes the average SLRs and the removals achieved.

Table 5. Average surface loadings rates (±standard deviation) of HF40 and HF10 in the periods of high and low loading rates.

	HF40		HF10	
	Low	**High**	**Low**	**High**
HLR, L/m^{2}d	25 ± 5	51 ± 8	26 ± 4	51 ± 7
COD-LR, g/m^{2}d	12 ± 5	24 ± 10	12 ± 5	25 ± 11
TSS-LR, g/m^{2}d	4 ± 2	6.5 ± 4	5 ± 3	7 ± 4

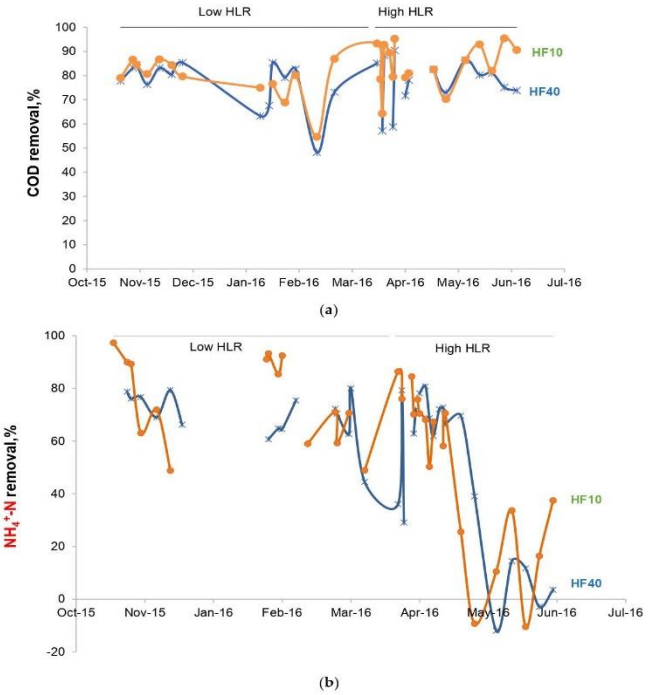


Figure 2. *Cont.*

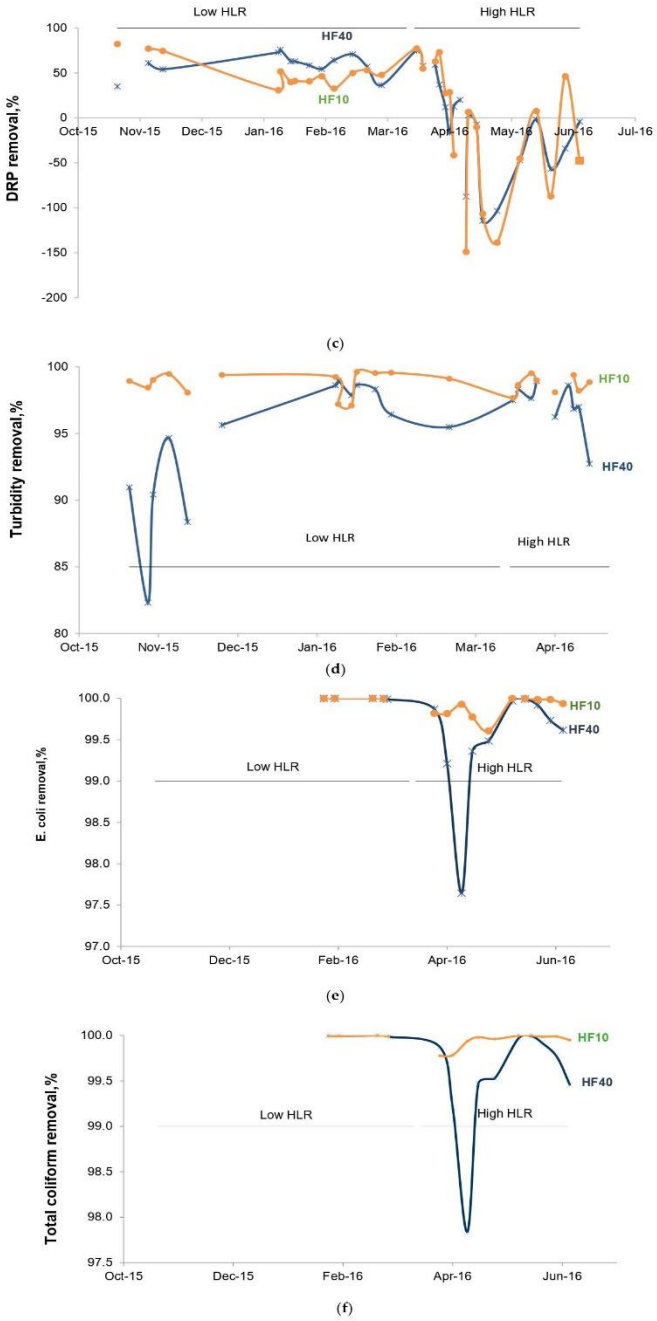


Figure 2. Removal (%) of: (**a**) COD, (**b**) NH_4^+-N, (**c**) DRP, (**d**) turbidity, (**e**) *E. coli* and (**f**) total coliforms in HF40 and HF10 during the periods of high and low HLR.

Table 6. Average removals (%, ±standard deviation) for HF40 and HF10 in the periods of low and high hydraulic loading rate (HLR). The different letters next to the same raw values denote significant differences for the considered parameter.

	HF40		HF10	
	Low HLR	**High HLR**	**Low HLR**	**High HLR**
COD	76 ± 11	78 ± 11	79 ± 9	85 ± 9
NH_4^+-N	67 ± 12	48 ± 31	75 ± 10	49 ± 31
DRP	60 ± 13	−16 ± 52	53 ± 17	−20 ± 61
Turbidity	94 ± 5 [a]	97 ± 2 [b]	99 ± 1 [b]	99 ± 1 [b]
E. coli	99.997 ± 0.004 [a]	99.5 ± 0.7 [b]	99.998 ± 0.1 [a]	99.9 ± 0.1 [b]
Total coliforms	99.994 ± 0.01 [a]	99.5 ± 0.6 [b]	99.994 ± 0.0 [a]	99.9 ± 0.08 [b]

The results from Figure 2 and Table 6 indicate that augmenting the SLR reduced the removals of NH_4^+-N, DRP and fecal indicators but those of COD and turbidity remained high. Figure 3 shows the mass removal rates (g/m^{2}d) of COD, NH_4^+-N and DRP and *E. coli* in the first stages (HF40-and HF10-1) and second stages of the HF CWs (HF40-2 and HF10-2) during the periods of high and low HLR. In the case of COD, the first stages achieved the highest COD mass removal rates in both periods.

In the period of low HLR, the average removals of NH_4^+-N were high for HF CWs (HF40: 67%, HF10: 75%, Table 6), suggesting the availability of enough dissolved oxygen to support nitrification. This could be partially due to the fact that the first unit of the CWs was placed above the other ones and the influent was intermittently dosed. Thus, a fill and drain effect was obtained that would favor the aeration of the substrate. Unfortunately, the role of the plants in terms of N removal was not considered in this study. When the HLR was increased, the removal of NH_4^+-N decreased (HF40: 48%, HF10: 49%) and became more unstable, as shown by the higher standard deviations observed (Table 6 and Figure 3). Unlike the results of this study, Nivala et al. [27] found negligible NH_4^+-N removal in shallow HF CWs, though the shallowest systems achieved the lowest mean effluent NH_4^+-N concentrations. In this study, in the low HLR period, similar surface removal rates were observed in both parts of the HFs. However, when the HLR increased, the surface removal rates also increased in both stages, being slightly better in the first stage, as observed for COD (Figure 2).

The average DRP removals in the period of low HLR were statistically similar (HF40: 60%, HF10: 53%, $p > 0.05$) and were high for HF CWs. Nonetheless, the high HLR had a notoriously negative effect, since DRP removals became negative (HF40: −16%, HF10: −20%). Dierberg et al. [32] found that TP retention efficiency decreased at high HLR due to lower HRT, as it favored preferential flow and affected the P diffusion and sorption processes. It is widely accepted that the main DRP removal mechanism in CWs is the adsorption/precipitation on the substrate, as plant uptake and microbial activity are less important [33]. It was expected that the sand used in the final unit of HF10 and HF40, with a high carbonate content, and thus in Ca^{2+} and Mg^{2+} ions, could help in the removal of DRP by precipitation [34]. However, the porous media used in these experiments (palm mulch, gravel and sand) did not have any removal phosphorus removal capacity, as observed in lab experiments. This can explain why there was no difference in the DRP surface removal rate removal in both stages of HF10 and HF40 (Figure 3). Thus, the results of this study indicate that plant uptake and microbial activity had a more relevant role than expected. In fact, plant uptake is considered to be the second most important mechanism of P removal [35]. Additionally, microbial P removal by means of polyphosphate-accumulating organisms can be an important mechanism [36]. These authors found that an intermediate HRT provided the best removal of TP in VFs, as it provided a balance between P adsorption on the substrate and release under anaerobic conditions. This effect can explain the negative DRP removals observed in the high HLR period of the present study.

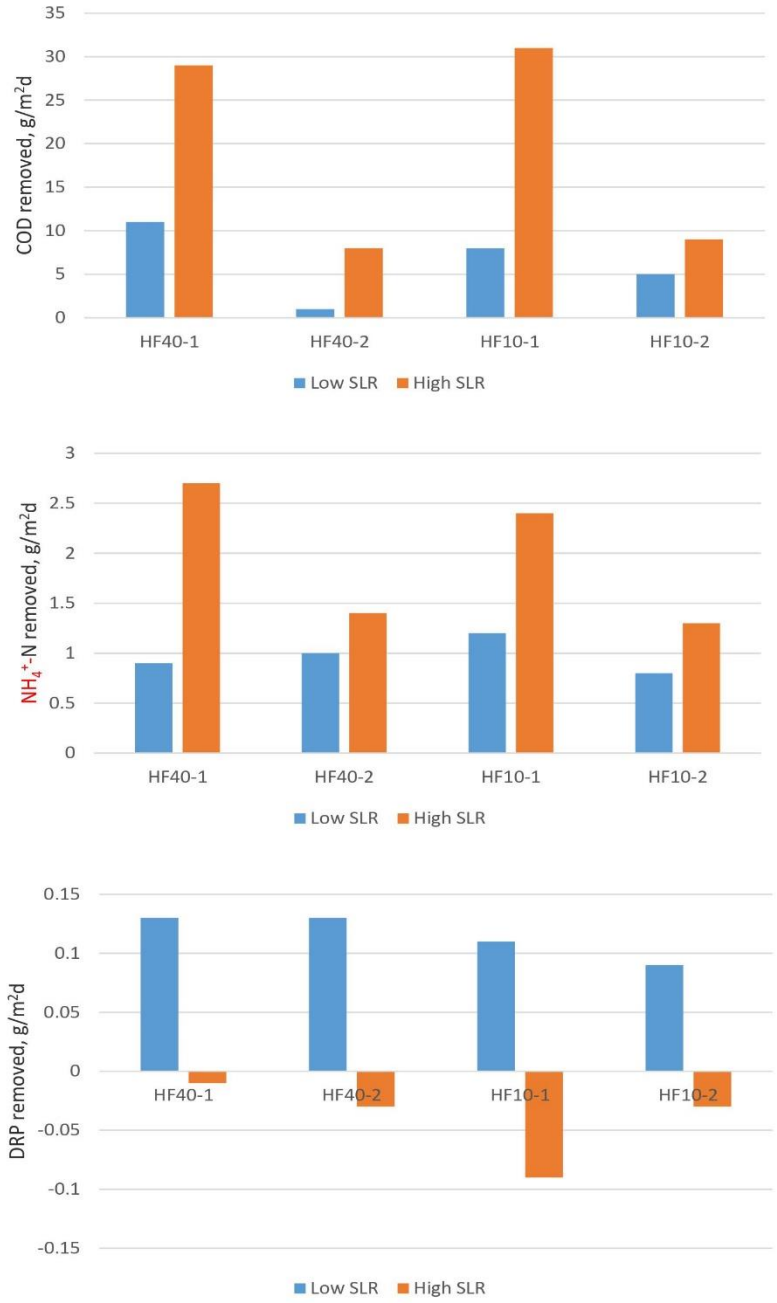


Figure 3. *Cont.*

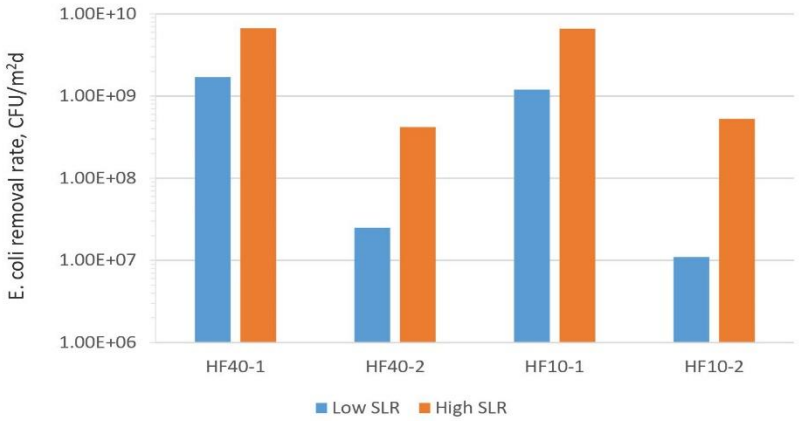


Figure 3. Average surface loading removal rates (g/m^{2}d) of COD, NH_4^+-N, DRP, and *E. coli* (CFU/m^{2}d) in the first stage (HF40-1 and HF10-1) and second stage (HF40-2 and HF10-2) of the HF CWs for the periods of low and high SLR.

The main mechanisms of pathogen removal in CWs are to kill them off by starvation or predation, sedimentation, filtration and adsorption [37]. Many different variables play a role in the removal of pathogens in CWs: temperature, influent composition, HRT and HLR, water flow type (surface, sub-surface, vertical or horizontal), the presence and type of macrophytes or the substrate [38]. Additionally, Morató et al. [23] observed that water depth had also an important effect on disinfection. The results from the present study do not reveal a significant role of water depth regarding *E. coli* and total coliform elimination (Table 6). During the low SLR period, *E. coli* and total coliform removals of almost five orders of magnitude were registered for both treatment lines (Table 6). Other authors have found similar *E. coli* and pathogen removals in CWs using fine soil [39] and sand [40] as substrates, but such high removals are not usually found in CWs [38].

In the case of *E. coli* and total coliforms, a clear removal reduction was observed after increasing the HLR for HF40 with respect to HF10 (Figure 2). This fact suggests the higher robustness of the latter. The analysis of surface removal rates for the first and second stages of HF40 and HF 10 (Figure 3) reveals a similar behavior of that of COD: a higher average SLR removal of both parameters at higher SLR and a stronger retention in the first part of the system (H40-1 and HF10-1). The results of this study suggest that the presence of the sand in the last treatment units of HF10 and HF40 did not play a key role in the removal of pathogens, since SLR removals were not better in the second stages of the treatment lines. This fact suggests that the presence of the plants and the good aeration of the substrate (as shown by the good NH_4^+-N removals observed) are the main pathogen removal mechanisms. Macrophytes can improve pathogen removal by increasing HRT with their root system [41] and providing a larger surface area for microbe attachment, favoring the formation of biofilms, oxygen seepage through roots, the secretion of plant exudates, etc. [38].

3.2.3. Hybrid CWs: Sand vs. Mulch Substrates for the VF Stage

The hybrid CWs achieved similar average removals without significant differences, as can be seen in Table 7. However, the preliminary results of the first 3 months of operation of Hybrid CW 1 with sand, were especially good and better than those of Hybrid CW 2, with removals of NH_4^+-N and *E. coli* greater than 90% and 4–5 log units, respectively. The *E. coli* concentrations in the effluent were 40–540 CFU/100 mL, although HLRs as high as 426 L/m2d were used in the VF stage (Table 2). However, after about 3 months of operation, the first symptoms of clogging began to be observed, i.e., ponding on the surface of the sand-based VF. In consequence, performance was dramatically

reduced. Initially, maintenance strategies such as resting periods of several days and scraping the surface were enough to unclog the filter, but after about 9 months of operation it became irreversibly clogged. It was necessary to remove a 0.10 m layer on its surface to recover an acceptable hydraulic conductivity, but the initial high performances were not observed again. Clogging is the main cause of malfunction in vertical sand filters and is the cause of the oxygen transfer reduction in vertical flow filters [42]. This can explain the obtained results, since nitrification is very sensitive to oxygenation and *E. coli* removal is faster in aerobic conditions. The results of the present study partially agree with those of de Oliveira Cruz [43] who found clogging problems after only 4 months of operation in a sand filter. However, the full restoration of its function was recovered by scraping off a shallow layer on its surface.

Table 7. Average removal (%) (±standard deviation) of Hybrid CW 1 (HF: mulch, VF: sand) and Hybrid CW 2 (HF: mulch, VF: mulch).

	Hybrid CW 1	**Hybrid CW 2**
COD	73 ± 18	79 ± 10
BOD	96 ± 4	96 ± 4
TSS	98 ± 1	96 ± 5
Turbidity	98 ± 1	98 ± 2
TN	43 ± 28	55 ± 20
NH_4^+-N	52 ± 77	64 ± 28
TP	23 ± 26	24 ± 32
DRP	9 ± 36	14 ± 40
E. coli	99.0 ± 1.5	99.5 ± 0.7
Total coliforms	99.0 ± 2	99.5 ± 1

Nevertheless, Hybrid CW 2 (only mulch) remained unclogged throughout the whole experimental period. The only maintenance required was the addition of mulch because of the reduction in the height of the substrate, which occurred more rapidly at the beginning of the experimental period, falling by 20% in the first months. The substrate was added, and the subsequent reductions were minimal. Regarding clogging, woodchips were also preferred to sand as substrates for filters treating soiled dairy water [44].

3.3. Comparison of the General Performance of the Multistage HF CWs and Hybrid CWs

The selection of a treatment system is made based on its efficiency, but also by taking into account the economic cost and ease of construction and maintenance. Table 8 shows the concentrations of the different parameters analyzed in the effluent of the hybrid and multistage HF CWs. In the case of the latter, only those of the higher SRL period were included, with the goal of comparing results with similar SLRs. As can be observed, the effluent concentrations of HF10 are lower than those of the other systems for BOD, COD, TSS, turbidity, *E. coli* and total coliforms, but not significantly. On the other hand, the construction and maintenance of a HF CW is easier than that of a hybrid CW. Thus, the recommended system for the treatment of raw urban wastewater without clogging problems would be HF10.

Table 8. Concentrations in the effluents of the CWs studied.

	Hybrid CW 1	Hybrid CW 2	HF40	HF10
COD	120 ± 82	102 ± 48	110 ± 47	93 ± 53
BOD	11 ± 11	12 ± 15	10 ± 13	9 ± 2
TSS	6 ± 6	7 ± 9	6 ± 5	2 ± 1
Turbidity	2 ± 1	3 ± 2	8 ± 8	2 ± 1
TN	37 ± 14	28 ± 9	28 ± 15	30 ± 14
NH_4^+-N	20 ± 15	25 ± 17	24 ± 14	23 ± 12
TP	8 ± 4	9 ± 5	9 ± 5	8 ± 5
DRP	7 ± 3	7 ± 3	8 ± 4	8 ± 4
E. coli	2.9 (±4.3) × 10^4	1.8 (±2.4) × 10^4	2.4 (±5.8) × 10^4	9.1 (±1.8) × 10^3
Total coliforms	2.7 (±4.9) × 10^4	1.3 (±1.3) × 10^4	3.4 (±6.5) × 10^4	3.8 (±4.8) × 10^3

4. Conclusions

CWs are regarded as a sustainable wastewater treatment technology. However, the extraction and transport of gravel and sand used to build CWs have a non-negligible environmental impact that can be reduced by using residual materials such as agro-forest wastes. To improve our knowledge on the use of this alternative material, pilot scale multistage HF CWs and hybrid CWs, in which gravel and sand have been partially or totally replaced by palm mulch, have been compared.

In the multistage HF CWs, the effect of water level height and HLR was studied. The best results were obtained with the shallowest system and an SLR of 12 g COD/m^2d. Using sand in the VF stage of the hybrid CW provided remarkably good NH_4^+-N and *E. coli* removals, but only during the first months of operation. Then, clogging problems considerably reduced the performance, which was initially similar to that of the mulch-based hybrid CW, which, on the other hand, did not clog.

Considering the removals obtained and the fact that there were no clogging incidents in this study, in addition to the easier construction and operation of HF CWs, a mulch-based multistage HF CW would be a better option than a mulch-based hybrid CW for the economic and sustainable treatment of raw urban wastewater in small communities.

Author Contributions: The idea for this article was developed by J.A.H.-M. Sampling and analyses were performed by M.M.-A. The paper was written by J.A.H.-M., R.G.-A., P.G.-J., M.C.-A. and E.R. All authors have read and agree to the published version of the manuscript.

Funding: This research was partially funded by the Departments of Chemistry and Biology of the University of Las Palmas de Gran Canaria (Spain).

Acknowledgments: The authors acknowledge the financial and technical support of the University of Las Palmas de Gran Canaria (Spain).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Molinos-Senante, M.; Gómez, T.; Caballero, R.; Hernández-Sancho, F.; Sala-Garrido, R. Assessment of wastewater treatment alternatives for small communities: An analytic network process approach. *Sci. Total Environ.* **2015**, *532*, 676–687. [CrossRef] [PubMed]
2. Vymazal, J. Is removal of organics and suspended solids in horizontal sub-surface flow constructed wetlands sustainable for twenty and more years? *Chem. Eng. J.* **2019**, *378*, 122117. [CrossRef]
3. Schandl, H. Global Material Flows and Resource Productivity. In *An Assessment Study of the UNEP International Resource Panel*; U.N. Environment Programme: Paris, France, 2016; pp. 30–34.
4. Torres, A.; Brandt, J.; Lear, K.; Liu, J. A looming tragedy of the sand commons. *Science* **2017**, *357*, 970–971. [CrossRef] [PubMed]
5. Bendixen, M.; Best, J.; Hackney, C.; Iversen, L.L. Time is running out for sand. *Nature* **2019**, *571*, 29–31. [CrossRef] [PubMed]
6. Vohla, C.; Kõiv, M.; Bavor, H.J.; Chazarenc, F.; Mander, Ü. Filter materials for phosphorus removal from wastewater in treatment wetlands—A review. *Ecol. Eng.* **2011**, *37*, 70–89. [CrossRef]

7. Saeed, T.; Muntaha, S.; Rashid, M.; Sun, G.; Hasnat, A. Industrial wastewater treatment in constructed wetlands packed with construction materials and agricultural by-product. *J. Clean. Prod.* **2018**, *189*, 442–453. [CrossRef]
8. Wang, R.; Korboulewsky, N.; Prudent, P.; Domeizel, M.; Rolando, C.; Bonin, G. Feasibility of using an organic substrate in a wetland system treating sewage sludge: Impact of plant species. *Bioresur. Technol.* **2010**, *101*, 51–57. [CrossRef]
9. Saeed, T.; Sun, G. Enhanced denitrification and organics removal in hybrid wetland columns: Comparative experiments. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 967–974. [CrossRef]
10. Tee, H.C.; Lim, P.E.; Seng, C.E.; Nawi, M.A.M. Newly developed baffled subsurface-flow constructed wetland for the enhancement of nitrogen removal. *Bioresour. Technol.* **2012**, *104*, 235–242. [CrossRef]
11. Saeed, T.; Sun, G. A lab-scale study of constructed wetlands with sugarcane bagasse and sand media for the treatment of textile wastewater. *Bioresour. Technol.* **2013**, *128*, 438–447. [CrossRef]
12. Wu, H.; Zhang, J.; Ngo, H.H.; Guo, W.; Hu, Z.; Liang, S.; Liu, H. A review on the sustainability of constructed wetlands for wastewater treatment: Design and operation. *Bioresour. Technol.* **2015**, *175*, 594–601. [CrossRef] [PubMed]
13. Herrera-Melián, J.A.; Guedes-Alonso, R.; Borreguero-Fabelo, A.; Santana-Rodríguez, J.J.; Sosa-Ferrera, Z. Study on the removal of hormones from domestic wastewaters with lab-scale constructed wetlands with different substrates and flow directions. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 20374–20384. [CrossRef] [PubMed]
14. Rambags, F.; Tanner, C.C.; Stott, R.; Schipper, L.A. Bacteria and virus removal in denitrifying bioreactors: Effects of media type and age. *Ecol. Eng.* **2019**, *138*, 46–53. [CrossRef]
15. García, J.; Aguirre, P.; Barragán, J.; Mujeriego, R.; Matamoros, V.; Bayona, J.M. Effect of key design parameters on the efficiency of horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Ecol. Eng.* **2005**, *25*, 405–418. [CrossRef]
16. Sánchez-Ramos, D.; Agulló, N.; Samsó, R.; García, J. Effect of key design parameters on bacteria community and effluent pollutant concentrations in constructed wetlands using mathematical models. *Sci. Total Environ.* **2017**, *584*, 374–380. [CrossRef]
17. Song, H.L.; Nakano, K.; Taniguchi, T.; Nomura, M.; Nishimura, O. Estrogen removal from treated municipal effluent in small-scale constructed wetland with different depth. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 2945–2951. [CrossRef]
18. Vo, T.; Bui, X.; Lin, C.; Nguyen, V.; Hoang, T.; Nguyen, H.; Nguyen, P.; Ngo, H.H.; Guo, W. A mini-review on shallow-bed constructed wetlands: A promising innovative green roof. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* **2019**, *12*, 38–47. [CrossRef]
19. Holland, J.; Martina, J.F.; Granata, T.; Bouchard, V.; Quigley, M.; Brown, L. Effects of wetland depth and flow rate on residence time distribution characteristics. *Ecol. Eng.* **2004**, *23*, 189–203. [CrossRef]
20. Nivala, J.; Knowles, P.; Dotro, G.; García, J.; Wallace, S. Clogging in subsurface-flow treatment wetlands: Measurement, modeling and management. *Water Res.* **2012**, *46*, 1621–1640. [CrossRef]
21. Knowles, P.; Dotro, G.; Nivala, J.; García, J. Clogging in subsurface-flow treatment wetlands: Occurrence and contributing factors. *Ecol. Eng.* **2011**, *37*, 99–112. [CrossRef]
22. Herrera-Melián, J.A.; Torres-Padrón, M.E.; Betancor-Abreu, A.; Sosa-Ferrera, Z.; Santana-Rodríguez, J.J.; Martín-González, M.A.; Araña, J.; Guedes-Alonso, R. Clogging reduction and removal of hormone residues with laboratory-scale vertical flow organic-based filter and hybrid wetland. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **2015**, *12*, 1039–1052. [CrossRef]
23. Morató, J.; Codony, F.; Sánchez, O.; Pérez, L.M.; García, J.; Mas, J. Key design factors affecting microbial community composition and pathogenic organism removal in horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Sci. Total Environ.* **2014**, *481*, 81–89. [CrossRef]
24. American Public Health Association (APHA). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st ed.; American Public Health Association: Washington, DC, USA, 2005.
25. Metcalf, E.; Eddy, E. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*; McGrawHill Inc.: New York, NY, USA, 2003.
26. Öövel, M.; Tooming, A.; Mauring, T.; Mander, Ü. Schoolhouse wastewater purification in a LWA-filled hybrid constructed wetland in Estonia. *Ecol. Eng.* **2007**, *29*, 17–26. [CrossRef]
27. Nivala, J.; Boog, J.; Headley, T.; Aubron, T.; Wallace, S.; Brix, H.; Mothes, S.; Afferden, M.; Müller, R.A. Side-by-side comparison of 15 pilot-scale conventional and intensified subsurface flow wetlands for treatment of domestic wastewater. *Sci. Total Environ.* **2019**, *658*, 1500–1513. [CrossRef] [PubMed]

28. Vymazal, J. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Sci. Total Environ.* **2007**, *380*, 48–65. [CrossRef]
29. Ilyas, H.; Masih, I. The performance of the intensified constructed wetlands for organic matter and nitrogen removal: A review. *J. Environ. Manag.* **2017**, *198*, 372–383. [CrossRef]
30. Royal, D. 1620/2007, That Establishes the Legal Framework for the Reuse of Recovered Wastewater. Available online: http://www.boe.es/boe/dias/2007/12/08/pdfs/A50639-50661.pdf (accessed on 6 January 2020).
31. Royal, D. 509/1996, That Establishes the Norms Applicable to the Treatment of Urban Wastewaters. Available online: https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-1996-7159 (accessed on 6 January 2020).
32. Dierberg, F.E.; Juston, J.J.; DeBusk, T.A.; Pietro, K.; Gu, B. Relationship between hydraulic efficiency and phosphorus removal in a submerged aquatic vegetation-dominated treatment wetland. *Ecol. Eng.* **2005**, *25*, 9–23. [CrossRef]
33. Babatunde, A.O.; Zhao, Y.Q.; Burke, A.M.; Morris, M.A.; Hanrahan, J.P. Characterization of aluminium-based water treatment residual for potential phosphorus removal in engineered wetlands. *Environ. Pollut.* **2009**, *157*, 2830–2836. [CrossRef]
34. Lan, W.; Zhang, J.; Hu, Z.; Ji, M.; Zhang, X.; Zhang, J.; Li, F.; Yao, G. Phosphorus removal enhancement of magnesium modified constructed wetland microcosm and its mechanism study. *Chem. Eng. J.* **2018**, *335*, 209–214. [CrossRef]
35. Mesquita, M.C.; Albuquerque, A.; Amaral, L.; Nogueira, R. Seasonal variation of nutrient removal in a full-size horizontal constructed wetland. *Energy Procedia* **2017**, *136*, 225–232. [CrossRef]
36. Du, L.; Chen, Q.; Liu, P.; Zhang, X.; Wang, H.; Zhou, Q.; Xu, D.; Wu, Z. Phosphorus removal performance and biological dephosphorization process in treating reclaimed water by Integrated Vertical-flow Constructed Wetlands (IVCWs). *Bioresour. Technol.* **2017**, *243*, 204–211. [CrossRef] [PubMed]
37. Wu, S.; Carvalho, P.N.; Müller, J.A.; Manoj, V.R.; Dong, R. Sanitation in constructed wetlands: A review on the removal of human pathogens and fecal indicators. *Sci. Total Environ.* **2016**, *541*, 8–22. [CrossRef] [PubMed]
38. Shingare, R.; Thawale, P.R.; Raghunathan, K.; Mishra, A.; Kumar, S. Constructed wetland for wastewater reuse: Role and efficiency in removing enteric pathogens. *J. Environ. Manag.* **2019**, *246*, 441–461. [CrossRef] [PubMed]
39. Ushijima, K.; Ito, K.; Ito, R.; Funamizu, N. Greywater treatment by slanted soil system. *Ecol. Eng.* **2013**, *50*, 62–68. [CrossRef]
40. Shingare, R.P.; Nanekar, S.V.; Thawale, P.R.; Karthik, R.; Juwarkar, A.A. Comparative study on removal of enteric pathogens from domestic wastewater using Typha latifolia and Cyperus rotundus along with different substrates. *Int. J. Phytoremediat.* **2017**, *19*, 899–908. [CrossRef]
41. Ranieri, E.; Gikas, P.; Tchobanoglous, G. BTEX removal in pilot-scale horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Desalin. Water Treat.* **2013**, *51*, 3032–3039. [CrossRef]
42. Petitjean, A.; Forquet, N.; Boutin, C. Oxygen profile and clogging in vertical flow sand filters for on-site wastewater treatment. *J. Environ. Manag.* **2016**, *170*, 15–20. [CrossRef]
43. de Oliveira Cruz, L.M.; Araujo Gomes, B.G.L.; Tonetti, A.L.; Salles Figueiredo, I.C. Using coconut husks in a full-scale decentralized wastewater treatment system: The influence of an anaerobic filter on maintenance and operational conditions of a sand filter. *Ecol. Eng.* **2019**, *127*, 454–459. [CrossRef]
44. Murnane, J.G.; Brennan, R.B.; Healy, M.G.; Fenton, O. Assessment of intermittently loaded woodchip and sand filters to treat dairy soiled water. *Water Res.* **2016**, *103*, 408–415. [CrossRef] [PubMed]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

REFERENCIAS

Abdo, Z., Schütte, U.M.E., Bent, S.J., Williams, C.J., Forney, L.J., Joyce, P., 2006. Statistical methods for characterizing diversity of microbial communities by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of *16S rRNA* genes. Environ. Microbiol., 8(5),929-938.

Agrawal, K., Verma, P., 2021. The Interest in Nanotechnology: A Step Towards Bioremediation. En *Removal of Emerging Contaminants Through Microbial Processes*. Ed. Shah, M.P., Springer, Singapur. pp. 265-282.

Arunbabu, V., Sruthy, S., Antony, I., Ramasamy, E.V., 2015. Sustainable greywater management with *Axonopus compressus* (broadleaf carpet grass) planted in sub surface flow constructed wetlands. J. Water Process. Eng., 7, 153-160.

Behr, M.A., Wilson, M.A., Gill, W.P., Salamon, H., Schoolnik, G.K., Rane, S., Small, P.M., 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. Science, 284(5419), 1520-1523.

Bej, A.K., Steffan, R.J., DiCesare, J., Haff, L., Atlas, R.M., 1990. Detection of Coliform Bacteria in Water by Polymoerase Chain Reaction and Gene Probes. Appl. Environ. Microbiol., 56(2), 307-314.

Blackwood, C.B., Marsh, T., Kim, S.H., Paul, E.A., 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. Appl. Environ. Microbiol., 69(2), 926-932.

Blackwood, C.B., Hudleston, D., Zak, D.R., Buyer, J.S., 2007. Interpreting ecological diversity indices applied to terminal restriction fragment length polymorphism data: insights from simulated microbial communities. Appl. Environ. Microbiol., 73(16), 5276-5283.

Brower, S., Leff, L., Mou, X., 2017. Effects of Short and Long-Term Hydrological Regimes on the Composition and Function of Denitrifying Bacteria in Experimental Wetlands. Wetlands, 37(3), 573-583.

Bru, D., Ramette, A., Saby, N.P.A., Dequiedt, S., Ranjard, L., Jolivet, C., Arrouays, D., Philippot, L., 2011. Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. ISME J., 5(3), 532-542.

Calhoun, A., King, G.M., 1997. Regulation of root-associated methanotrophy by oxygen availability in the rhizosphere of two aquatic macrophytes. Appl. Environ. Microbiol., 63(8), 3051-3058.

Campos-Serrano, A., Rodríguez-Esteban, J.A., 2017. Imagined territories and histories in conflict during the struggles for Western Sahara, 1956–1979. J. Hist. Geogr., 55, 44–59.

Cao, W., Wang, Y., Sun, L., Jiang, J., Zhang, Y., 2016. Removal of nitrogenous compounds from polluted river water by floating constructed wetlands using rice straw and ceramsite as substrates under low temperature conditions. Ecol. Eng., 88, 77–81.

Carvalho, P.N., Arias, C.A., Brix, H., 2017. Constructed wetlands for water treatment: New developments. Water, 9, 397.

Casas-Ledón, Y., Rivas, A., López, D., Vidal, G., 2017. Life-cycle greenhouse gas emissions assessment and extended exergy accounting of a horizontal-flow constructed wetland for municipal wastewater treatment: A case study in Chile. Ecol. Indicators, 74, 130–139.

Cho, H.B., Lee, J.K., Choi, Y.K., 2003. The Genetic Diversity Analysis of the Bacterial Community in Groundwater by Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). J. Microbiol., 41(4), 327-334.

Clarke, K.R., Gorley, R.N., 2015. Getting started with PRIMER v7. PRIMER-E Ltd., pp. 20.

Crump, B.C., Hopkinson, C.S., Sogin, M.L., Hobbie, J.E., 2004. Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: combined influences of bacterial growth and residence time. Appl. Environ. Microbiol., 70(3), 1494-1505.

Cui, B., Luo, J., Jin, D., Jin, B., Zhuang, X., Bai, Z., 2018. Investigating the bacterial community and amoebae population in rural domestic wastewater reclamation for irrigation. J. Environ. Sci., 70, 97-105.

Deasy, B.M., Rea, M.C., Fitzgerald, G.F., Cogan, T.M., Beresford, T.P., 2000. A Rapid PCR Based Method to Distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. System. Appl. Microbiol., 23(4), 510–522.

Duarte, P., Almeida, C.M.R., Fernandes, J.P., Morais, D., Lino, M., Gomes, C.R., Carvalho, M.F., Mucha, A.P., 2019. Bioremediation of bezafibrate and paroxetine by microorganisms from estuarine sediment and activated sludge of an associated wastewater treatment plant. Sci.Total Environ., 655, 796-806.

Dunbar, J., Ticknor, L.O., Kuske, C.R., 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of *16S rRNA* genes from bacterial communities. Appl. Environ. Microbiol., 67(1),190–197.

ElZein, Z., Abdou, A., Abd ElGawad, I., 2016. Constructed wetland as a sustainable wastewater treatment method in communities. Procedia Environ. Sci., 34, 605–617.

Engebretson, J.J., Moyer, C.L., 2003. Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal restriction fragment length polymorphism. Appl. Environ. Microbiol., 69(8),4823-4829

Erdiansyah, M., Meryandini, A., Wijaya, M., Suwanto, A., 2021. Microbiological quality of tempeh with different wraps: banana leaf versus plastic. J. Food Sci. Technol., 1-8.

Fan, T., Sun, Y., Peng, J., Wu, Q., Ma, Y., Zhou, X., 2018. Combination of amplified rDNA restriction analysis and high-throughput sequencing revealed the negative effect of colistin sulfate on the diversity of soil microorganisms. Microbiol. Res., 206, 9-15.

Farahani, H., Bayazidi, S., 2018. Modeling the assessment of socio-economical and environmental impacts of sand mining on local communities: A case study of Villages Tatao River Bank in North-western part of Iran. Resour. Policy, 55, 87–95.

Fioriti, S., Coccitto, S.N., Cedraro, N., Simoni, S., Morroni, G., Brenciani, A., Mangiaterra, G., Vignaroli, L., Vezzulli, L., Biavasco, F. & Giovanetti, E., 2021. Linezolid resistance genes in enterococci isolated from sediment and zooplankton in two Italian coastal areas. Appl. Environ. Microbiol., 87(9).

Fuchs, V.J., Mihelcic, J.R., Gierke, J.S., 2011. Life cycle assessment of vertical and horizontal flow constructed wetlands for wastewater treatment considering nitrogen and carbon greenhouse gas emissions. Water Res., 45(5), 2073–2081.

Garcia-Jimenez, P., García-Maroto, F., Garrido-Cárdenas, J.A., Ferrándiz, C., Robaina, R.R., 2009. Differential expression of the ornithine decarboxylase gene during carposporogenesis in the thallus of the red seaweed *Grateloupia imbricata* (Halymeniaceae). J. Plant Physiol., 166(16), 1745-1754.

Gich, F.B., Amer, E., Figueras, J.B., Abella, C.A., Balaguer, M.D., Poch, M., 2000. Assessment of microbial community structure changes by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). Int. Microbiol., 3(2), 103-106.

Herrera-Melián, J.A., González-Bordón, A., Martín-González, M.A., García-Jiménez, P., Carrasco, M., Araña, J., 2014. Palm tree mulch as substrate for primary treatment wetlands processing high strength urban wastewater. J. Environ. Manag., 139, 22-31.

Herrera-Melián, J.A., Borreguero-Fabelo, A., Araña, J., Peñate-Castellano, N., Ortega-Méndez, J.A., 2018. Effect of Substrate, Feeding Mode and Number of Stages on the Performance of Hybrid Constructed Wetland Systems. Water, 10(1), 39.

Herrera-Melián, J.A., 2020. Sustainable Wastewater Treatment Systems (2018–2019). Sustainability 2020, 12, 1940.

Herrera-Melián, J.A., Mendoza-Aguiar, M., Alonso-Guedes, R., García-Jiménez, P., Carrasco-Acosta, M., Ranieri, E., 2020. Multistage Horizontal Subsurface Flow vs. Hybrid Constructed Wetlands for the Treatment of Raw Urban Wastewater. Sustainability, 12(12), 5102.

Hua, G., Chenga, Y., Kongb, J., Li, M., Zhao, Z., 2018. High-throughput sequencing analysis of bacterial community spatiotemporal distribution in response to clogging in vertical flow constructed wetlands. Bioresour. Technol., 248, 104–112.

Ioannidou, D., Meylan, G., Sonnemann, G., Haberte, G., 2017. Is gravel becoming scarce? Evaluating the local criticality of construction aggregates. Resour. Conserv. Recycle, 126, 25–33.

Kadam, S.K., Chandanshivea, V.V., Raneb, N.R., Patilb, S.M., Gholaved, A.R., Khandareb, R.V., Bhosalee, A.R., Jeonf, B.H., Govindwar, S.P., 2018. Phytobeds with *Fimbristylis dichotoma* and *Ammannia baccifera* for treatment of real textile effluent: An in situ treatment, anatomical studies and toxicity evaluation. Environ. Res., 160, 1–11.

Kim, S.Y., Freeman, C., Lukac, M., Lee, S.H., Kim, S.D., Kang, H., 2020. Elevated CO_2 and high salinity enhance the abundance of sulfate reducers in a salt marsh ecosystem. App. Soil Ecol., 147, 103386.

Kitts, C.L., 2001. Terminal restriction fragment patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. Curr. Opin. Microbiol., 2(1), 17.

Knowles, P., Dotro, G., Nivala, J., García, J., 2011. Clogging in subsurface-flow treatment wetlands: Occurrence and contributing factors. Ecol. Eng., 37(2), 99–112.

Lazzaro, A., Widmer, F., Sperisen, C., Frey, B., 2008. Identification of dominant bacterial phylotypes in a cadmium-treated forest soil. FEMS Microbiol. Ecol., 63(2), 143-155.

Le Borgne, S., Avitia, M., 2014. Bacterial communities as bioindicators of environmental health. En *Bioindicadores: guardianes de nuestro futuro ambiental*, Eds. González-Zuarth, C.A., Vallarino, A., Pérez-Jiménez, J.C., Low-Pfeng, A.M., ECOSUR, México, pp. 127-145.

Li, Y., Wang, C., Zhang, W., Wang, P., Niu, L., Hou, J., Wang, J., Wang, L., 2015. Modeling the Effects of Hydrodynamic Regimes on Microbial Communities within Fluvial Biofilms: Combining Deterministic and Stochastic Processes. Environ. Sci. Technol., 49(21), 12869-12878.

Liao, D., 2000. Gene conversion drives within genic sequences: Concerted evolution of ribosomal RNA genes in bacteria and archea. J. Mol. Evol., 51(4), 305-317.

Lindström, E.S., Leskinen, E., 2002. Do Neighboring Lakes Share Common Taxa of Bacterioplankton? Comparison of *16S rDNA* Fingerprints and Sequences from Three Geographic Regions. Microb. Ecol., 44(1),1-9.

Llames, M.E.D.R., 2011. Diversidad y ecología de las comunidades microbiológicas de las lagunas pampeanas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, pp. 159.

Madigan, M., Martinku, J.Y., Parker, J., 1997. Biología de los microorganismos. Prentice Hall. Madrid, pp. 1064.

Maheux, A.F., Bouchard, S., Bérubé, È., Bergeron, M.G., 2017. Comparison of MI, Chromocult® coliform, and Compass CC chromogenic culture-based methods to detect *Escherichia coli* and total coliforms in water using *16S rRNA* sequencing for colony identification. J. Water Health, 15(3), 353-359.

Maier, R.M., Pepper, I.L., Gerba, C.P., 2009. Introduction to Environmental microbiology. En *Environmental microbiology*. Eds. Maier, R.M., Pepper, I.L., Gerba, C.P. Academic Press, San Diego, California, pp. 3-7.

Marsh, T.L., 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. Curr. Opin. Microbiol., 2(3), 323-327.

Masi, F., Rizzo, A., Regelsberger, M., 2018. The role of constructed wetlands in a new circular economy, resource oriented, and ecosystem services paradigm. J. Environ. Manag., 216, 275–284.

Masseret, E., Sukenik, A., 2008. Amplified rDNA Restriction Analysis (ARDRA) for monitoring of potentially toxic cyanobacteria in water samples. Isr. J. Plant Sci., 56(1-2), 75-82.

Moeseneder, M.M., Arrieta, J.M., Muyzer, G., Winter, C., Herndl, G.J., 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol., 65(8), 3518-3525.

Moyer, C.L., Tiedje, J.M., Dobbs, F.C., Karl, D.M., 1996. A computersimulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. Appl. Environ. Microbiol., 62(7), 2501–2507.

Mukherjee, A., Reddy, M.S., 2020. Metatranscriptomics: an approach for retrieving novel eukaryotic genes from polluted and related environments. Biotech., 10(2), 71.

Müller-Hill, B., Oehler, S., 1996. The lac operon. De Gruyter, Nueva York, pp. 203.

Murray, M.G., Thompson, W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res., 8(19), 4321-4326.

Nishi, E., Tashiro, Y., Sakai, K., 2015. Discrimination among individuals using terminal restriction fragment length polymorphism profiling of bacteria derived from forensic evidence. Int. J. Legal Med., 129(3), 425-433.

Panigrahi, S., Velraj, P., Rao, T.S., 2018. Functional microbial diversity in contaminated environment and application in bioremediation. En *Microbial Diversity in the Genomic Era*. Eds. Das, S., Dash, H.R., Academic Press, Londres, pp. 359-385.

Pedrós-Alió, C., 2006. Marine microbial diversity: can it be determined? Trends Microbiol., 14(6), 257-263

Peñate-Castellano, N., 2016. Estudio a Nivel de Planta Piloto de un Humedal Orgánico para el Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas. Proyecto Final Carrera. Escuela de Ingenierías Industriales y Civiles. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, pp. 212.

Piterina, A.V., Pembroke, J.T., 2013. Use of PCR-DGGE based molecular methods to analyse microbial community diversity and stability during the thermophilic stages of an ATAD wastewater sludge treatment process as an aid to performance monitoring. ISRN Biotechnol., 1-13.

Pukall, R., Brambilla, E., Stackebrandt, E., 1998. Automated fragment length analysis of fluorescently-labeled *16S rDNA* after digestion with 4-base cutting restriction enzymes. J. Microbiol. Methods, 32(1), 55-63.

Ramond, J.B., Welz, P.J., Tuffin, M.I., Burton, S.G., Cowan, D.A., 2013. Assessment of temporal and spatial evolution of bacterial communities in a biological sand filter mesocosm treating winery wastewater. J. App. Microbiol., 115(1), 91-101.

Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. Boletín Oficial del Estado, de 8 de diciembre de 2007, 294, pp. 50639-50661.

Reichert, G., Hilgert, S., Alexander, J., de Azevedo, J.C.R., Morck, T., Fuchs, S. Schwartz, T., 2021. Determination of antibiotic resistance genes in a WWTP-impacted river in surface water, sediment, and biofilm: Influence of seasonality and water quality. Sci. Total Environ., 768, 144526.

Ren, X.U., Wang, Y., Xu, G., Dai, L., 2016. Effect of rapamycin on endometriosis in mice. Exper. Ther. Med., 12(1), 101-106.

Rezasoltani, S., Bashirzadeh, D.A., Mojarad, E.N., Aghdaei, H.A., Norouzinia, M., Shahrokh, S., 2020. Signature of Gut Microbiome by Conventional and Advanced Analysis Techniques: Advantages and Disadvantages. Middle East J. Dig. Dis., 12(1), 5.

Rodas, A.M., Chenoll, E., Macian, M.C., Ferrer, S., Pardo, I., Aznar, R., 2006. *Lactobacillus vini* sp. nov., a wine lactic acid bacterium homofermentative for pentoses. Int. J. Syst. Evol. Micr., 56(3), 513-517.

Rodrigues, E.M., Kalks, K.H., Fernandes, P.L., Tótola, M.R., 2015. Bioremediation strategies of hydrocarbons and microbial diversity in the Trindade Island shoreline Brazil. Mar. Pollut. Bull., 101(2), 517-525.

Ruan, Q., Steele, J.A., Schwalbach, M.S., Fuhrman, J.A., Sun, F., 2006. A dynamic programming algorithm for binning microbial community profiles. Bioinformatics, 22(12),1508–1514.

Ruqaya, M.A., Al-Mawla, Y.H. & Jebor, M.A., 2018. Molecular differentiation between *Shigella* and *Escherichia coli* using PCR Technique. Int. J. Pharm. Sci. Res., 10(2), 276-277.

Saeed, T., Sun, G., 2017. Pollutant removals employing unsaturated and partially saturated vertical flow wetlands: A comparative study. Chem. Eng. J. 325, 332–341.

Sakamoto, M., Hayashi, H., Benno, Y, 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis for human fecal microbiota and its application for analysis of complex bifidobacterial communities. Microbiol. Immun., 47(2), 133-142.

Samsó, R., García, J., Molle, P., Forquet, N., 2016. Modelling bioclogging in variably saturated porous media and the interactions between surface/subsurface flows: Application to Constructed Wetlands. J. Environ. Manag., 165, 271-279.

Saro, C., Molina-Alcaide, E., Abecia, L., Ranilla, M.J., Carro, M.D., 2018. Comparison of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) techniques for analysing the influence of diet on ruminal bacterial diversity. Arch. Anim. Nutr., 72(2), 85-99.

Scheinert, P., Krausse, R., Ullmann, U., Söller, R., Krupp, G., 1996. Molecular differentiation of bacteria by PCR amplification of the 16S–23S rRNA spacer. J. Microbiol. Methods, 26(1-2), 103-117.

Schütte, U.M., Abdo, Z., Bent, S.J., Shyu, C., Williams, C.J., Pierson, J.D., Forney, L.J., 2008. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of *16S rRNA* genes to characterize microbial communities. Appl. Microbiol. Biote., 80(3), 365-380.

Shekhar, S.K., Godheja, J., Modi, D.R., 2020. Molecular Technologies for Assessment of Bioremediation and Characterization of Microbial Communities at Pollutant-Contaminated Sites. En *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety*. Eds. Saxena, G., Bhragava, R.N., Springer, Singapur, pp. 437-474.

Smith, C.J., Danilowicz, B.S., Clear, A.K., Costello, F.J., Wilson, B., Meijer, W.G., 2005. T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profile. FEMS Microbiol. Ecol., 54(3), 375–380.

Thies, J.E., 2007. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorphisms. Soil Sci. Soc. Am. J., 71(2), 579–591.

Thomas, R., Gough, R., Freeman, C., 2017. Linear alkylbenzene sulfonate (LAS) removal in constructed wetlands: The role of plants in the treatment of a typical pharmaceutical and personal care product. Ecol. Eng., 106, 415–422.

Tsilimigras, M.C., Fodor, A.A., 2016. Compositional data analysis of the microbiome: fundamentals, tools, and challenges. Ann. Epidemiol., 26(5), 330-335.

Vaneechoutte, M., De Beenhouwer, H., Claeys, G., Verschraegen, G. De Rouck, A., Paepe, N., Elaichouni, A., Portaels, F., 1993. Identification of *Mycobacterium* species by using amplified ribosomal DNA restriction analysis. J. Clin. Microbiol., 31(8), 2061-2065.

Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., Losick, R., 2006. Biología molecular del gen. Médica Panamericana, Madrid, pp.742.

Xiang, W., Xiao, X., Xue, J., 2020. Purification effect and microorganisms diversity in an *Acorus calamus* constructed wetland on petroleum-containing wastewater. Environ. Pollut. Bioavail., 32(1), 19-25.

Yang, Y., Zhao, Y., Liu, R., Morgan, D., 2018. Global development of various emerged substrates utilized in constructed wetlands. Bioresour. Technol., 261, 441–452.

Zanella, L., Nour, E., Roston, D., 2010. Use of bamboo rings as substrate in subsuperficial constructed wetland system in Brazil. En *Proceedings of the 12th International Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control*, Venecia, Italia, 3–6 Octubre.

Zhao, Y.Q., Zhao, X.H., Babatunde, A.O., 2009. Use of dewatered alum sludge as main substrate in treatment reed bed receiving agricultural wastewater: Long-term trial. Bioresour. Technol., 100(2), 644–648.

ANEXO II

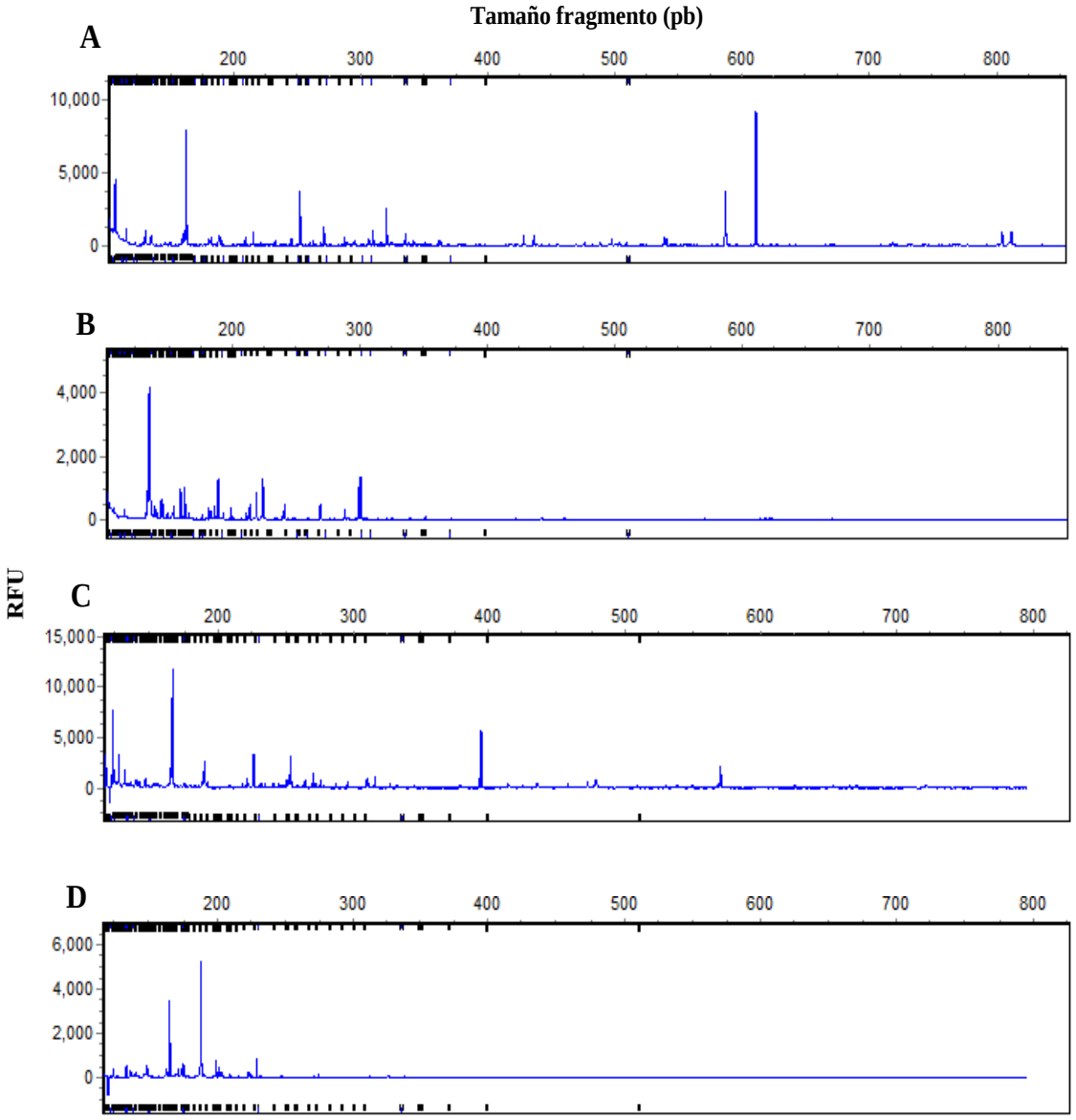


Figura A.II.1. Electroferogramas brutos de los perfiles a partir de la amplificación del gen *lacZ* de *E. coli*. **A**. Reactor de flujo vertical plantado (HFV 1p) muestreado en el periodo de obturación leve (OL); **B**. Reactor de flujo vertical plantado (HFV 1p) muestreado en el periodo de obturación severa (OS); **C**. Reactor de flujo vertical sin plantas (HFV 1np) muestreado en el periodo de obturación leve (OL); **D**. Reactor de flujo vertical sin plantas (HFV 1np) muestreado en el periodo de obturación severa (OS). RFU: *Relative Fluorescence Units*.

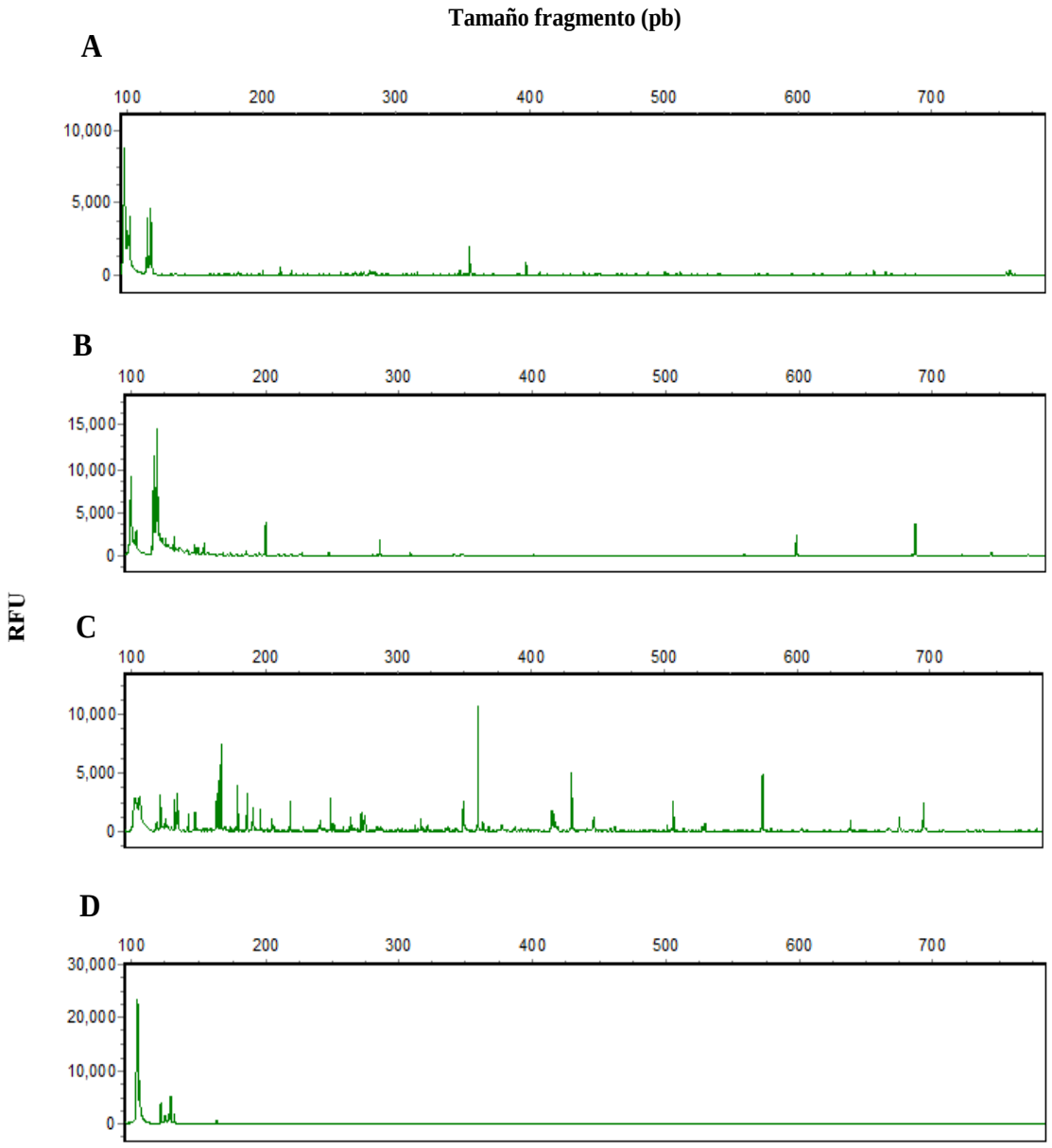


Figura A.II.2. Electroferogramas brutos de los perfiles a partir de la amplificación del gen *16S rRNA* de *Enterococcus*. **A**. Reactor de flujo vertical plantado (HFV 1p) muestreado en el periodo de obturación leve (OL); **B**. Reactor de flujo vertical plantado (HFV 1p) muestreado en el periodo de obturación severa (OS); **C**. Reactor de flujo vertical sin plantas (HFV 1np) muestreado en el periodo de obturación leve (OL); **D**. Reactor de flujo vertical sin plantas (HFV 1np) muestreado en el periodo de obturación severa (OS). RFU: *Relative Fluorescence Units*.

Tabla A.II.1. Matriz de abundancias del bioindicador *Enterococcus* (*16S rRNA*), sumatoria del número de T-RFs y abundancia relativa total de cada matriz.

	Abundancia relativa			
Longitud T-RF (pb)	**HFV 1p OL**	**HFV 1p OS**	**HFV 1np OL**	**HFV 1np OS**
115,3	1927,64	0,00	442,72	0,00
116,4	1537,96	0,00	0,00	0,00
118,7	0,00	6122,18	1331,30	3612,68
120,3	0,00	6168,83	0,00	0,00
121,9	0,00	4380,76	584,73	1010,53
122,0	0,00	2141,79	0,00	0,00
123,4	0,00	1309,95	0,00	0,00
125,0	0,00	0,00	0,00	2922,38
127,6	0,00	1193,34	0,00	1356,21
129,2	0,00	777,42	1675,88	0,00
132,5	92,75	1002,87	0,00	327,65
138,2	0,00	555,86	788,34	0,00
143,5	68,22	0,00	913,64	0,00
146,0	0,00	0,00	0,00	116,64
148,8	0,00	777,42	0,00	0,00
151,0	0,00	482,00	0,00	0,00
154,2	0,00	375,11	0,00	0,00
158,3	0,00	190,47	0,00	0,00
160,3	81,24	0,00	1566,24	660,61
161,7	0,00	0,00	4557,76	0,00
164,3	0,00	0,00	0,00	87,16
166,2	0,00	0,00	204,66	0,00
168,7	0,00	167,92	0,00	0,00
170,3	0,00	0,00	215,10	0,00
173,7	65,58	0,00	0,00	0,00
175,9	0,00	170,64	2218,84	0,00
182,4	118,89	0,00	1717,64	0,00
186,9	0,00	320,69	1305,20	0,00
192,3	0,00	0,00	384,25	0,00
200,7	197,20	0,00	631,72	0,00
202,4	0,00	2106,81	0,00	0,00
213,3	222,67	0,00	0,00	0,00
215,4	0,00	0,00	1414,84	0,00
221,6	159,46	0,00	0,00	0,00
224,6	0,00	0,00	201,52	0,00
228,1	0,00	138,38	0,00	0,00
237,7	0,00	0,00	527,30	0,00
245,2	0,00	0,00	1472,27	0,00
246,7	0,00	0,00	316,38	0,00
249,0	0,00	246,83	0,00	0,00
254,8	0,00	0,00	185,86	0,00
259,2	133,04	0,00	396,26	0,00
268,1	0,00	0,00	887,54	0,00
269,4	87,09	0,00	0,00	0,00
270,5	0,00	0,00	783,12	0,00
273,5	93,13	0,00	0,00	0,00
275,6	105,68	0,00	0,00	0,00

HFV 1p: Reactor con plantas; HFV 1p: Reactor sin plantas; OL: periodo obstrucción leve; OL: periodo obstrucción severa.

Tabla A.II.1 (continuación). Matriz de abundancias del bioindicador *Enterococcus* (*16S rRNA*), sumatoria del número de T-RFs y abundancia relativa total de cada matriz.

	Abundancia relativa			
Longitud T-RF (pb)	**HFV 1p OL**	**HFV 1p OS**	**HFV 1np OL**	**HFV 1np OS**
280,1	177,38	0,00	0,00	0,00
284,4	137,76	0,00	0,00	0,00
288,0	0,00	1103,94	0,00	0,00
295,5	0,00	0,00	161,84	0,00
308,5	0,00	0,00	332,04	0,00
311,3	0,00	230,12	0,00	0,00
312,8	0,00	0,00	410,88	0,00
315,9	97,18	0,00	0,00	0,00
317,9	0,00	0,00	293,41	0,00
343,9	0,00	160,93	0,00	0,00
347,9	175,50	0,00	508,51	0,00
355,4	678,40	0,00	7528,39	0,00
357,1	0,00	0,00	0,00	67,44
359,8	0,00	0,00	410,88	0,00
364,4	0,00	0,00	191,08	0,00
374,1	0,00	0,00	332,04	0,00
397,5	579,33	0,00	0,00	0,00
407,7	116,05	0,00	0,00	0,00
411,6	0,00	0,00	600,39	0,00
413,5	0,00	0,00	793,56	0,00
424,5	93,41	0,00	4072,22	34,99
429,2	108,51	0,00	0,00	0,00
439,5	127,38	0,00	0,00	0,00
442,0	0,00	0,00	694,37	0,00
454,7	0,00	0,00	114,86	0,00
457,1	0,00	0,00	220,84	0,00
487,5	89,45	0,00	0,00	0,00
497,0	0,00	0,00	335,70	0,00
501,0	129,26	0,00	1519,25	0,00
509,3	0,00	0,00	127,39	0,00
512,1	134,93	0,00	0,00	0,00
522,7	0,00	0,00	177,51	0,00
525,3	0,00	0,00	395,21	0,00
565,2	0,00	0,00	0,00	29,27
567,9	0,00	0,00	2944,53	0,00
574,8	0,00	0,00	134,17	0,00
601,8	0,00	1414,90	0,00	0,00
611,7	71,14	0,00	0,00	0,00
633,5	0,00	0,00	548,18	0,00
639,2	90,67	0,00	0,00	0,00
657,1	157,57	0,00	0,00	0,00
665,8	116,05	0,00	0,00	0,00
688,0	0,00	0,00	1675,88	0,00
691,0	0,00	2071,82	0,00	0,00
713,9	68,31	0,00	0,00	0,00
ΣT-RFs	32,00	24,00	48,00	11,00
Abundancia relativa total	8038,81	33610,98	49246,24	10225,57

HFV 1p: Reactor con plantas; HFV 1p: Reactor sin plantas; OL: periodo obstrucción leve; OL: periodo obstrucción severa.

Tabla A.II.2. Matriz de abundancias del bioindicador *E. coli* (*lacZ*), sumatoria del número de T-RFs y abundancia relativa total de cada matriz.

	Abundancia relativa			
Longitud T-RF (pb)	**HFV 1p OL**	**HFV 1p OS**	**HFV 1np OL**	**HFV 1np OS**
116,7	810,4	0,0	0,0	0,0
118,0	0,0	247,3	0,0	0,0
121,4	0,0	0,0	1424,4	0,0
122,9	147,1	0,0	2175,1	247,3
125,5	0,0	0,0	656,9	78,5
131,0	525,3	0,0	861,3	0,0
132,4	0,0	0,0	0,0	168,9
134,7	0,0	217,0	0,0	163,8
136,5	471,3	2842,2	0,0	121,1
137,0	0,0	0,0	0,0	134,3
138,4	0,0	0,0	0,0	148,6
139,8	0,0	0,0	0,0	106,8
142,2	0,0	278,3	0,0	0,0
143,6	0,0	0,0	0,0	108,9
145,5	0,0	0,0	402,2	178,1
147,5	0,0	491,2	0,0	0,0
150,9	0,0	130,6	0,0	0,0
154,4	0,0	195,6	0,0	0,0
160,6	750,4	747,3	0,0	615,6
163,6	5823,1	255,7	3609,6	0,0
168,4	0,0	163,3	0,0	0,0
169,6	0,0	0,0	0,0	214,7
172,1	0,0	0,0	0,0	317,5
173,9	0,0	0,0	226,2	0,0
175,5	0,0	0,0	170,3	0,0
178,4	0,0	131,8	0,0	0,0
180,6	285,8	0,0	132,7	0,0
182,4	407,0	0,0	0,0	119,1
184,4	0,0	261,1	145,1	1567,1
186,5	0,0	0,0	925,0	0,0
188,4	561,9	316,1	593,2	145,5
190,1	422,6	529,0	0,0	0,0
195,1	0,0	125,5	0,0	99,1
196,9	0,0	0,0	0,0	478,3
198,8	0,0	0,0	0,0	273,7
201,2	0,0	249,8	0,0	207,6
203,2	0,0	0,0	0,0	92,7
207,2	0,0	0,0	0,0	116,0
209,0	359,0	0,0	0,0	0,0
213,8	0,0	110,4	0,0	0,0
215,8	684,4	349,3	200,4	0,0
219,2	0,0	0,0	455,8	0,0
221,3	120,7	591,9	184,0	186,2
224,0	0,0	0,0	1739,4	0,0
226,1	0,0	856,4	0,0	333,8

HFV 1p: Reactor con plantas; HFV 1p: Reactor sin plantas; OL: periodo obstrucción leve; OL: periodo obstrucción severa.

Tabla A.II.2 (continuación). Matriz de abundancias del bioindicador *E. coli* (*lacZ*), sumatoria del número de T-RFs y abundancia relativa total de cada matriz.

	Abundancia relativa			
Longitud T-RF (pb)	**HFV 1p OL**	**HFV 1p OS**	**HFV 1np OL**	**HFV 1np OS**
228,0	0,0	0,0	240,6	0,0
229,2	0,0	0,0	0,0	85,8
231,4	0,0	0,0	0,0	73,9
232,6	239,5	0,0	190,7	0,0
233,9	0,0	0,0	0,0	75,8
235,7	0,0	104,5	0,0	0,0
237,2	103,9	60,0	0,0	0,0
239,0	0,0	0,0	265,1	0,0
242,3	0,0	73,0	234,6	0,0
244,2	0,0	326,6	126,7	0,0
245,7	0,0	0,0	205,1	115,0
247,0	0,0	0,0	418,9	0,0
248,2	0,0	0,0	891,5	0,0
261,1	0,0	0,0	378,7	0,0
265,8	0,0	0,0	519,5	0,0
269,1	135,1	0,0	258,7	0,0
271,2	1032,6	327,0	0,0	88,3
272,9	124,3	0,0	392,1	0,0
280,4	0,0	0,0	0,0	20,6
283,6	0,0	0,0	241,3	0,0
284,7	0,0	0,0	0,0	38,7
287,3	407,0	0,0	0,0	0,0
288,8	157,9	0,0	0,0	0,0
291,0	0,0	235,1	166,6	0,0
291,6	0,0	0,0	225,6	0,0
293,4	0,0	113,4	0,0	0,0
295,0	247,3	0,0	0,0	0,0
296,8	0,0	0,0	77,1	0,0
299,1	0,0	0,0	0,0	0,0
300,6	0,0	377,0	0,0	0,0
302,3	0,0	0,0	93,8	23,8
304,0	0,0	852,2	0,0	0,0
306,0	240,1	0,0	0,0	0,0
307,3	0,0	0,0	151,5	0,0
310,5	780,4	0,0	489,3	89,2
314,3	0,0	0,0	0,0	0,0
316,0	153,7	0,0	0,0	0,0
317,5	0,0	23,0	0,0	0,0
320,7	1921,0	0,0	0,0	0,0
323,2	0,0	36,4	183,3	63,2
325,1	0,0	0,0	0,0	67,1
328,0	0,0	39,1	178,0	0,0
334,1	324,8	0,0	0,0	0,0
335,8	0,0	0,0	96,2	77,2
340,7	0,0	0,0	133,1	0,0

HFV 1p: Reactor con plantas; HFV 1p: Reactor sin plantas; OL: periodo obstrucción leve; OL: periodo obstrucción severa.

Tabla A.II.2 (continuación). Matriz de abundancias del bioindicador *E. coli* (*lacZ*), sumatoria del número de T-RFs y abundancia relativa total de cada matriz.

	Abundancia relativa			
Longitud T-RF (pb)	**HFV 1p OL**	**HFV 1p OS**	**HFV 1np OL**	**HFV 1np OS**
341,8	285,2	0,0	0,0	0,0
343,4	0,0	53,7	0,0	0,0
344,9	0,0	26,2	0,0	0,0
355,1	0,0	72,2	0,0	0,0
362,6	252,1	0,0	0,0	16,9
373,0	0,0	0,0	0,0	25,2
374,7	0,0	0,0	0,0	22,6
387,4	0,0	0,0	1612,1	0,0
407,9	0,0	0,0	203,8	0,0
412,2	0,0	0,0	107,6	0,0
413,9	59,8	0,0	0,0	0,0
417,4	0,0	0,0	114,3	0,0
420,9	0,0	0,0	96,5	0,0
427,7	489,9	0,0	177,0	0,0
436,1	501,3	0,0	0,0	0,0
447,7	0,0	0,0	86,1	0,0
450,9	0,0	0,0	240,0	0,0
454,0	102,7	0,0	0,0	0,0
456,5	0,0	0,0	0,0	43,5
463,7	0,0	0,0	324,8	0,0
467,9	0,0	0,0	301,3	0,0
475,0	121,3	0,0	0,0	0,0
486,9	136,3	0,0	0,0	53,4
490,9	0,0	0,0	99,9	0,0
493,3	0,0	0,0	71,7	17,9
496,4	338,0	0,0	0,0	0,0
499,8	0,0	0,0	185,0	0,0
502,2	152,5	0,0	0,0	0,0
507,4	108,7	0,0	102,2	0,0
508,7	0,0	0,0	75,4	0,0
512,9	0,0	0,0	89,1	0,0
515,5	0,0	0,0	81,1	0,0
520,2	85,2	0,0	126,0	0,0
523,4	94,9	0,0	0,0	0,0
525,6	0,0	0,0	81,4	0,0
528,2	0,0	0,0	160,9	0,0
538,0	374,0	0,0	150,5	0,0
546,5	0,0	0,0	62,7	0,0
557,4	0,0	0,0	439,0	0,0
565,0	0,0	0,0	90,8	0,0
567,8	0,0	0,0	77,1	0,0
570,4	0,0	0,0	89,1	0,0
585,8	1740,9	0,0	70,7	0,0
590,9	0,0	0,0	76,1	0,0
594,8	0,0	0,0	68,4	0,0

HFV 1p: Reactor con plantas; HFV 1p: Reactor sin plantas; OL: periodo obstrucción leve; OL: periodo obstrucción severa

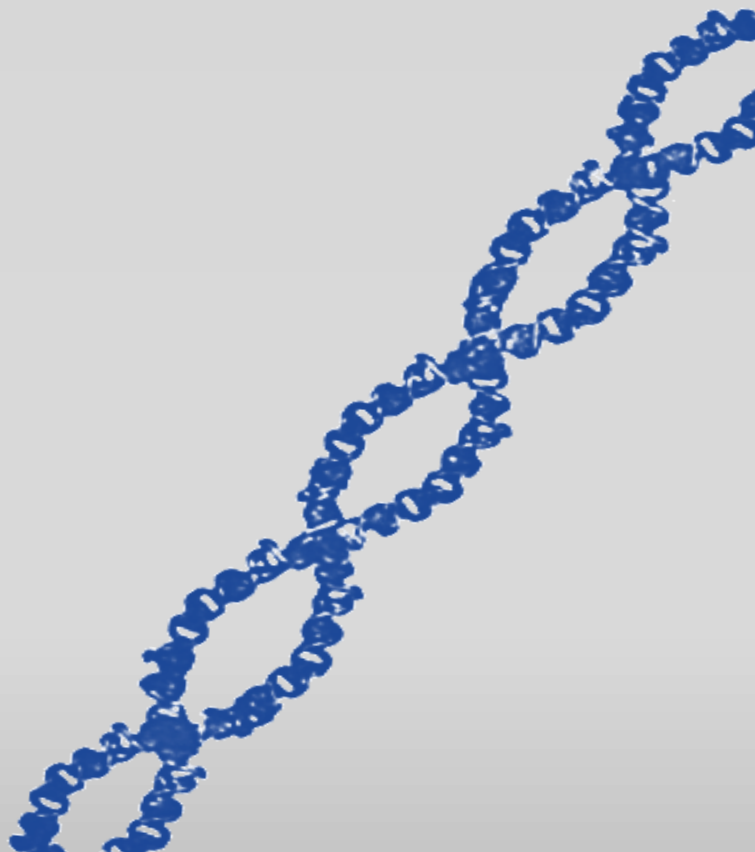
Tabla A.II.2 (continuación). Matriz de abundancias del bioindicador *E. coli* (*lacZ*), sumatoria del número de T-RFs y abundancia relativa total de cada matriz.

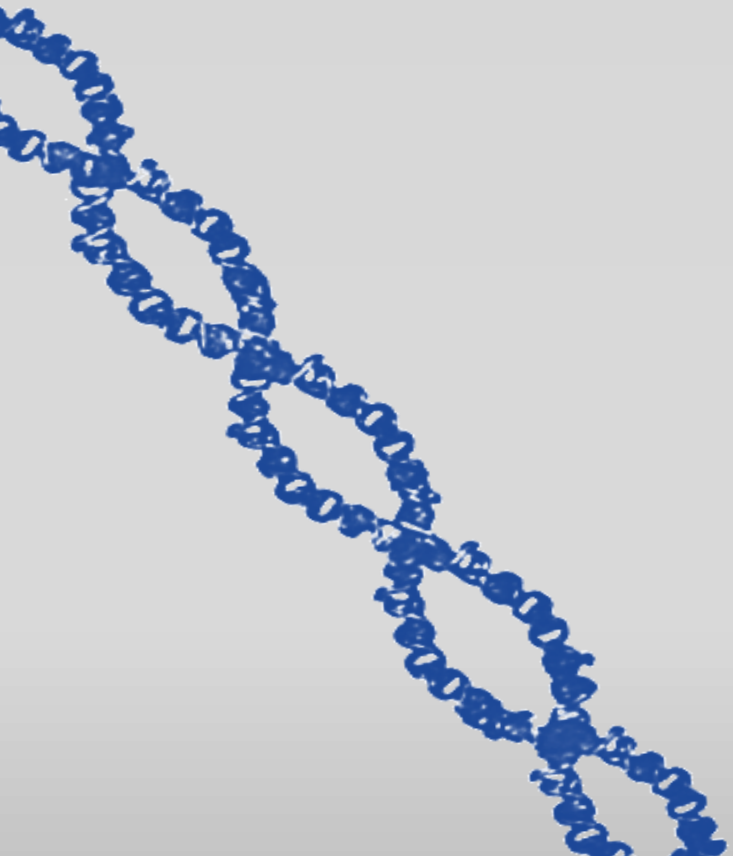
	Abundancia relativa			
Longitud T-RF (pb)	**HFV 1p OL**	**HFV 1p OS**	**HFV 1np OL**	**HFV 1np OS**
596,2	0,0	0,0	65,7	0,0
609,9	7215,9	0,0	0,0	0,0
612,9	0,0	0,0	177,0	0,0
639,0	0,0	0,0	108,6	0,0
652,2	0,0	0,0	154,5	0,0
655,2	0,0	0,0	116,3	0,0
674,5	0,0	0,0	50,9	0,0
705,2	0,0	0,0	254,0	0,0
708,1	0,0	0,0	63,7	0,0
729,2	336,2	0,0	120,7	0,0
803,2	636,3	0,0	0,0	0,0
ΣT-RFs	44,0	35,0	77,0	42,0
Abundancia relativa total	30267,5	11809,5	26631,7	7221,1

HFV 1p: Reactor con plantas; HFV 1p: Reactor sin plantas; OL: periodo obstrucción leve; OL: periodo obstrucción severa

CAPÍTULO III

Detección y cuantificación de bioindicadores de contaminación fecal en aguas y sedimentos marinos de la Bahía del Confital (Gran Canaria) mediante multiplex RT qPCR





Capítulo III

Detección y cuantificación de bioindicadores de contaminación fecal en aguas y sedimentos marinos de la Bahía del Confital (Gran Canaria) mediante *multiplex* RT qPCR

Detection and quantification of faecal bioindicators of marine waters and sediments from the Bay of Confital (Gran Canaria, Spain) using multiplex real-time quantitative PCR

Carrasco-Acosta, M., Garcia-Jimenez, P., En preparación

III.1 │INTRODUCCIÓN

Globalmente, la contaminación fecal de origen antropogénico, y por consiguiente los patógenos asociados a la misma, representan un serio problema, tanto a nivel medioambiental como de salud pública (Shahraki *et al.*, 2019). Este riesgo está presente y afecta, en menor o mayor grado, a todas las tipologías de masas de agua (continentales, acuíferos, aguas de consumo y marinas).

No obstante, entre todas ellas, las aguas marinas son una de las más comprometidas. Estas se ven afectadas por múltiples rutas de entrada de contaminación fecal, la mayoría de las cuales tienen origen en actividades en tierra llevadas a cabo por el hombre (Walter *et al*., 2011). Una de las más significativas sería la evacuación de aguas residuales tratadas, mediante emisarios submarinos, tanto reglamentada –procedentes de estaciones de depuración de aguas residuales (EDAR)–, como no regulada, donde el control del agua evacuada es precario o nulo.

Si añadido a estos hechos, se suman factores tales como el continuo crecimiento de la población y el cambio climático (Levy *et al*., 2016), así como la gestión inadecuado de la línea litoral, se evidencia una correlación directa entre todos ellos y el incremento de enfermedades hídricas asociadas al uso de estas masas de agua marina contaminadas (Walter *et al*., 2011). En esta línea, McClung y colaboradores (2017) han identificado a las aguas recreacionales como segunda causa más común, a nivel mundial, de brotes de enfermedades hídricas, detrás de las aguas de consumo contaminadas. Similarmente, Stewart y colaboradores (2011) informaron de las repercusiones sobre la salud de acciones como nadar y bañarse en aguas costeras contaminadas, relacionándose estas con al menos 120 millones de casos de enfermedades gastrointestinales, y 50 millones de casos de enfermedades respiratorias, a nivel mundial.

III.1.1 │Calidad de aguas de baño y parámetros microbiológicos

A través de los estudios epidemiológicos llevados a cabo a partir de la década de los 50, se empezaron a reportar correlaciones entre la calidad del agua –entendida como la presencia/ausencia de bioindicadores o patógenos–, y las enfermedades hídricas. De acuerdo a estos estudios se indexaron estándares para el correcto control de los cuerpos de agua.

Para ello, se propusieron varios parámetros microbiológicos, siendo la especie bacteriana *Escherichia coli* una de las más utilizadas en el control de la calidad de aguas. Como ya hemos expuesto a lo largo de este manuscrito, la especie *E. coli* es uno de los miembros predominantes de la flora normal de los tractos gastrointestinales de humanos y del resto de mamíferos (Gauthier & Archibald, 2001; Maheux *et al.*, 2011). Este hecho fue determinante para su proposición como bacteria indicadora de contaminación fecal (FIB, *Faecal Indicator Bacteria*) a finales de los años 90, su posterior utilización a nivel comunitario a mediados de los años 2000 –con la Directiva 2006/7/CE–, y su actual valoración, a nivel estatal, a través del Real Decreto 1341/2007, pertinente a la gestión de calidad de aguas de baño.

Asimismo, el grupo bacteriano *Enterococcus intestinalis*, también descrito como FIB, es el complemento de *E. coli*, en cuanto a parámetros microbiológicos a valorar en el control de la calidad de las aguas de baño. No obstante, es conveniente tener presente lo expuesto y discutido respecto a este parámetro microbiológico y al desacuerdo, entre la comunidad científica, relativo a los integrantes que configuran este grupo. Cabe recordar también que, la discordancia respecto a los integrantes deriva de la falta de información e investigación exhaustiva relacionada con el o los hospedadores de cada una de las especies de *Enterococcus* definidas hasta la actualidad. Además, la constante actualización de las especies integrantes del género, basada en métodos moleculares, y llevada a cabo durante las dos últimas décadas, dificultad dicha labor (Šplíchalová *et al.*, 2013; Takakura *et al*., 2019; Gouba *et al.*, 2020).

Varios son los trabajos que centran sus pesquisas en torno a esta cuestión (Leclerc *et al*., 1996; Tedim *et al*., 2015), y aunque a día de hoy, no existe unanimidad sobre las especies integrantes del grupo *Enterococcus intestinalis*, sin duda, como ya adelantamos en el Capítulo I, sí hay consenso por parte de la comunidad científica en que *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* son las especies del género *Enterococcus* predominantes en la colonización del tracto gastrointestinal humano (Nallapareddy *et al*., 2005; Galloway-Peña *et al*., 2012; Palmer *et al*., 2012; Qin *et al*., 2012). Asimismo, algunas cepas pertenecientes a estas dos especies han sido determinadas como enterotoxigénicas, siendo *E. faecalis* y *E. faecium*, además, los agentes etiológicos más frecuentes en infecciones en humanos provocadas por *Enterococci*, de ahí su interés clínico (Facklma *et al.*, 2002; Miranda *et al.*, 2005). Más aún, *E. faecalis* y *E. faecium* pueden sobrevivir a exposiciones prolongadas a ambientes estresores –pH bajos, alta salinidad y rango amplio de temperaturas–, fuera de sus hospedadores (Byappanahalli *et al.*, 2012).

Por tanto, se puede asumir que estas especies son comunes en las aguas residuales urbanas (Korajkic *et al*., 2020), y pueden presentarse en las aguas costeras y los sedimentos marinos (Garrido-Pérez *et al.*, 2008), por lo que, su control se propone como clave en materia de calidad de zonas de baño

(Byappanahalli *et al*., 2012; Erdem *et al*., 2019; Korajkic *et al*., 2020). Las evidencias reportadas respecto a los mecanismos de resistencia a antibióticos de ciertas cepas de estas dos especies, enfatizan la necesidad de su correcto control (Korajkic *et al*., 2020; Růžičková *et al.*, 2020).

III.1.2 │Valoración de los parámetros microbiológicos

La valoración y cuantificación de los bioindicadores *E. coli* y *Enterococcus intestinalis,* recogidas en el RD 1341/2007, se determina mediante métodos de análisis de referencia basados en la concentración de las muestras de agua de mar, a través de métodos de filtración por membrana, y el correspondiente cultivo de las mismas en medios específicos. Posterior a la incubación de las muestras, la cual se demora de 24-48h dependiendo del organismo a determinar, se procede a la confirmación de los bioindicadores bacterianos (descrita en el Capítulo I). Todo ello, implica largos tiempos de diagnóstico, que impiden una correcta planificación y gestión de las zonas de baño.

En contraposición, en la actualidad, existe una amplia variedad de métodos de detección y cuantificación de bacterias. Entre ellos, los métodos moleculares desarrollados para este fin, proponen un amplio y plural abanico de posibilidades. No obstante, aunque su implementación es prometedora en materia de calidad de aguas, la convalidación entre las unidades de medida utilizadas en los métodos tradicionales –UFC 100 mL^{-1} de muestra, unidades de medida recogidas en los estándares definidos en el RD 1341/2007–, y las proporcionadas por metodologías moleculares –copias del gen diana o ng de ADN 100 mL^{-1} de muestra, en métodos moleculares de cuantificación como la RT qPCR o la qNASBA (*real time quantification nucleic acid sequence-based amplification*)–, entraña ciertas problemáticas en su empleo normalizado en laboratorios acreditados. Los esfuerzos de la comunidad científica de los últimos años, así como en la actualidad, han ido versados hacia la búsqueda de métodos moleculares de cuantificación y de diagnóstico rápido, con unidades de medida estandarizadas y de fácil manejo.

III.1.3 │Valoración de calidad de aguas. *Multiplex* RT qPCR

Uno de los métodos moleculares más adecuados para la determinación y cuantificación rápida de parámetros microbiológicos es el método simultáneo de cuantificación a tiempo real mediante reacción en cadena de la polimerasa (*multiplex* RT qPCR, *multiplex Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*). La *multiplex* RT qPCR es un método comúnmente empleado en diversas aplicaciones, como la expresión génica, la detección de patógenos, o el genotipado de polimorfismos de nucleótido único o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Gupta *et al.*, 2010; Paolucci *et al*., 2010; Nagy, 2013), entre muchas otras. Algunos ejemplos de trabajos recientes donde utilizan este método son i) la detección rápida y simultánea de cepas del virus SARS-CoV-2 (Kudo *et al*., 2020); ii) la cuantificación de la expresión de genes de resistencia a antifúngicos de cepas de hongos filamentosos potencialmente patógenos (D'Agostino *et al*., 2018); o, iii) la determinación y cuantificación de bacterias patógenas en muestras clínicas (Yang *et al.*, 2019).

El método *multiplex* RT qPCR combina la amplificación y la detección a tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa convencional en un solo paso. En consecuencia, se elimina la necesidad de visualizar los amplicones mediante electroforesis, permitiendo así, a diferencia de la PCR convencional, obtener cuantificaciones absolutas o relativas de la región amplificada. En los ensayos RT qPCR se incluyen fluoróforos para identificar los productos de amplificación durante el ciclado térmico. De esta manera, los termocicladores empleados permiten determinar la acumulación de las señales de fluorescencia emitidas por los fluoróforos durante la fase exponencial de la reacción, cuantificando de forma rápida y precisa los amplicones obtenidos.

Además, se añade una ventaja significativa. La reacción *multiplex* posibilita la amplificación simultánea de varios genes o regiones *target* (amplicones) en una misma muestra, pudiendo llegar a amplificar hasta cinco *targets* a la vez, a partir del diseño y empleo de conjuntos de juegos de cebadores y composiciones químicas de detección de secuencias específicas, que sean compatibles entre sí.

Este procedimiento una vez desarrollado y puesto a punto ofrece ventajas tales como, la rapidez de diagnóstico, la limitación del volumen de muestra requerido, además, de la reducción del coste y manipulación de los ensayos por su carácter simultáneo (Settypalli *et al.*, 2016; Wohlwend *et al*., 2016; Yang *et al.*, 2019; Alía *et al.*, 2020).

No obstante, la detección y cuantificación simultánea de varios bioindicadores de calidad de aguas, con diferentes regiones *target*, representa un reto debido a las dificultades asociadas a la etapa de diseño *in silico* y experimental de esta técnica (Shahraki *et al*., 2019), vinculadas al carácter simultáneo de la misma (interacción simultánea de hasta 20 cebadores y 5 sondas de hidrólisis). Por consiguiente, debe ponerse especial atención en la etapa de diseño, la cual en primer lugar requiere la puesta a punto de la detección individual de cada organismo problema. Tras obtener resultados satisfactorios de manera individual, se podrán diseñar las combinaciones simultáneas y proceder a su consiguiente optimización.

Uno de los cuellos de botella a superar durante la etapa de diseño de los *primers* y sondas empleados en reacciones RT qPCR simultáneas es el estudio de la posible formación de estructuras secundarias, que pueden inhibir las reacciones de amplificación disminuyendo el rendimiento de las mismas y aumentando las amplificaciones inespecíficas (Johnston *et al.*, 2019). En atención a lo cual, es fundamental realizar un análisis minucioso de la formación de este tipo de estructuras. El análisis de la formación de estas estructuras se realiza a través de la determinación del incremento de la energía libre de Gibbs (ΔG), siendo este la medida de la espontaneidad de la interacción entre las secuencias de los oligos y sondas de hidrólisis.

Se pueden formar tres tipos de estructuras secundarias. La primera de ellas es la llamada horquilla o *hairpin*, la cual se forma por la interacción intramolecular dentro del cebador o sonda, determinándose como valores idóneos aquellos mayores a -8 kcal/mol (Gentilini *et al.*, 2010). La segunda es el auto dímero o *self dimer*, formado por interacciones intermoleculares entre las secuencias de los *primers* o sondas con misma orientación. La tercera estructura es el dímero

cruzado o *cross-dimer*, el cual se forma por la interacción intermolecular entre los *primers* con orientación *forward, reverse* o sondas de hidrólisis. Se ha evidenciado que para que los auto dímeros y los dímeros cruzados no interfieran en las reacciones de amplificación, se pueden tolerar $\Delta G > -9$ kcal/mol (Shen *et al.*, 2010).

Respecto a las composiciones químicas de detección de secuencias, en el mercado existe una amplia variedad de las mismas. Algunas de ellas son las sondas *Eclipse*, los *primers LUX*, los cebadores *Scorpions* o los oligos *BD QZyme,* siendo las más utilizadas, las sondas de hidrólisis formato TaqMan o las balizas moleculares de hibridación o *molecular beacons*. La razón del uso generalizado de las sondas TaqMan y los *molecular beacons* está relacionada con la amplia literatura científica publicada reportando los procesos de diseño y los resultados de la amplificación de estas sondas, frente a los pocos disponibles sobre el resto de composiciones químicas de detección de secuencias existentes (Andersen *et al*., 2006). Otros factores añadidos son i) las múltiples herramientas disponibles para su diseño –no necesitan ser diseñados a demanda–; ii) los rediseños de estas sondas no suelen ser necesarios a diferencia, por ejemplo, de los ensayos basados en *primers* LUX; y, iii) aunque la inversión de su puesta a punto suele ser elevada, su implementación tiene uno de los costes más bajos entre las composiciones químicas de detección de secuencias disponibles (Gašparič *et al*., 2008).

En este estudio, los ensayos *multiplex* RT qPCR se basan en la acción conjunta de *primers* y sondas de hidrólisis formato TaqMan específicas. En la Figura III.1 se presenta el funcionamiento de un ensayo TaqMan tipo (par de oligos y sonda de hidrólisis formato TaqMan). Para ser detectada por el termociclador multicanal, este tipo de sonda de hidrólisis –de longitud comprendida entre los 20-30-mer–, debe marcarse con un fluoróforo en el extremo 5', y un apagador de fluorescencia o *quencher* en el extremo 3'. Cuando la reacción aún no se ha iniciado, y el fluoróforo y el *quencher* están aún próximos entre sí, la fluorescencia emitida por el fluoróforo se ve extinguida por su proximidad con el *quencher* (Figura III.1).

Durante el proceso de hibridación/extensión de la reacción en cadena de la polimerasa, la sonda hibrida con la secuencia objetivo, y a partir de la actividad de una exonucleasa dsADN-específica 5'→3' formato *Taq*, el fluoróforo puede ser detectado. Como resultado, el fluoróforo y el apagador de fluorescencia se separan, y la señal de fluorescencia resultante emitida en esta acción se cuantifica como proporcional a la cantidad de producto de amplificación en la muestra.

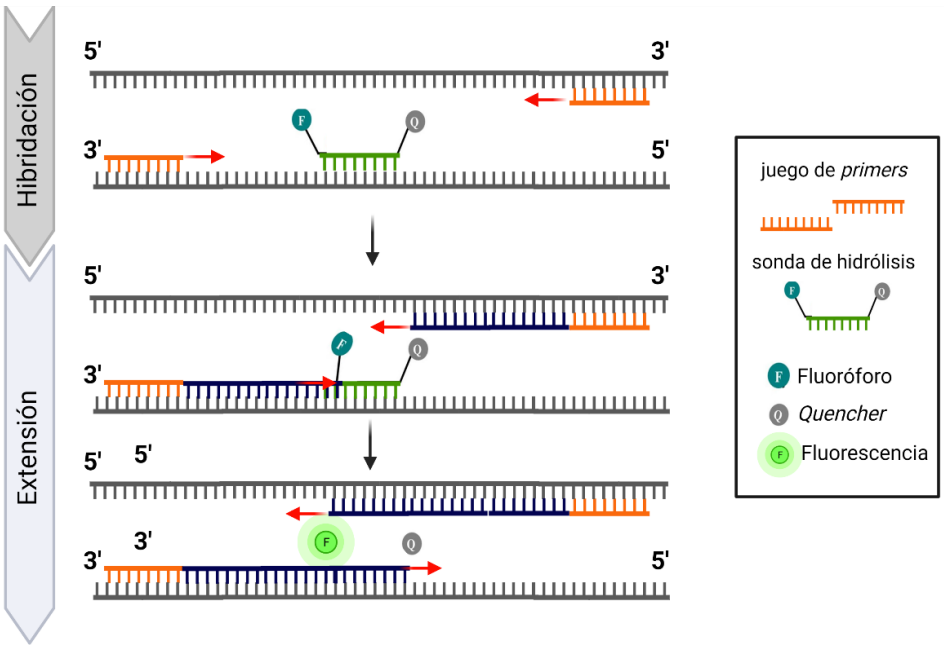


Figura III.1. Ensayo RT qPCR basado en una sonda de hidrólisis formato TaqMan.

Algunos de los fluoróforos y *quenchers* más utilizados son los fluoróforos 6-FAM™ (*6-Carboxyfluorescein*) o HEX™ (*Hexachloro-Fluorescein-CE Phosphoramidite*), en combinación con el apagador de señal IABkFQ (*3-Iowa Black® F quencher*, IDT), o el fluoróforo Cy5™ (*Cyanine*-5), combinado con el *quencher Iowa Black® RQ*. En una *multiplex* RT qPCR, la utilización de una u otra combinación de fluoróforos y *quenchers*, fundamentalmente dependerá de la longitud de onda de emisión de los fluoróforos empleados (Figura III.2), evitando que las longitudes de onda sean próximas entre sí, para prevenir el solapamiento de las señales. El diseño de las sondas de hidrólisis, en algunos casos, no solo

incluye un *quencher* terminal en la posición 3' del segmento de nucleótidos de la sonda, sino que también, se puede incluir un *quencher* interno.

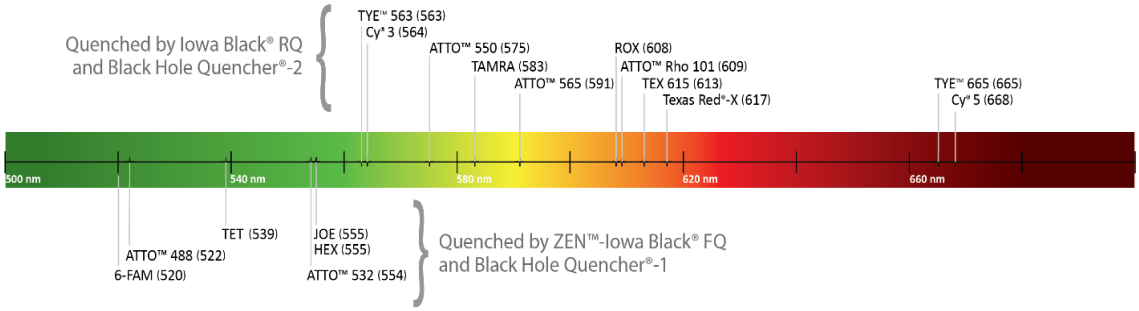


Figura III.2. Longitudes de onda de los fluoróforos de la casa comercial *Integrated DNA Technologies* (IDT, IA, EE. UU.) y los *quenchers* apropiados para cada uno de los fluoróforos.

Algunos de los *quenchers* internos más utilizados son las moléculas ZEN™ y TAO™. Este tipo de extintores de fluorescencia se ubican internamente entre la 9ª y 10ª base de la secuencia de las sondas, desde el extremo 5' donde se localiza el fluoróforo (Figura III.3). Estos *quencher* ZEN™ y TAO™ acortan así la distancia entre el fluoróforo y el *quencher* terminal, y en combinación con este último (*quencher* 3'), proporciona un mayor grado de extinción. De esta manera, se reduce el ruido de fondo, aumentando así la detección de la señal. Por ende, las sondas de hidrólisis provistas de apagadores de fluorescencia internos proporcionan lecturas más sensibles de los umbrales de ciclo o C_t (*Cycle threshold*) (Zhang & Ishii, 2018).

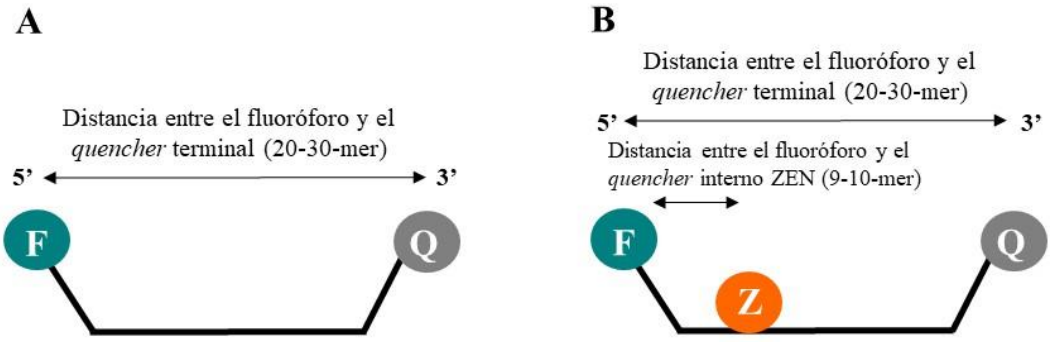


Figura III.3. Componentes de dos tipos de sondas de hidrólisis. **A**. Sonda de hidrólisis convencional donde el fluoróforo y el *quencher* están separados por 20-30 mer. **B.** Sonda de hidrólisis provista de un *quencher* interno ZEN™ situado a 9-10 mer de distancia del fluoróforo, y uno terminal en la posición 3'. F: fluoróforo; Q: *quencher* terminal 3'; Z: *quencher* interno ZEN™.

III.1.4 │Genes específicos utilizados para la detección y cuantificación de FIB

La utilización de *E. coli* como FIB a lo largo de más de una década, sumada a la investigación exhaustiva sobre esta especie, gracias a los avances en el campo de la biología molecular –varias de sus cepas, p. ej. cepa K-12, están entre los tipos bacterianos mejor estudiados, en términos de fisiología, metabolismo y regulación génica (Karp *et al.*, 2018; Korotetskiy *et al.*, 2020)–, han determinado que el género *Escherichia* es extraordinariamente diverso. Asimismo, los análisis de los alineamientos múltiples entre genomas de varias de sus especies, y correspondientes cepas, han revelado el bajo número de genes con secuencias comunes entre ellas (Walker *et al.*, 2017). Consiguientemente, la elección de regiones verdaderamente ubicuas y específicas entre las cepas de *E. coli*, debe ser estudiada cuidadosamente. Además, la estrecha relación de la especie *E. coli* con otras especies de la familia Enterobacteriaceae, plantea un desafío en cuanto a prevención de amplificaciones inespecíficas –p. ej. especies del género *Shigella*– (Maheux *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2017).

Más aún, y al hilo de lo anterior, destacar que, desde la década de los años 40, las cepas de *Shigella* se han ido clasificando en diferentes géneros acorde a su importancia clínica. Estas distinciones a nivel de género se han mantenido a lo largo del tiempo. Pese a ello, aún hoy en día, no se ha logrado la unanimidad en torno a la clasificación taxonómica de *Shigella*. De la revisión de la literatura científica, se extrae que entre la comunidad investigadora hay dos corrientes respecto a esta problemática. Autores como Lan & Reeves (2002), reportan que las muchas formas de *Shigella* solo son clones de *E. coli*. Otros no coinciden con la clasificación de Lan & Reeves (2002), y determinan que las especies de *Shigella* son especies diferenciadas de *E. coli*, ahora bien, estrechamente relacionadas entre sí, y consiguientemente presentan una alta similitud en sus genomas (Zuo *et al.*, 2013). Aun reportando las diferencias a nivel de especie entre *Escherichia* y *Shigella*, estos autores señalan la necesidad de una revisión exhaustiva de las mismas a nivel de género. Por consiguiente, hasta su determinación consensuada,

se ha adoptado la nomenclatura *Escherichia/Shigella* como válida para referirse a las especies de ambos géneros aceptados en la actualidad.

De hecho, la identificación de *E. coli* y sus variantes, a partir de los ensayos de PCR previos al trabajo de Walker y colaboradores (2017), no habían demostrado una exclusividad del 100% para cepas ambientales de *E. coli*, dado que amplificaban algunas especies estrechamente relacionadas con esta especie (p. ej. *Shigella sp.*). Muchos de estos trabajos basaban sus diseños de juegos de *primers* y sondas específicas en el marcador molecular más ampliamente utilizado en la determinación y distinción de especies bacterianas, que como ya hemos ampliamente discutido en esta tesis, se trata del gen *16S rRNA*. Como se ha evidenciado recientemente, en el caso de la determinación específica de *E. coli*, el gen *16S rRNA* presenta ciertas limitaciones para la diferenciación entre especies estrechamente relacionadas, como es el caso de las especies pertenecientes al grupo *Escherichia/Shigella*.

Por ello, en este estudio, se plantean dos enfoques desde donde abordar la identificación y cuantificación de este bioindicador recogido en la normativa RD 1341/2007. El primero de ellos, consiste en una determinación y cuantificación mediante sondas de hidrólisis tipo TaqMan del grupo-específico *Escherichia/Shigella* diseñadas en la región del gen *16S rRNA*.

El segundo, se basa en la determinación y cuantificación a través de sondas TaqMan especie-específicas del gen *ybbW* de *E. coli*. El gen *ybbW* está descrito como presunto gen codificante de la proteína de transporte de la alantoína (alantoína permeasa). La alantoína –o 5-ureidohidantoína– es utilizada por las bacterias a partir de su degradación a través de la ruta biosintética de las purinas (Cusa *et al*., 1999; Xi *et al*., 2000; Switzer *et al*., 2020), variando su metabolismo según la especie bacteriana (Navone, 2014). Específicamente, el uso de este compuesto como fuente de nitrógeno por *E. coli*, y otras especies de la familia Enterobacteriaceae, fue sugerido por primera vez, por Vogels y van der Drift (1976).

Metabólicamente, como se presenta en la Figura III.4, la alantoína es convertida en alantoato mediante la enzima alantoinasa (*allB*), luego la enzima

alantoato amidohidrolasa (*allC*) transforma este compuesto en ureidoglicolato, liberando en el proceso dos moléculas de NH_4^+ (Cusa *et al.*, 1999). A partir del ureidoglicolato la ruta metabólica se bifurca en dos vías, la ureidoglicolato deshidrogenasa (*allD*) y la ureidoglicolato liasa (*allA*). En la segunda, la enzima ureidoglicolato liasa transforma este sustrato en glioxilato y urea (Percudani *et al.*, 2013). Finalmente, el glioxilato es transformado en 3-fosfoglicerato por la acción secuencial de las enzimas glioxilato carboligasa (*gcl*), tartronato semialdehído reductasa (*glxR*) y glicerato quinasa (*glxK*) (Rintoul *et al.*, 2002). La enzima hidroxipiruvato isomerasa (*hyi*) también formaría parte de esta vía, generando hidroxipiruvato a partir de tartronato semialdehído, sin embargo, no se conoce con exactitud el destino metabólico de esta molécula (Navone, 2014).

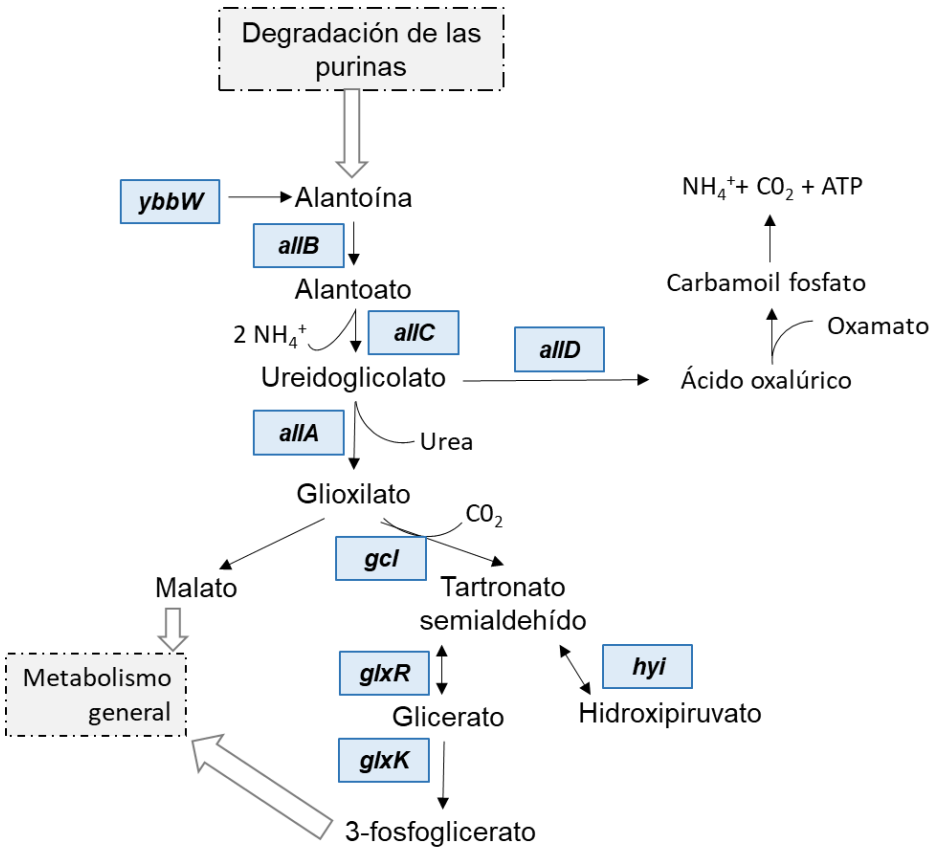


Figura III.4. Ruta metabólica de la degradación de la alantoína en *Escherichia coli*. Los genes que interviene en esta vía biosintética se representan con un rectángulo azul (adaptada de Cusa *et al.*, 1999; Navone, 2014).

Molecularmente, en *Escherichia coli* los genes que codifican para todas las enzimas involucradas en la degradación de alantoína se encuentran agrupados en tres unidades transcripcionales.

En concreto, el gen *ybbW*, de longitud 1 455 bp, se localiza dentro de una de estas tres unidades transcripcionales, donde se agrupan los genes de utilización de la alantoína (*allantoin-utilization gene cluster*), cuya conformación se presenta en la Figura III.5. Este locus genético, determinado como altamente conservado dentro de las poblaciones naturales de *E. coli* (McQuillan & Wilson 2021), se postula en la literatura científica como un marcador molecular alternativo al gen *16S rRNA*, adecuado para la valoración específica de *E. coli* en muestras medioambientales.

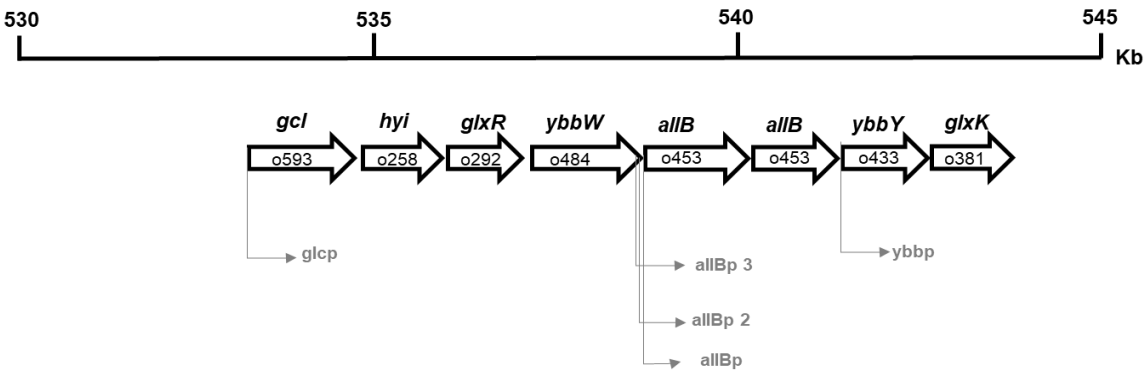


Figura III.5 Grupo de genes de utilización de la alantoína *gcl-hyi-glxR-ybbV-**ybbW**-allB-ybbY-glxK* correspondiente a la cepa K-12 de *Escherichia coli.* La línea gruesa representa el fragmento de la secuencia en el genoma. La dirección y extensión de lectura de los genes se representa por flechas abiertas y la enumeración en su interior (adaptado de la base de datos de la red reguladora de la expresión génica en la cepa K-12 de *Escherichia coli*; http://regulondb.ccg.unam.mx/; Cusa *et al.,* 1999; Shimada *et al*., 2007).

Por otro lado, en este estudio, para la detección y cuantificación del grupo *Enterococcus intestinalis*, también se plantea el diseño de reacciones RT qPCR, basadas en sondas de hidrólisis TaqMan. Por un lado, se propone un ensayo grupo-específico a partir del cual se puedan determinar y cuantificar las especies de *Enterococcus* de origen antropogénico fecal con interés clínico, y, por otro lado, dos ensayos especie-específicos para *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium.* Todo ellos diseñados dentro del segmento del gen *16S rRNA*.

Además, en este trabajo se pretende abordar una deficiencia significativa de los procedimientos de vigilancia y gestión de las zonas de baño. Como algunos autores indican, la legislación reguladora de las aguas de baño, tanto a nivel comunitario como estatal, se limita a la valoración de la calidad de las aguas sin tener en cuenta la presencia y la concentración de FIB en los sedimentos o lechos marinos (Garrido-Pérez *et al.*, 2008; Byappanahalli *et al.*, 2012).

En algunos estudios, se reporta que la tasa de supervivencia de las bacterias entéricas en los sedimentos marinos tiende a ser mayor que en la columna de agua (Stenstrom & Carlander, 2001; Wheeler *et al.*, 2003; Shibata *et al.*, 2004; Garrido-Pérez *et al.*, 2008). Varias razones apoyan estas evidencias, siendo algunas de ellas i) las mejores condiciones nutricionales del sedimento en comparación a las dadas en la columna de agua (Davies *et al.*, 1995; Villar *et al.*, 1999); ii) al estar el sedimento menos expuesto a la radiación solar, las bacterias contenidas en él se encuentran más protegidas contra la inactivación producida por la radiación UV (Sinton *et al.*, 1994; Davies-Colley *et al.*, 1999); y, iii) el lecho marino proporciona una mayor protección contra la depredación por protozoos (Davies & Bavor, 2000).

Atendiendo a lo expuesto y contempladas las ventajas brindadas por el método *multiplex* RT qPCR, en este trabajo, se ha diseñado un método de detección rápido y simultáneo de bioindicadores de contaminación fecal en aguas y sedimentos marinos de la Bahía del Confital (Gran Canaria) mediante *multiplex* RT qPCR.

Concretamente, la Bahía del Confital se encuentra contigua a la franja litoral oeste del istmo de la península de La Isleta (28°9′34.92″ N, 15°26′6.72″ W), situada al noreste de la isla de Gran Canaria (España). Ocupa una superficie de 634,2 hectáreas (Luque, 2004). Los fondos de su franja litoral, de forma general, son arenosos y la profundidad máxima es de ca. 50 m (Ojeda *et al.*, 1996). Su uso es recreativo y está declarada como la zona de aguas de baño más septentrional del municipio de Las Palmas de Gran Canaria. La calidad de sus aguas de baño se ha visto afectada por altas concentraciones del bioindicador *Enterococcus*, superando en algunas ocasiones 10 veces el estándar de calidad que otorga la categoría de

excelencia a estas aguas (<100 UFC mL^{-1}, según RD 1341/2007). Esta problemática surgió a partir de varios episodios de contaminación de origen no conocido durante el verano del 2017, y hasta la actualidad, no se ha podido restablecer los valores tolerados para la catalogación de sus aguas como excelentes (Náyade, Sistema de Información Nacional de Aguas de Baño competencia del Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social del Gobierno de España; http://nayadeciudadano.sanidad.gob.es/).

Como hipótesis de este trabajo se plantea que el diseño de reacciones simultáneas grupo y especie-específicas basadas en los genes *16S rRNA* y *ybbW*, permitirán la detección y cuantificación de los bioindicadores *Escherichia coli* y *Enterococcus intestinalis*. Esta aproximación permite el empleo de una herramienta rápida y normalizada con doble aplicabilidad en los ámbitos técnico e investigador, en materia de calidad de zonas de baño en su conjunto (agua y sedimento marino).

El objetivo principal pretende obtener un análisis completo del estado de la calidad de la Bahía del Confital (Gran Canaria, España), tanto de las aguas como de los sedimentos marinos. El objetivo específico planteado es el diseño de cinco ensayos TaqMan desde dos enfoques i) identificación y cuantificación de los grupos bacterianos a los cuales pertenecen los bioindicadores objetivo (*Escherichia/Shigella* y especies de *Enterococcus* de origen antropogénico fecal con interés clínico); y, ii) identificación y cuantificación específica de las especies *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Escherichia coli*.

III.2 │MATERIAL Y MÉTODOS

III.2.1 │Diseño de *primers* y sondas de hidrólisis

Para cuantificar las FIB, individual y simultáneamente, se diseñaron juegos de cebadores y sondas de hidrólisis que permitieron valorar la calidad de las zonas de baño, en muestras de agua de mar y sedimentos marinos de la Bahía del Confital (Gran Canaria). Atendiendo a la siguiente clasificación, los ensayos se dividieron en determinación y cuantificación de:

- Los grupos-específicos *Enterococcus* (EN) y *Escherichia*/*Shigella* (ES); y,
- De las especies: *Enterococcus faecalis* (Ef), *Enterococcus faecium* (Efium) y *Escherichia coli* (EC*ybbW*).

III.2.1.1 Diseño in silico de cebadores y sondas de hidrólisis para la valoración grupo-específica

El diseño de cebadores y sondas para *Enterococcus* grupo-específicas se realizó sobre un fragmento del gen *16S rRNA*, tal y como se describió en el Capítulo I. Los *primers* y las secuencias usadas se presentan en la Tabla I.22 (Capítulo I).

Además, para la valoración del grupo específico de *Enterococcus* de naturaleza fecal se seleccionaron 10 secuencias del gen *16S rRNA* (Tabla III.1). Estas secuencias se extrajeron de la base de datos *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) mediante la herramienta TAXONOMY. A continuación, se realizaron alineamientos múltiples con la herramienta CLUSTAL Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/), utilizando los parámetros por defecto. Tras los alineamientos múltiples, se identificaron las cajas conservadas de del segmento del *16S rRNA*, a partir de las cuales se diseñaron los cebadores y sondas correspondientes. Para este fin, se recurrió a la herramienta *PrimerQuest Tool* (Integrated DNA Technologies, IA, EE. UU.), utilizando también los parámetros por defecto.

Tabla III.1. Secuencias del gen *16S rRNA* de *Enterococcus* utilizadas en este estudio.

Especie	Huésped / Fuente	Nº de acceso NCBI
Enterococcus avium E16	H / M.C.	MK322649
Enterococcus casseliflavus HWII1-F	A / Agua	LC487888
Enterococcus dispar CNM419_12	An / Producto lácteo	KC699163
Enterococcus faecalis JCM 5803	A, An, H / Ar, SpA, Fecal	NR_040789
Enterococcus gallinarum CKY	H / Heces	AB269767
Enterococcus malodoratus ATCC43197	An, H / SpA, Fecal	NR_114453
Enterococcus massiliensis AM1	H / Heces	NR_144723
Enterococcus mediterraneensis Marseille-P4358	H / Heces	NZ_UWOP01000001[a]
Enterococcus pseudoavium EP2-4	An, H / SpA, Fecal	MN867717
Enterococcus raffinosus JCM 8733	An, H / M.C.	LC097071

H: Humano; A: Ambiental; An: Animal; M.C.: Muestra Clínica; Ar: Agua residual; SpA: Subproducto de origen animal

[a] Fragmento no anotado del gen *16S rRNA*, se toma secuencia completa del genoma.

Igualmente, para la determinación del grupo-específico *Escherichia*/*Shigella*, se seleccionaron los *primers* y las sondas sobre el fragmento del gen *16S rRNA*, tal y como se describió en la Tabla I.22 del Capitulo I. Asimismo, se llevó a cabo una segunda aproximación a partir de 11 secuencias del gen *16S rRNA*, correspondientes a 11 tipos bacterianos pertenecientes a este grupo y estrechamente relacionados entre sí (Tabla III.2). La elección de las secuencias, su alineamiento y el diseño de los *primers* y sondas de hidrólisis se realizó como se ha descrito previamente.

De la variedad de *primers* y sondas obtenidas (ca. 30 secuencias), para las determinaciones grupo-específicas, las secuencias validadas de acuerdo a los siguientes apartados (III.2.1.3. Estructuras secundarias, y, III.2.1.4. Tipo de marcaje) se indican en la Tabla III.7.

Tabla III.2. Secuencias del gen *16S rRNA* de especies del grupo *Escherichia/Shigella* utilizadas en este estudio.

Especie	Huésped / Fuente	Nº de acceso NCBI
Escherichia coli AE1-2	H / Heces	AB269763
Escherichia coli O157:H7	H/ M.C.	AY513502
Escherichia coli XJ133-127-1NF1	H / M.C.	JX975415
Escherichia coli K-12 / MG1655	-	NC_000913 [a]
Escherichia coli K-12 / W3110	-	NC_007779 [a]
Escherichia fergusonii 190311L245	A	MT225668
Escherichia marmotae HT073016	A / Agua residual	MH972185
Shigella dysenteriae FBD015	H / M.C.	EU009186
Shigella flexneri GH24	H / Heces	KC887964
Shigella sonnei CECT 4887	-	NR_104826
Shigella boydii P288	-	NR_104901

H: Humano; A: Ambiental; An: Animal; M.C.: Muestra Clínica
[a] Fragmento no anotado del gen *16S rRNA*, se toma secuencia completa del genoma.

III.2.1.2 Diseño in silico de cebadores y sondas de hidrólisis para la valoración especie-específica

Para el diseño *in silico* de los cebadores y sondas específicas de las especies *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* se utilizó el gen *16S rRNA*, y el gen codificante de la alantoína permeasa (*ybbW*) para *Escherichia coli*.

En el caso de las dos especies de *Enterococcus*, 62 secuencias del gen *16S rRNA*, se extrajeron de la base de datos NCBI (Tabla III.3). Estas se alinearon para identificar las zonas conservadas y variables. Estas últimas son las que permiten la identificación diferencial de *E. faecalis* y *E. faecium*. El diseño de los *primers* y sondas se realizó como se ha descrito previamente.

Tabla III.3. Secuencias del gen *16S rRNA* correspondientes a especies del género *Enterococcus* utilizadas en este estudio.

Especie	**Nº de acceso NCBI**
Enterococcus alcedinis L34	NR_109727
Enterococcus aquimarinus API 8407116	NR_042375
Enterococcus asini 1_11027	MN822908
Enterococcus avium E16	MK322649
Enterococcus azikeevi IB-A35	AJ309563
Enterococcus bulliens LMG 28766	NR_145937
Enterococcus caccae 2215-02	NR_043285
Enterococcus camelliae BLN48	MN880432
Enterococcus canintestini 0.3	MK611105
Enterococcus canis NBRC 100695	NR_113931
Enterococcus casseliflavus HWII1-F	LC487888
Enterococcus cecorum A60	NR_024905
Enterococcus columbae DSM 7374	NR_041708
Enterococcus crotali NF45	MT266953
Enterococcus devriesei 790	MT367750
Enterococcus diestrammenae JCM 18359	LC521987
Enterococcus dispar CNM419_12	KC699163
Enterococcus durans 6895	MT463953
Enterococcus eurekensis 29.3	MN197986
Enterococcus faecalis JCM 5803	NR_040789
Enterococcus faecium IMAU98249	MT473604
Enterococcus florum Gos25-1	LC428281
Enterococcus gallinarum CKY	AB269767
Enterococcus gilvus 3	JN989551
Enterococcus haemoperoxidus NBRC 100709	NR_113936
Enterococcus hawaiiensis AN-16	MN874277
Enterococcus hermanniensis L40	MN904849
Enterococcus hirae MLG3-29-2	MT473367
Enterococcus inusitatus E2ET28	AM050564
Enterococcus italicus IMAU98151	MT473506
Enterococcus lactis CK1025	AY683836
Enterococcus lemanii PC32	NR_114648

Tabla III.3 (continuación). Secuencias del gen *16S rRNA* correspondientes a especies del género *Enterococcus* utilizadas en este estudio

Especie	Nº de acceso NCBI
Enterococcus malodoratus ATCC 43197	NR_114453
Enterococcus massiliensis AM1	NR_144723
Enterococcus mediterraneensis Marseille-P4358	NZ_UWOP01000001[a]
Enterococcus moraviensis P37_BA2H	MK883074
Enterococcus mundtii L49	MN904853
Enterococcus olivae IGG16.11	NR_125610
Enterococcus pallens NBRC 100697	NR_113933
Enterococcus pernyi CS1	FJ555518
Enterococcus phoeniculicola 772	MN513232
Enterococcus plantarum CCM 7889	NR_118050
Enterococcus pseudoavium EP2-4	MN867717
Enterococcus quebecensis CCRI-16985	NR_117519
Enterococcus raffinosus JCM 8733	LC097071
Enterococcus ratti	AF326472
Enterococcus rivorum 756	MT367752
Enterococcus rotai CCM 4630	NR_108137
Enterococcus saccharolyticus JCM 8734	LC097072
Enterococcus saigonensis A28	MT176583
Enterococcus silesiacus R-23712	NR_042405
Enterococcus sulfureus NCIMB 13117	NR_119290
Enterococcus termitis LMG 8895	NR_042406
Enterococcus thailandicus S56	JF302672
Enterococcus timonensis Marseille-P2817T	NZ_FNVY01000004[a]
Enterococcus ureasiticus HYN0074	MF988707
Enterococcus ureilyticus CCM 4629	NR_125485
Enterococcus viikkiensis CNM328_12	KC699114.1
Enterococcus villorum JCM 11557	LC311744.1
Enterococcus wangshanyuanii MN05	NR_159231
Enterococcus xiangfangensis 11097	NR_133741
Enterococcus xinjiangensis JCM 30200	LC590881

[a] Fragmento no anotado del gen *16S rRNA*, se toma secuencia completa del genoma.

El diseño de cebadores y sondas específicas para la especie *E. coli* se llevó a cabo a partir de secuencias del gen *ybbW*. Para ello, se tomaron cuatro secuencias de genomas completos de *E. coli* (Tabla III.4), y en base a los *primers* referenciados para este gen por Walker y colaboradores (2017), se realizaron PCR *in silico*.

Los *primers* descritos en Walker y colaboradores (2017) son: 401F con orientación *forward,* 5'-TGATTGGCAAAATCTGGCCG-3', y con orientación *reverse,* el 611R, 5'-GAAATCGCCCAAATCGCCAT-3'. Estas PCR se llevaron a cabo utilizando el software *UGENE v33.0* (Okonechnikov *et al*., 2012). Las secuencias resultantes de estas amplificaciones *in silico* del gen *ybbW* se alinearon para obtener una secuencia consenso. En base a esta secuencia consenso se diseñaron los cebadores y sondas específicas para esta especie, tal y como se ha descrito anteriormente.

Tabla III.4. Secuencias completas del genoma anotadas como *Escherichia coli* utilizadas en el diseño de los cebadores y sondas especie-específicas del gen *ybbW*.

Especie	**Cepa**	**Nº de acceso NCBI**
Escherichia coli	ATCC8739	NZ_CP022959
Escherichia coli	K-12 subcepa MG1655	NC_000913
Escherichia coli	O157:H7 subcepa Sakai	NC_002695
Escherichia coli	ATCC 11775	NZ_CP033092

Igualmente, las secuencias seleccionadas, de las secuencias de *primers* y sondas obtenidas (ca. 45 secuencias) para las determinaciones especie-específicas, se muestran en la Tabla III.7.

III.2.1.3 Análisis de las estructuras secundarias de los cebadores y sondas de hidrólisis diseñados in silico

Tras, la obtención de los juegos de oligos y sondas de hidrólisis, se requirió el análisis de los parámetros intrínsecos –temperaturas de hibridación, tipo de fluoróforo, y formación de estructuras secundarias (ΔG)–, tanto para los pares de cebadores y sondas utilizados individualmente (*singleplex*), como aquellos usados simultáneamente (*multilplex*).

Los parámetros se determinaron con el software *Beacon Designer* (Premier Biosoft International, CA, EE. UU.), mientras que la idoneidad se valoró atendiendo a:

- Las temperaturas de hibridación de los oligos se establecieron entre 55-60 ºC;
- Para las sondas de hidrólisis las temperaturas de hibridación se fijaron entre 5-10 ºC por encima de las temperaturas establecidas para los oligos;
- Los fluoróforos se seleccionaron en base a sus espectros de emisión de longitud de onda (Figura III.2); y,
- Las ΔG se establecieron en > -8 kcal/mol (Gentilini *et al.*, 2010) para la no formación de estructuras tipo horquilla, y en ΔG > -9 kcal/mol (Shen *et al.*, 2010) para evitar la formación de auto dímeros y dímeros cruzados.

III.2.1.4 Marcaje de las sondas de hidrólisis

El marcaje de las sondas utilizado consistió en un fluoróforo posicionado en el extremo 5' y dos *quenchers*, localizados en la región intermedia y terminal de la sonda. En la Tabla III.5 se recogen los tipos de fluoróforos y *quenchers* utilizados para la determinación grupo y especie-específica. En la Tabla III.6 se recogen las longitudes de onda de excitación y emisión de los fluoróforos y los espectros de absorción de los *quenchers* empleados.

Finalmente, los pares de oligos y sondas de hidrólisis validados según los criterios de estructuras secundarias y marcaje con flurorróforos y apagadores de fluorescencia se muestran en la Tabla III.7. El análisis de validación de los oligos y las sondas de hidrólisis grupo y especie-específicos se encuentran en el Anexo III (Tablas A.III.1 - A.III.5).

Tabla III.5. Tipos de fluoróforos y *quenchers* utilizados en este trabajo para la determinación grupo y especie-específica.

Grupo/Especie a determinar	**Fluoróforo**	***Quencher* interno**	***Quencher* terminal**
Enterococcus	HEX™ (*Hexachloro-Fluorescein-CE Phosphoramidite*)	ZEN™	IABkFQ (3-*Iowa Black® F quencher*)
Escherichia/Shigella	6-FAM™ (6-*Carboxyfluorescein*)	ZEN™	IABkFQ (3-*Iowa Black® F quencher*)
Enterococcus faecalis	Cy5™ (*Cyanine*-5)	TAO™	IAbRQSp (3-*Iowa Black® R quencher*)
Enterococcus faecium	6-FAM™ (6-*Carboxyfluorescein*)	ZEN™	IABkFQ (3-*Iowa Black® F quencher*)
Escherichia coli	HEX™ (*Hexachloro-Fluorescein-CE Phosphoramidite*)	ZEN™	IABkFQ (3-*Iowa Black® F quencher*)

Tabla III.6. Longitudes de onda (λ) de excitación y de emisión de los fluoróforos, y espectros de absorción de los apagadores de fluorescencia utilizados en este estudio.

	Tipo de Fluoróforo	**λ de excitación** (nm)	**λ de emisión** (nm)
Fluoróforo	HEX™ (*Hexachloro-Fluorescein-CE Phosphoramidite*)	538	555
	6-FAM™ (6-*Carboxyfluorescein*)	495	520
	Cy5™ (*Cyanine*-5)	650	668
	Tipo de *quencher*	**Espectro de absorción** (nm)	
***Quenchers* interno y terminal**	ZEN™/ IABk®FQ (ZEN™/3-*Iowa Black® F quencher*)	420 - 620 (máxima absorbancia a 531 nm)	
	TAO™ /IAbRQSp (TAO™/3-*Iowa Black® R quencher*)	500 - 700 (máxima absorbancia a 656 nm)	

Tabla III.7. Juegos de oligos y sondas de hidrólisis grupo y especie-específicos validados en este estudio.

Ensayo	**Organismo objetivo**	**Oligos y sondas**	**Secuencia** (5'⟶3')	**Longitud** (mer)	**T_m[a]** (ºC)	**Longitud Amplicon (**pb)
EN	*Enterococcus*[*]	EF399F	GCTCGTGTCGTGAGATGTT	19	55,0	86
		ProbeEN	**HEX**/AACAATAAG/**ZEN**/GGTTGCGCTCGTTGC/**IABkFQ**	24	60,6	
		EF484R	CGCTAGAGTGCCCAACTAAA	20	54,7	
ES	*Escherichia/Shigella*	EC501F	TCGGAATTACTGGGCGTAAAG	21	54,8	104
		ProbeES	**6FAM**/ACGCAGGCG/**ZEN**/GTTTGTTAAGTCAGA/**IABkFQ**	23	60,0	
		EC604R	GACTCAAGCTTGCCAGTATCA	21	54,8	
Ef	*Enterococcus faecalis*	EF1203F	CTTATGACCTGGGCTACACAC	21	55,1	103
		ProbeEf	**Cy5**/ACCGCGAGG/**TAO**/TCATGCAAATCTCTT/**3IAbRQSp**	24	60,9	
		EF1305R	CTGCAATCCGAACTGAGAGAA	21	54,7	
Efium	*Enterococcus faecium*	EFium96F	TGGCGAACGGGTGAGTAA	18	56,5	140
		ProbeEFium	**6FAM**/CAAAACCGC/**ZEN**/ATGGTTTTGATTTGAAAGGCG/**3IABkFQ**	30	61,3	
		EFium225R	TCCATCCATCAGCGACAC	18	54,7	
EC*ybbW*	*Escherichia coli*	*ybbW*F	GCAAAATCTGGCCGGGAT	18	56,0	203
		Probe*ybbW*	**HEX**/CACTGCCAT/**ZEN**/TCTTAACCCGTGCATC/**3IABkFQ**	25	60,3	
		*ybbW*R	AATCGCCCAAATCGCCA	17	55,2	

* Especies de *Enterococcus* de origen fecal.

a T_m: *Melting Temperature* a 50 mM de NaCl.

III.2.1.5 Aproximación in silico a la especificidad de los taxones atendiendo a la filogenia

Con el fin de validar la especificad de los taxones de acuerdo a la filogenia, se utilizó la herramienta *TestProbe* alojada en la base de datos *SILVA 138 SSU Ref NR High Quality Ribosomal RNA Databases* de la *German Networkfor Bioinformatics Infrasestructure* (deNBI; https://www.arb-silva.de/search/testprobe/) (Quast *et al.*, 2013). La herramienta *TestProbe* contiene secuencias exclusivamente del gen *16S rRNA* y evalúa solo la especificidad de la sonda.

Para *Enterococcus*, las tres sondas diseñadas, tanto para el grupo-específico como para las especies de *E. faecalis* y *E. faecium* (Tabla III.7), fueron alineadas individualmente contra todas las secuencias depositadas en esta base de datos (381 535 secuencias). Como resultado se obtuvo una clasificación filogenética de acuerdo al porcentaje de cobertura en cada nivel taxonómico.

Para el grupo específico de *Escherichia/Shigella*, la sonda del gen *16S rRNA* (Tabla III.7), fue también alineada contra las mismas secuencias de esta herramienta. Por el contrario, dado que la base de datos *SILVA* solo recoge secuencias del gen *16S rRNA*, los *primers* y sonda del gen *ybbW* se alinearon contra las secuencias depositadas en la herramienta *In Silico PCR Amplification* (http://insilico.ehu.es/PCR/; San Millán *et al.*, 2013) y/o con el software bioinformático *UGENE v33.0*. Esta aproximación mediante PCR *in silico* se desarrolló también con los cebadores y sondas diseñados para *Enterococcus* (Tabla III.7). En ambos casos los resultados se validaron con la presencia de amplicones.

III.2.2 │Valoración de bioindicadores en aguas y sedimentos marinos de la Bahía del Confital

A continuación, se detallan los procesos de muestreo, preparación de las muestras, aislamiento del ADN y desarrollos de los procedimientos de amplificación utilizados para la detección y cuantificación de las FIB en la Bahía del Confital.

III.2.2.1 Muestreo

El muestreo se llevó a cabo en la Bahía del Confital situada al noreste de la isla de Gran Canaria (España). Se seleccionaron tres puntos de muestreo a lo largo de la zona de baño (Figura III.6). El primero de los puntos, o estación de muestreo (E1), se localizó en la entrada de la playa (zona sur de la bahía); una segunda estación de muestreo (E2) se situó en el centro de la bahía; y un tercer punto o estación (E3), se ubicó en la parte norte de la bahía (Figura III.6).



Figura III.6. Localización de las estaciones muestreadas en la Bahía del Confital (Gran Canaria). **A.** Isla de Gran Canaria; **B**. Península de La Isleta; **C.** Bahía del Confital. Estación de muestreo 1 (1); Estación de muestreo 2 (2); y, Estación de muestreo 3 (3) (imágenes de satélite obtenidas de Google Earth, CA, EE. UU.).

Se muestrearon dos tipos de matrices: agua de mar y sedimentos marinos. Por un lado, se recogieron volúmenes de 2 L de agua de mar siguiendo la metodología de toma de muestras descrita en el Anexo V del Real Decreto 1341/2007, sobre la gestión de la calidad de las aguas de baño. Esta metodología estandariza el protocolo de toma de muestras, el cual consiste en recoger un volumen mínimo de 250 mL de agua de mar, por muestra, a 30 cm por debajo de la superficie y en aguas cuya profundidad no sea inferior a un metro. Las muestras se almacenaron en botellas de polietileno de 2 L de capacidad pre-esterilizadas mediante autoclave durante 20 min a 121 ºC.

Por otro lado, las muestras del sustrato marino se recolectaron de los sedimentos situados bajo de la columna de agua de cada uno de los puntos de muestreo señalados en la Figura III.6C. De cada uno de los tres puntos muestreados se recogieron 600 g de sedimento marino separados en tres botes de polietileno pre-esterilizados por radiación UV.

Se realizaron dos muestreos. El primero de ellos en invierno y el segundo en primavera. Todas las muestras, se transportaron refrigeradas 4 ºC y en oscuridad y protegidas de la exposición a la luz. Las muestras se procesaron en un intervalo de tiempo no superior a 24 horas.

III.2.2.2 Preparación de las muestras

Previo al aislamiento del ADN de cada una de las matrices (agua de mar y sedimento marino) se precisó el concentrado de las mismas.

a. Agua de mar

Específicamente, 500 mL de agua de mar, de cada uno de los puntos y periodos muestreados, se filtraron separadamente a través de filtros de mix de ésteres de celulosa de 47 mm Ø y con tamaño de poro de 0,45 µm (HAWP04700, Millipore, Massachusetts, EE. UU.). La filtración se llevó a cabo en una rampa de filtrado de tres posiciones (Millipore^{TM}). A continuación, los filtros se homogeneizaron en nitrógeno líquido utilizando morteros de porcelana, y se guardaron separadamente en microtubos de capacidad de 2 mL. Seguidamente, 500 µL de agua doblemente destilada (H_2O_{dd}) y libre de ARNasas, se añadieron a cada uno de los microtubos y se agitaron mediante vórtex. Tras ello, las muestras se centrifugaron a 3 000 rpm durante 5 min en una centrífuga *VWR Micro Star 17R* (VWR International Eurolab, Barcelona, España). El sobrenadante de cada una de las muestras se dispuso en un nuevo microtubo de 1,5 mL de capacidad, centrifugándose de nuevo a 22 000 x *g* durante 10 min. A continuación, se descartó el sobrenadante y los

precipitados o *pellets* resultantes de cada una de las muestras se almacenaron a -20 ºC hasta su utilización.

b. Sedimento marino

La preparación de las muestras de sedimento marino consistió en el pesaje de 200 g de cada una de las ellas. Estas muestras se dispusieron individualmente en matraces Erlenmeyer con H_2O_{dd}, en una ratio 1:1 (1g de sedimento marino:1mL de H_2O_{dd}), y se agitaron a 300 rpm durante 30 min. Tras la agitación, los sobrenadantes fueron dispuestos en tubos de 50 mL de capacidad, obteniéndose 4 tubos de 50 mL por muestra. A continuación, se centrifugaron a 3 000 rpm durante 5 min en una centrífuga *Beckman Avanti^{TM} J-25* (Beckman Coulter® Life Sciences, California, EE. UU.). El sobrenadante de cada uno de los tubos se traspasó a un nuevo tubo de 50 mL de capacidad, y se centrifugaron de nuevo a 22 000 x *g* durante 10 min. A continuación, se descartó el sobrenadante y los *pellets* de cada uno de los puntos de muestreo se reunieron, de acuerdo al periodo de muestreo, en un solo microtubo de 2 mL de capacidad. Los precipitados resultantes se mantuvieron a -20 ºC hasta su posterior uso.

III.2.2.3 Aislamiento del ADN ambiental

Para el aislamiento del ADN, se utilizó el procedimiento basado en la acción del detergente de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), modificado por García-Jiménez y colaboradores (2009), y descrito previamente por Murray & Thompson (1980). El ADN se aisló a partir de los precipitados obtenidos según se ha descrito anteriormente. El procedimiento de extracción de ADN se llevó a cabo acorde a lo detallado en el Capítulo I (apartado I.2.2.2). El mismo se inició con la incubación de los *pellets* en 800 µL de solución de extracción CTAB, a 65 ºC durante 1 hora, agitando las muestras mediante vórtex cada 10 min, y, finalizando este con la resuspensión, en 20 µL H_2O_{dd}, de los precipitados de ADN.

La valoración de la calidad del ADN se determinó mediante la evaluación de su integridad en gel de agarosa tal y como se detalló en el Capítulo I. La

cuantificación y la pureza (ratio A260/A280) del ADN se determinó por espectrofotometría con *NanoDrop* (ThermoFisher Scientific, MA, EE. UU.). El ADN se almacenó a 4 ºC, hasta su posterior uso como cadena molde o *template*, en la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.

III.2.3 │Valoración de bioindicadores de contaminación fecal en aguas y sedimentos marinos. Diseño experimental

La reacción *singleplex* se estableció para optimizar tanto la detección como la cuantificación absoluta de los grupos y especies bacterianas objetivo. Los pares de oligos y sondas de hidrólisis validados de forma *in silico* (Tabla III.7), y empleados en este estudio, fueron suministrados por *Integrated DNA Technologies* (IDT, IA, EE. UU.).

La puesta a punto de estas reacciones permitió establecer las concentraciones finales de los juegos de *primers* y sondas, así como los parámetros de amplificación. De las tres concentraciones probadas para los oligos (200 nM, 400 nM y 600 nM) y de las correspondientes a las sondas (150 nM, 200nM y 250 nM), las mejores amplificaciones se obtuvieron con 400 nM y 200nM, respectivamente, y por lo tanto, las mismas se establecieron para este diseño experimental. La mezcla de reacción de amplificación se muestra en la Tabla III.8.

Tabla III.8. Reactivos empleados en las reacciones *singleplex* RT qPCR diseñadas en este estudio.

Componentes (concentración sotck)	**Volumen para una muestra** (µL)
PrimeTime Gene Expression Master Mix (2X)	5
Cebador *Forward* (10 µM)	0,4
Cebador *Reverse* (10 µM)	0,4
Sonda de hidrólisis (10 µM)	0,2
ADN *template*	2
H_2O_{dd} libre de ARNasas	2
Volumen final	10 µL

Las reacciones de RT qPCR se llevaron a cabo en un termociclador *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* (BioRad, CA, EE. UU.). Las temperaturas de *annealing* o hibridación (T_a), se diseñaron a partir de un rango de temperaturas, establecido entre 5 ºC por arriba y 5 ºC por abajo del valor empírico del cebador en cuestión. Para este diseño experimental se fijó una T_a de 55 ºC para cada uno de los juegos de cebadores, con el fin de facilitar la amplificación de varios genes simultáneamente (Tabla III.9).

Tabla III.9. Condiciones experimentales de las amplificaciones llevadas a cabo en este trabajo.

Etapa	**Nº ciclos**	**Temperatura**	**Duración**
Activación de la polimerasa	1	95 ºC	3 min
Amplificación:			
Desnaturalización	45	95 ºC	15 s
Hibridación/Extensión		55 ºC	60 s

Las reacciones *multiplex* RT qPCR se realizaron utilizando las combinaciones de *primers* y sondas descritos en la Tabla III.10. Los volúmenes de mezcla de reacción fueron los mismos que los detallados en la Tabla III.8, con la excepción del H_2O_{dd} libre de ARNasas, que se modificó por la adición de los respectivos volúmenes de cebadores y sondas.

Tabla III.10. Ensayos *multiplex* RT qPCR llevados a cabo en este estudio.

Reacción *multiplex*	**Ensayo grupo o especie específico** (fluoróforo)	**Grupo o especie biondicador objetivo** (gen)
M1	EN (**HEX**) y ES (**6FAM**)	*Enterococcus* (*16s rRNA*) y *Escherichia/Shigella* (*16s rRNA*)
M2	Ef(**Cy5**), Efium(**6FAM**) y EC*ybbW* (**HEX**)	*Enterococcus faecalis* (*16s rRNA*), *Enterococcus faecium* (*16s rRNA*) y *Escherichia coli* (*ybbW*)
M3	Ef(**Cy5**) y Efium(**6FAM**)	*Enterococcus faecalis* (*16s rRNA*) y *Enterococcus faecium* (*16s rRNA*)
M4	ES (**6FAM**) y EC*ybbW* (**HEX**)	*Escherichia/Shigella* (*16s rRNA*) y *Escherichia coli* (*ybbW*)

Tanto los ensayos *singleplex* como los *multiplex* se realizaron por triplicado y fueron llevados a cabo considerando:

- Control negativo: el ADN *template* se sustituye por H_2O_{dd} libre de ARNasas.
- Control positivo: el ADN *template* procede de las cepas puras de referencia (Tabla III.11).

Tabla III.11. Controles positivos incluidos en los ensayos *singleplex* y *multiplex* RT qPCR realizados en este estudio

Ensayo grupo o especie específico	Grupos o especies objetivo	Control positivo
EN	*Enterococcus*	WDCM 00009
ES	*Escherichia/ Shigella*	WDCM 00012 WDCM 00127
Ef	*Enterococcus faecalis*	WDCM 00009
Efium	*Enterococcus faecium*	WDCM 00010
EC*ybbW*	*Escherichia coli*	WDCM 00012

WDCM: Código de la *World Data Centre for Microorganisms*. WDCM 00009: *Enterococcus faecalis;* WDCM 00012: *Escherichia coli;* WDCM 00127*: Shigella sonnei*; WDCM 00010: *Enterococcus faecium.*

III.2.4 │Cuantificación de los bioindicadores de contaminación fecal

La cuantificación de los bioindicador en las muestras, expresado como número de copias del gen por unidad de volumen, requirió de i) el establecimiento de diluciones (de orden 10) del ADN de las correspondientes cepas puras; ii) el cálculo teórico del número de copias de los genes respectivos; iii) la correlación de los C_t con el número de copias de esos genes; y, iv) la cuantificación absoluta de los genes.

i) Establecimiento de diluciones (de orden 10) del ADN de las cepas puras

Las cepas utilizadas fueron certificadas por la Colección Española de Cultivo Tipo de la Universidad de Valencia (CECT-UV). La extracción de ADN se realizó a partir de 200 µl de cada una de las presentaciones de cepa pura, indicadas en la

Tabla III.12, y siguiendo el protocolo mencionado en el apartado III.2.2.3. Las diluciones seriadas se realizaron a partir de la concentración del ADN determinada mediante espectrofotometría. Las diluciones fueron $1/10^1$; $1/10^2$; $1/10^3$; $1/10^4$; $1/10^5$; $1/10^6$; $1/10^7$; $1/10^8$; $1/10^9$; y $1/10^{10}$.

Tabla III.12. Cepas bacterianas puras con cuantificación certificada por CECT-UV, utilizadas en este estudio.

Organismo	**WDCM**	**Normativa de referencia**	**Cuantificación*** (UFC mL^{-1})	**Nº de UFC referencia para la extracción de ADN**
Enterococcus faecalis	WDCM 00009	UNE-EN ISO 7899-2	$1{,}6 \times 10^{10}$	$3{,}2 \times 10^9$
Enterococcus faecium	WDCM 00010	UNE-EN ISO 7899-2	$1{,}3 \times 10^{10}$	$2{,}6 \times 10^9$
Escherichia coli	WDCM 00012	UNE-EN ISO 9308-1	$3{,}7 \times 10^{10}$	$7{,}4 \times 10^9$
Shigella sonnei	WDCM 00127	-	$1{,}1 \times 10^{10}$	$2{,}2 \times 10^9$

WDCM: Código de la *World Data Centre for Microorganisms*
UNE-EN ISO 7899-2:2001: Calidad del agua. Detección y recuento de *Enterococos intestinales*. Parte 2: Método de filtración de membrana.
UNE-EN ISO 9308-1:2014/A1:2017: Calidad del agua. Recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes. Parte 1: Método de filtración por membrana para aguas con bajo contenido de microbiota.
*Concentración cuantificada y certificada por la Colección Española de Cultivo Tipo de la Universidad de Valencia (CECT-UV)

ii) Cálculo teórico del número de copias de los genes

La cuantificación del número de copias de los genes *16S rRNA* y *ybbW*, se realizó atendiendo a la expresión descrita por Whelan y colaboradores (2003) (Ec.1).

$$nº\ copias\ gen = \frac{6{,}022x10^{23}\ x\ cantidad\ de\ ADN\ (g)}{longitud\ del\ ADN\ (pb) x\ 660\ (g\ mol^{-1} pb^{-1})} \qquad \text{(Ec.1)}$$

donde:

$6{,}022 \times 10^{23}$= constante de Avogadro;

660 g $mol^{-1}pb^{-1}$= masa promedio de un par de bases;

Cantidad de ADN (g)= se determinó a partir de la concentración valorada espectrofotométricamente como previamente se ha indicado;

Longitud del ADN (pb)= tamaño del amplicon estimado durante el diseño

Este número de copias debe relacionarse, a su vez, con el número de operones en los que se encuentra cada uno de los genes en las especies estudiadas. Para el *16S rRNA*, el número medio de operones existente en cada una de las especies objetivo se extrajo de la base de datos *Ribosomal RNA Operon Copy Number* (RRNDB; https://rrndb.umms.med.umich.edu/), donde se encuentra depositada la información relacionada con los operones rRNA de procariotas (Tabla III.13). Por el contrario, el gen *ybbW* se enmarca dentro de un único operón (Santos-Zavaleta *et al*., 2019). Con esta información el nº de copias resultantes de la Ec. 1 se recalcula a nº de copias por operón.

Tabla III.13. Número medio de operones *rRNA* de cada especie bacteriana utilizada en este trabajo.

Especies objetivo	**Nº operones rRNA** *
Escherichia coli	7
Enterococcus faecalis	4
Enterococcus faecium	6

***** Nº medio de operones rrn obtenido de la herramienta *Ribosomal RNA Operon Copy Number* (RRNDB; https://rrndb.umms.med.umich.edu/)

iii) Correlación de los C_t con el número de copias de los genes

La determinación de los C_t, de cada una de las muestras diluidas y sin diluir, se realizó mediante amplificaciones de cada uno de los genes con las cepas correspondientes, según lo descrito. Estos valores de C_t se extrajeron de las curvas

RFU (*Relative Fluorescence Units*) *vs.* nº de ciclos resultantes de esas amplificaciones. Sobre estas curvas también se definió el límite de detección (LDD) fijándose a la menor dilución (nº copias del gen) donde se obtiene un valor C_t.

La relación de estos C_t frente al logaritmo del número de copias permitió el cálculo de las concentraciones del nº de copias en las muestras problema, y de la eficiencia de la reacción. La eficiencia de las amplificaciones, se calculó en base a las pendientes de las rectas de regresión haciendo uso de la expresión descrita por Rasmussen (2001):

$$Eficiencia = 10^{-1/pendiente}$$

iv) Cuantificación absoluta de los genes

La cuantificación absoluta de los genes en las muestras problema se llevó a cabo a partir de las ecuaciones de las rectas de regresión obtenidas, es decir:

$$C_t = m(log\ del\ nº\ de\ copias) + b$$

de donde:

$$nº\ de\ copias = 10^{(\frac{Ct-b}{m})}$$

El número de copias se expresó como nº de copias 100 mL^{-1} o nº de copias 100 g^{-1}, atendiendo a si la matriz era agua o sedimento, respectivamente.

III.2.5 │Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó comparando copias de genes, expresadas como cantidad de copias del gen por volumen o peso de la matriz muestreada, y los tiempos estudiados (invierno y primavera) mediante el modelo de ANOVA unidireccional seguido del test *post hoc* de Tukey (HSD). Ambos modelos se

utilizaron para detectar diferencias significativas con un intervalo de confianza del 95% ($p \leq 0,05$). Para realizar este análisis estadístico se recurrió al software *IBM® SPSS® Statistics v27.0* (IBM, NY, EE. UU.).

III.3 │ RESULTADOS

III.3.1 │ Aproximación *in silico* a la especificidad de los taxones atendiendo a la filogenia

La especificad de los taxones de acuerdo a la filogenia, analizada mediante la herramienta *TestProbe* de la base de datos *SILVA High Quality Ribosomal RNA Databases*, presentó los niveles taxonómicos para *Enterococcus* recogidos en la Tabla III.14. De las 381 535 secuencias depositadas para el dominio Bacteria, y con un porcentaje de coincidencia del 100% con la secuencia de la sonda, el 87% (1 350 secuencias) de los taxones se clasificaron dentro del género *Enterococcus* y el 85,1% (1 362 secuencias) como Enterococcaceae.

Significativo es el porcentaje de cobertura asignado a la clase Clostridia 4,4% (2 225 secuencias), así como a las familias Streptococcaceae y Lactobacillaceae, con 9,7% (520 secuencias) y 11,8% (561 secuencias), respectivamente.

En relación a la especificidad de las sondas de *E. faecalis* y *E. faecium*, los resultados muestran que el porcentaje de cobertura es específico a la especie objetivo. En el caso de *E. faecalis*, de 292 secuencias anotadas como *Enterococcus*, 203 se identificaron como *E. faecalis*. Similarmente, de 179 secuencias que coinciden con la sonda específica de *E. faecium*, el análisis reveló que 129 corresponden con esta especie (*E. faecium*).

Cabe destacar que, de las 302 secuencias inicialmente anotadas para este análisis, 203 son específicas de *E. faecalis* (Tabla III.14). Y no se muestra ningún tipo de coincidencia con las familias anteriormente mencionadas (Streptococcaceae y Lactobacillaceae). En el caso de *E. faecium* 129 de 180 secuencias iniciales son coincidentes con el taxón objetivo e igualmente no muestran similitud con Streptococcaceae y Lactobacillaceae (Tabla III.14).

Tabla III.14. Resultados de la aproximación *in silico* a la especificidad de los taxones atendiendo a la filogenia de las sondas de hidrólisis grupo-específica para *Enterococcus*, y especie-específicas para *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* del gen *16S rRNA* diseñadas en este trabajo.

	Porcentaje de cobertura del taxón objetivo % (nº de secuencias coincidentes / nº total de secuencias dentro del taxón)*		
Sonda de hidrólisis **Taxón *target***	**Grupo-específica** (*Enterococcus*)	**Especie-específica** (*Enterococcus faecalis*)	**Especie-específica** (*Enterococcus faecium*)
Dominio Bacteria	1,3 (4951/381535)	0,1 (302/381535)	0,0 (180/381535)
Proteobacteria	0,0 (22/109146)	0,0 (1/109146)	NC
Firmicutes	**4,8 (4875/100538)**	**0,3 (301/100538)**	**0,2 (180/100538)**
Syntrophomonadia	1,6 (5/309)	NC	NC
Dethiobacteria	2,9 (4/137)	NC	NC
Clostridia	4,4 (2225/50639)	0,0 (2/50639)	NC
Bacilli	**6,2 (2633/42707)**	**0,7 (299/42707)**	**0,7 (180/42707)**
Acholeplasmatales	9,2 (69/752)	NC	NC
Erysipelotrichales	1,3 (30/2343)	NC	NC
Lactobacillales	**19,0 (2507/13176)**	**19,0 (295/13176)**	**1,4 (180/13176)**
Aerococcaceae	4,2 (11/264)	NC	NC
Streptococcaceae	9,7 (520/5371)	0,0 (1/5371)	0,0 (1/5371)
Lactobacillaceae	11,8 (561/4739)	0,0 (2/4739)	NC
Vagococcaceae	78,3 (36/46)	NC	NC
Enterococcaceae	**85,1 (1362/1600)**	**18,4 (292/1600)**	**11,3 (179/1600)**
Melissococcus	100,0 (9/9)	NC	NC
Tetragenococcus	5,1 (2/39)	NC	NC
Enterococcus	**87,0 (1350/1551)**	**19,0 (292/1551)**	**11,7 (179/1551)**
Enterococcus faecalis	-	**80,2 (203/253)**	0,8 (3/253)
Enterococcus faecium	-	0,4 (1/261)	**49,4 (129/261)**
Enterococcus sp.	-	16,0 (28/175)	13,1 (23/175)
Enterococcus sp. no cultivada	-	23,1 (52/225)	7,6 (17/225)

En negrita se destacan los niveles taxonómicos correspondientes al género *Enterococcus* y a las dos especies de interés; NC: no se han encontrado coincidencias.

* Porcentaje de cobertura de la sonda en ausencia de discordancia (*perfect match*) con las secuencias depositadas en la herramienta *TestProbe* alojada en el la base de datos *SILVA 138 SSU Ref NR* (https://www.arb-silva.de/search/testprobe/). Ensayo *in silico* realizado en diciembre del 2020.

Usando la aproximación PCR *in silico*, con las secuencias de *Enterococcus* depositadas en las bases de datos, y utilizando los *primers* y sondas diseñados, los resultados demuestran nuevamente la especificidad para las reacciones especie-específicas de *E. faecalis* y *E. faecium* (Tabla III.15). Respecto al grupo específico correspondiente a este género, los *primers* y la sonda empleados amplifican especies mayoritariamente relacionadas con un origen antropogénico fecal. En particular, de 10 especies con este origen, 7 han sido amplificadas (Tabla III.15).

Tabla III.15. Resultados de la PCR *in silico* realizada con *UGENE v33.0* e *In Silico PCR Amplification* para las reacciones grupo-específica de *Enterococcus*, y especie-específicas de *E. faecalis* y *E. faecium*, del gen *16S rRNA*, diseñadas en este trabajo.

Especie	Huésped*	Fuente*	Ensayo grupo o especie específico		
			Enterococcus	*E. faecalis*	*E. faecium*
Enterococcus alcedinis	An (ave)	*Alcedo atthis*	-	-	-
Enterococcus aquimarinus	A	Agua de mar	-	-	-
Enterococcus asini	An		-	-	-
Enterococcus avium	H	MC	+	-	-
Enterococcus azikeevi	-		-	-	-
Enterococcus bulliens	An (mamífero)	SpA lácteo de *Camelus* spp	-	-	-
Enterococcus caccae	H	Fecal	-	-	-
Enterococcus camelliae	An	SpA lácteo	-	-	-
Enterococcus canintestini	A (vegetal)	Ensilado	-	-	-
Enterococcus canis	An	-	+	-	-
Enterococcus casseliflavus	A y An	Agua y Fecal	+	-	-
Enterococcus cecorum	An (aves)	Fecal	-	-	-
Enterococcus columbae	An (ave)	Fecal origen *Columba* spp	-	-	-
Enterococcus crotali	An (réptiles)	Fecal	-	-	-
Enterococcus devriesei	An	-	+	-	-
Enterococcus diestrammenae	An (insecto)	*Diestrammena coreana*	-	-	-
Enterococcus dispar	An	SpA lácteo *de Ovis* spp	+	-	-
Enterococcus durans	An y H	Fecal	-	-	-
Enterococcus eurekensis	An (mamífero)	Fecal de *Sus scrofa* spp	-	-	-
Enterococcus faecalis	A, An y H	Agua residual, SpA, y Fecal	+	+	-
Enterococcus faecium	A, An y H	Agua residual, SpA, y Fecal	-	-	+
Enterococcus florum	A (vegetal)	*Gossypium* spp	+	-	-
Enterococcus gallinarum	An y H	Fecal	+	-	-
Enterococcus gilvus	H	MC	+	-	-

H: Humano; A: Ambiental; An: Animal; MC: Muestra clínica; SpA: Subproducto Animal.
*Información recopilada del Catálogo Global de Microorganismos; http://gcm.wfcc.info/

Tabla III.15 (continuación). Resultados de la PCR *in silico* realizada con *UGENE v33.0* e *In Silico PCR Amplification* para las reacciones grupo-específica de *Enterococcus*, y especie-específicas de *E. faecalis* y *E. faecium* del gen *16S rRNA* diseñadas en este trabajo.

Especie	Huésped*	Fuente*	Ensayo grupo o especie específico		
			Enterococcus	*E. faecalis*	*E. faecium*
Enterococcus haemoperoxidus	A	Agua	-	-	-
Enterococcus hawaiiensis	A y An	Agua y Fecal	+	-	-
Enterococcus hermanniensis	A	MC	-	-	-
Enterococcus hirae	A, An y Hu	Agua, SpA y Fecal	-	-	-
Enterococcus lemanii	An (mamífero)	Fecal de *Sus scrofa* spp	+	-	-
Enterococcus inusitatus	A	Agua residual	+	-	-
Enterococcus italicus	An y H	SpA lácteo y MC	+	-	-
Enterococcus lactis	An	SpA lácteo	-	-	-
Enterococcus malodoratus	An y H	SpA lácteo y Fecal	+	-	-
Enterococcus massiliensis	H	Fecal	+	-	-
Enterococcus mediterraneensis	H	Fecal	+	-	-
Enterococcus moraviensis	A	Agua	-	-	-
Enterococcus mundtii	A, An y H	Vegetación y suelos, Fecal y MC	-	-	-
Enterococcus olivae	A (vegetación)	*Olea* spp	-	-	-
Enterococcus pallens	H	MC	+	-	-
Enterococcus pernyi	An (insecto)	*Antheraea* spp	-	-	-
Enterococcus phoeniculicola	An	MC	+	-	-
Enterococcus plantarum	A (vegetación)	-	-	-	-
Enterococcus pseudoavium	An y H	SpA lácteo y Fecal	+	-	-
Enterococcus quebecensis	A	Agua de pozo	-	-	-
Enterococcus raffinosus	An y H	MC	+	-	-
Enterococcus ratti	An (mamífero)	Fecal de *Rattus* spp	-	-	-
Enterococcus rivorum	A	Agua	-	-	-
Enterococcus rotai	A	Vegetación y Agua	-	-	-
Enterococcus saccharolyticus	A	Vegetación y suelo	-	-	-
Enterococcus saigonensis	An	MC y SpA	+	-	-
Enterococcus silesiacus	A	Aguas superficiales y de consumo	-	-	-
Enterococcus sulfureus	A (vegetación)	-	+	-	-
Enterococcus termitis	An (insecto)	*Isoptera* spp	-	-	-
Enterococcus thailandicus	A (vegetación) y An	SpA cárnico de *Sus scrofa* spp	-	-	-
Enterococcus timonensis	-		-	-	-
Enterococcus ureasiticus	A	Agua de pozo	-	-	-
Enterococcus ureilyticus	A	Vegetación y Agua superficial y de consumo	-	-	-
Enterococcus viikkiensis	An (ave)	SpA de *Gallus* spp	+	-	-
Enterococcus villorum	An (mamífero)	Fecal de *Sus scrofa* spp	-	-	-
Enterococcus wangshanyuanii	An (mamífero)	Fecal de *Bos* spp	-	-	-
Enterococcus xiangfangensis	A	Subproducto Vegetal	-	-	-
Enterococcus xinjiangensis	An	SpA lácteo	-	-	-

H: Humano; A: Ambiental; An: Animal; MC: Muestra clínica; SpA: Subproducto Animal.
*Información recopilada del Catálogo Global de Microorganismos; http://gcm.wfcc.info/

Para *Escherichia/Shigella*, la valoración de la especificidad de la sonda grupo-específica revela, que de las 3 638 secuencias coincidentes con el dominio Bacteria, 3 602 son asignadas como Enterobacterales (15,6%), y específicamente 2 491 secuencias corresponden a la familia Enterobacteriaceae (Tabla III.16).

Tabla III.16. Ensayo PCR *in silico* con la sonda de hidrólisis grupo-específica para *Escherichia/Shigella* del gen *16S rRNA* diseñada en este trabajo.

Taxón *target*	**Porcentaje de la cobertura del taxón objetivo** % (nº de secuencias coincidentes / nº total de secuencias dentro del taxón)*
Dominio Bacteria	1,0 (3638/381535)
Firmicutes	0,0 (5/100538)
Proteobacteria	**3,3 (3632/109146)**
Gammaproteobacteria	**4,8 (3631/75026)**
Enterobacterales	**15,6 (3602/23028)**
Erwiniaceae	2,4 (29/1233)
Hafniaceae	8,5 (12/142)
Pectobacteriaceae	10,2 (44/433)
Budviciaceae	27,3 (6/22)
Yersiniaceae	81,3 (985/1212)
Enterobacteriaceae	**31,3 (2491/7969)**
Shimwellia	8,0 (2/25)
Kluyvera	11,4 (10/88)
Raoultella	18,8 (18/96)
Buttiauxella	19,3 (11/57)
Cronobacter	30,7 (47/153)
Pseudocitrobacter	70,0 (14/20)
Plesiomonas	85,0 (91/107)
Aquamonas	100,0 (1/1)
Escherichia / Shigella	**80,8 (2268/2807)**
Escherichia coli	**98,2 (1019/1038)**
Escherichia fergusonii	**95,7 (22/23)**
Escherichia albertii	**27,3 (6/22)**
Shigella flexneri	**100,0 (53/53)**
Shigella boydii	**100,0 (24/24)**
Shigella dysenteriae	**87,2 (34/39)**
Shigella sonnei	**91,4 (32/35)**
Escherichia sp.	94,4 (34/36)
Escherichia sp. no cultivada	57,1 (12/21)
Shigella sp.	90,9 (10/11)
Shigella sp. no cultivada	70,0 (14/20)
Escherchia/Shigella[a]	68,8 (242/352)
Escherchia/Shigella[b]	69,9 (737/1054)

En negrita se destacan los taxones correspondientes al grupo bacteriano *Escherichia/Shigella.*

* Porcentaje de cobertura de la sonda en ausencia de discordancia (*perfect match*) con las secuencias depositadas en la herramienta *TestProbe* alojada en el la base de datos *SILVA 138 SSU Ref NR* (https://www.arb-silva.de/search/testprobe/). Ensayo *in silico* realizado en diciembre del 2020.

[a] Especie no identificada perteneciente al taxón; [b] Especie no identificada ni cultivada perteneciente al taxón

De estas, 2 268 (80,8%) se engloban dentro del grupo *Escherichia/Shigella*. Estas secuencias coinciden en un alto porcentaje tanto con especies de *Escherichia* como con especies *Shigella* (Tabla III.16). Sin embargo, un porcentaje de cobertura significativo ha sido anotado dentro del orden Yersiniaceae 81,3% (985 secuencias) (Tabla III.16).

Por otra parte, la evaluación de la especificidad de la sonda especie-específica *ybbW*, mediante las diferentes PCR *in silico*, revela que se obtienen amplicones cuando se utiliza como *template* las secuencias de *Escherichia coli* depositadas en las bases de datos (Tabla III.17). Siguiendo el mismo procedimiento, las secuencias de *Shigella* no amplificaron en ninguno de los casos (Tabla III.17).

Tabla III.17. Resultados de la PCR *in silico* realizada con *UGENE v33.0* e *In Silico PCR Amplification* del ensayo especie-específico para *E. coli* (gen *ybbW*).

Especie y cepa	**Ensayo EC*ybbW*1**
Escherichia blattae DSM 4481	-
Escherichia coli AE1-2	+
Escherichia coli O157:H7	+
Escherichia coli XJ133-127-1NF1	+
Escherichia coli K-12 / MG1655	+
Escherichia coli K-12 / W3110	+
Escherichia coli 0127:H6 E2348/69	+
Escherichia coli 042	-
Escherichia coli 536	+
Escherichia coli 55989	+
Escherichia coli ABU 83972	+
Escherichia coli APEC O1	+
Escherichia coli APEC O78	+
Escherichia coli ATCC 8739	+
Escherichia coli ATCC 11775	+
Escherichia coli BREL606	+
Escherichia coli BL21(DE3)	+
Escherichia coli BL21(DE3)	+
Escherichia coli BL21-Gold(DE3)pLysS AG	+

Tabla III.17 (continuación). Resultados de la PCR *in silico* realizada con *UGENE v33.0* e *In Silico PCR Amplification* del ensayo especie-específico para *E. coli* (gen *ybbW*).

Especie y cepa	**Ensayo EC*ybbW*1**
Escherichia coli BW2952	+
Escherichia coli CFT073	+
Escherichia coli DH1	+
Escherichia coli DH1	+
Escherichia coli E24377A	+
Escherichia coli ED1a	+
Escherichia coli ETEC H10407	+
Escherichia coli HS	+
Escherichia coli IAI1	+
Escherichia coli IAI39	-
Escherichia coli IHE3034	+
Escherichia coli JJ1886	+
Escherichia coli K-12 subcepa W3110	+
Escherichia coli KO11FL	+
Escherichia coli LF82	+
Escherichia coli LY180	+
Escherichia coli NA114	+
Escherichia coli O103:H2 12009	+
Escherichia coli O104:H4 2009EL-2050	+
Escherichia coli O104:H4 2009EL-2071	+
Escherichia coli O104:H4 2011C-3493	+
Escherichia coli O111:H- 11128	+
Escherichia coli O157:H7 EDL933	+
Escherichia coli O157:H7 EC4115	+
Escherichia coli O157:H7 Sakai	+
Escherichia coli O157:H7 TW14359	+
Escherichia coli O26:H11 11368	+
Escherichia coli O157:H7 TW14359	+
Escherichia coli O26:H11 11368	+
Escherichia coli O55:H7 CB9615	+
Escherichia coli O55:H7 RM12579	+
Escherichia coli O7:K1 CE10	-
Escherichia coli O83:H1 NRG 857C	+
Escherichia coli P12b	+
Escherichia coli PMV-1	+
Escherichia coli S88	+
Escherichia coli SE11	+
Escherichia coli SE15	+
Escherichia coli SMS-3-5	+
Escherichia coli UM146	+
Escherichia coli UMN026	+
Escherichia coli UMNK88	+
Escherichia coli UTI89	+

Tabla III.17 (continuación). Resultados de la PCR *in silico* realizada con *UGENE v33.0* e *In Silico PCR Amplification* del ensayo especie-específico para *E. coli* (gen *ybbW*).

Especie y cepa	Ensayo EC*ybbW*1
Escherichia coli W	+
Escherichia coli Xuzhou21	+
Escherichia coli str. K-12 subcepa DH10B	+
Escherichia coli str. K-12 subcepa MDS42 DNA	+
Escherichia coli str. clon D i14	+
Escherichia coli str. clon D i2	+
Escherichia fergusonii 190311L245	-
Escherichia fergusonii ATCC 35469	-
Escherichia marmotae HT073016	-
Escherichia marmotae NCTC8196	-
Shigella boydii P288	-
Shigella boydii CDC 3083-94	-
Shigella boydii Sb227	-
Shigella dysenteriae FBD015	-
Shigella dysenteriae 1617	-
Shigella dysenteriae Sd197	-
Shigella flexneri GH24	-
Shigella flexneri 2002017	-
Shigella flexneri 2a 301	-
Shigella flexneri 2a. 2457T	-
Shigella flexneri 5 8401	-
Shigella sonnei CECT 4887	-
Shigella sonnei 53G	-
Shigella sonnei Ss046	-

III.3.2 │Valoración de bioindicadores en aguas y sedimentos marinos

III.3.2.1 Número teórico de copias de los genes 16S rRNA y ybbW

El número teórico de copias de los genes *16S rRNA* y *ybbW* resultantes para cada una de las diluciones seriadas y las reacciones grupo- y especie-específicas utilizadas se presentan en la Tabla III.18. Asimismo, en esta tabla se recogen los parámetros necesarios para su cálculo –concentraciones de ADN de las cepas de referencia (ng μL^{-1}); longitud del amplicón resultante (pb); y, nº medio de operones–.

Tabla III.18. Número teórico de copias de los genes *16S rRNA* y *ybbW*, parámetros necesarios para su cálculo y diluciones seriadas utilizadas en este trabajo.

Ensayo grupo o especie específico	**Cepa referencia** (Código WDCM)[a]	**Nº operones**[b]	**Longitud amplicón** (pb)	**Concentración ADN**[c] (ng μL^{-1})	**Diluciones**	**Nº copias gen**[d]
EN	*Enterococcus faecalis* (WDCM 00009)	4	86	413,5 ± 3,45	$1/10^1$ - $1/10^{10}$	$2{,}19 \times 10^{11}$ – $2{,}19 \times 10^{2}$
ES	*Escherichia coli* (WDCM 00012)	7	104	519,7 ± 3,13	$1/10^1$ - $1/10^{10}$	$1{,}30 \times 10^{11}$ – $1{,}30 \times 10^{2}$
Ef	*Enterococcus faecalis* (WDCM 00009)	4	103	413,5 ± 3,45	$1/10^1$ - $1/10^{10}$	$1{,}81 \times 10^{11}$ – $1{,}81 \times 10^{2}$
Efium	*Enterococcus faecium* (WDCM 00010)	6	140	433,5± 6,95	$1/10^1$ - $1/10^{10}$	$9{,}43 \times 10^{10}$ – $9{,}43 \times 10^{1}$
EC*ybbW*	*Escherichia coli* (WDCM 00012)	-	203	519,7 ± 3,13	$1/10^1$ - $1/10^{10}$	$4{,}67 \times 10^{11}$ – $4{,}67 \times 10^{2}$

[a] WDCM: Código de la *World Data Centre for Microorganisms*.

[b] Nº medio de operones rrn obtenidos de la herramienta *Ribosomal RNA Operon Copy Number* (RRNDB; https://rrndb.umms.med.umich.edu/).

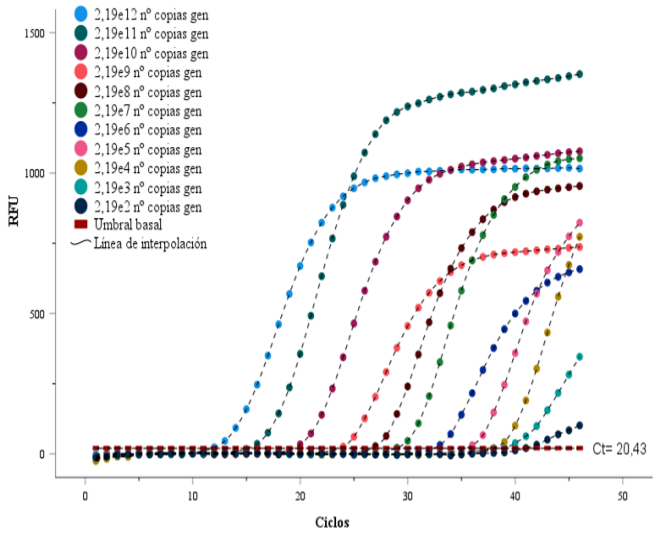
[c] Medias de las concentraciones de ADN de las cepas bacterianas ± desviación estándar (n=3).

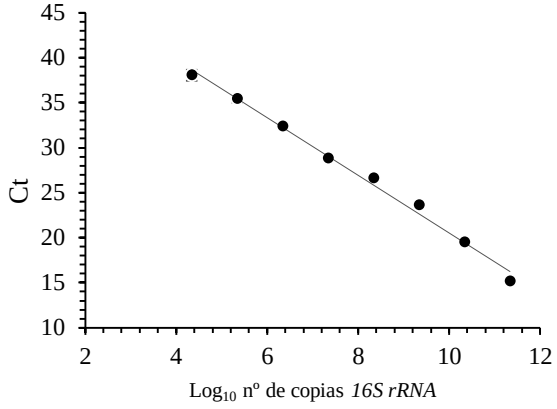
[d] El número de copias de los genes se obtienen a partir de la ecuación de Whelan y colaboradores (2003), considerando los factores de dilución correspondientes.

III.3.2.2 Rectas de regresión y parámetros

A continuación, se muestran las curvas RFU *vs.* ciclos de amplificación, para la determinación del límite de detección y los valores de C_t de cada una de las reacciones de amplificación para los grupos específicos (Tablas III.19 y III.20) y especies específicas (Tablas III.21-III.23). También se muestran las rectas de regresión y los parámetros obtenidos, así como la cuantificación absoluta del nº de copias de cada uno de los genes utilizados.

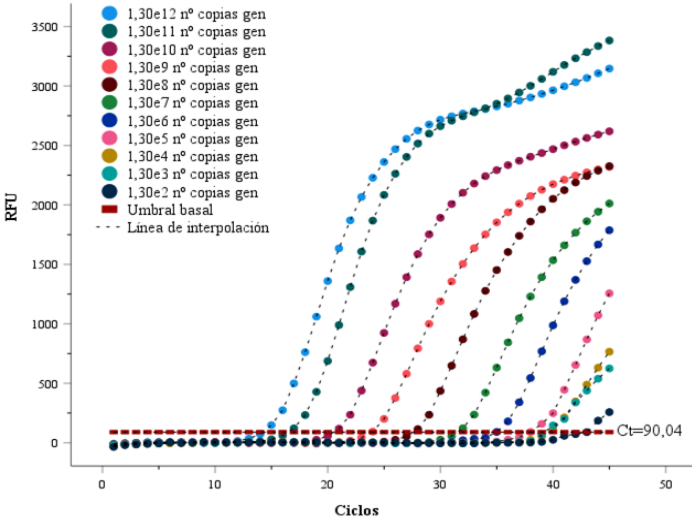
Tabla III.19. Curvas RFU *vs.* ciclos, recta de regresión, diluciones, nº de copias del gen, C_t, eficiencia de amplificación, parámetros obtenidos, así como la cuantificación absoluta del nº de copias del gen *16S rRNA* resultante de las reacciones grupo-específicas para *Enterococcus*.

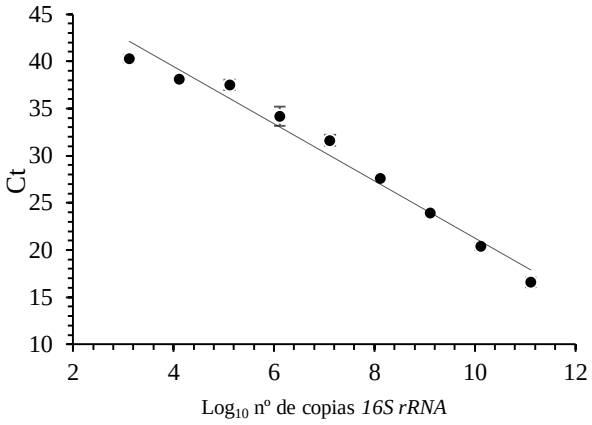
Curvas RFU *vs.* ciclos	**Dilución**	**Nº copias gen**	**C_t**
	sd	2,19 x 10^{12}	11,74±0,44
	1/10^{1}	2,19 x 10^{11}	15,15±0,16
	1/10^{2}	2,19 x 10^{10}	19,50±0,06
	1/10^{3}	2,19 x 10^{9}	23,61±0,11
	1/10^{4}	2,19 x 10^{8}	26,59±0,10
	1/10^{5}	2,19 x 10^{7}	28,86±0,27
	1/10^{6}	2,19 x 10^{6}	32,40±0,24
	1/10^{7}	2,19 x 10^{5}	35,44±0,39
	1/10^{8}	2,19 x 10^{4}	38,05±0,62
	1/10^{9}	2,19 x 10^{3}	39,34±0,23
	1/10^{10}	2,19 x 10^{2}	40,91±0,89

Recta de regresión	**Parámetros**
	y = -3,1981x + 52,526 R^2 = 0,9928 Eficiencia= 105% LDD= 2,19 x 10^{2} nº de copias gen $nº\ copias\ gen = 10^{(\frac{Ct-52,526}{-3,1981})}$

sd: muestra sin diluir; LDD: Límite de detección

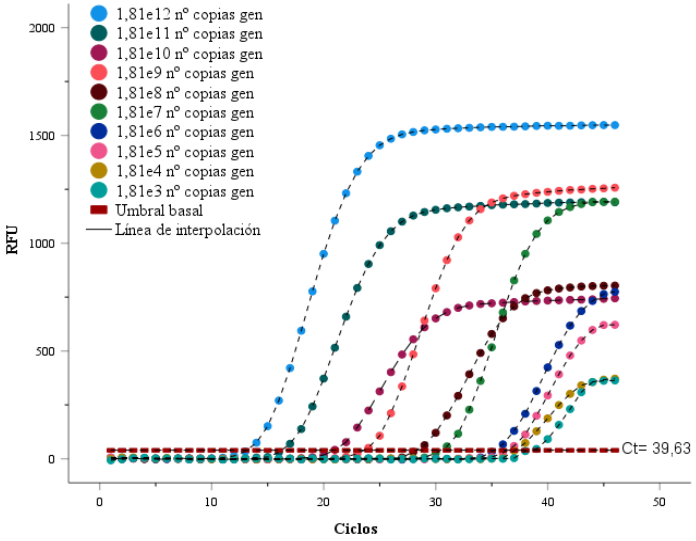
Tabla III.20. Curvas RFU *vs.* ciclos, recta de regresión, diluciones, nº de copias del gen, C_t, eficiencia de amplificación, parámetros obtenidos, así como la cuantificación absoluta del nº de copias del gen *16S rRNA* resultante de las reacciones grupo-específicas para *Escherichia/Shigella*.

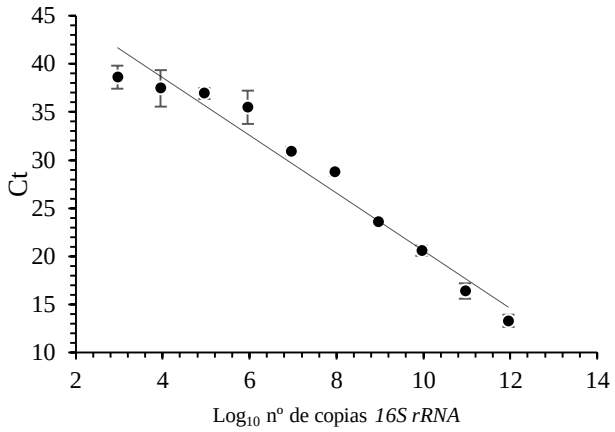
Curvas RFU *vs.* ciclos	**Dilución**	**Nºcopias gen**	**C_t**
	sd	1,30 x 10^{12}	14,24±0,14
	1/10^{1}	1,30 x 10^{11}	16,58±0,53
	1/10^{2}	1,30 x 10^{10}	20,40±0,38
	1/10^{3}	1,30 x 10^{9}	23,91±0,17
	1/10^{4}	1,30 x 10^{8}	27,61±0,23
	1/10^{5}	1,30 x 10^{7}	31,63±0,57
	1/10^{6}	1,30 x 10^{6}	34,17±0,99
	1/10^{7}	1,30 x 10^{5}	37,50±0,52
	1/10^{8}	1,30 x 10^{4}	38,12±0,14
	1/10^{9}	1,30 x 10^{3}	40,26±0,40
	1/10^{10}	1,30 x 10^{2}	40,50±0,18

Recta de regresión	**Parámetros**
	y = -3,0273x + 51,559 R^2 = 0,9772 Eficiencia= 114% LDD= 1,30 x 10^{2} nº de copias gen $nº\ copias\ gen = 10^{(\frac{Ct-51,559}{-3,0273})}$

sd: muestra sin diluir
LDD: Límite de detección

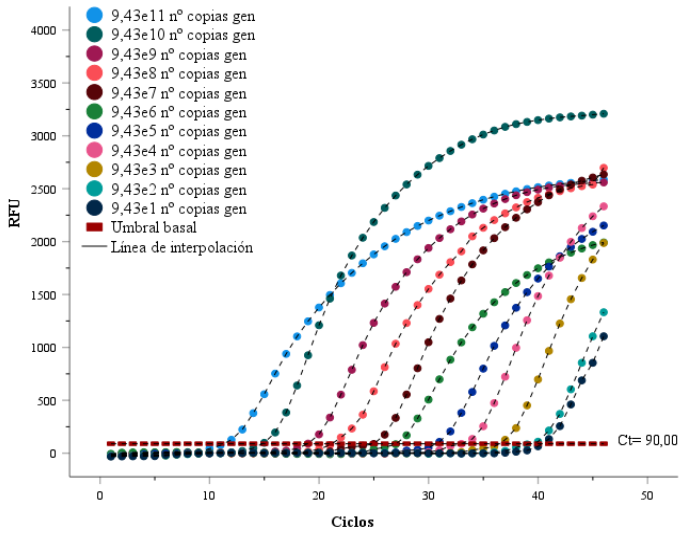
Tabla III.21. Curvas RFU *vs.* ciclos, recta de regresión, diluciones, nº de copias del gen, C_t, eficiencia de amplificación, parámetros obtenidos, así como la cuantificación absoluta del nº de copias del gen *16S rRNA* resultante de las reacciones especie-específicas para *Enterococcus faecalis*.

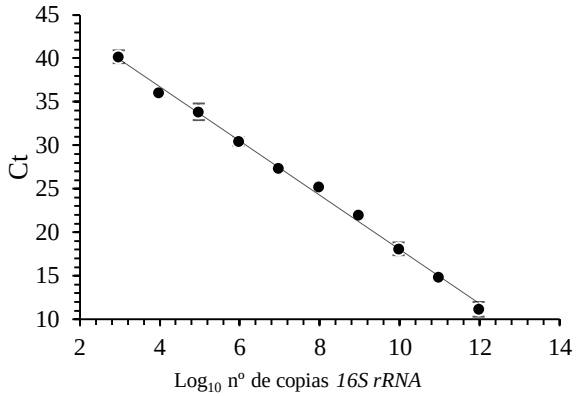
Curvas RFU *vs.* ciclos	**Dilución**	**Nºcopias gen**	**C_t**
	sd	1,81 x 10^{12}	13,29±0,64
	1/10^1	1,81 x 10^{11}	16,39±0,82
	1/10^2	1,81 x 10^{10}	20,56±0,53
	1/10^3	1,81 x 10^9	23,59±0,07
	1/10^4	1,81 x 10^8	28,76±0,36
	1/10^5	1,81 x 10^7	30,91±0,43
	1/10^6	1,81 x 10^6	35,49±1,71
	1/10^7	1,81 x 10^5	36,94±0,57
	1/10^8	1,81 x 10^4	37,46±1,89
	1/10^9	1,81 x 10^3	38,60±1,20

Recta de regresión	**Parámetros**
	y = -3,0004x + 50,575 R^2 = 0,9613 Eficiencia= 115% LDD= 1,81 x 10^3 nº de copias gen $nº\ copias\ gen = 10^{(\frac{Ct-50,575}{-3,0004})}$

sd: muestra sin diluir
LDD: Límite de detección

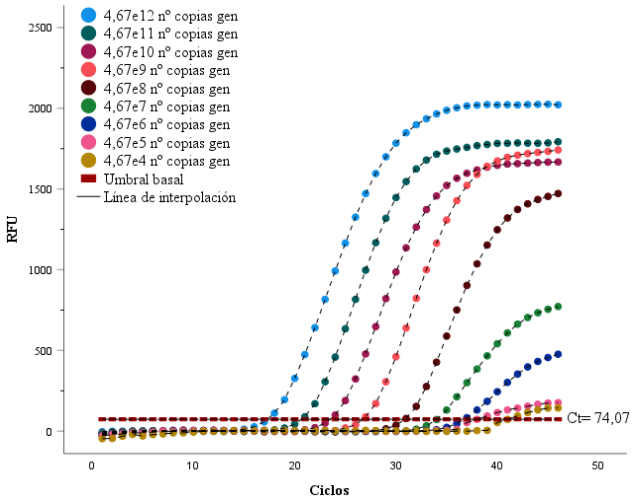
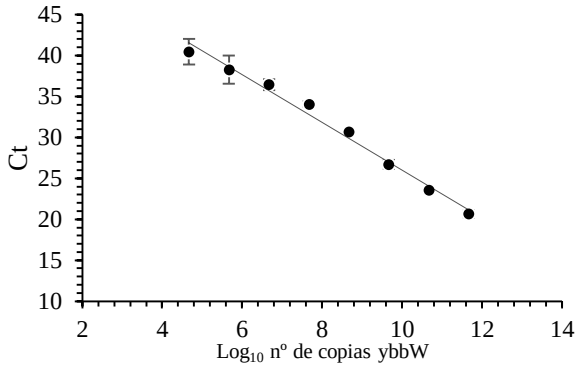
Tabla III.22. Curvas RFU *vs.* ciclos, recta de regresión, diluciones, nº de copias del gen, C_t, eficiencia de amplificación, parámetros obtenidos, así como la cuantificación absoluta del nº de copias del gen *16S rRNA* resultante de las reacciones especie-específicas para *Enterococcus faecium*.

Curvas RFU *vs.* ciclos	**Dilución**	**Nºcopias gen**	**C_t**
	sd	9,43 x 10^{11}	11,18±0,85
	$1/10^1$	9,43 x 10^{10}	14,83±0,15
	$1/10^2$	9,43 x 10^9	18,10±0,68
	$1/10^3$	9,43 x 10^8	21,98±0,32
	$1/10^4$	9,43 x 10^7	25,24±0,07
	$1/10^5$	9,43 x 10^6	27,38±0,05
	$1/10^6$	9,43 x 10^5	30,45±0,35
	$1/10^7$	9,43 x 10^4	33,83±0,36
	$1/10^8$	9,43 x 10^3	36,04±0,17
	$1/10^9$	9,43 x 10^2	40,16±0,80
	$1/10^{10}$	9,43 x 10^1	40,92±0,74

Recta de regresión	**Parámetros**
	y = -3,1245x + 49,272 R^2 = 0,9968 Eficiencia= 109% LDD= 9,43 x 10^1 nº de copias gen $nº\ copias\ gen = 10^{(\frac{Ct-49,272}{-3,1245})}$

sd: muestra sin diluir
LDD: Límite de detección

Tabla III.23. Curvas RFU *vs.* ciclos, recta de regresión, diluciones, nº de copias del gen, C_t, eficiencia de amplificación, parámetros obtenidos, así como la cuantificación absoluta del nº de copias del gen *ybbW* resultante de las reacciones especie-específicas para *E. coli*.

Curvas RFU *vs.* ciclos	**Dilución**	**Nºcopias gen**	**C_t**
	sd	4,67 x 10^{12}	17,36±0,59
	$1/10^1$	4,67 x 10^{11}	20,67±0,43
	$1/10^2$	4,67 x 10^{10}	23,55±0,16
	$1/10^3$	4,67 x 10^9	26,72±0,52
	$1/10^4$	4,67 x 10^8	30,68±0,25
	$1/10^5$	4,67 x 10^7	34,09±0,34
	$1/10^6$	4,67 x 10^6	36,46±0,65
	$1/10^7$	4,67 x 10^5	38,28±1,74
	$1/10^8$	4,67 x 10^4	40,48±1,56
Recta de regresión		**Parámetros**	
		y = -2,9166x + 55,193 R^2 = 0,9871 Eficiencia= 120% LDD= 4,67 x 10^4 nº de copias gen $n^o\ copias\ gen = 10^{(\frac{Ct-55,193}{-2,9166})}$	

sd: muestra sin diluir
LDD: Límite de detección

III.3.2.3 Cuantificación de los bioindicadores de contaminación fecal

Para responder adecuadamente al comportamiento de los dos grupos de bioindicadores, es decir, grupos específicos de *Enterococcus* y *Escherichia/Shigella*, se valoró el comportamiento relativo tanto espacial como estacionalmente. La tendencia de las abundancias de las FIB se calculó en función del número total de copias existente en cada estación de muestreo. Así, la Figura III.7 muestra las tendencias grupo-específicas de *Enterococcus* y *Escherichia/Shigella*.

En la matriz agua, el grupo *Enterococcus* presenta un comportamiento diferencial en la estación 2 con un mínimo en invierno y un máximo en primavera (Figura III.7A).

La cuantificación absoluta mostró que el máximo de primavera se correspondía con 6 veces más la concentración de copias del gen *16S rRNA* que aquella reportada en invierno, aunque no se detectan cambios significativos ($p>0,05$) (Tabla III.24). Por otro lado, la determinación del gen en *singleplex* de este grupo muestra que, en general, la expresión es entre 1-3 órdenes de magnitud inferior a la reportada en simultáneo con *Escherichia/Shigella* (Tabla III.24).

Tabla III.24. Cuantificación absoluta (nº de copias del gen *16S rRNA* 100 mL^{-1} agua de mar*) en la matriz agua de mar del bioindicador grupo-específico *Enterococcus* a partir de la reacción simultánea llevada a cabo en conjunto con el grupo *Escherichia/Shigella* y la reacción individual.

Estaciones / Periodos	E1	E2	E3
		Multiplex **	
Invierno	2,4 (1,7) x 10^7	1,2 (0,6) x 10^7	1,5 (0,1) x 10^7
Primavera	1,8 (0,2) x 10^7	6,3 (1,0) x 10^7	2,1 (0,5) x 10^7
		Singleplex	
Invierno	2,0 (1,2) x 10^4 **a**	2,8 (3,9) x 10^6	1,5 (0,6) x 10^7
Primavera	5,5 (0,6) x 10^5 **a; b**	4,9 (0,3) x 10^6 **b**	5,2 (2,7) x 10^6

*Nº de copias 100 mL^{-1}: Media expresada en notación científica (sd) (n=3)

****** *Multiplex* 1: reacción simultánea de *Enterococcus* (*16S rRNA*) y *Escherichia/Shigella* (*16S rRNA*)

a: Indica diferencias significativas entre las estaciones muestreadas ($p<0,05$)

b: Indica diferencias significativas entre los periodos de muestreo ($p<0,05$)

El grupo *Escherichia/Shigella* mostró un comportamiento homogéneo, a lo largo de las tres estaciones de muestreo y en los dos periodos (invierno y primavera; Figura III.7A), si bien la tendencia mostraba un máximo relativo en la estación 2 –el número de copias dobla a aquel reportado en la estación 1 ($p>0,05$; Tabla III.25)–. La comparación del número de copias de *16s rRNA* entre la determinación de *Escherichia/Shigella* en simultáneo con *Enterococcus*, e individual –*singleplex*–, resulta en una disminución en el número de copias de un orden de magnitud en la medida en *multiplex* en la estación 3 (Tabla III.25).

Tabla III.25. Cuantificación absoluta (nº de copias del gen *16S rRNA* 100 mL^{-1} agua de mar*) en la matriz agua de mar del bioindicador grupo-específico *Escherichia/Shigella* a partir de la reacción simultánea llevada a cabo en conjunto con el grupo bioindicador *Enterococcus* y la reacción *singleplex.*

Estaciones / Periodos	E1	E2	E3
		Multiplex **	
Invierno	7,7 (3,4) x 10^5	2,7 (0,9) x 10^6	3,8 (3,1) x 10^4 **a**
Primavera	1,8 (0,6) x 10^6	2,4 (0,8) x 10^6	2,0 (2,7) x 10^4 **a**
		Singleplex	
Invierno	1,2 (0,7) x 10^6	4,5 (0,8) x 10^6	8,5 (3,0) x 10^5
Primavera	3,3 (0,7) x 10^6	8,9 (1,5) x 10^6	4,9 (1,6) x 10^5

* Nº de copias 100 mL^{-1}: Media expresada en notación científica (sd) (n=3)
****** *Multiplex* 1: reacción simultánea de *Enterococcus* (*16S rRNA*) y *Escherichia/Shigella* (*16S rRNA*)
a: Indica diferencias significativas entre las estaciones muestreadas ($p<0,05$)

A nivel de la cuantificación de especies, *E. faecalis* siguió la misma tendencia que el grupo (Figura III.8A), correspondiéndose el máximo de primavera con 1,5 x 10^6 copias de gen 100 mL^{-1} en la estación 2, valor significativamente ($p<0,05$) diferente tanto espacial como estacionalmente (Tabla III.26).

La tendencia de *E. faecium* se reporta en la Figura III.8A. *Enterococcus faecium* fue determinada, en ambas temporadas, en la estación localizada más al norte (estación 3), mientras, que en invierno solo se determinó en la estación central 2. No hubo diferencias significativas en ninguna de ellas (Tabla III.27).

Tabla III.26. Cuantificación absoluta (nº de copias del gen *16S rRNA* 100 mL^{-1} agua de mar*) en la matriz agua de mar del bioindicador especie-específico *E. faecalis* en la reacción simultánea** llevada a cabo en conjunto con el bioindicador *E. faecium.*

Estaciones / Periodos	E1	E2	E3
Invierno	4,7 (6,2) x 10^4	4,3 (2,7) x 10^4	3,0 (3,2) x 10^4
Primavera	1,5 (0,3) x 10^4	1,5 (0,1) x 10^6 **a; b**	1,1 (0,4) x 10^4

* Nº de copias 100 mL^{-1}: Media expresada en notación científica (sd) (n=3)
** *Multiplex* 3: reacción simultánea de *E. faecalis* (*16S rRNA*) y *E. faecium* (*16S rRNA*)
a: Indica diferencias significativas entre las estaciones muestreadas ($p<0,05$)
b: Indica diferencias significativas entre los periodos de muestreo ($p<0,05$)

Tabla III.27. Cuantificación absoluta (nº de copias del gen *16S rRNA* 100 mL^{-1} agua de mar*) en la matriz agua de mar del bioindicador especie-específico *E. faecium* en la reacción *singleplex*.

Estaciones / Periodos	E1	E2	E3
Invierno	nd	1,0 (1,7) x 10^3	2,3 (0,7) x 10^3
Primavera	nd	nd	1,1 (1,8) x 10^3

nd: no detectada

* Nº de copias 100 mL^{-1}: Media expresada en notación científica (sd) (n=3)

En relación al gen *ybbW* de *E. coli* no fue detectado en *multiplex* aunque sí lo hizo en *singleplex*, y se expresó en la estación 3 durante las dos temporadas, y en el invierno en la estación 2 (Tabla III.28).

Tabla III.28. Cuantificación absoluta (nº de copias del gen *ybbW* 100 mL^{-1} agua de mar*) en la matriz agua de mar del bioindicador especie-específico *E. coli* en la reacción *singleplex*.

Estaciones / Periodos	E1	E2	E3
Invierno	nd	nd	4,9 (1,5) x 10^5
Primavera	nd	nd	2,1 (0,2) x 10^6

nd: no detectada

* Nº de copias 100 mL^{-1}: Media expresada en notación científica (sd) (n=3)

En la matriz sedimento, el comportamiento del grupo *Escherichia/Shigella* muestra tendencia a incrementar hacia la estación norte (estación 3), en ambas temporadas (Figura III.7B).

En *multiplex*, y durante el invierno, este grupo específico mostró un número de copias significativamente superior ($p<0,05$) en las estaciones más septentrionales (estación 2 y 3; 2,1-3 x 10^7 copias gen 100 g^{-1} de sedimento) comparadas con 2,4 x 10^5 copias gen 100 g^{-1} sedimento de la estación 1 (al sur de la bahía) (Tabla III.29). En primavera, el número de copias reportado también fue significativamente superior ($p<0,05$) en la estación 3 (2,4 x 10^6 copias gen 100 g^{-1} de sedimento) frente a las otras dos estaciones (Tabla III.29). La determinación del gen en *singleplex* de este grupo muestra que, en general, la expresión oscila entre

las mismas magnitudes que las reportadas en simultáneo con *Enterococcus* (Tabla III.29).

Tabla III.29. Cuantificación absoluta (nº de copias del gen *16S rRNA* 100 g^{-1} sedimento[*]) en el sustrato marino del bioindicador grupo específico *Escherichia/Shigella* a partir de la reacción simultánea llevada a cabo en conjunto con el grupo *Enterococcus* y la reacción individual.

Estaciones / Periodos	E1	E2	E3
		Multiplex[**]	
Invierno	2,4 (1,8) x 10^5 **a**	2,1 (0,9) x 10^7	3,0 (2,2) x 10^7
Primavera	1,2 (1,0) x 10^5 **a**	9,2 (2,6) x 10^4 **a; b**	2,4 (0,4) x 10^6 **b**
		Singleplex	
Invierno	4,4 (0,3) x 10^5	2,2 (0,5) x 10^7 **a**	7,2 (7,7) x 10^6
Primavera	4,1 (3,0) x 10^4 **b**	1,3 (0,4) x 10^5 **b**	1,2 (0,9) x 10^7

*Nº de copias 100 g^{-1}: Media expresada en notación científica (sd) (n=3)
****** *Multiplex* 1: reacción simultánea de *Enterococcus* (*16S rRNA*) y *Escherichia/Shigella* (*16S rRNA*)
a: Indica diferencias significativas entre las estaciones muestreadas ($p<0,05$)
b: Indica diferencias significativas entre los periodos de muestreo ($p<0,05$)

El grupo *Enterococcus*, en sedimentos, en la reacción simultánea muestra concentraciones mínimas significativas del número de copias ($p<0,05$) en la estación 3 de casi 3-4 órdenes de magnitud por debajo a las correspondientes a las otras estaciones en invierno (4,9 x 10^5 *vs.* 0,82-1,5 x 10^9 copias gen 100 g^{-1} de sedimento; Tabla III.30; Figura III.7B). En primavera, sin embargo, la concentración es significativamente superior ($p<0,05$) en esta estación (Tabla III.30) y también significativamente ($p<0,05$) más alta entre temporadas (Tabla III.30; Figura III.7B). En general, las concentraciones determinadas en la reacción *singleplex* no difirieron de la obtenidas en simultáneo con *Escherichia/Shigella* (Tabla III.30).

Respecto a las especies, no hay cambios significativos en las concentraciones de *E. faecalis* entre las estaciones, pero sí cuando las temporadas se comparan (Figura III.8B; Tabla III.31). *Enterococcus faecium* está presente en concentraciones muy bajas, del orden 10^2, o directamente no ha sido determinada (Tabla III.32).

Tabla III.30. Cuantificación absoluta (nº de copias del gen *16S rRNA* 100 g^{-1} sedimento[*]) en el sedimento marino del bioindicador grupo *Enterococcus* a partir de la reacción simultánea llevada a cabo en conjunto con el grupo *Escherichia/Shigella* y la reacción *singleplex*.

Periodos \ Estaciones	E1	E2	E3
		Multiplex[**]	
Invierno	8,2 (0,2) x 10^8	1,5 (0,3) x 10^9	4,9 (0,7) x 10^5 **a**
Primavera	4,5 (1,7) x 10^5 **b**	1,8 (1,3) x 10^5 **b**	1,3 (1,0) x 10^7 **a; b**
		Singleplex	
Invierno	8,4 (6,0) x 10^8	1,1 (2,8) x 10^9	8,0 (0,8) x 10^5 **a**
Primavera	2,7 (2,0) x 10^5 **b**	1,9 (1,8) x 10^5 **b**	6,1 (7,7) x 10^6 **a; b**

*Nº de copias 100 g^{-1}: Media expresada en notación científica (sd) (n=3)

****** *Multiplex* 1: reacción simultánea de *Enterococcus* (*16S rRNA*) y *Escherichia/Shigella* (*16S rRNA*)

a: Indica diferencias significativas entre las estaciones muestreadas ($p<0,05$)

b: Indica diferencias significativas entre los periodos de muestreo ($p<0,05$)

Tabla V.31. Cuantificación absoluta (nº de copias del gen *16S rRNA* 100 g^{-1} sedimento[*]) en el sedimento marino del bioindicador especie-específico *E. faecalis* en la reacción simultánea[**] llevada a cabo en conjunto con el bioindicador *E. faecium.*

Periodos \ Estaciones	E1	E2	E3
		Multiplex[**]	
Invierno	5,4 (3,0) x 10^5	3,6 (0,2) x 10^4	7,9 (2,6) x 10^5
Primavera	1,9 (1,9) x 10^4 **b**	4,0 (0,6) x 10^3 **b**	nd

nd: no detectada

*Nº de copias 100 g^{-1}: Media expresada en notación científica (sd) (n=3)

******_Multiplex_ 3: reacción simultánea de *E. faecalis* (*16S rRNA*) y *E. faecium* (*16S rRNA*)

b: Indica diferencias significativas entre los periodos de muestreo ($p<0,05$)

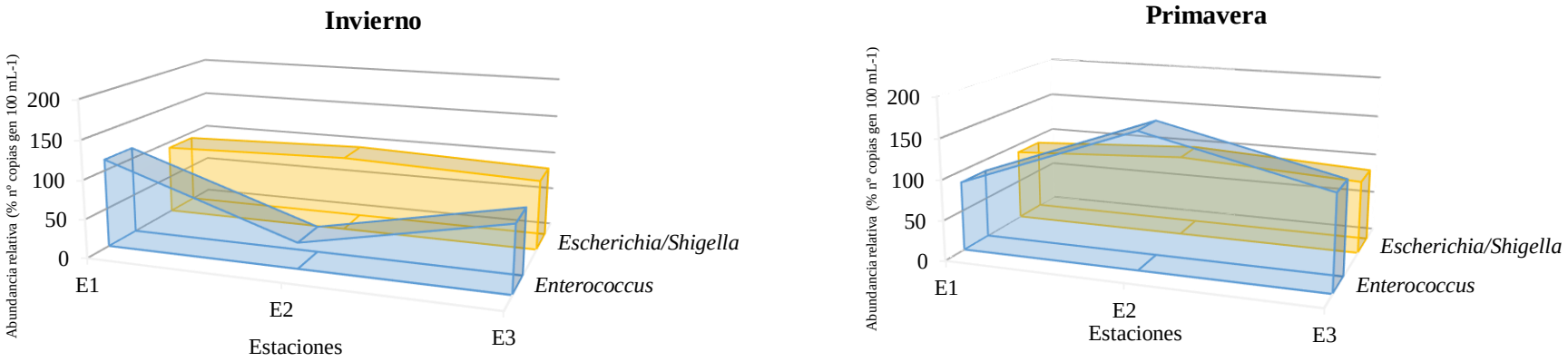
Tabla III.32. Cuantificación absoluta (nº de copias del gen *16S rRNA* 100 g^{-1} sedimento[*]) en el sedimento marino del bioindicador especie-específico *E. faecium* en la reacción *singleplex.*

Periodos \ Estaciones	E1	E2	E3
Invierno	nd	nd	3,6 (0,8) x 10^2
Primavera	4,0 (1,6) x 10^3	1,4 (0,1) x 10^2	nd

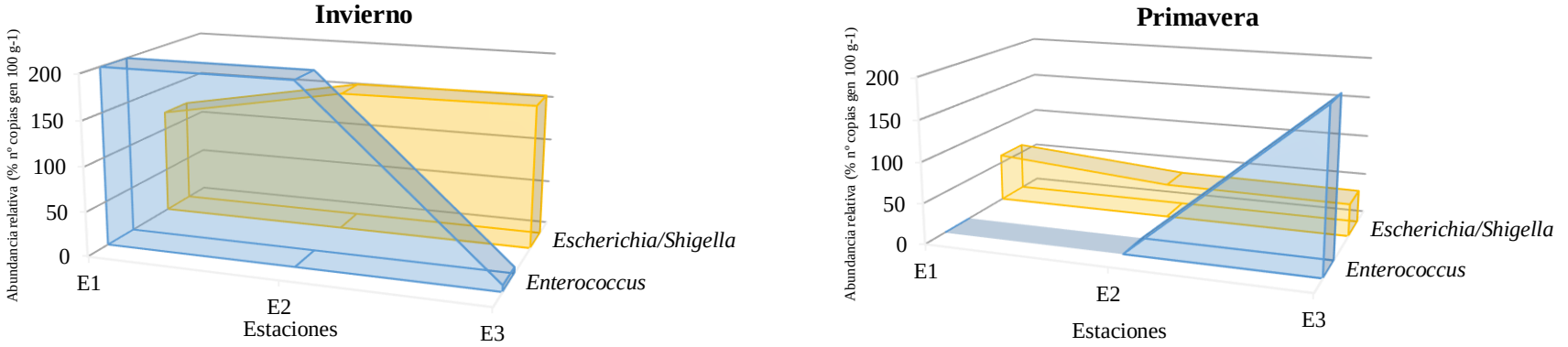
nd: no detectada

*Nº de copias 100 g^{-1}: Media expresada en notación científica (sd) (n=3)

A

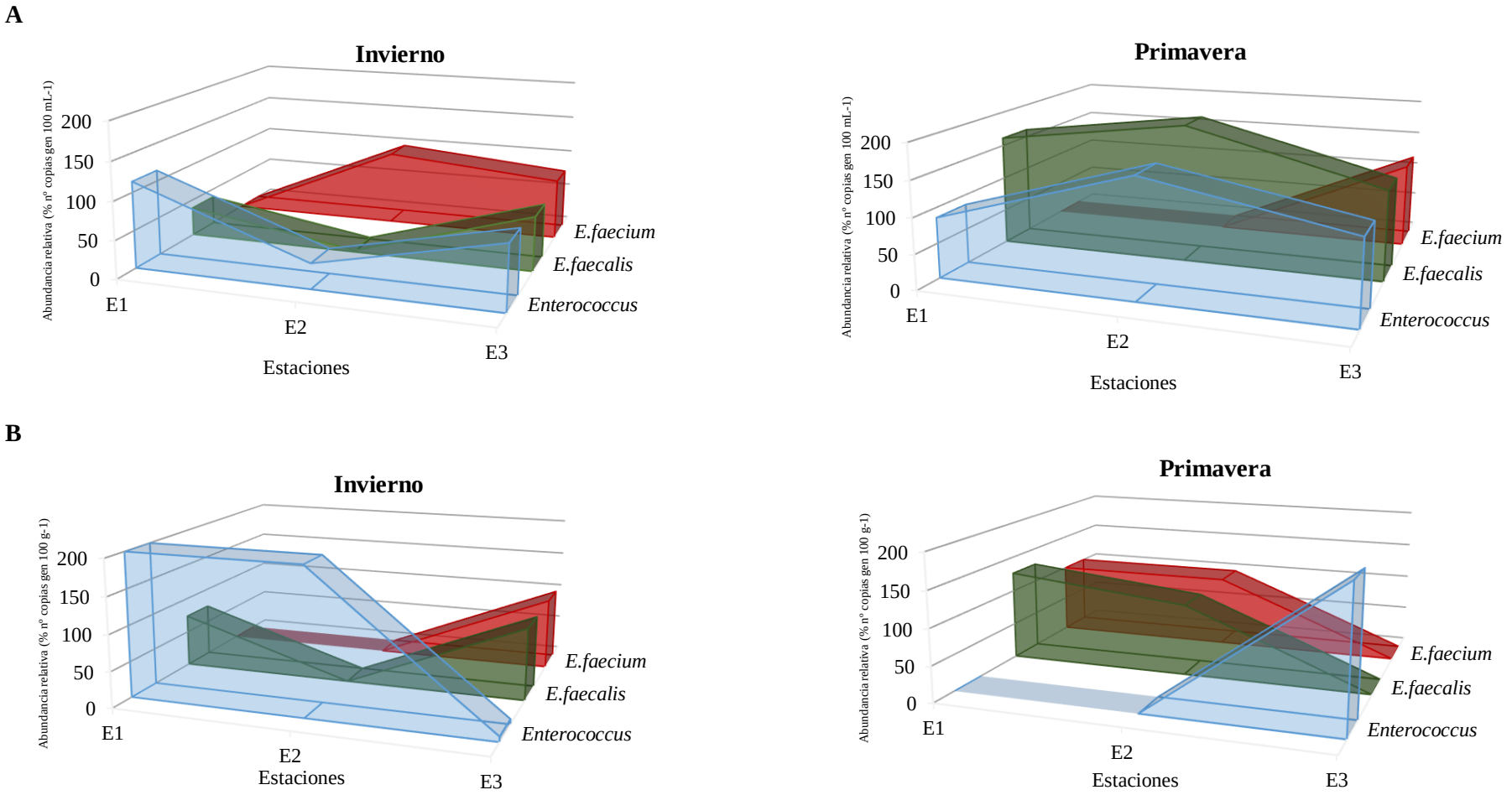


B



***Enterococcus* 100% (agua de mar)**	***Escherichia/Shigella* 100% (agua de mar)**	***Enterococcus* 100% (sedimento)**	***Escherichia/Shigella* 100% (sedimento)**
E1= 2,1 x 10^7 nº copias gen 100 mL^{-1}	E1= 1,3 x 10^6 nº copias gen 100 mL^{-1}	E1= 4,1 x 10^8 nº copias gen 100 g^{-1}	E1= 1,8 x 10^5 nº copias gen 100 g^{-1}
E2= 3,8 x 10^7 nº copias gen 100 mL^{-1}	E2= 2,6 x 10^6 nº copias gen 100 mL^{-1}	E2= 7,5 x 10^8 nº copias gen 100 g^{-1}	E2= 1,1 x 10^7 nº copias gen 100 g^{-1}
E3= 1,8 x 10^7 nº copias gen 100 mL^{-1}	E3= 2,9 x 10^4 nº copias gen 100 mL^{-1}	E3= 6,7 x 10^6 nº copias gen 100 g^{-1}	E3= 2,6 x 10^7 nº copias gen 100 g^{-1}

Figura III.7. Abundancias relativas (% nº de copias del gen 100 mL^{-1} de agua de mar o g^{-1} sedimento marino) de las reacciones de los grupos específicos *Enterococcus* y *Escherichia/Shigella.* **A.** Agua de mar**; B.** Sedimento marino**.**



***Enterococcus* 100% (agua de mar)**	***E. faecalis* 100% (agua de mar)**	***E. faecium* 100% (agua de mar)**	***Enterococcus* 100% (sedimento)**	***E. faecalis* 100% (sedimento)**	***E. faecium* 100% (sedimento)**
E1= 2,1 x 10^7 nº copias gen 100 mL^{-1}	E1= 3,1 x 10^4 nº copias gen 100 mL^{-1}	E1= No detectada	E1= 4,1 x 10^8 nº copias gen 100 g^{-1}	E1= 2,8 x 10^5 nº copias gen 100 g^{-1}	E1= 4,0 x 10^3 nº copias gen 100 g^{-1}
E2= 3,8 x 10^7 nº copias gen 100 mL^{-1}	E2= 7,7 x 10^5 nº copias gen 100 mL^{-1}	E2= 1,0 x 10^3 nº copias gen 100 mL^{-1}	E2= 7,5 x 10^8 nº copias gen 100 g^{-1}	E2= 2,0 x 10^4 nº copias gen 100 g^{-1}	E2= 1,4 x 10^2 nº copias gen 100 g^{-1}
E3= 1,8 x 10^7 nº copias gen 100 mL^{-1}	E3= 2,1 x 10^4 nº copias gen 100 mL^{-1}	E3= 1,7 x 10^3 nº copias gen 100 mL^{-1}	E3= 6,7 x 10^6 nº copias gen 100 g^{-1}	E3= 7,9 x 10^5 nº copias gen 100 g^{-1}	E3= 3,6 x 10^2 nº copias gen 100 g^{-1}

Figura III.8. Abundancias relativas (% nº de copias del gen 100 mL^{-1} de agua de mar o g^{-1} sedimento marino) de las reacciones específicas de las especies *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. **A.** Agua de mar**; B.** Sedimento marino**.**

III.4 │DISCUSIÓN

Como se ha avanzado, las bacterias *Escherichia coli* y *Enterococcus intestinalis* son bioindicadoras de contaminación fecal. Estas bacterias están incluidas como parámetros microbiológicos de referencia en las diferentes normativas de valoración de calidad de aguas. En estas valoraciones se asume que la distribución de los filotipos –clasificación de procariotas de acuerdo a ciertas similitudes entre su material génico– en la zona estudiada es proporcional a la distribución de esos filotipos en la muestra. Sin embargo, como también se ha expuesto, algunas cepas pueden tener una persistencia comparativamente prolongada fuera del huésped, mientras que otras pueden persistir muy poco en las aguas ambientales. Similarmente, los organismos indicadores que están adaptados a vivir en el tracto gastrointestinal y pasan a un entorno diferente (p. ej. agua residual), pueden también estar dejando un *hábitat* primario y adaptarse a otro. Estos cambios de medio han puesto en evidencia dos consideraciones importantes i) a nivel de metodología basada en cultivo, puede haber un cambio sustancial en los miembros dominantes a lo largo del tiempo que determina cierta aclimatación o adaptación en el nuevo entorno, y por tanto, mayor presencia de organismos cultivables; y ii) a nivel de determinación molecular de la bacteria, esta adaptación lleva inherente un cambio en la correcta determinación de las especies o de esos filotipos, dado que puede producirse intercambio de material génico.

Un ejemplo claro que demuestra lo expuesto, es la catalogación de *Enterococcus intestinalis*, dentro del grupo de especies con origen fecal del género *Enterococcus*. A nivel de cultivo, se asume que su determinación valida un conjunto de especies de *Enterococcus*. Sin embargo, como ya hemos adelantado, a un nivel de identificación más detallado, no hay unanimidad por parte de la comunidad científica en cuanto a las especies que integran este grupo de *Enterococcus*, aunque la literatura enfatiza las especies *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* como aquellas, pertenecientes a este género, que son predominantes y que colonizan del tracto gastrointestinal humano (Nallapareddy *et al*., 2005; Galloway-Peña *et al*., 2012; Palmer *et al*., 2012; Qin *et al*., 2012).

En este sentido, diversos estudios corroboran la idoneidad de la utilización de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* como FIB e identifican a estas dos especies como las especies de *Enterococcus* más abundantes en ambientes acuáticos (Ryu *et al.*, 2013; Gotkowska-Płachta, 2021). Como tal, han sido tratadas como organismos de referencia en estos ambientes (Converse *et al.*, 2009; Erdem *et al.*, 2019).

Respecto a *Escherichia coli*, las identificaciones bioquímicas para esta especie ponen en evidencia que las correspondientes para *Shigella* son similares. Como muestra de esto, los antígenos O del lipopolisacárido de los serotipos conocidos de *Shigella* (excepto para *S. sonnei*) se comparten con uno o más de los muchos grupos de antígenos O de *E. coli* (Ewing, 1986; Liu *et al*., 2008).

Algo similar ocurre con la determinación a nivel de ADN de estos dos grupos. En un reciente trabajo de Chattaway y colaboradores (2017), se reportó que de 1 982 secuencias de *Escherichia coli* y *Shigella sp*. analizadas, el 98,4% eran similares entre sí, en concordancia con lo obtenido a través de las aproximaciones bioquímicas y serológicas para estas especies.

Esta estrecha relación bioquímica y molecular, hace que los límites taxonómicos sean difusos entre los géneros *Escherichia* y *Shigella*, (Lan & Reeves, 2002; Maheux *et al.*, 2009), y que no haya un acercamiento claro y fehaciente para la exclusiva determinación y cuantificación de *E. coli* como especie bioindicadora (Walker *et al*., 2017). De ahí que la propuesta en este trabajo, y más acorde con la realidad, fuera la determinación del grupo específico *Escherichia*/ *Shigella.*

Atendiendo a la identificación molecular, el uso del gen *16S rRNA* ha sido fundamental para la caracterización de las FIB. Como se recuerda, la estructura del gen *16S rRNA* –compuesta de secuencias altamente conservadas, presentes en casi todas las especies bacterianas debido a las funciones esenciales, y, de regiones hipervariables, específicas a una o más clases de bacterias (Wang & Qian, 2009)–, permite estudios filogenéticos y de clasificación taxonómica de procariotas (Woese, 1987). Como también hemos señalado, este gen no solo es ubicuo y su

papel funcional es esencial, sino que su rol como marcador molecular ha permitido ampliar el conocimiento que se tiene de los procariotas, no solo a nivel de abundancia, sino también de diversidad y función de estos microorganismos.

La amplia literatura y el uso de este marcador ha puesto también de relieve la existencia de múltiples copias heterogéneas de este gen *16S rRNA* dentro del genoma (Dahllöf *et al.*, 2000; Crosby & Criddle, 2003). Esta multiplicidad puede producir, y de hecho así ha sido referenciado, complejos y diversos bandeados que terminan afectando a la estimación de las especies, tanto por sobreexpresión como por represión del gen (Dahllöf *et al*., 2000). Sin embargo, a pesar de este hecho y al sesgo inherente durante la manipulación de las muestras, la extracción de ADN o la propia reacción de la polimerasa (Webster *et al*., 2003; de Lipthay *et al.*, 2004), se ha visto que estas secuencias, incluso con un 99% de identidad, reconocen una amplia diversidad de ribotipos, y permiten la identificación clara de las especies (Acinas *et al.,* 2004).

Por todo ello, los dos acercamientos para la identificación de *Enterococcus*, consistentes en valorar al grupo específico y a las especies específicas, quedan plenamente justificados en este trabajo. En el primer caso, el gen *16S rRNA* puede informar con seguridad a nivel de grupo (Grutzke *et al*., 2019). La segunda aproximación, basada en alineamientos múltiples de las secuencias respectivas a las especies del género *Enterococcus*, permite identificar zonas altamente hipervariables exclusivas de *E. faecalis* y *E. faecium*.

No obstante, en esta línea del discurso, es posible plantearse el uso de genes de una sola copia, con los que permitir la medición precisa de la diversidad. Si bien existe bibliografía a este respecto (Walker *et al*., 2017; Shakraki *et al*., 2019), en este trabajo, se ha realizado una aproximación con un gen marcador de copia única para *E. coli*. Asimismo, hay que considerar que los criterios por los que se seleccionó originalmente el gen *16S rRNA* deben ineludiblemente establecerse para este nuevo marcador.

Escherichia coli fue una especie candidata idónea para esta identificación por medio de un gen de copia única, ya que como se demostró *in silico*, no se identificaron regiones dentro del fragmento *16S rRNA* potencialmente útiles para el diseño de pares de oligos y sondas específicas para esta especie, siempre y cuando en los alineamientos múltiples se incluyeran las especies del género *Shigella.*

Algunos de los ensayos especie-específicos, con gen de copia única, para *E. coli* recogidos en la bibliografía utilizan el gen *uidA*, codificante de la enzima glucuronidasa (Frahm & Obst, 2003; Silkie *et al*., 2008, Shakraki *et al*., 2019), el gen *tuf*, codificante de la proteína de elongación Ef-Tu (*Elongation factor Thermo unstable*) (Maheux *et al*., 2011), o el gen codificante de la alantoína permeasa (*ybbW*) (Walker *et al*., 2017; Chevée *et al*., 2019; McQuillan & Wilson, 2019, 2021), entre otros. Este último se caracteriza por estar dentro del *cluster* génico que agrupa los genes de utilización de la alantoína en *E. coli*, encargado de la degradación de la alantoína. La alantoína es un importante intermediario metabólico en la mayoría de los organismos –tanto bacterias como animales (incluidos humanos)–, vía la degradación de las nucleobases de purina por acción enzimática (Pizzichini *et al*., 1996; Rintoul *et al*., 2002; Johnson *et al*., 2009; Navone, 2014; Switzer *et al*., 2020). En las bacterias, las purinas se utilizan como fuentes secundarias de nitrógeno en condiciones de limitación de nutrientes y su degradación termina en la formación de la fuente primaria de nitrógeno.

Con esta información y su posible relevancia en nuestra zona de muestreo, ya que, sabemos que está afectada antropogénicamente, y de acuerdo a las evidencias de respuesta de los otros genes, donde *uidA* y *tuf* también detectaban *Shigella* spp u otras especies del género *Escherichia* (Walker *et al*., 2017; McQuillan & Wilson, 2019, 2021), en este trabajo se optó por el uso de *ybbW* ya que presentaba especificidad del 100% para *E. coli*, según los autores anteriormente mencionados.

Ante lo expuesto en relación a los problemas potenciales que pueden surgir en la identificación de grupos específicos y/o uso del gen marcador, otro paso necesario

para certificar los resultados, tuvo que ver con la validación de los cebadores u oligos y las sondas. La formación de estructuras secundarias, derivadas de la interacción cebador-cebador, cebador-sonda, o sonda-sonda, deben ser evitadas para maximizar el rendimiento del producto de amplificación y minimizar las amplificaciones inespecíficas (Johnston *et al.,* 2019). La confirmación de la no formación de estructuras secundarias viene basada en el análisis del incremento de la energía libre de Gibbs (ΔG) asociada a las interacciones entre las secuencias nucleotídicas de oligos y sondas (Gentilini *et al.*, 2010). El éxito de los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa depende en gran medida del correcto análisis *in silico* de la secuencia de ácidos nucleicos, antes de la etapa de ensayo en laboratorio (Kalendar *et al.*, 2017).

En este trabajo de tesis se han diseñado una amplia variedad de secuencias grupo y especie-específicas (ca. 30 y 45 secuencias, respectivamente) para los organismos objetivo. Todas ellas se han validado *in silico,* considerando los parámetros interferentes asociados a la hibridación de las secuencias de nucleótidos y el revelado de la señal (formación de estructuras secundarias, temperaturas de hibridación, y marcaje de sondas).

En concreto, del análisis de las estructuras secundarias de los juegos de oligos y sondas, se obtuvieron los datos recogidos en el Anexo III –Tablas A (III.1-III.5)–, pudiendo concluir que nuestros resultados apoyaban la idoneidad de estas secuencias para la determinación específica de los tipos bacterianos objetivo. Así, los valores de ΔG, en todos y todas ellas, se determinaron dentro del rango tolerable para verificar la validez de los mismos, es decir, las sondas y cebadores utilizados (Tabla III.7) no formaron horquillas con valores < -8 kcal/mol (Gentilini *et al.*, 2010), ni auto dímeros y dímeros cruzados con ΔG < -9 kcal/mol (Shen *et al.*, 2010).

La cuestión en torno a la especificidad de los métodos de determinación y cuantificación de FIB es crucial para el *savoir faire* en materia de gestión de un entorno litoral. La especificidad de los taxones, atendiendo a la filogenia, de los

pares de *primers* y sondas grupo-específicas para *Enterococcus* y *Escherichia/Shigella*, así como, para las especie-específicas *E. faecalis* y *E. faecium*, se valoraron mediante aproximación *in silico* a través de las herramientas *TestProbe* –ubicada en la base de datos *SILVA 138 SSU Ref NR High Quality Ribosomal RNA Databases* (https://www.arb-silva.de/search/testprobe/)–, *In Silico PCR Amplification* (http://insilico.ehu.es/PCR/) y *UGENE v33.0*.

En el caso particular de *SILVA*, está documentada como una de las herramientas más utilizadas en la realización de aproximaciones *in silico* para la especificidad de los taxones atendiendo a la filogenia de sondas de hidrólisis del gen *16S rRNA* (Quast *et al.*, 2013; Jo *et al.*, 2020).

A partir de los resultados obtenidos mediante *SILVA* se ha corroborado la especificidad de las sondas del gen *16S rRNA* especie-específicas diseñadas para *E. faecalis* y *E. faecium*, obteniendo porcentajes de cobertura significativos en los niveles taxonómicos correspondientes a estas especies (Tabla III.14). Esto nos permite confirmar la robustez de la especificidad de los ensayos especie-específicos diseñados para *E. faecalis* y *E. faecium.*

Igualmente, los resultados obtenidos para las sondas grupo-específicas del gen *16S rRNA* en *Enterococcus* y *Escherichia/Shigella*, arrojaron porcentajes de cobertura dentro del género y grupo del 87% y 80,8%, respectivamente, confirmando la especificidad esperada a este nivel taxonómico.

No obstante, cabe destacar que en otros niveles taxonómicos se obtuvieron porcentajes de cobertura significativos. En concreto, para la sonda grupo-específica de *Enterococcus,* significativo es el porcentaje de cobertura asignado a la clase Clostridia 4,4% (2 225 secuencias), así como a las familias Streptococcaceae y Lactobacillaceae, con 9,7% (520 secuencias) y 11,8% (561 secuencias) (Tabla III.14). Estos porcentajes se deben interpretar en el contexto del total de secuencias identificadas de *Enterococcus* y entendiendo que, en relación a otros taxones (clases y/o familias), estos últimos están muy distribuidos y mínimamente representados, de ahí el bajo porcentaje en apariencia. También, en el caso de la sonda grupo específica de *Escherichia/Shigella* significativo es el

porcentaje de cobertura obtenido para la familia Yersiniaceae 81,3% (985 secuencias) (Tabla III.16).

Todo ello viene a indicarnos que, a pesar de todas las aproximaciones en cuanto al diseño de sondas, las secuencias depositadas en las bases de datos también están sometidas a un margen de error en sus anotaciones. De ahí que los porcentajes de cobertura no sean exclusivamente específicos para los grupos- o especies *target*. Por tanto, las aproximaciones a la especificidad de la sonda *16S rRNA*, son orientativos, haciéndose necesaria completar la información obtenida por esta vía con las aproximaciones PCR *in silico* para una anotación taxonómica más precisa.

Para esta validación fueron empleadas las herramientas *In Silico PCR Amplification* y *UGENE v33.0*. La conjunción de ambas permitió aumentar el conocimiento en torno a la especificidad de los juegos de *primers* y sondas *16S rRNA* grupo- y especie-específicos para *Enterococcus*, y también para realizar la aproximación *in silico* del correspondiente gen codificante de la alantoína permeasa para *E. coli*.

Respecto al grupo específico de *Enterococcus* (Tabla III.15), nuestros *primers* y sondas confirman, mediante la obtención *in silico* de un único amplicón, tanto la especificidad a nivel de grupo –relacionándose además con especies de *Enterococcus* con un origen fecal antropogénico–, como las correspondientes a las especies específicas de *E. faecalis* y *E. faecium* (Tabla III.15).

Dado que la sonda de hidrólisis diseñada para el gen que codifica la alantoína permeasa no puede testarse con *SILVA*, ya que dicho software solo es válido para el gen *16S rRNA*, la garantía de los *primers* y sonda que amplifican el gen *ybbW*, solo se comprobó, como se mencionó previamente, a través de las herramientas de amplificación *in silico* (*In Silico PCR Amplification* y *UGENE*). Estas amplificaciones arrojaron resultados de especificidad, con un 95% de cobertura, para las cepas de *E. coli*. Por el contrario, en ningún caso se detectó otras especies del género *Escherichia* ni de *Shigella* (Tabla III.17).

En definitiva, los porcentajes de cobertura tanto a nivel de grupo (*Enterococcus* y *Escherichia /Shigella*), como de especie (*E. faecalis* y *E. faecium)*, mediante validación de las sondas *16S rRNA*, y la aproximación a través de amplificaciones *in silico* para el gen *ybbW* de *E. coli*, nos permite ratificar que el procedimiento para la identificación molecular de las FIB es adecuado.

Metodológicamente, además de la certeza en el uso de *primers* y sondas apropiadas, una cuantificación rápida también es importante para los estudios de microbiología ambiental. Como hemos dicho, esta tesis pretende aunar la rápida determinación de bacterias con la gestión de calidad de aguas. Por tanto, si bien el método de PCR cuantitativa ha demostrado un excelente rendimiento –rapidez, sensibilidad e inclusión de las cepas no cultivables en la determinación–, sí se hace necesario que haya una cierta estandarización en la cuantificación de las bacterias, con el fin de acometer las acciones propuestas en este trabajo para la correcta gestión acorde a lo reflejado en las normativas. Esta es la razón del abordaje de parámetros tales como el límite de detección, la eficacia de la qPCR o las validaciones, expuestas en la metodología y los resultados, sobre inclusividad (detección de la FIB) y exclusividad (no detección o detección simultánea con otras) de especies.

La eficiencia de amplificación de la PCR debe establecerse mediante curvas de calibración, ya que dicha calibración da una idea sencilla, rápida y reproducible de la sensibilidad analítica y la solidez del ensayo (Bustin & Wittwer, 2017). Todas las curvas estándar presentaron una correlación lineal adecuada ($R^2 \geq 0{,}960$) en un rango de 10^1 a 10^{12} nº de copias del gen, dependiendo si se relacionaban con grupo- o especie-específica, y con un rango de valores de pendiente de -3 a -3,19, lo que se adecúa a una muy buena eficiencia de la PCR a tiempo real (Zhang & Fang, 2006; Miotto *et al.*, 2019; valor medio de la pendiente of -3,3576). Los rangos de los límites de detección reportados en la bibliografía para la detección y cuantificación bacteriana oscilan significativamente (10^0-10^4 copias gen), dado que los resultados de los límites de detección (LDD) están estrechamente ligados

al diseño *in silico* y experimental, así como al gen amplificado y al organismo objetivo.

Ahondando en la eficiencia de las amplificaciones, cabe destacar que el método clásico de cuantificación asume que la eficiencia de amplificación es constante o incluso igual al 100% (Mallona *et al*., 2011). Un valor de eficiencia del 100% implica que durante la fase exponencial de la reacción de PCR en tiempo real se generan dos copias a partir de cada cadena molde disponible. No obstante, ese valor empírico de 100% no se ajusta a las múltiples evidencias experimentales (Ramakers *et al*., 2003), aceptándose eficiencias comprendidas entre diferentes rangos como 93-115% (Shahraki *et al*., 2019) o entre 80-115% (Zhang & Fang, 2006).

Por otro lado, el intercepto de "y", en las curvas C_t *vs*. log (número de copias) también es un indicador de la sensibilidad de la amplificación. Se ha reportado que valores de intercepto (C_t), correspondientes a 33 a 37 ciclos, es una buena medida de la precisión con la que la amplificación tiene lugar (Adams, 2006). Asumiendo que los valores empíricos recogidos en la bibliografía son los adecuados, sí que es cierto que estos parámetros pueden modificarse atendiendo a las especies de referencia y /o condiciones de aislamiento del ADN y su amplificación, potenciadores e inhibidores de la reacción de PCR, o de sustancias procedentes de la matriz de la muestra (Cankar *et al.*, 2006; Siefring *et al.*, 2008). Así, por ejemplo, la red europea de laboratorios de organismos modificados genéticamente (ENGL, *European Network of GMO Laboratories*) estableció que, para el análisis de estos organismos, los parámetros de la curva estándar deberían ser más restrictivos (Mazzara *et al*., 2008). En línea con lo expuesto, nuestras cepas de referencia no fueron aisladas de las matrices analizadas, sino adquiridas a través de un centro de referencia. Posiblemente esto afecta a que nuestro número de ciclos, 3-5 ciclos, se localice por encima del referenciado.

Relativo a la especificidad, como era de esperar, no se obtuvieron amplificaciones en los controles negativos. Además, para confirmar la adecuación de los parámetros de nuestra curva estándar con una buena amplificación, y por tanto la consistencia de nuestros resultados, se hizo una valoración con ADN

extraído de aguas residuales urbanas (ARU), procedentes del Campus Universitario de Tafira de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Los procedimientos de aislamiento del ADN y de amplificación para determinar las FIB se realizaron siguiendo aquellos previamente descritos en este trabajo. En la Tabla III.33 se muestran los resultados obtenidos, y tal como se refleja, hubo amplificaciones para cada uno de los grupos- y especies-específicas.

Tabla III.33. Cuantificación absoluta (nº de copias del gen 100 mL^{-1} ARU) y valores C_t, para los bioindicadores grupo-específicos *Enterococcus y Escherichia/Shigella* y especie específicos *E. faecalis, E. faecium y E. coli* en aguas residuales urbanas.

Grupo o especie objetivo	**Ct**	**Nº copias gen 100 mL^{-1}**
Enterococcus (*16S rRNA*)	19,3 ± 0,6	3,3 (1,42 x 10^{10}
Escherichia/Shigella (16S rRNA)	27,6 ± 1,2	7,2 (4,8) x 10^{7}
Enterococcus faecalis (*16S rRNA*)	31,4 ± 2,9	7,6 (9,9) x 10^{6}
Enterococcus faecium (*16S rRNA*)	21,5 ± 0,3	6,3 (0,9) x 10^{8}
Escherichia coli (*ybbW*)	26,9 ± 0,9	3,0 (1,6) x 10^{10}

Ct: Media ± sd (n=3); Nº de copias 100 mL^{-1}: Media expresada en notación científica (sd) (n=3)

En relación a la comparación entre datos PCR a tiempo real y aquellos procedentes de cultivo, se deduce que hay una buena correlación (R^2= 0,98) entre los logaritmos de UFC y el número de copias de las cepas de referencia. La relación lineal y el hecho de que la PCR a tiempo real funciona con una eficacia constante, confirmaron que la valoración de los grupos- y especies-específicos es correcta.

Sin embargo, esta relación con muestras ambientales parece ser menos evidente (Amann *et al*., 1995). En este tipo de muestras, la determinación mediante pruebas bioquímicas confirmativas necesarias para la identificación de especies-específicas, hace que frente a las medidas de PCR, no pueda presentarse una relación lineal como aquella obtenida con las cepas certificadas. La determinación de bacterias mediante métodos de cultivo, en los periodos establecidos por las normativas, puede suponer que el crecimiento bacteriano esté en fase de latencia lo que ralentizaría el contaje. También por otro lado, la determinación mediante PCR implica que se amplificarán tanto los ácidos nucleicos de células viables como no viables, ya que el ADN puede permanecer intacto después de la muerte celular, persistiendo a lo largo del tiempo (de días a semanas después de la misma).

De ahí que, la presencia de FIB viables puede sobrestimarse con el uso de la PCR en tiempo real.

Caso de estudio: Bahía del Confital

Como hemos avanzado y con fines de diagnóstico, la RT qPCR *multiplex* puede utilizarse para la detección de varios bioindicadores y patógenos en una sola muestra (Yang *et al.*, 2019; Shahraki *et al*., 2019). Así para este caso de estudio se ha revelado simultáneamente varios marcadores tanto de los grupos específicos de *Enterococcus* y *Escherichia/Shigella* como de las especies de *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. coli*. Este tipo de ensayo *multiplex* aúna la relativa simplicidad analítica con la posibilidad de detectar y cuantificar directamente la mayoría de los microorganismos indicadores de calidad. En este estudio y como también hemos relatado, se usaron dos tipos de indicadores: el primero usando el marcador molecular *16S rRNA* y el segundo el gen que codifica la alantoína permeasa (*ybbW*). Aunque ambas aproximaciones tenían el mismo propósito, los resultados fueron diferentes, siendo infructuosa cuando en los ensayos simultáneos estaba presente el gen *ybbW* y limitado para el gen *16S rRNA* de *E. faecium.* Este fallo en la RT qPCR *multiplex* puede ser explicado por varias causas. La primera es que el gen *ybbW* codifica la alantoína permeasa, entrando la alantoína en la célula cuando hay déficit o limitación de nutrientes, e iniciándose con su entrada la degradación metabólica de la misma (Figura III.4). Dado que su degradación rinde nitrógeno, pero el entorno medioambiental analizado es rico en este nutriente por la acción antropogénica, es posible que la expresión del gen se encuentre inhibida. Más aun, la obtención de ADN y el seguimiento del propio procedimiento requiere de varios pasos (p. ej. elución del ADN, diluciones, etc.) que no tienen un 100% de rendimiento. Esto unido a la poca expresión del gen, puede dar una señal deficiente.

No menos importante, es el tamaño del producto resultante de la amplificación. Como se determinó, el amplicón es de 203 pb para el gen *ybbW* y de 140 pb para el gen *16S rRNA* de *E. faecium,* comparado con los 103 pb de *E. faecalis* (Tabla III.18). Esta diferencia en el tamaño del amplicón en los diversos

ensayos *multiplex* podría estar afectando, conjuntamente con la poca expresión de los dos genes, *ybbW* y *16S rRNA*, a la eficiencia del ensayo, produciendo retrasos u ocultaciones en la detección de señal (Fratamico & Strobaugh, 1998). Un ejemplo claro de ello serían los datos correspondientes a C_t altos obtenidos para la valoración de *ybbW* individualmente –C_t E3 Primavera=36,78±0,8 y C_t E3 Invierno= 38,63±1,2 (C_t respectivos a los datos de abundancias absolutas recogidos en la Tabla III.28)–. Con estos resultados, es probable que el uso de cebadores deba considerarse de una manera más restrictiva en la *multiplex* de acuerdo al tamaño de los amplicones estimados. Esta consideración se vería apoyada por los resultados positivos obtenidos en la identificación de *E. coli* individualmente (Walker *et al*., 2017; Chevée *et al*., 2019).

De manera similar, en ensayos dúplex, para la determinación de *E. coli*, mediante *lacZ* y *uidA*, se generaron señales disminuidas en comparación con las obtenidas en amplificaciones independientes para cada uno de los segmentos (Bej *et al*., 1991). Estos autores nuevamente hacen referencia al tamaño de los fragmentos que amplificaban, y a que el contenido de citosinas y guaninas en las secuencias era diferente.

En nuestro estudio lo que parece claro es que tenemos dos comportamientos de acuerdo al organismo a amplificar. Por un lado, el hecho de que en *singleplex*, *E. faecium*, mediante *16S rRNA*, se haya podido identificar, pone de manifiesto que la limitada o la no determinación en los ensayos *multiplex* podría significar que las concentraciones de este segmento de gen son bajas –con límite de detección por debajo de los estimados–, lo que unido a un tamaño de amplicón relativamente alto (140 pb) comparado con los otros amplicones (80-100 pb), retrase y/o oculte aún más la señal.

En el caso de la detección del gen *ybbW* de *E. coli* en condiciones de *multiplex*, parece no adecuada, puesto que, en *singleplex* no se han podido determinar amplificaciones en todas las muestras. Más aun, no descartamos que este resultado podría coincidir con aquellos previamente reportados por otros investigadores donde se señalan que *E. coli* presenta baja detección cuando va

acompañada de otras bacterias patógenas tales como *Vibrio cholerae* (Motes *et al.*, 1992), *Aeromonas* (Ashbolt *et al.*, 1995), *Yersinia enterocolitica* y *Campylobacter jejuni* (Lund, 1996) en muestras de aguas de mar. De verificarse esta acepción, se pondría en duda el uso adecuado de *E. coli* como bioindicador.

¿Qué ocurre con la variación espacial y estacional de las FIB en la Bahía del Confital?

La elección de esta bahía viene dada por la existencia de picos de contaminación de origen desconocido, sin un patrón estacional determinado (Náyade, Sistema de Información Nacional de Aguas de Baño;http://nayadeciudadano.sanidad.gob.es/).

Los puntos de muestreo (estaciones) se seleccionaron en base al mayor uso que se les da a estas zonas de la bahía. Las tres localizaciones se caracterizan por depósitos de arena seca con zonas de baño de fondo arenoso, rodeadas de coladas volcánicas. Hace décadas, sobre estas coladas se asentaban infra-construcciones usadas como primera y/o segunda vivienda, con una presión antropogénica significativa. Además, la bahía se conformó por el deslizamiento de una parte del cono volcánico lo que da lugar a la presencia de una pared de coladas con oquedades que sirven de refugio a aves marinas.

El muestreo temporal ha permitido la comparación de dos etapas coincidentes con el comienzo de las restricciones de uso de la zona de baño (estación invierno) y transcurridos tres meses de esa prohibición (primavera), por tanto, las valoraciones no se han visto afectadas por el uso antropogénico de la playa.

En un intento de explicar a nivel microbiológico el funcionamiento de esta zona, el primer dato relevante es que la estación 2 es la más impactada por la presencia de los bioindicadores. Esta zona es justo la que mayor presión antropogénica ha recibido en las últimas décadas. A nivel de grupo, *Enterococcus* y *Escherichia/Shigella* son reportados en los muestreos en el agua de mar en concentraciones en número de copias no significativamente diferente entre las temporadas.

A nivel de especie, es posible discutir dos rasgos importantes de comportamiento en sus tendencias. Por una parte, *E. faecalis* mostraba una tendencia acompasada, tanto en el espacio como en el tiempo con el grupo *Enterococcus.* Por otra parte, la tendencia de *E. faecium* era al alza hacia las estaciones más septentrionales, como esta estación 2. En tercer lugar, *E. faecalis* y *E. faecium* aun habiendo sido determinadas, ninguna de las dos está en el orden obtenido para el grupo (10^7 copias del gen 100 mL^{-1} agua de mar).

De alguna manera, este dato nos indica que dentro del grupo *Enterococcus*, como es de esperar, se amplifica alguna que otra especie que no pertenece a estas dos especies utilizadas como FIB. Además, este dato estaría en consonancia con la posibilidad de determinar otras especies de *Enterococcus* que se encuentran en estado latente o naturalizadas en el ambiente salino, dado que, las especies de este grupo presentan una alta tolerancia a la salinidad (Noble *et al*., 2003), lo que les permite permanecer en el medio y poder ser determinadas incluso a bajas concentraciones con las técnicas de biología molecular. En esta línea, Badgley y colaboradores (2011) recogieron la formación de poblaciones ambientales de *enterococci* aparentemente estables y potencialmente naturalizadas, con capacidad para adaptarse a rangos amplios de temperatura y al NaCl (Huycke *et al*., 1998; Gilmore *et al*., 2013). De esta manera, estas poblaciones pueden confundir la valoración de *Enterococcus* considerados FIB, si estas están presentes en abundancia, ya que, también se han determinado en hábitats extraentéricos tales como arenas de playa, sedimentos, y aguas naturales (Byappanahalli *et al.*, 2012).

Más aun, el conocimiento del genoma que se tiene a día de hoy, ha permitido reconsiderar el concepto de bioindicador como aquel organismo predominante y procedente de un huésped determinado. Dada la propensión de ciertos enterococos a albergar varios elementos genéticos móviles en su genoma, además de, su resistencia natural y adaptabilidad, hace que la proliferación de nuevas cepas de *Enterococcus* sea un hándicap para su uso como bioindicador (Gilmore *et al*., 2013).

Significativo es el comportamiento de *Escherichia coli* en agua. Esta FIB es detectada en tiempo real de manera individual (Tabla III.28), pero no en simultáneo con otras especies. Como se ha indicado anteriormente, la determinación de *E coli* –en *multiplex* en tiempo real– puede ser nula o atenuada cuando se identifica simultáneamente con otras bacterias patógenas (Ashbolt *et al*., 1995; Lund, 1996). Si nos atenemos a las circunstancias de cerramiento de la playa, puede ocurrir que *E. coli* en agua de mar se encuentre en bajas concentraciones o que haya aportes de especies consideradas patógenas que inhiban su determinación. Aquí el papel de los sedimentos, como fuente de patógenos, sería fundamental cómo discutiremos a continuación.

Lo destacable del área, es el comportamiento de las FIB en los sedimentos. Por ejemplo, *Escherichia/Shigella* muestran picos de concentraciones en invierno (Figura III.7B), y es relevante que estas concentraciones son significativamente superiores en las estaciones septentrionales (estación 2 y 3) (Tabla III.29), con valores de concentración similares (orden 10^7 copias gen *16s rRNA* 100 g^{-1} sedimento) a aquellos obtenidos durante la determinación de manera individual (Tabla III.29). Este comportamiento, si lo comparamos con la matriz agua, nos permite inferir que la matriz de sedimento está desempeñando un papel en esta área que probablemente está afectando a la dinámica de la valoración de las FIB.

A priori, la identificación del grupo *Escherichia/Shigella* podría relacionarse con contaminación reciente por desechos animales o aguas residuales (Senkbeil *et al*., 2019; Holcomb *et al.*, 2020), mientras que específicamente *E. coli* estaría fuertemente influenciada por i) las altas concentraciones de NaCl, lo que tendría efectos drásticos en la concentración dado el aumento de la salinidad que se presupone retenida en los intersticios del sedimento; o, ii) afectada por otros patógenos no identificados.

Sin embargo, otras consideraciones también deben tenerse en cuenta, ya que, Luo y colaboradores (2011) recogieron que hasta 9 cepas de *E. coli*, adaptadas al medio ambiente, son indistinguibles fenotípica y taxonómicamente de la *E. coli* comensal y/o patógena. Las diferencias principales entre esas cepas ambientales y

esas otras asumidas como FIB radican en que i) las primeras pueden intercambiar material genético comparadas con las comensales/patógenas que no pueden; y ii) que estas últimas expresan genes diferentes que tienen que ver con la adaptación al medio.

Esto podría nuevamente explicar la alta concentración de copias del gen *16S rRNA* encontradas durante la determinación a nivel de grupo *Escherichia/Shigella*, frente a la no determinación de la especie *E. coli* en particular. Esto complica aún más una interpretación fiable de lo que ocurre en esta bahía porque podemos pensar en poblaciones naturalizadas (adaptadas en un hábitat secundario) que coexisten con esas patógenas (procedentes del hábitat primario). Si asumimos también, como dicen estos autores, que *E. coli* ambiental puede formar biopelículas frente a las patógenas, de vida libre (Luo *et al*. 2011), la respuesta de los sedimentos en la Bahía del Confital estaría apuntando a esta situación de poblaciones naturalizadas, máxime cuando el área de muestreo está asentada sobre coladas porosas, que habrían favorecido la especiación, el desarrollo de biopelículas maduras, y coadyuvado por una fuerte y consistente presión antropogénica de varias décadas.

En línea con lo descrito, este trabajo presenta oportunidades para la búsqueda de genes que diferencien a las cepas de *E. coli* entéricas frente a sus homólogas ambientales. Estos genes podrían representar biomarcadores robustos para el desarrollo de ensayos moleculares para la cuantificación de células de *E. coli* con mayor precisión.

Respecto a las especies de *Enterococcus,* y como se explicaba anteriormente, lo normal es que haya variables inherentes al proceso de extracción de ADN, tamaño de gen, etc., que afecten a la disminución de copias del gen *16s rRNA* durante la determinación en *multiplex*. Sin embargo, y dados nuestros resultados, donde las concentraciones de este grupo entre condiciones *single-* y *multiplex* (Tabla III.30) no se ven reducidas en el sedimento, sería importante retomar dos consideraciones asumidas por la aplicación propia de las normativas. La primera es que el diseño de cebadores se hizo sobre un grupo de *Enterococcus* que no incluye a *E. faecium* y probablemente tampoco, a otras especies presentes en estos entornos marinos, de

origen antropogénico o de otra índole. En segundo lugar, el grupo *Enterococcus* amplifica a 7 especies de origen fecal antropogénico, es decir al 70% de las especies depositadas de mismo origen (Tabla III.15), lo que efectivamente deja fuera a otros enterococos cuyo huésped no es humano o, la fuente no es fecal humana.

En esta línea, estas consideraciones también apoyarían la razón de la reducción de copias del gen *16s rRNA* tanto para *E. faecalis* como *E. faecium* con respecto al grupo *Enterococcus* en los sedimentos. Pero más aun, el sedimento cobra un papel esencial en la valoración de bioindicadores en el momento en el que ya se ha reportado la presencia de especies de FIB con resistencia a antibióticos (Di Cesare *et al*., 2012, 2013; Vignaroli *et al*., 2013, 2018; Korajkic *et al*., 2020), como serían algunas de las cepas de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* (Růžičková *et al*., 2020).

La dinámica costera además explicaría el movimiento de sedimentos entre las tres zonas de muestreo y con él, aquellas bacterias retenidas o adsorbidas sobre las partículas de arena. En particular, para esta bahía han sido documentados fenómenos costeros dependientes de las corrientes, a partir de las cuales la dinámica sedimentaria transporta en una dirección u otra el sustrato marino (Alonso & Vilas, 1996; Bilbao, 1999).

Significativamente, la prevalencia de FIB en el sedimento marino, respecto a la columna de agua, es una evidencia documentada por la literatura científica, considerándose al sedimento marino como reservorio de bacterias patógenas (Garrido-Pérez *et al*., 2008; Rumbal *et al*., 2021). Al tiempo, la resuspensión de los sedimentos debido al movimiento de las olas puede inducir a altas concentraciones de FIB, en las aguas circundantes (Halliday & Gast, 2011). Así, por ejemplo, se ha determinado que las gaviotas contribuyen a la contaminación fecal en las playas recreativas (Alderisio & DeLuca, 1999). En concreto, se ha reportado la presencia de *E. coli* y *Enterococcus sp.* en depósitos de guano de gaviota, a menudo en altas densidades –ca. 10^5-10^9 y 10^4-10^8 UFC g^{-1} materia fecal, respectivamente (Koskey, 2013)–, y persistiendo y creciendo en los

sedimentos de las playas, e inoculando, en ocasiones, las aguas cuando son perturbados por las olas o los nadadores (Kleinheinz *et al.*, 2006).

En definitiva, el comportamiento de las FIB en las aguas y los sedimentos de la Bahía del Confital centra la problemática actual del área, poniendo el foco en especies naturalizadas en la zona y cuya determinación y valoración va más allá de la medida de su concentración en el agua. Tomado como referencia los grupos y especies mencionados en la bibliografía, y trabajados en esta tesis, podemos resumir:

En relación a *Escherichia/Shigella*, puede haber otras especies de *Escherichia*, además de *E. coli*, presentes. Es muy factible que estas especies se hayan naturalizado y hayan sido retenidas en los intersticios de la arena formando biopelículas.

Respecto a *Enterococcus*, también podemos hablar de nuevas especies de *Enterococcus* no incluidas dentro de las FIB. La naturalización de las mismas podría haber favorecido especies resistentes.

El fundamento que nos permite hacer estas asunciones, relativas a la naturalización y coexistencia de estas "nuevas" especies (ambientales), con aquellas bioindicadoras, se entienden con el conocimiento del área de estudio donde i) hay entradas de aguas residuales no regularizadas; ii) las redes de saneamiento próximas están obsoletas o con instalaciones no adecuadas; iii) el posible embolsamiento de aguas residuales, durante años, en las cavidades volcánicas subterráneas, y su correspondiente incorporación a las aguas costeras por las dinámicas marinas; o iv) la removilización del sustrato marino tras las obras de acondicionamiento acometidas en los últimos años.

Por ello es preciso, en actuaciones futuras, realizar un monitoreo más exhaustivo, más allá de lo que la propia normativa señala (zonas de baño reguladas según RD 1347/2007), e incluir otros parámetros transversales (otras especies de *Enterococcus*, *Salmonella sp.*, *Clostridum perfringens*, *Bacteroides* spp, entre otros) y causales o influyentes (estado de la red de saneamiento, valoración de los

embolsamiento de aguas residuales en galerías subterráneas, fauna habitante de la línea de costa, uso de la playa, etc.) en los episodios contaminantes, para la compresión integra de la situación y dar soluciones de mejora.

Este trabajo propone incluir muestras de sedimentos marinos en los análisis rutinarios de valoración de *Enterococcus* y *Escherichia/Shigella*, además de estudios de trazabilidad de las fuentes de contaminación fecal que permitan distinguir la contaminación fecal humana de la no humana.

El método molecular *Microbial Source Tracking* (MST) se postula como uno de los más alentadores en cuanto a trazabilidad del origen de la contaminación. Esta herramienta, utilizada en varios trabajos para analizar el origen de contaminaciones fecales en aguas de baño (Converse *et al.*, 2009; Jofre *et al*., 2014; Shahraki *et al*., 2019; González-Fernández *et al*., 2021; Sinigalliano *et al*., 2021), permite determinar y cuantificar de manera robusta marcadores moleculares de trazabilidad del hospedador (marcador MST), mediante reacciones simultáneas RT qPCR, y a partir del cual se obtiene una huella génica de las fuente de contaminación de un área afectada concreta.

Algunos de los marcadores MST pertenecen al género de *Enterococcus*. Como queda recogido en la Tabla III.15, varias especies son específicas del hospedador y/o fuente, de ahí que en diferentes estudios de trazabilidad de contaminación fecal antropogénica y animal se hayan empleado ciertos tipos de enterococos como marcadores. Entre ellos la especie *Enterococcus casseliflavus* ha sido utilizada para dar trazabilidad a contaminaciones fecales de origen bovino (Molina, 2005, Purnell *et al*., 2011); *Enterococcus columbae* se ha propuesto como marcador de depósitos fecales de palomas (Layton *et al.*, 2010); *Enterococcus cecorum* se ha empleado como marcador MST de heces de aves –entre ellas gaviotas– (Aarestrup *et al.*, 2002; Layton et al., 2010), u otros no catalogados como marcadores MST, pero que podrían potencialmente utilizarse como tal. Un ejemplo claro de estos últimos sería el trazador de contaminación por material fecal excretada por ratas –*Enterococcus ratti* siendo este uno de los agentes etiológicos comunes de diarrea en ratas (*Rattus* spp)–.

Estos marcadores de trazabilidad, basados en especies de *Enterococcus*, se pueden complementar con otro tipo de marcadores MST para rastrear de forma fiable la fuente de contaminación (Layton *et al* 2010; Shahraki *et al*., 2019; González-Fernández *et al*., 2021; Sinigalliano *et al*., 2021). Varios organismos de diferente naturaleza (bacterias, arqueas y virus), en complemento a los enterococos, han sido sugeridos para este fin.

Entre ellos el marcador MST más destacable es el género bacteriano *Bacteroides*. Este grupo de bacterias gram negativas anaerobias ha cobrado un gran interés como marcadores MST debido a sus características favorables respecto a las FIB utilizadas actualmente. Estas características definen las ventajas principales del empleo de estos microorganismos, siendo algunas de ellas i) sus altas concentraciones en las heces; y ii) la baja probabilidad de persistencia o reproducción en el medio acuático (Shahraki *et al.*, 2019). Asimismo, señalar que, el uso de estas bacterias como bioindicador de contaminación fecal, ya había sido contemplado, pero el hándicap que plantea el cultivo rutinario de bacterias anaerobias impidió su catalogación como FIB (Converse *et al*., 2009; Vogt *et al*., 2018). Actualmente, esta problemática podría verse solventada con las técnicas moleculares, como las diseñadas, implementadas y discutidas en este trabajo. En esta línea, varios trabajos han descrito y utilizado sondas del gen *16S rRNA* de *Bacteroides* específicos del huésped – p. ej. *Bacteroides dorei* marcador HF183 específico de humanos (Nguyen *et al*., 2018; Ahmed *et al.*, 2019; Shahraki *et al.*, 2019); *Bacteroides* específicos del ganso de Canadá (*Branta canadensis*) (Vogt et al., 2018); de canes domésticos (*Canis lupus familiaris*); o de ganado porcino (*Sus scrofa domesticus*) (Okabe *et al.*, 2007)–.

Además, dentro de los procariotas también se han propuesto otras especies del filo Firmicutes, como por el ejemplo la especie *Catellicoccus marimammalium*, identificada como marcador de trazabilidad de contaminación de origen fecal procedente de gaviotas (Lee *et al.*, 2013; Sinigalliano *et al*., 2021), o la arquea *Methanobrevibacter smithii*, específica y predominante en la flora intestinal humana (Ufnar *et al*., 2006; Stewart *et al*., 2011; Nkamga *et al*., 2017).

Respecto a los virus, algunos bacteriófagos que infectan ciertas cepas de *Enterococcus* y *Bacteroides* también han sido reportados como potenciales marcadores MST. Las ventajas del uso de estos fagos vienen dadas por las altas concentraciones en las que están presentes en las aguas contaminadas –las cuales son invariables en el tiempo–, así como por su resistencia ante factores estresores naturales y antropogénicos (Purnell *et al*., 2011; Jofre *et al*., 2014). Sin embargo, existen evidencias respecto a las diferencias entre los bacteriófagos según su localización geográfica (Payán *et al*., 2005), lo que hace necesario aislar los huéspedes adecuados en cada una de las distintas zonas geográficas, intensificando el coste experimental y la dificultad en la estandarización del procedimiento.

Así, el presente trabajo pone en valor la metodología de detección y cuantificación simultánea diseñada e implementada, sentando así la base de futuros estudios de trazabilidad de la contaminación fecal. Además, a través de los resultados de nuestro trabajo, se plantea la hipótesis que a través de estas futuras investigaciones basadas en la herramienta *Microbial Source Tracking*, y el uso de *primers* y sondas especie-específicos de los marcadores MST de las especies de *Enterococcus columbae*, *Enterococcus cecorum*, *Enterococcus ratti*, la bacteria *Catellicoccus marimammalium*, los marcadores procariotas específico de humanos *Bacteroides dorei* marcador HF183 y *Methanobrevibacter smithii*, entre otros, así como la inclusión en la valoración de especies bacterianas patógenas como *Salmonella* spp y *Clostridium perfringens*, en conjunto con los cebadores y sondas diseñados, validados e implementados en este trabajo, se podrá obtener mayor información sobre los episodios de contaminación fecal de la Bahía del Confital.

REFERENCIAS

Aarestrup, F.M., Butaye, P., Witte, W., 2002. Nonhuman reservoirs of *enterococci*. En *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*. Eds. Gilmore, M.S., Acinas, S.G., Klepac-Ceraj, V., Hunt, D.E, Pharino, C., Ceraj, I., Distel, D. L., Polz., M.F. ASM press, Washington D.C., pp. 55-99.

Acinas, S.G., Klepac-Ceraj, V., Hunt, D.E, Pharino, C., Ceraj, I., Distel, D. L., Polz., M. F., 2004. Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. Nature, 430(6999), 551-554.

Adams, P.S., 2006. Data analysis and reporting. En *Real-time PCR*. Ed. Dorak, M.T. Taylor & Francis Group, Nueva York, pp. 39-62.

Ahmed, W., Payyappat, S., Cassidy, M., Besley, C., 2019. A duplex PCR assay for the simultaneous quantification of *Bacteroides* HF183 and crAssphage CPQ_056 marker genes in untreated sewage and stormwater. Environ. Int., 126, 252-259.

Alderisio, K.A., DeLuca, N., 1999. Seasonal enumeration of fecal coliform bacteria from the feces of ring-billed gulls (*Larus delawarensis*) and Canada geese (*Branta Canadensis*). Appl. Environ. Microbiol., 65 (12), 5628-5630.

Alía, A., Andrade, M. J., Córdoba, J.J., Martín, I., Rodríguez, A., 2020. Development of a multiplex real-time PCR to differentiate the four major *Listeria monocytogenes* serotypes in isolates from meat processing plants. Food Microbiol., 87, 103367.

Alonso, I., Vilas, F., 1996. Variabilidad sedimentaria en la playa de Las Canteras (Gran Canaria). Geogaceta, 20(2), 428-430.

Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev., 59(1), 143–169.

Andersen, C.B., Holst-Jensen, A., Berdal, K.G., Thorstensen, T., Tengs, T., 2006. Equal performance of TaqMan, MGB, molecular beacon, and SYBR green-based detection assays in detection and quantification of roundup ready soybean. J. Agric. Food. Chem., 54, 9658-9663

Ashbolt, N.J., Ball, A., Dorsch, M., Turner, C., Cox, P., Chapman, A., Kirov, S.M., 1995. The identification and human health significance of environmental aeromonads. Water Sci. Technol., 31(5-6),263–9.

Badgley, B.D., Thomas, F.I.M., Harwood, V.J., 2011. Quantifying environmental reservoirs of fecal indicator bacteria associated with sediment and submerged aquatic vegetation. Environ. Microbiol., 3,932-942.

Bej, A.K., Mahbubani, M.H., Atlas, R.M., 1991. Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol., 57, 597-600.

Bilbao, I.A., 1999. Medición del transporte de sedimentos por olas y corrientes. Vector Plus, 14, 13-23.

Bustin, S. A., Wittwer, C.T., 2017. MIQE: a step toward more robust and reproducible quantitative PCR. Clin. Chem., 63(9), 1537-1538.

Byappanahalli, M.N., Nevers, M.B., Korajkic, A., Staley, Z.R., Harwood, V.J., 2012. *Enterococci* in the environment. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 76, 685-706.

Cankar, K., Stebih, D., Dreo, T., Zel, J., Gruden, K., 2006. Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. BMC Biotechnol., 6(1), 1-15.

Chattaway, M.A., Schaefer, U., Tewolde, R., Dallman, T.J., Jenkins, C., 2017. Identification of *Escherichia coli* and *Shigella* species from whole-genome sequences. J. Clin. Microbiol., 55(2), 616-623.

Chevée, V., Sachar, U., Yadav, S., Heryanto, C., Eleftherianos, I., 2019. The peptidoglycan recognition protein PGRP-LE regulates the *Drosophila* immune response against the pathogen *Photorhabdus*. Microb. Pathog., 136, 103664.

Converse, R.R., Blackwood, A.D., Kirs, M., Griffith, J.F., Noble, R.T., 2009. Rapid QPCR-based assay for fecal *Bacteroides* spp as a tool for assessing fecal contamination in recreational waters. Water Res., 43(19), 4828-4837.

Crosby, L.D., Criddle., C.S., 2003. Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrn operon copy number heterogeneity. BioTechniques, 34, 790–794.

Cusa, E., Obradors, N., Baldomà, L., Badía, J., Aguilar, J., 1999. Genetic analysis of a chromosomal region containing genes required for assimilation of allantoin nitrogen and linked glyoxylate metabolism in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 181(24), 7479-7484.

D'agostino, M., Lemmet, T., Dufay, C., Luc, A., Frippiat, J.P., Machouart, M., Debourgogne, A., 2018. Overinduction of CYP51A Gene After Exposure to Azole Antifungals Provides a First Clue to Resistance Mechanism in *Fusarium solani* Species Complex. Microb. Drug Resist., 24(6), 768-773.

Dahllöf, I., Baillie, H., Kjelleberg, S., 2000. *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in *16S rRNA* gene intraspecies heterogeneity. Appl. Environ. Microbiol. 66, 3376–3380.

Davies, C.M., Long, J.A.H., Donald, M., Ashbolt, N.J., 1995. Survival of faecal microorganisms in marine and freshwater sediments. Appl. Environ. Microbiol., 61 (5), 1888–1896.

Davies, C.M., Bavor, I.I.J., 2000. The fate of storm water associated bacteria in constructed wetland and water pollution control pond system. J. Appl. Microbiol., 89 (2), 349–360.

Davies-Colley, R.J., Donnison, A.M., Speed, D.J., Ross, C.M., Nagels, J.W., 1999. Inactivation of faecal indicator microorganisms in waste stabilisation ponds: interaction of environmental factors with sunlight. Water Res., 33 (5), 1220–1230.

de Lipthay, J.R., Enzinger, C., Johnsen, K., Aamand, J., Sorensen., S. J., 2004. Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. Soil Biol. Biochem., 36,1607–1614.

Di Cesare, A., Vignaroli, C., Luna, G.M., Pasquaroli, S., Biavasco, F., 2012. Antibiotic-resistant *enterococci* in seawater and sediments from a coastal fish farm. Microb. Drug Resist., 18,502–509.

Di Cesare, A., Luna, G.M., Vignaroli, C., Pasquaroli, S., Tota, S., Paroncini, P., Biavasco, F., 2013. Aquaculture can promote the presence and spread of antibiotic-resistant *Enterococci* in marine sediments. PloS ONE, 8, e62838.

Directive 2006/7/EEC of the European Parliament and of the Council of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality. J. Eur. Union., 64,37–51.

Erdem, Ö., Saylan, Y., Cihangir, N., Denizli, A., 2019. Molecularly imprinted nanoparticles based plasmonic sensors for real-time *Enterococcus faecalis* detection. Biosens. Bioelectron., 126, 608-614.

Ewing, W.H., 1986. The genus *Escherichia* and the genus *Shigella*. En *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae*. Ed. Ewing, W.H., Elsevier Science Publishing Co, Nueva York, pp. 93-172.

Fratamico, P.M., Strobaugh, T.P., 1998. Simultaneous detection of *Salmonella* spp and *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 21, 92-98.

Galloway-Peña, J., Roh, J.H., Latorre, M., Qin, X., Murray, B.E., 2012. Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcus faecium*. PloS ONE, 7(1), e30187.

Garcia-Jimenez, P., García-Maroto, F., Garrido-Cárdenas, J.A., Ferrándiz, C., Robaina, R.R., 2009. Differential expression of the ornithine decarboxylase gene during carposporogenesis in the thallus of the red seaweed *Grateloupia imbricata* (Halymeniaceae). J. Plant Physiol., 166(16), 1745-1754.

Garrido-Pérez, M.C., Anfuso, E., Acevedo, A., Perales-Vargas-Machuca, J.A., 2008. Microbial indicators of faecal contamination in waters and sediments of beach bathing zones. Int. J. Hyg. Envir. Heal., 211(5-6), 510-517.

Gašparič, M.B., Cankar, K., Žel, J., Gruden, K., 2008. Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms. BMC Biotechnol., 8(1), 1-12.

Gauthier, F., Archibald, F., 2001. The ecology of "fecal indicator" bacteria commonly found in pulp and paper mill water systems. Water Res., 35(9), 2207-2218.

Gentilini, F., Turba, M.E., Calzolari, C., Cinotti, S., Forni, M., Zannoni, A., 2010. Real-time quantitative PCR using hairpin-shaped clone-specific primers for minimal residual disease assessment in an animal model of human non-Hodgkin lymphoma. Mol. Cel. Probes, 24(1), 6-14.

Gilmore, M.S., Lebreton, F., van Schaik, W., 2013 Genomic transition of *enterococci* from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. Curr. Opin. Microbiol., 16, 10–16.

González-Fernández, A., Symonds, E. M., Gallard-Gongora, J.F., Mull, B., Lukasik, J.O., Navarro, P.R., Badilla, A., Aguilar, J.P., Brown, M., Mora-Alvarado, D., Breitbart, M., Cairns, M.R., Harwood, V.J., 2021. Relationships among microbial indicators of fecal pollution, microbial source tracking markers, and pathogens in Costa Rican coastal waters. Water Res., 188, 116507.

Gotkowska-Płachta, A., 2021. The Prevalence of Virulent and Multidrug-Resistant *Enterococci* in River Water and in Treated and Untreated Municipal and Hospital Wastewater. Int. J. Environ. Res. Public Health, 18(2), 563.

Gouba, N., Yimagou, E.K., Hassani, Y., Drancourt, M., Fellag, M., Fonkou, M.D.M., 2020. *Enterococcus burkinafasonensis* sp. nov. isolated from human gut microbiota. New Microbes New Infect., 63, 100702.

Grützke, J., Malorny, B., Hammerl, J. A., Busch, A., Tausch, S.H., Tomaso, H., Deneke, C., 2019. Fishing in the soup–pathogen detection in food safety using metabarcoding and metagenomic sequencing. Front. Microbiol., 10, 1805.

Gupta, S., Bandyopadhyay, D., Paine, S.K., Gupta, S., Banerjee, S., Bhattacharya, S., Gachhuim R., Bhattacharyam, B., 2010. Rapid identification of mycobacterium species with the aid of multiplex polymerase chain reaction (PCR) from clinical isolates. Open Microbiol. J., 4,93-97.

Halliday, E., Gast, R.J., 2011. Bacteria in beach sands: an emerging challenge in protecting coastal water quality and bather health. Environ. Sci Technol., 45(2), 370-379.

Holcomb, D.A., Knee, J., Sumner, T., Adriano, Z., de Bruijn, E., Nalá, R., Cumming, O., Brown, J., Stewart, J.R., 2020. Human Fecal Contamination of Water, Soil, and Surfaces in Households Sharing Poor-Quality Sanitation Facilities in Maputo, Mozambique. Int. J. Hyg. Environ. Health, 226, 113496.

Huycke, M.M., Sahm, D.F., Gilmore, M.S. 1998. Multiple-drug resistant *enterococci*: the nature of the problem and an agenda for the future. Emerg. Infect. Dis., 4:239-249.

Jo, Y.J., Tagele, S.B., Pham, H.Q., Jung, Y., Ibal, J.C., Choi, S., Kang, G., Park, S., Kang, Y., Kim, S., Koh, H., Shin, J.H., 2020. *In Situ* profiling of the three dominant phyla within the human gut using TaqMan PCR for pre-hospital diagnosis of gut dysbiosis. Int. J. Mol. Sci., 21(6), 1916.

Jofre, J., Blanch, A.R., Lucena, F., Muniesa, M., 2014. Bacteriophages infecting *Bacteroides* as a marker for microbial source tracking. Water Res., 55, 1-11.

Johnson, R.J., Sautin, Y.Y., Oliver, W.J., Roncal, C., Mu, W., Sanchez-Lozada, G., Rodriguez-Iturbe, B., Nakagawa, T., Benner, S.A., 2009. Lessons from comparative physiology: could uric acid represent a physiologic alarm signal gone awry in western society? J. Comp. Physiol. B., 179(1), 67-76.

Johnston, A.D., Lu, J., Ru, K.L., Korbie, D., Trau, M., 2019. PrimerROC: accurate condition-independent dimer prediction using ROC analysis. Sci. Rep., 9(1), 1-14.

Kalendar, R., Khassenov, B., Ramankulov, Y., Samuilova, O., Ivanov, K.I., 2017. FastPCR: An *in silico* tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. Genomics, 109(3-4), 312-319.

Karp, P. D., Ong, W. K., Paley, S., Billington, R., Caspi, R., Fulcher, C., Kothari, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Midford, P.E., Subhraveti, P., Gama-Castro, S., Muñiz-Rascado, L., Bonavides-Martinez, C., Santos-Zavaleta, A., Mackie, A., Collado-Vides, J., Keseler, I.M., Paulsen, I., 2018. The ecocyc database. EcoSal Plus, 8(1).

Kleinheinz, G.T., McDermott, C.M., Chomeau, V., 2006. Evaluation of avian waste and bird counts as predictors of *Escherichia coli* contamination at Door County, Wisconsin beaches. J. Great Lakes Res., 32 (1), 117–123.

Korajkic, A., McMinn, B.R., Staley, Z.R., Ahmed, W., Harwood, V.J., 2020. Antibiotic-Resistant *Enterococcus* Species in Marine Habitats: A Review. Curr. Opin. Environ. Sci. Health, 16, 92-100.

Korotetskiy, I.S., Jumagaziyeva, A.B., Shilov, S.V., Kuznetsova, T.V., Suldina, N.A., Kenesheva, S.T., Ilin, A.I., Joubert, M., Taukobong, S., Reva, O.N., 2020. Differential gene expression and alternation of patterns of DNA methylation in the multidrug resistant strain *Escherichia coli* ATCC BAA-196 caused by iodine-containing nano-micelle drug FS-1 that induces antibiotic resistance reversion. BioRxiv.

Koskey, A.M., 2013. Transcending Microbial Source Tracking Techniques Across Geographic Borders: An Examination of Human and Animal Microbiomes and the Integration of Molecular Approaches in Pathogen Surveillance in Brazil and the United States. Tesis doctoral, Universidad de Wisconsin- Milwaukee, pp. 125.

Kudo, E., Israelow, B., Vogels, C.B., Lu, P., Wyllie, A.L., Tokuyama, M., Venkataraman, A., Brackney, D.E., Ott, I.M., Petrone, M.E., Earnest, R., Lapidus, S., Muenker, M.C., Moore, A.J., Casanovas-Massana, A., Yale, S., Omer, B., Dela Cruz, C.S., Farhadian, S.F., Ko, A.I., Grubaugh, N.D., Iwasaki, A., 2020. Detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex RT-qPCR. PLoS Biol., 18(10), e3000867.

Lan, R., Reeves, P.R., 2002. *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of *Shigella*. Microb. Infect., 4(11), 1125-1132.

Layton, B.A., Walters, S.P., Lam, L.H., Boehm, A.B., 2010. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. J. Appl. Microbiol., 109(2), 539-547.

Leclerc, H., Devriese, L.A., Mossel, D.A.A., 1996. Taxonomical changes in intestinal (faecal) *enterococci* and *streptococci*: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. J. Appl. Bacteriol., 81(5), 459-466.

Lee, C., Marion, J.W., Lee, J., 2013. Development and application of a quantitative PCR assay targeting *Catellicoccus marimammalium* for assessing gull-associated fecal contamination at Lake Erie beaches. Sci. Total Environ., 454, 1-8.

Levy, K., Woster, A.P., Goldstein, R.S., Carlton, E.J., 2016. Untangling the impacts of climate change on waterborne diseases: A systematic review of relationships between diarrheal diseases and temperature, rainfall, flooding, and drought. Environ. Sci. Technol., 50(10), 4905-4922.

Liu, B., Knirel, Y.A., Feng, L., Perepelov, A.V., Senchenkova, S.N., Wang, Q., Reeves, P.R., Wang., G., 2008. Structure and genetics of *Shigella* O antigens. FEMS Microbiol. Rev. 32, 627-653.

Lund, V., 1996. Evaluation of *E. coli* as an indicator for the presence of *Campylobacter jejuni* and *Yersinia enterocolitica* in chlorinated and untreated oligotrophic lake water. Water Res., 30(6), 1528-1534.

Luo, C., Walk, S.T., Gordon, D.M., Feldgarden, M., Tiedje, J.M., Konstantinidis, K.T., 2011. Genome sequencing of environmental *Escherichia coli* expands understanding of the ecology and speciation of the model bacterial species. Proc. Natl. Acad. Sci., 108(17), 7200-7205.

Luque-Escalona, A., 2004. Las áreas marinas protegidas en Canarias. Cartas Urbanas, 10, 52-171.

Maheux, A.F., Picard, F.J., Boissinot, M., Bissonnette, L., Paradis, S., Bergeron, M.G., 2009. Analytical comparison of nine PCR primer sets designed to detect the presence of *Escherichia coli/Shigella* in water samples. Water Res., 43(12), 3019-3028.

Maheux, A.F., Bissonnette, L., Boissinot, M., Bernier, J.L.T., Huppé, V., Picard, F.J., Bérubé, E., Bergeron, M.G, 2011. Rapid concentration and molecular enrichment approach for sensitive detection of *Escherichia coli* and *Shigella* species in potable water samples. Appl. Environ. Microbiol., 77(17), 6199-6207.

Mallona, I., Weiss, J., Egea-Cortines, M., 2011. pcrEfficiency: a Web tool for PCR amplification efficiency prediction. BMC Bioinformatics, 12(1), 1-7.

Mazzara, M., Savini, C., Delobel, C., Broll, H., Damant, A., Paoletti, C., Van den Eede, G., 2008. Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing. Ispra: Joint Research Centre, pp. 12.

McClung, R.P., Roth, D.M., Vigar, M., Roberts, V.A., Kahler, A.M., Cooley, L.A., Hilborn, E.D., Wade, T.J., Fullerton, K.E., Yoder, J.S., Hill, V.R., 2017. Waterborne disease outbreaks associated with environmental and undetermined exposures to water—United States, 2013–2014. Morb. Mortal Wkly. Rep., 66(44), 1222.

McQuillan, J.S., Wilson, M.W., 2019. 'Ready Mixed', improved nucleic acid amplification assays for the detection of *Escherichia coli* DNA and RNA. J. Microbiol. Methods, 165, 105721.

McQuillan, J.S., Wilson, M.W., 2021. Recombinase polymerase amplification for fast, selective, DNA-based detection of faecal indicator *Escherichia coli*. Lett. Appl. Microbiol., 72(4), 382-389.

Miotto, M., Júnior, A.A.F., Barretta, C., da Silva, H.S., Pellizzaro, T., Lindner, J.D.D., Viera, R.W., Parveen, S., Prudencio, E.S., 2019. Development and application of a real-time polymerase chain reaction method for quantification of *Escherichia coli* in oysters (*Crassostrea gigas*). Food Microbiol., 77, 85-92.

Miranda, J.M., Franco, C.M., Vázquez, B.I., Fente, C.A., Barros-Velázquez, J., Cepeda, A., 2005. Evaluation of Chromocult® *enterococci* agar for the isolation and selective enumeration of *Enterococcus* spp in broilers. Lett. Appl. Microbiol., 41(2), 153-156.

Molina, M., 2005. Temporal and spatial variability of fecal indicator bacteria: implications for the application of MST methodologies to differentiate sources of fecal contamination. Ecosystems Research Division, National Exposure Research Laboratory Athens, pp. 40.

Motes, M.L., DePaola, A., Capers, G.M., Zywno, S.R., McPhearson, R.M., 1992. *Cholera* and oysters: Mobile Bay, Alabama. Aquaculture 92': growing towards the 21st century. Aquaculture, 92, 165-169.

Murray, M.G., Thompson, W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res., 8, 4321-4325.

Nagy, B., 2013. Application of real-time polymerase chain reaction in the clinical genetic practice. J. Pediatr. Genet., 2, 1-8.

Nallapareddy, S.R., Wenxiang, H., Weinstock, G.M., Murray, B.E., 2005. Molecular characterization of a widespread, pathogenic, and antibiotic resistance-receptive *Enterococcus faecalis* lineage and dissemination of its putative pathogenicity island. J. Bacteriol., 187(16), 5709-5718.

Navone, L., 2014. Metabolismo de alantoína en *Streptomyces coelicolor*: relación entre metabolismo primario y secundario. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, pp. 173.

Nguyen, K.H., Senay, C., Young, S., Nayak, B., Lobos, A., Conrad, J., Harwood, V.J., 2018. Determination of wild animal sources of fecal indicator bacteria by microbial source tracking (MST) influences regulatory decisions. Water Res., 144, 424-434.

Nkamga, V.D., Henrissat, B., Drancourt, M., 2017. Archaea: essential inhabitants of the human digestive microbiota. Hum. Microbiome J., 3, 1-8.

Noble, R.T., Moore, D.F., Leecaster, M.K., McGee, C.D., Weisberg, S.B., 2003. Comparison of total coliform, fecal coliform, and *Enterococcus* bacterial indicator response for ocean recreational water quality testing. Water Res., 37(7), 1637-1643.

Ojeda, M.A., Alonso, I., Alcántara Carrió, J., 1996. Cartografía sedimentaria de la bahía de El Confital (Gran Canaria). Consideraciones sobre el transporte de sedimentos hacia la playa de Las Canteras. Geogaceta, 20(2) 374-377.

Okabe, S., Okayama, N., Savichtcheva, O., Ito, T., 2007. Identification and quantification of host-specific *Bacteroides–Prevotella 16S rRNA* genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwaters. Appl. Microbiol. Biotechnol., 74, 890-901.

Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. Bioinformatics, 28(8), 1166-1167.

Palmer, K.L., Godfrey, P., Griggs, A., Kos, V.N., Zucker, J., Desjardins, C., Cerqueira, G., Gevers, D., Walker, S., Wortman, j., Feldgarden, M., Hass, B., Birren, B., Gilmore, M.S., 2012. Comparative genomics of *enterococci*: variation in *Enterococcus faecalis*, clade structure in *E. faecium*, and defining characteristics of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*. MBio, 3(1), e00318-11.

Paolucci, M., Landini, M.P., Sambri, V., 2010. Traditional and molecular techniques for the early diagnosis of bacteraemia. Int. J. Antimicrob. Agents, 36(2), S6–S16.

Payán, A., Ebdon, J., Taylor, H., Gantzer, C., Ottoson, J., Papageorgiou, G.T., Blanch, A.R., Lucena, F., Jofre, J., Muniesa, M., 2005. Method for isolation of *Bacteroides* bacteriophages host strains suitable for tracking sources of faecal pollution in water. Appl. Environ. Microbiol. 71, 5659e5662.

Percudani, R., Carnevali, D., Puggioni, V., 2013. Ureidoglycolate hydrolase, amidohydrolase, lyase: how errors in biological databases are incorporated in scientific papers and vice versa. Database-Oxford, bact071.

Pizzichini, M., Pandolfi, M.L., Arezzini, L., Terzuoli, L., Fe, L., Bontemps, F., Van den Berghe, G., Marinello, E., 1996. Labelling of uric acid and allantoin in different purine organs and urine of the rat. Life Sci., 59(11), 893-899.

Purnell, S.E., Ebdon, J.E., Taylor, H.D., 2011. Bacteriophage lysis of *Enterococcus* host strains: a tool for microbial source tracking? Environ.Sci. Technol., 45(24), 10699-10705.

Qin, X., Galloway-Peña, J R., Sillanpaa, J., Roh, J.H., Nallapareddy, S R., Chowdhury, S., Bourgogne, A., Choudhury, T., Muzny, D.M, Buhay, C.J., Ding, Y., Dugan-Rocha, S., Liu, W., Kovar, C., Sodergren, E., Highlander, S., Worley, K.C, GibbS, R.A., Weinstock, G.M., Murray, B. E., 2012. Complete genome sequence of *Enterococcus faecium* strain TX16 and comparative genomic analysis of *Enterococcus faecium* genomes. BMC Microbiology, 12(1), 1-20.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res., 41(D1), D590-D596.

Ramakers, C., Ruijter, J., Deprez, R., Moorman, A., 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neurosci. Lett., 339,62-66.

Rasmussen, R., 2001. Quantification on the LightCycler. En *Rapid cycle real-time PCR*. Springer, Heidelberg, Berlín, pp. 21-34.

Real Decreto 1341/2007, de 11 de octubre, sobre la gestión de la calidad de las aguas de baño. Boletín Oficial del Estado, de 26 de octubre de 2007, 257, pp. 43620-43629.

Rintoul, M.R., Cusa, E., Baldomà, L., Badia, J., Reitzer, L., Aguilar, J., 2002. Regulation of the *Escherichia coli* Allantoin Regulon: Coordinated Function of the Repressor AllR and the Activator AllS. J. Mol. Biol., 324(4), 599-610.

Rumball, N.A., Mayer, H.C., McLellan, S.L., 2021. Selective survival of *Escherichia coli* phylotypes in freshwater beach sand. Appl. Environ. Microbiol., 87(4).

Růžičková, M., Vítězová, M., Kushkevych, I., 2020. The characterization of *Enterococcus* genus: resistance mechanisms and inflammatory bowel disease. Open Med., 15(1), 211-224.

Ryu, H., Henson, M., Elk, M., Toledo-Hernandez, C., Griffith, J., Blackwood, D., Noble, R., Gourmelon, M., Glassmeyer, S., Santo Domingo, J.W., 2013. Development of quantitative PCR assays targeting the 16S rRNA genes of *Enterococcus* spp. and their application to the identification of *Enterococcus* species in environmental samples. Appl. Environ. Microbiol., 79(1), 196-204.

San Millán RM, Martínez-Ballesteros I, Rementeria A, Garaizar J, Bikandi J., 2013. Online exercise for the design and simulation of PCR and PCR-RFLP experiments. BMC Res. Notes, 6, 513.

Santos-Zavaleta, A., Salgado, H., Gama-Castro, S., Sánchez-Pérez, M., Gómez-Romero, L., Ledezma-Tejeida, D., García-Sotelo, J.S., Alquicira-Hernández, K., Muñiz-Rascado, L.J., Peña-Loredo, P., Ishida-Gutiérrez, C., Velázquez-Ramírez, D.A., Del Moral-Chávez, V., Bonavides-Martínez, C., Méndez-Cruz, C.F., Galagan, J, Collado-Vides, J., 2019. RegulonDB v 10.5: tackling challenges to unify classic and high throughput knowledge of gene regulation in *E. coli* K-12. Nucleic Acids Res., 47(D1), D212-D220.

Senkbeil, J.K., Ahmed, W., Conrad, J., Harwood, V.J., 2019. Use of *Escherichia coli* Genes Associated with Human Sewage to Track Fecal Contamination Source in Subtropical Waters. Sci. Total Environ., 686, 1069-1075.

Settypalli, T.B.K., Lamien, C.E., Spergser, J., Lelenta, M., Wade, A., Gelaye, E., Loitsch, A., Minoungou, G, Rhiaucourt, F., Diallo, A., 2016. One-step multiplex RT-qPCR assay for the detection of Peste des petits ruminants virus, *Capripoxvirus*, *Pasteurella* multocida and *Mycoplasma capricolum* subspecies (ssp.) *capripneumoniae*. PloS ONE, 11(4), e0153688.

Shahraki, A.H., Heath, D., Chaganti, S.R., 2019. Recreational water monitoring: Nanofluidic qRT-PCR chip for assessing beach water safety. Environ. DNA, 1(4), 305-315.

Shen, Z., Qu, W., Wang, W., Lu, Y., Wu, Y., Li, Z., Hang, X., Wang, X., Zhao, D., Zhang, C., 2010. MPprimer: a program for reliable multiplex PCR primer design. BMC Bioinformatics, 11(1), 1-7.

Shibata, T., Solo-Gabriele, H.M., Fleming, L.E., Elmir, S., 2004. Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in an urban tropical environment. Water Res. 38, 3119-3131.

Shimada, T., Hirao, K., Kori, A., Yamamoto, K., Ishihama, A., 2007. RutR is the uracil/thymine-sensing master regulator of a set of genes for synthesis and degradation of pyrimidines. Mol. Microbiol., 66(3), 744-757.

Siefring, S., Varma, M., Atikovic, E., Wymer, L., Haugland, R.A., 2008. Improved real-time PCR assays for the detection of fecal indicator bacteria in surface waters with different instrument and reagent systems. J. Water Health, 6(2), 225-237.

Silkie, S.S., Tolcher, M.P., Nelson, K.L., 2008. Reagent decontamination to eliminate false-positives in *Escherichia coli* qPCR. J. Microbiol. Methods, 72(3), 275-282.

Sinigalliano, C., Kim, K., Gidley, M., Yuknavage, K., Knee, K., Palacios, D., Bautista, G., Bonacolta, A., Lee, H.W., Maurin, L., 2021. Microbial Source Tracking of Fecal Indicating Bacteria in Coral Reef Waters, Recreational Waters, and Groundwater of Saipan by Real-Time Quantitative PCR. Front. Microbiol., 11, 3486.

Sinton, L.W., Davies-Colley, R.J., Bell, R.G., 1994. Inactivation of *enterococci* and faecal coliforms from sewage and meatwork effluents in seawater chambers. Appl. Environ. Microbiol., 60(6), 2040–2048.

Šplíchalová, P., Švec, P., Sedláček, I., Mašlaňová, I., Černohlávková, J., Ghosh, A., Zurek., L., Radiměřský, T., Literák, I., 2013. *Enterococcus alcedinis* sp. nov., isolated from common kingfisher (*Alcedo atthis*). United Kingdom: Society for General Microbiology, 63(8), 3069-3074.

Stentström, T.A., Carlander, A., 2001. Occurrence and die-off of indicator organisms in the sediment in two constructed wetlands. Water Sci. Technol., 44(11-12), 223-230.

Stewart, J.R., Fleming, L.E., Fleisher, J.M., Abdelzaher, A.M., Lyons, M.M., 2011. Waterborne pathogens. En *Marine Pollution and Human Health*. Ed. Hester, R.E., Royal Society of Chemistry, Londres, pp. 25-67.

Switzer, A., Burchell, L., McQuail, J., Wigneshweraraj, S., 2020. The adaptive response to long-term nitrogen starvation in *Escherichia coli* requires the breakdown of allantoin. J. Bacteriol., 202(17), e00172-20.

Takakura, T., Francis, R., Anani, H., Bilen, M., Raoult, D., Khalil, J.B., 2019. *Enterococcus mediterraneensis* sp. nov., a new bacterium isolated from the stool of a 39-year-old Pygmy. New Microbes New Infect., 32, 100599.

Tedim, A.P., Ruiz-Garbajosa, P., Corander, J., Rodríguez, C. M., Cantón, R., Willems, R.J., Baquero, F., Coque, T.M., 2015. Population biology of intestinal *Enterococcus* isolates from hospitalized and nonhospitalized individuals in different age groups. Appl. Environ. Microbiol., 81(5), 1820-1831.

Ufnar, J.A., Wang, S.Y., Christiansen, J.M., Yampara-Iquise, H., Carson, C A., Ellender, R.D., 2006. Detection of the *nifH* gene of *Methanobrevibacter smithii*: a potential tool to identify sewage pollution in recreational waters. J. Appl. Microbiol., 101(1), 44-52.

Vignaroli, C., Luna, G. M., Pasquaroli, S., Di Cesare, A., Petruzzella, R., Paroncini, P., Biavasco, F., 2013. Epidemic *Escherichia coli* ST131 and *Enterococcus faecium* ST17 in coastal marine sediments from an Italian beach. Environ Sci. Technol., 47(23), 13772-13780.

Vignaroli, C., Pasquaroli, S., Citterio, B., Di Cesare, A., Mangiaterra, G., Fattorini, D., Biavasco, F., 2018. Antibiotic and heavy metal resistance in *Enterococci* from coastal marine sediment. Environ Pollut., 237, 406-413.

Villar, C., De Cabo, L., Vaithiyanathan, P., Bonetto, C., 1999. Pore water N and P concentration in a floodplain marsh of the Lower Parana River. Hydrobiology, 392(1), 65–71.

Vogels, G.D., van der Drift, C., 1976. Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. Bacteriol. Rev., 40, 403-468.

Vogt, N.A., Pearl, D.L., Taboada, E.N., Mutschall, S.K., Janecko, N., Reid-Smith, R., Jardine, C.M., 2018. Epidemiology of *Campylobacter*, *Salmonella* and antimicrobial resistant *Escherichia coli* in free-living Canada geese (*Branta canadensis*) from three sources in southern Ontario. Zoonoses Public Health, 65, 873–886

Walker, D.I., McQuillan, J., Taiwo, M., Parks, R., Stenton, C. A., Morgan, H., Lees, D. N., 2017. A highly specific *Escherichia coli* qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters. Water Res., 126, 101-110.

Walters, S.P., Thebo, A.L., Boehm, A.B., 2011. Impact of urbanization and agriculture on the occurrence of bacterial pathogens and stx genes in coastal waterbodies of central California. Water Res., 45(4), 1752-1762.

Wang, Y., Qian, P.Y., 2009. Conservative fragments in bacterial *16S rRNA* genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. PloS ONE, 4(10).

Webster, G., Newberry, C.J., Fry, J.C., Weightman, A.J., 2003. Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. J. Microbiol. Methods, 55,155–164.

Wheeler, E.A., Burke, J., Spain, A., 2003. Faecal indicator bacteria are abundant in wet sand at freshwater beaches. Water Res. 37, 3878–3983.

Whelan, J.A., Russell, N.B., Whelan, M.A., 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. J. Immunol. Methods, 278(1-2), 261-269.

Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev., 51(2), 221–271.

Wohlwend, N., Tiermann, S., Risch, L., Risch, M., Bodmer, T., 2016. Evaluation of a multiplex real-time PCR assay for detecting major bacterial enteric pathogens in fecal specimens: intestinal inflammation and bacterial load are correlated in *Campylobacter* infections. J. Clin. Microbiol., 54(9), 2262-2266.

Xi, H., Schneider, B.L., Reitzer, L., 2000. Purine catabolism in *Escherichia coli* and function of xanthine dehydrogenase in purine salvage. J. Bacteriol., 182(19),5332-5341.

Yang, Y., Rajendran, V., Jayaraman, V., Wang, T., Bei, K., Krishna, K., Rajasekaran, K., Rajasekaran, J.J., Krishnamurthy, H., 2019. Evaluation of the Vibrant DNA microarray for the high-throughput multiplex detection of enteric pathogens in clinical samples. Gut Pathog., 11(1), 1-12.

Zhang, T., Fang, H.H., 2006. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. Appl. Microbiol. Biotechnol., 70(3), 281-289.

Zhang, Q., Ishii, S., 2018. Improved simultaneous quantification of multiple waterborne pathogens and fecal indicator bacteria with the use of a sample process control. Water Res., 137, 193-200.

Zuo, G., Xu, Z., Hao, B., 2013. Shigella strains are not clones of *Escherichia coli* but sister species in the genus *Escherichia*. Genomics Proteomics Bioinformatics, 11(1), 61-65.

ANEXO III

A continuación, se muestran los resultados de los análisis de las estructuras secundarias de los ensayos *singleplex* y *multiplex* RT qPCR.

Tabla A.III.1. Análisis de las estructuras secundarias de los oligos y sondas de hidrólisis empleados en los ensayos TaqMan *singleplex* EN, ES, Ef, EFium y EC*ybbW*, realizado con el software *Beacon Designer* **(**Premier Biosoft International).

Bioindicador	***Primers y* sonda**	**Orientación del oligo**	**Estructura secundaria**		
			Cross dimer [a] (ΔG)	***Self dimer*** [a] (ΔG)	***Hairpin*** [b] (ΔG)
Enterococcus	EF399F	*Forward*	-1,0	-1,0	-1,0
	EF484R	*Reverse*	-1,0	-1,6	-0,8
	ProbeEF1		-2,1* / -2,9**	-5,2	-0,7
Escherichia /Shigella	EC501F	*Forward*	-5,2	-1,4	-1,4
	EC604R	*Reverse*	-5,2	-8,8	-0,8
	ProbeEC1		-4,3* / -2,4**	-2,9	0,0
Enterococcus faecalis	EF1203F	*Forward*	0,0	0,0	0,0
	EF1305R	*Reverse*	0,0	-3,4	0,0
	ProbeEF2		-6,7* / -3,5**	-5,2	-1,5
Enterococcus faecium	EFium96F	*Forward*	-1,5	0,0	0,0
	EFium225R	*Reverse*	-1,5	0,0	0,0
	ProbeEFium1		-2,9* / -2,9**	-6,6	-6,6
Escherichia coli	*ybbW*F	*Forward*	-3,9	-4,4	-0,4
	*ybbW*R	*Reverse*	-3,9	0,0	0,0
	Probe *ybbW*		-4,3* / 0,0**	-3,4	-2,0

* Valores de ΔG entre la sonda y el oligo con orientación *forward.*

** Valores de ΔG entre la sonda y el oligo con orientación *reverse.*

[a] ΔG tolerados en estructuras secundarias, *cross dimer* o dímeros cruzados, y, *self dimer* o auto dímeros ΔG > -9 kcal/mol (Shen *et al.*, 2010).

[b] Valores tolerables de ΔG en la formación de horquillas o *hairpins* > -8 kcal/mol (Gentilini *et al*., 2010).

Tabla A.III.2. Análisis de los dímeros cruzados formados entre los oligos y sondas de hidrólisis del gen *16S rRNA* grupo-específicas EN1 y ES1, empleados simultáneamente en el ensayo *multiplex* 1 (M1). Análisis realizado con el software *Beacon Designer* **(**Premier Biosoft International).

		Escherichia coli		
		Primer forward (EC501F)	***Primer reverse*** (EC604R)	**Sonda de hidrólisis** (ProbeEC1)
Enterococcus faecalis	***Primer forward*** (EF399F)	0,0	0,0	-1,9
	Primer reverse (EF484R)	-5,8	-2,4	-2,9
	Sonda de hidrólisis (ProbeEF1)	-2,9	-5,2	-4,3

Los valores > -9 kcal/mol de ΔG son toleradas en estructuras secundarias del tipo dímeros cruzados (Shen *et al.*, 2010).

Tabla A.III.3. Análisis de los dímeros cruzados formados entre de los oligos y sondas de hidrólisis especie-específicos de los bioindicadores *Enterococcus faecalis* (*16S rRNA*), *Enterococcus faecium* (*16S rRNA*) *y Escherichia coli* (*ybbW*), empleados simultáneamente en el ensayo *multiplex* 2 (M2). Análisis realizado con el software *Beacon Designer* **(**Premier Biosoft International).

		Enterococcus faecalis			***Enterococcus faecium***		
		Primer forward (EF1203F)	***Primer reverse*** (EF1305R)	**Sonda de hidrólisis** (ProbeEF2)	***Primer forward*** (EFium96F)	***Primer reverse*** (EFium225R)	**Sonda de hidrólisis** (ProbeEFium1)
Enterococcus faecalis	***Primer forward*** (EF1203F)						
	Primer reverse (EF1305R)						
	Sonda de hidrólisis (ProbeEF2)						
Enterococcus faecium	***Primer forward*** (EFium96F)	-1,5	-2,4	-2,9			
	Primer reverse (EFium225R)	-1,8	-2,4	-2,9			
	Sonda de hidrólisis (ProbeEFium1)	-1,5	-2,0	-4,7			
Escherichia coli	***Primer forward*** (*ybbW*F)	-2,4	-2,4	-2,4	-2,4	-2,3	-3,0
	Primer reverse (*ybbW*R)	-5,8	-1,8	-4,2	-7,5	-4,2	-4,8
	Sonda de hidrólisis (Probe*ybbW*)	-2,4	-3,4	-4,4	-7,2	-1,3	-2,6

Los valores >-9 kcal/mol de ΔG son toleradas en estructuras secundarias del tipo dímeros cruzados (Shen *et al*., 2010).

Tabla A.III.4. Análisis de los *cross dimer* formados entre de los oligos y sondas de hidrólisis de los bioindicadores *Escherichia/Shigella* (*16S rRNA*) *y Escherichia coli* (*ybbW*), empleados simultáneamente en el ensayo *multiplex* 3 (M3). Análisis realizado con el software *Beacon Designer* **(**Premier Biosoft International).

		Escherichia / Shigella		
		Primer forward (EC501F)	***Primer reverse*** (EC604R)	**Sonda de hidrólisis** (ProbeEC1)
Escherichia coli	***Primer forward*** (*ybbW*F)	-2,4	-5,4	-2,4
	Primer reverse (*ybbW*R)	-8,1	-0,7	-4,8
	Sonda de hidrólisis (Probe *ybbW*)	-2,4	-2,5	-4,1

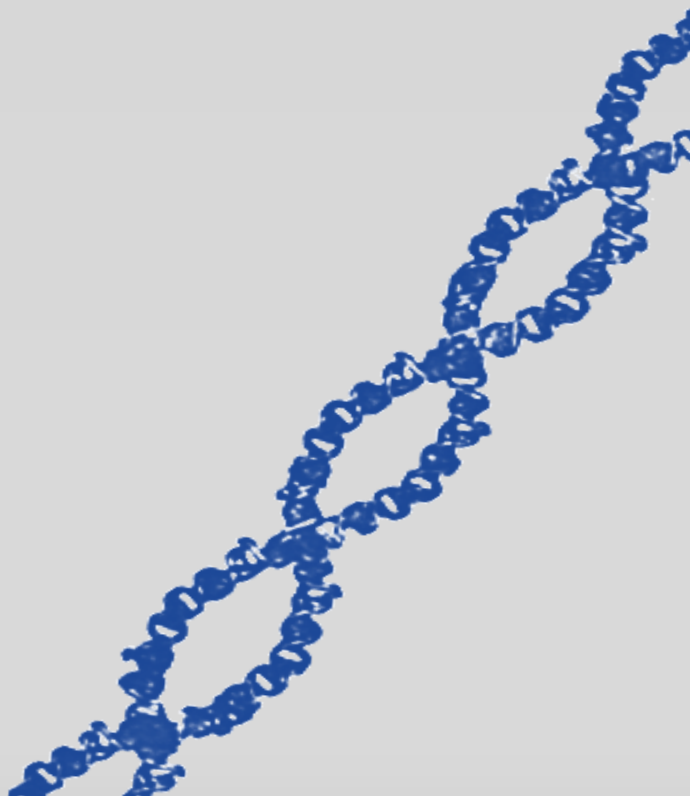
Los valores >-9 kcal/mol de ΔG son toleradas en estructuras secundarias del tipo dímeros cruzados (Shen *et al.*, 2010).

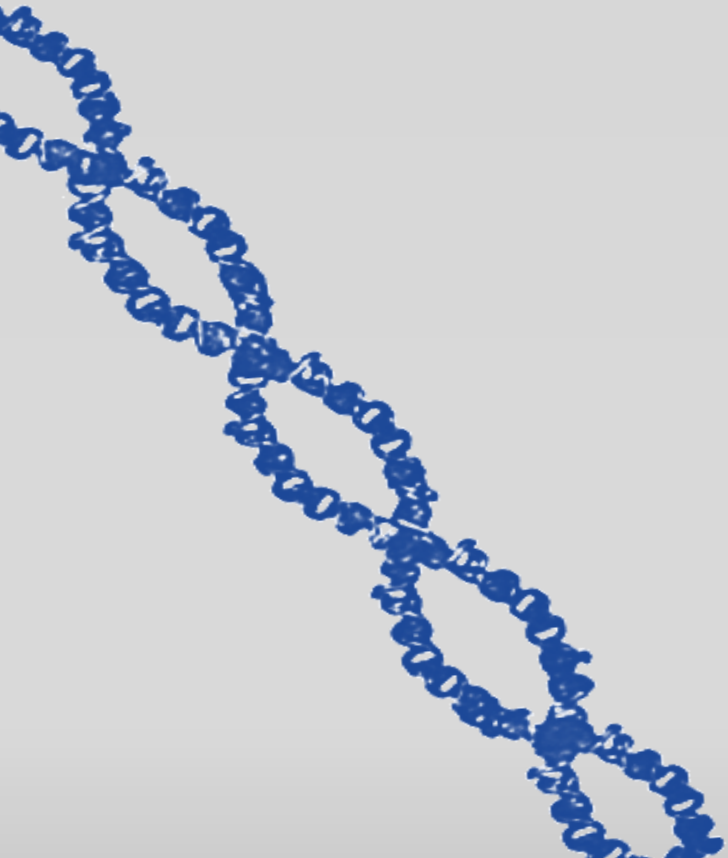
Tabla A.III.5. Análisis de los dímeros cruzados formados entre de los oligos y sondas de hidrólisis del gen *16S rRNA* especie-específicos de los bioindicadores *Enterococcus faecalis y Enterococcus faecium*, empleados simultáneamente en el ensayo *multiplex 4* (M4). Análisis realizado con el software *Beacon Designer* **(**Premier Biosoft International).

		Enterococcus faecalis		
		Primer forward (EF1203F)	***Primer reverse*** (EF1305)	**Sonda de hidrólisis** (Probe EF2)
Enterococcus faecium	***Primer forward*** (EFium96F)	-1,5	-2,4	-2,9
	Primer reverse (EFium225R)	-1,8	-2,4	-2,9
	Sonda de hidrólisis (Probe Efium1)	-1,5	-2,0	-4,7

Los valores >-9 kcal/mol de ΔG son toleradas en estructuras secundarias del tipo dímeros cruzados (Shen *et al.*, 2010).

Conclusiones Generales
General Conclusions





Conclusiones Generales

- Primero. En este trabajo, se han diseñado cebadores y optimizado procedimientos para la valoración del gen *16S rRNA* tanto grupo- como especie-específicos para distintos bioindicadores tales como *Escherichia/Shigella*, *Enterococcus* spp, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, y para los patógenos *Salmonella* spp, y *Legionella* spp.

- Segundo. La aplicación de estos diseños y procedimientos ha permitido su implementación en dos sistemas bien diferenciados. Por un lado, las membranas de ósmosis inversa, y por otro, las salinas costeras.

- Tercero. *Sphingomonas* y *Pseudomonas* reportadas en las membranas de ósmosis inversa son los grupos mayoritarios. Mientras *Halobacterium*, *Halorubrum* y *Salinibacter* lo son en ambientes extremófilos. Estos resultados abren un marco de trabajo interesante para el estudio de estos géneros de procariotas, tanto en la formación de biopelículas como en la síntesis de compuestos bioactivos de interés.

- Cuarto. Los perfiles de restricción de los genes marcadores *16S rRNA* y *lacZ* han permitido evaluar cambios en las estructuras poblacionales bacterianas. Las modificaciones de los perfiles cuando se comparan los sistemas de depuración de aguas residuales, en presencia de plantas y sin plantas, nos han permitido reconocer el sistema con el mejor rendimiento.

- Quinto. Se propone gracias al desarrollo de este trabajo el uso de sistemas naturales de humedales de depuración, basados en sustratos orgánicos y con plantas, por la capacidad de biorremediación que manifiestan.

- Sexto. La detección y cuantificación simultánea de bioindicadores de contaminación fecal mediante *multiplex* a tiempo real, usando genes codificantes como el *ybbW* y no codificantes como el *16S rRNA*, ha sido otro hito alcanzado en este trabajo. Así, el desarrollo e implementación de este método, en agua y sedimentos marinos, ha permitido la evaluación espacio-temporal de los bioindicadores valorados, evidenciándose que los sedimentos marinos son un reservorio importante para los bioindicadores fecales.

- Séptimo. Este trabajo propone la inclusión de los sedimentos marinos en las labores de monitorización de las zonas de baño para obtener un mayor conocimiento del estado de la calidad de sus aguas.

General Conclusions

- First. In this study, primers have been designed and procedures have been optimised for the assessment of the *16S rRNA* gene, both group- and species-specific for different bioindicators such as *Escherichia/Shigella*, *Enterococcus* spp, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, and for the pathogens *Salmonella* spp, y *Legionella* spp.

- Second. The application of these designs and procedures has allowed their implementation in two well differenced systems: the reverse osmosis membranes and the coastal saltworks.

- Third. *Sphingomonas* and *Pseudomonas* reported in reverse osmosis membranes, are the major groups. Meanwhile, *Halobacterium*, *Halorubrum* and *Salinibacter* are the major groups in extremophilic environments. These results open an interesting framework for the study of these prokaryotic genera, both in the formation of biofilms and in the synthesis of bioactive compounds of interest.

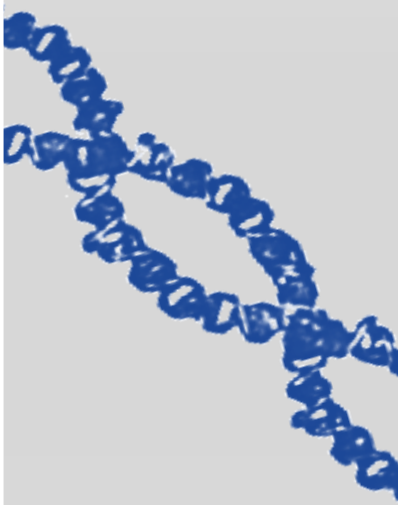
- Fourth. The restriction profiles of the *16S rRNA* and *lacZ* marker genes have allowed us to evaluate changes in bacterial population structures. The application of this work in wetlands has revealed these modifications when the plant and non-plant depuration systems are compared, which has allowed us to recognise the best performances of these systems.

- Fifth. As a result of this study, the use of natural wetlands treatments systems based on organic substrates and plants is proposed due to their bioremediation capacity.

- Sixth. The simultaneous detection and quantification of bioindicators of faecal contamination by real-time multiplex, using encoding genes such as *ybbW* and non-encoding genes such as *16S rRNA*, has been another milestone achieved in this work. Thus, the development and implementation of this method, in water and marine sediments, has allowed the spatio-temporal evaluation of the bioindicators assessed, showing that marine sediments are an important reservoir for faecal bioindicators.

- Seventh. This work proposes the inclusion of the marine sediments in the monitoring of the bathing areas to gain a better understanding of their water quality status.

¿Cómo evaluamos el impacto de las actividades humanas en los ecosistemas? ¿Qué puede decirnos la microbiota sobre el medioambiente y su relación con la salud ambiental? ¿Puede la identificación y caracterización de las comunidades de procariotas ayudar a la resolución de problemas de carácter industrial y biotecnológico? Para dar respuesta a todas estas preguntas es necesario recurrir a la valoración de bioindicadores microbianos tales como las bacterias y arqueas.



ULPGC
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
Departamento de Biología