

ECOLOGIA, APLICACIONES BIOTECNOLOGICAS Y SISTEMATICA DE PROTISTAS

Lucía Arregui, Pilar Calvo, Almudena Guinea, Mercedes Martín-Cereceda, Blanca Pérez-Uz, Humbert Salvadó y Susana Serrano.

Dirección del Grupo: Almudena Guinea y Susana Serrano

Departamento de Microbiología III, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid

Departamento Facultad de Biología, Universidad de Barcelona

La investigación sobre la sistemática y biología celular, especialmente los elementos citoesqueléticos y procesos morfogenéticos en protozoos ciliados fue introducida en España, entre otros, por el profesor D. Dimas Fernández-Galiano que formó un extenso grupo de profesionales en el campo de la protozoología/protistología. El grupo contaba con una amplia experiencia y numerosos trabajos nacionales e internacionales en sistemática de protozoos/protistas, cuando se inició en 1990 la que ha constituido nuestra línea prioritaria: el estudio de las comunidades microbianas, especialmente de protistas, en los sistemas de depuración de aguas residuales. Nuestro interés se ha centrado, durante estos años, en la caracterización de las poblaciones de protozoos/protistas, su estructura y función en los reactores biológicos de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) y la relación con los factores físico-químicos y operacionales de las plantas. La función de esta comunidad microbiana en el sistema y su utilidad bioindicadora pueden aplicarse al control de la eficiencia y el estado del proceso. Puesto que en la actualidad existen diversos tipos de depuradoras, diseñadas, entre otros factores, en función de la cantidad y la naturaleza de los vertidos, es importante determinar las diferencias existentes en los parámetros biológicos que pueden ser aplicados en cada caso. Estos estudios se han llevado a cabo con la financiación de los Ministerios de Educación y Ciencia e Innovación y Tecnología, así como proyectos de la Comunidad Autónoma de Madrid y la Universidad Complutense, colaborando con diversas empresas del sector del agua en distintas comunidades autónomas (Canal de Isabel II-Madrid, EMASESA-Sevilla, Aguas de Valencia-EGEVASA- Valencia y Aguas de Barcelona-Barcelona) y con otras Universidades como la Universidad de Barcelona y la Universidad Politécnica de Valencia. En el año 2004, nuestro grupo fue reconocido como Grupo Consolidado de Investigación Complutense 910672 - Ecología, aplicaciones biotecnológicas y sistemática de protistas. .

Se ha colaborado también en un Proyecto Europeo IBAES en el periodo 2002-2005 (HP3) (Workpackage: Microorganisms of activated sludge. Contract nº EVK2-CT-2002-80009, Proposal nº EVK2-2002-00503) financiado por EC 5th Framework Program. Research and Technological development Programme: "Energy, Environment and Sustainable Development" coordinado por el Department of Hydrobiology, Institute of Environmental Sciences, Jagiellonian University (Cracow, Poland).

Las depuradoras de aguas residuales con sistemas de lodos activos, se basan en el desarrollo de una comunidad microbiana estable que se mantiene en agregados o flóculos, formados fundamentalmente por bacterias, protistas y material polimérico extracelular, que constituyen la unidad funcional del sistema. Nuestros primeros estudios se orientaron a la caracterización de la comunidad de protozoos en varias depuradoras

convencionales de lodos activos de la Comunidad de Madrid, para ello se realizaron seguimientos quincenales o mensuales del reactor, analizándose en el laboratorio, las variaciones en los parámetros físico-químicos y biológicos de la depuradoras. El análisis comparativo de las muestras procedentes de EDAR con distintos vertidos y localización nos permitió determinar la composición de las comunidades de protistas características de este sistema y se plantearon los principales criterios para la identificación de las especies más frecuentes, proponiéndose algunos grupos o especies que podían relacionarse positiva o negativamente con parámetros de control y eficacia de las plantas. Asimismo se publicó una guía de identificación de ciliados en plantas depuradoras.

Se estudiaron también otros tipos de EDAR de película fija como el sistema de contactores biológicos rotativos o biodiscos. Este sistema se basa en la actividad gradual de una comunidad microbiana que se desarrolla en forma de biopelículas sobre discos parcialmente sumergidos que rotan en contacto con el agua residual. Se analizó la variación de la estructura y distribución secuencial y espacial de las poblaciones de protistas en el sistema, lo cual permitió además la propuesta de bioindicadores relacionados con el funcionamiento de las plantas. Se realizaron también investigaciones sobre la estructura de la biopelícula y la distribución de células viables y no viables en la misma, resultados publicados en diferentes revistas internacionales.

Por otra parte, los ríos son los principales ecosistemas receptores de los efluentes de las estaciones depuradoras, puesto que la calidad ecológica o sanitaria de los cauces receptores podría alterarse por la persistencia en los efluentes de bacterias o protistas y sólidos en suspensión, nuestro grupo investigó el impacto de los efluentes de las EDAR en el río Guadarrama: en general, salvo la descarga directa sobre el río de efluentes o vertidos incontrolados, el río presenta una capacidad de autodepuración adecuada para su recuperación tras el vertido. Los efluentes no ocasionan una alteración significativa de los parámetros físico-químicos, sin embargo, si se produce un incremento en la abundancia de ciertas especies características de depuradoras. Se detectaron además ciertos grupos bacterianos que se descargaban junto con el efluente y que potencialmente podrían dañar la calidad del agua.

Tradicionalmente la presencia de protistas, especialmente ciliados, se consideraba esencial para la obtención de efluentes de calidad, principalmente por su actividad trófica sobre las poblaciones bacterianas y la eliminación de bacterias patógenas o potencialmente patógenas del licor mezcla. Según nuestros resultados estos organismos participan además activamente en la formación de los flóculos mediante procesos de secreción activa y sus actividades biológicas. Asimismo, se determinó que la depredación de ciliados bacterívoros sobre bacterias depende tanto del tamaño como del contenido C:N. Se publicó además un libro en la International Water Association (IWA) titulado "Guidelines for the identification of ciliates in wastewater treatment plants" en el que se recoge la metodología de estudio e identificación de los ciliados en las EDAR.

El desarrollo de nuevas estrategias para la eliminación de nutrientes (P y N) en depuradoras con el sistema de lodos activos, supone la compartimentalización del reactor biológico en tres fases: aeróbica, anóxica y anaeróbica, que permiten no sólo la eliminación de materia orgánica, sino también fósforo y nitrógeno del agua residual, lo cual evitaría problemas de

eutrofización en las aguas que reciben los efluentes de las depuradoras. En colaboración con empresas del sector del aguas (EMASESA y EGEVASA) y el grupo de bioindicación de Sevilla (GBS), se realizó un estudio sobre la estructura, composición y dinámica de los microorganismos implicados en estos procesos, en especial de las comunidades de protistas y bacterias nitrificantes. En este proyecto, desarrollado entre los años 2009 y 2011, se estudiaron plantas con capacidad de eliminar N y/o P en tres depuradoras con distinta localización geográfica, comparándose la estructura de la comunidad con las descritas para sistemas convencionales de lodos activos. Se han encontrado diferencias significativas en la estructura de ambas biocenosis siendo, en este caso, las poblaciones de flagelados y amebas un componente de la comunidad estable, con una relevancia tanto en abundancia como en frecuencia de aparición. Los ciliados, más abundantes en sistemas convencionales, representan en estos sistemas las poblaciones más diversas. Las relaciones entre los parámetros físico-químicos y biológicos permitió la propuesta de parámetros biológicos de control. Se ha elaborado un capítulo de revisión sobre este tipo de EDAR titulado "Progresses on the knowledge about the ecological function and structure of the protists community in activated sludge wastewater treatment plants" en el libro "Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology".

En el futuro se pretende estudiar un sistema más reciente de lodos activos, los reactores biológicos con sistemas de membrana (MBR), que permiten además de la eliminación biológica de contaminantes, la posible reutilización de aguas, ya que se obtienen efluentes de alta calidad. En este sentido hemos presentado recientemente un proyecto coordinado a la convocatoria del Plan Nacional de I+D+I 2008-2011 del Ministerio de Ciencia e Innovación (Subprograma de Proyectos de Investigación Fundamental) titulado "Análisis integrado de biorreactores de membranas, identificación de las fuentes de contaminación, microbiología del proceso, medidas de prevención, reducción y control del ensuciamiento de las membranas" compuesto por cinco subproyectos de las Universidades Politécnica de Valencia (Subproyectos IP: 1. ALONSO MOLINA JOSE LUIS LÓPEZ , 2. PÉREZ MARÍA FERNANDA, 3. FERRÚS PÉREZ MARÍA ANTONIA, , Universidad de Barcelona (Subproyecto IP 4. SALVADÓ CABRÉ HUMBERT) y Universidad Complutense de Madrid (Subproyecto IP 5. SERRANO BARRERO SUSANA). El coordinador del proyecto propuesto es Susana Serrano Barrero de la Universidad Complutense de Madrid.

Durante los últimos años hemos realizado también estudios sobre ecología y sistemática de protistas en otros medios acuáticos distintos a los sistemas de depuración de aguas residuales, en concreto en medios marinos. En estos medios, se han caracterizado en detalle especies poco conocidas o controvertidas, al tiempo que se han puesto de manifiesto las complejas e interesantes interacciones tróficas existentes entre los protistas del plancton marino. En este sentido se han mantenido las relaciones de colaboración con el Natural History Museum (Londres) donde tanto la Dra. Martín-Cereceda como la Dra. Pérez-Uz trabajaron y desarrollaron investigaciones sobre ecología y procesos de depredación desarrollados por protistas marinos. Recientemente, se ha iniciado una línea paralela en estequiometría ecológica de protistas de medios acuáticos en colaboración con entidades internacionales, en especial con la Universidad de Kansas, Lawrence, EEUU (Dr. Val Smith), en donde la Dra. Martín-Cereceda es investigador asociado.

Se ha iniciado además colaboración con el Dr. Jordan Okie de la Universidad de Nuevo Mexico (EEUU). Esta investigación conjunta es altamente integradora y pretende estudiar la ecofisiología y estequiometría de orgánulos intracelulares y endosimbiontes en protistas con distintas líneas evolutivas.

Algunas Publicaciones Representativas del Grupo:

- Arregui, L., Muñoz-Fontela, C., Serrano, S., Barasoain, I. y Guinea, A. (2002). Direct Visualization of the microtubular cytoskeleton of ciliated protozoa with a fluorescent Taxoid. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49: 312-318.
- Arregui, L., Linares, M., Pérez-Uz, B. Serrano, S. and Guinea, A. (2007). Contribution of ciliates to the floc formation: extracellular polymeric substances in axenic cultures of *Tetrahymena thermophila*. *International Microbiology* 10: 91-96.
- Arregui, L., B. Pérez-Uz, A. Zornoza, S. Serrano. (2010). A new species of the genus *Metacystis* (Ciliophora, Prostomatida, Metacystida) from a Wastewater Treatment Plant. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 57 (4): 362-368.
- Arregui, L., B. Pérez-Uz, H. Salvado, S. Serrano. (2010). Progresses on the knowledge about the ecological function and structure of the protists community in activated sludge wastewater treatment plants. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*; A. Mendez-Vilas (Ed.) Volume 2 ISBN: 978-84-614-6195-0.
- Fernández-Galiano, D. (1994). The ammoniacal silver carbonate method as a general procedure in the study of protozoa of sewage (and other) waters. *Water Research* 28: 495-496.
- Martín-Cereceda, M. Serrano, S. y Guinea, A. (1999). Description of *Opisthonecta matiensis*, sp.n. (Protozoa, Ciliophora) a new peritrich ciliate from wastewater. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46 (3): 283-289.
- Martín-Cereceda, M., Serrano, S. and Guinea, A. (1996). A comparative study of ciliated protozoa communities in activated sludge plants. *FEMS Microbiology Ecology* 21: 267-276.
- Martín-Cereceda, M., Zamora, J., Pérez-Uz, B. y Guinea, A. (2002). Ciliate communities of rotating biological contactor biofilms: A multivariate approach. *Systematic and Applied Microbiology* 25: 301-313.
- Martín-Cereceda, M. Pérez-Uz B, and Guinea A. (2010). Marine phytoplanktonic protists in the nano-size range: taxonomy and trophic interactions. Chapter 6 pp. 189-211. *New Oceanography Research Developments: Marine Chemistry, Ocean Floor Analyses and Marine Phytoplankton*. ISBN: 978-1-60876-341-2 (Louis Martorino and Karl Puopolo (Eds.) Nova Science Publishers, Inc.
- Pérez-Uz, B. (1996). Bacterial Preferences and Growth Kinetics Variation on *Uronema marinum* and *Uronema nigricans* (Ciliophora: Scuticociliatida). *Microbial Ecology*, 31: 189-198.
- Pérez-Uz, B., L. Arregui, P. Calvo, H. Salvadó, N. Fernández, E. Rodríguez, A. Zornoza, S. Serrano. (2010). Assesment of advanced wastewater treatments for nitrogen removal searching for plausible efficiency bioindicators. *Water Research* 44: 5059-5069.
- Serrano, S., Arregui L., Perez-Uz B., Calvo P. y Guinea A. (2008) Guidelines for the Identification of Ciliates in Wastewater Treatment Plants Ref. IWA Publishing Co. United Kingdom.



Foto: de izquierda a derecha: Pilar Calvo, Mercedes Martín-Cereceda, Lucía Arregui, Blanca Pérez-Uz, Susana Serrano, Almudena Guinea (arriba) y Humbert Salvadó (arriba).

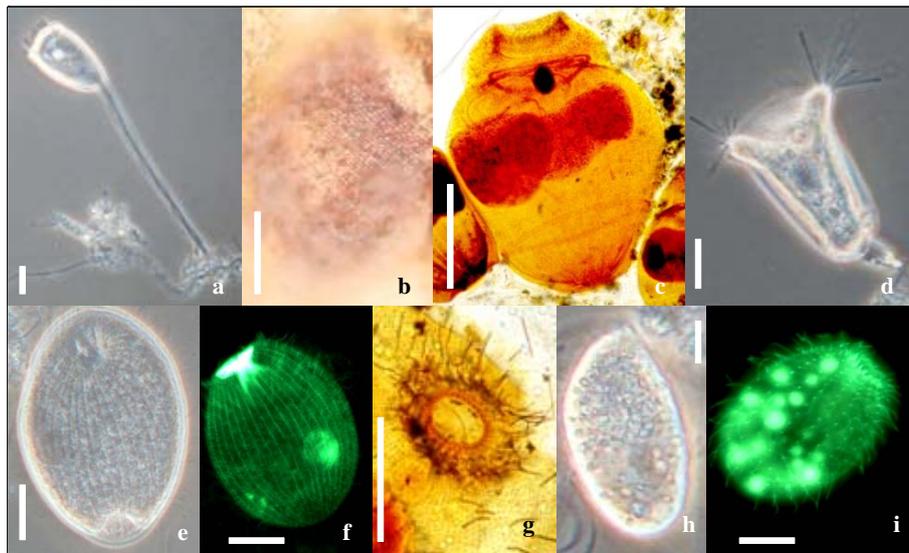


Foto: ciliados representativos de los reactores biológicos de EDAR. a-c Peritricos: a. *Vorticella convallaria*. Contraste de fases, b. estructura cortical de *Pseudovorticella* con tinción de Klein, c. tinción de carbonato de plata de *Epistylis*, d. *Acineta tuberosa* (sector), contraste de fases, e-i. Prostomátidos: e-f. *Holophrya teres* "in vivo" y con tinción Flutax, g. Detalle de la zona oral con tinción de carbonato de plata de *Holophrya ovum*, h-i. *Plagiocampa rouxi* "in vivo" y con tinción de Flutax. Escala= 25 micrometros.