

Comunidades de protistas asociados a plantas con eliminación de nitrógeno

Susana Serrano¹, Lucia Arregui¹, Pilar Calvo¹, Humbert Salvadó², Andrés Zornoza³, Natividad Fernández⁴, Eva Rodríguez⁴, Blanca Pérez-Uz¹

¹Departamento de Microbiología III. Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid.

²Departamento de Biología, Universidad de Barcelona

³EPSAR. EGEVASA, EDAR Quart-Benager, Valencia

⁴Grupo de Bioindicación de Sevilla

Responsable de la exposición Susana Serrano (susurra@bio.ucm.es)

1. INTRODUCCIÓN

Las estaciones depuradoras de lodos activos con sistemas avanzados de eliminación de nutrientes están diseñadas para la eliminación biológica de componentes nitrogenados y de fósforo, contaminantes que provocarían una aceleración en los procesos de eutrofización en los cauces receptores, cuestión ampliamente regulada en la Directiva 200/60/CE de la Unión Europea del 23 de Octubre de 2000.

La eliminación de nutrientes en estas depuradoras se lleva a cabo con diferentes fases durante el tratamiento biológico. La eliminación de nitrógeno tiene lugar en dos compartimentos:

- a) una fase aeróbica en la cual se potencia el desarrollo de poblaciones de bacterias nitrificantes (oxidantes de amonio y de nitritos) que son poblaciones de crecimiento lento y con estrictos requerimientos de oxígeno,
- b) una fase anóxica en la cual las poblaciones de bacterias desnitrificantes llevan a cabo procesos de respiración anaeróbica en la que utilizan el nitrato y otros componentes nitrogenados como aceptores terminales de electrones, generando nitrógeno gaseoso como producto final.

En la fase aeróbica del reactor biológico, en aquellas plantas que tienen un adecuado rendimiento en la eliminación de nitrógeno, los flóculos presentan, generalmente, una estructura abierta multinucleada. En ellos, se han detectado bacterias nitrificantes que se disponen, preferentemente, en la parte superficial del flóculo. Estas bacterias suelen formar microagregados compactos y mucosos que pueden alcanzar un tamaño considerable (bacterias oxidantes de amonio). Las bacterias oxidantes de nitrato pueden ocupar también posiciones más internas dentro del flóculo.

Los protistas son una de las principales comunidades de microorganismos implicadas en la eliminación de contaminantes en los reactores biológicos de lodos activos,

contribuyendo a la formación del flóculo (Arregui *et al.*, 2007, 2008) y a la depredación de las poblaciones de bacterias (Pérez-Uz *et al.*, 2005). En las depuradoras convencionales los ciliados representan la comunidad más abundante dentro de los componentes estables del sistema, siendo especialmente importantes los ciliados peritricos sésiles y los esticotricos (ambos asociados al flóculo); los flagelados y las amebas están asociados, salvo excepciones, a procesos de colonización y puesta en marcha de la depuradora o a problemas relacionados con la entrada de productos tóxicos a la planta, que producen una alteración en la estructura de la comunidad (Al-Shawani, 1991; Curds & Cockburn, 1970; Madoni, 1991, 1994, Madoni *et al.*, 1993; Martín-Cereceda *et al.*, 1996, 2002; Poole, 1984; Serrano *et al.*, 2008).

Los datos acerca de las comunidades de protistas en EDAR de alto rendimiento son muy escasas; el grupo de investigación compuesto por los autores de esta comunicación ha realizado, durante los años 2007 y 2008, un estudio en diversas plantas sobre la estructura de las comunidades asociadas a la eliminación de nitrógeno cuyos resultados se expondrán a continuación.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron tres depuradoras con sistemas de eliminación de nitrógeno con diferente localización geográfica y diseño.

Los parámetros físico-químicos analizados a la entrada y salida de la fase biológica fueron: DBO₅, DQO, N- total, N-NH₄, nitratos y nitritos. Los análisis de las muestras se llevaron a cabo de acuerdo con los métodos estándar de análisis para aguas residuales (APHA, 1998).

Los recuentos de la microbiota en las muestras se realizaron inmediatamente después de su recogida utilizando microscopía de contraste de fases, manteniendo las mismas en agitación y a partir de dos alícuotas de 25

μL . La identificación de especies se llevó a cabo posteriormente utilizando métodos descritos para protistas (Fernández-Galiano, 1994; Arregui *et al.*, 2002, 2003; Lee & Soldo, 1992). Las bacterias totales, oxidantes de amonio y oxidantes de nitrato se tiñeron con sondas moleculares específicas (Kit Vermicon) y se observaron con un microscopio de epifluorescencia.

3. RESULTADOS

Nuestros resultados indican que la estructura de las comunidades de protistas y la función de cada uno de sus componentes varía con respecto a aquellas descritas en sistemas no diseñados para la eliminación de nutrientes.

Para el análisis de los resultados se consideraron tres rangos de rendimiento en la eliminación de NTK: rendimiento alto (100-85%), moderado (85-50%) y bajo (<50%).

El porcentaje de aparición de especies en cada rango de eliminación de nutrientes es claramente diferente. El primer factor que hay que señalar es que los **flagelados**, especialmente los bodónidos (figura 1), constituyen un componente importante de la comunidad en plantas con alto rendimiento en eliminación de nitrógeno (figura 2). Las poblaciones de flagelados disminuyen claramente su porcentaje de aparición a medida que disminuye la eficiencia. Cuando el rendimiento es bajo la comunidad se aproxima más a la de las depuradoras convencionales. Estos flagelados presentan además los valores de abundancia absoluta (ind/ml) más elevados cuando la depuradora elimina eficazmente nitrógeno, mientras que en depuradoras con rendimientos moderados o bajos disminuye su densidad.

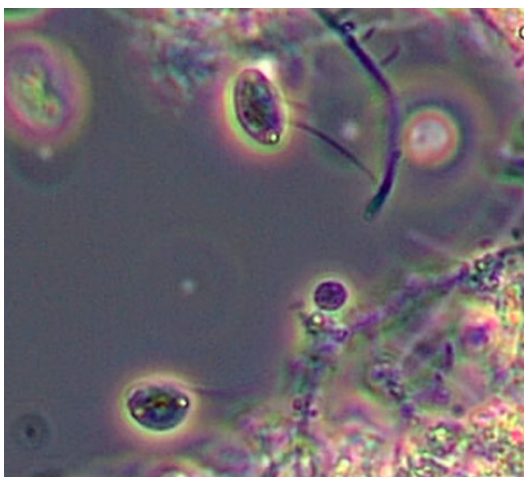


Fig. 1-1 *Bodo* sp. Contraste de fases, 1000x.

Flagelados

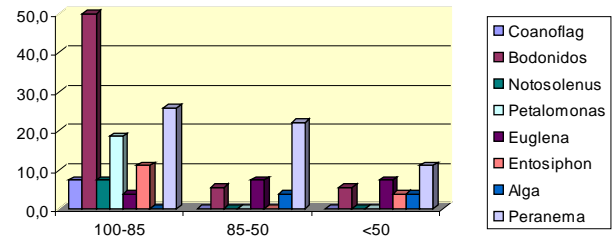


Fig. 2-2 Relación entre las especies de flagelados y los rendimientos de eliminación de NTK

El estudio de los porcentajes de aparición de **amebas** en las muestras indica, como en el caso anterior, que en depuradoras en las que se elimina eficazmente nitrógeno las amebas están ampliamente representadas, mientras que a medida que disminuye el rendimiento disminuye también su frecuencia de aparición (tanto en las amebas desnudas como en las testáceas -especialmente las especies de *Arcella*) (figura 3). Si bien los porcentajes de aparición en las muestras de las amebas mayores y menores de 50 μm son muy semejantes, las pequeñas amebas componen las poblaciones con valores más elevados de abundancia absoluta.

Amebas

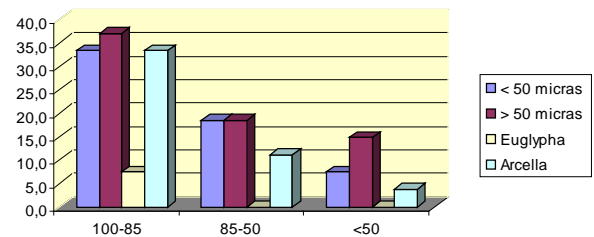


Fig. 3- Relación entre amebas y el rendimiento de eliminación de NTK

Por último, los **ciliados** presentan los valores de abundancia más bajos en relación con flagelados y amebas en aquellas depuradoras que presentan un rendimiento alto de eliminación de nitrógeno, y además sus abundancias son mucho menores que en depuradoras convencionales (figura 4).

Los resultados indican que la estructura de las poblaciones de ciliados es diferente en los tres rangos de rendimiento:

➤ EDAR con rendimiento alto en eliminación de N

Las especies más representativas, tanto en porcentaje de presencia en las muestras como en términos de abundancia absoluta, son los peritricos *Opercularia articulata* (figura 5b) y *Vorticella aquadulcis*, el litostomado *Acineria uncinata* y el filofaríngeo *Trochilia minuta* (figura

5a). Otros ciliados como los suctores *Tokophrya* y *Acineta* también caracterizan la comunidad, si bien su abundancia en las muestras, es mucho menos significativa. Entre los esticotricos la especie que aparece con más frecuencia es *Aspidisca cicada*, aunque *A. lynceus* es la que presenta unos valores más elevados de abundancia.

➤ **EDAR con rendimiento moderado en eliminación de N**

Las especies más representativas son los litostomados *A. uncinata* y *Litonotus lamella*, los filofaríngeos *Chilodonella* sp y *Trochilia minuta* y las especies de los géneros *Epistylis*, *Opercularia* y *Vorticella*. Estas especies presentan menor abundancia que en las depuradoras con alto rendimiento, es decir, cuando el rendimiento es moderado la comunidad es más diversa en especies, pero éstas están representadas por un menor número de individuos por mililitro. Los oligohimenóforos y heterotricos

adquieren una mayor representatividad pero con baja abundancia. También destaca el desplazamiento de *A. lynceus* por *A. cicada*.

➤ **EDAR con rendimiento bajo en eliminación de N**

Los oligohimenóforos, especialmente el escuticociliado *Uronema nigricans*, presenta un alto porcentaje de presencia en las muestras, con densidades medias. Los peritricos coloniales del género *Epistylis*, especialmente *E. balatonica* dominan en términos de abundancia, aunque las especies de *Vorticella* están ampliamente representadas en un alto porcentaje de las muestras. Entre los hipotricos, *Aspidisca cicada* es la especie más representativa.

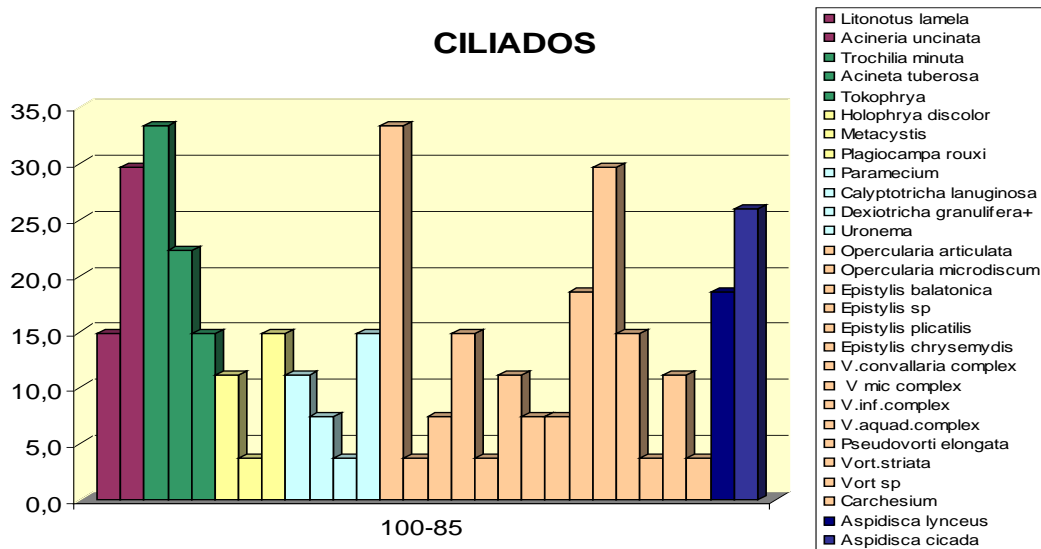


Fig. 4- Relación entre ciliados y el rendimiento de eliminación de NTK3

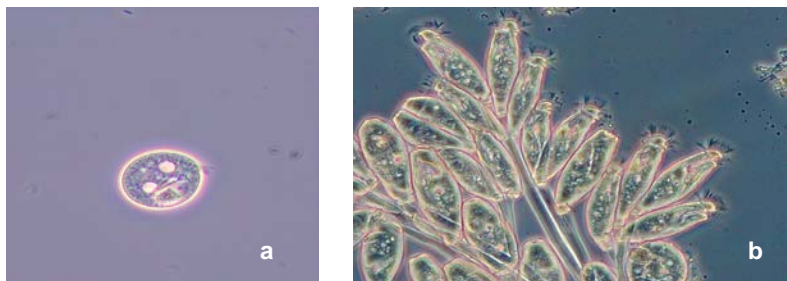


Fig. 5- a) *Trochilia minuta*. Contraste de fases, 400x b) *Opercularia articulata*. Contraste de fases, 100x4

4. CONCLUSIONES

En conclusión, la estructura de la comunidad de protistas se modifica sustancialmente respecto a los sistemas convencionales, siendo los flagelados y las amebas componentes habituales de los reactores biológicos, especialmente cuando la EDAR presenta un rendimiento alto en eliminación de nitrógeno.

Los pequeños flagelados y amebas conforman un elemento significativo de la comunidad, por lo que deberían considerarse en este tipo de sistemas como componentes de la comunidad biológica floculante. Las amebas mayores de 50 μm podrían depredar sobre los agregados mucosos que forman las bacterias nitrificantes. La función de los ciliados reptantes se lleva a cabo, no sólo por los ciliados espirotrícos como *Aspidisca*, sino también por el filofaríngeo *Trochilia minuta*. La comunidad de ciliados en el flóculo estaría representada, además, por peritricos coloniales de los géneros *Opercularia* y *Epistylis* (dependiendo de la eficiencia en eliminación de nitrógeno) y diversas especies de *Vorticella*, así como por el filofaríngeo *Acineria uncinata*.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Shahwani, S.M. y Horan, N.J. (1991). The use of Protozoa to indicate changes in the performance of activated-sludge plants. *Wat. Res.*, 25 (6): 633-638.
- Arregui, L., Muñoz-Fontela, C., Guinea, A., y Serrano, S. (2003). Flutax employment simplifies the visualization of the ciliature of oxytrichid hypotrichs. *European Journal of Protistology*, 39 : 169-172.
- 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. *The 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., Linares, M., Pérez-Uz, B., Guinea, A., Serrano, S. (2008). Involvement of crawling and attached ciliates in the aggregation of particles in wastewater treatment plants. *Air, Soil and Water Research*, 1.
- Curds, C.R. y Cockburn, A. (1970). Protozoa in biological sewage-treatment processes-II. Protozoa as indicators in the activated sludge process. *Wat. Res.*, 4: 237-249.
- Fernández-Galiano, D. (1994) The ammoniacal silver carbonate method as a general procedure in the study of protozoa of sewage (and other) waters. *Water Res.* 28, 495-496.
- Lee, J.J. and Soldo A.T. (1992). *Protocols in Protozoology*, (ed. Society of Protozoologists), Lawrence, Kansas.
- Madoni, P. (1991). Role of protozoans and their indicator value in the activated sludge process. In: *Biological approach to sewage treatment process: Current status and perspectives*. Ed. Centro Bazzcchi, Perugia.
- Madoni, P. (1994). A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis. *Wat. Res.*, 28 (1): 67-75.
- Madoni, P., Davoli, D. y Chierici, E. (1993). Comparative analysis of the activated sludge microfauna in several sewage treatment works. *Wat. Res.*, 27 (9): 1485-1491.
- Martín-Cereceda, M., Serrano, S. and Guinea, A. (1996). A comparative study of ciliated protozoa communities in activated sludge plants. *FEMS Microb. Ecol.*, 21:267-276.
- Martín-Cereceda, M., Pérez-Uz, B., Serrano, S. y Guinea, A. (2002). An integrated approach to analysed biofilms of a full scale wastewater treatment plant. *Water Science and Technology*.
- Pérez-Uz, B., y Guinea, A. (2005). Respuestas de crecimiento en ciliados bacterívoros de fangos activos al contenido C:N bacteriano. Comunicación. XX Congreso Nacional de Microbiología. SEM.
- Poole, S.E.P. (1984). A study of the relationship between the mixed liquor faune and plant performance for a variety of activated sludge sewage treatment works. *Wat. Res.*, 18 (3): 281-287.
- Serrano, S., Arregui L., Perez-Uz B., Calvo P. y Guinea A. (Febrero 2008) Guidelines for the Identification of Ciliates in Wastewater Treatment Plants Ref. IWA Publishing Co. United Kingdom.