

**Idoneidad de *Escherichia coli* portadoras de genes
que codifican proteínas fluorescentes para
conocer el destino de las bacterias intestinales
durante el tratamiento de aguas residuales**

M Orruño, I Arana, C Seco, I Garaizabal, A Muela & I Barcina
Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología
Fac. Ciencia y Tecnología
UPV/EHU

El agua es un recurso natural escaso cuya calidad debe ser protegida



Las aguas superficiales son recursos renovables con una capacidad limitada de recuperación ante los impactos negativos de la actividad humana



El tratamiento del agua residual uno de los procesos biotecnológicos más extendidos

Tratamiento aguas residuales

Reducción de:

DBO

Sólidos suspendidos

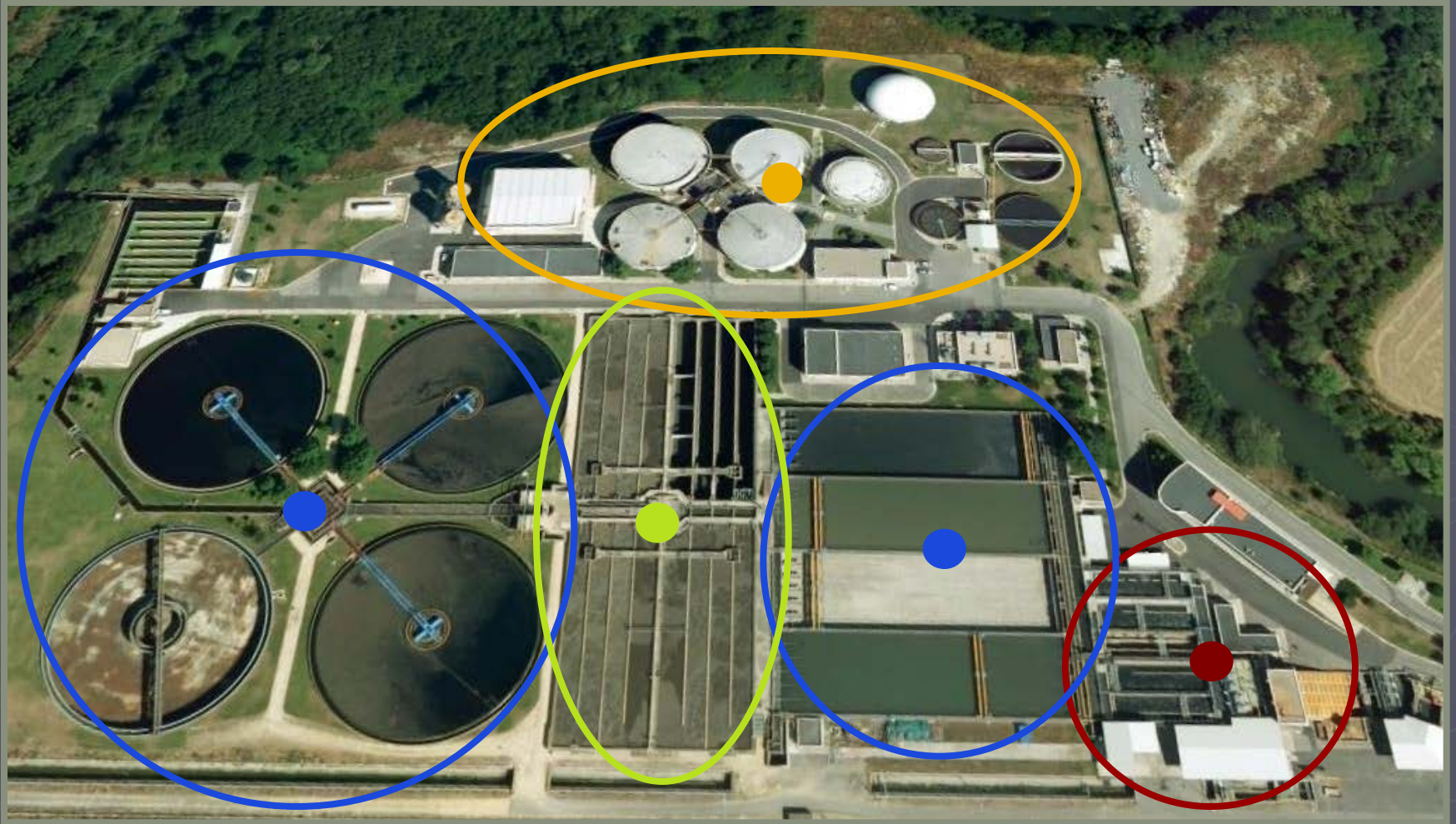
Nutrientes

Poblaciones bacterianas



Reducción de los riesgos sanitarios y ecológicos en el cauce receptor de las aguas residuales

EDAR Crispijana



● Pretratamiento

● Decantación primaria y secundaria

● Tratamiento biológico

● Digestión fangos

Estudios previos

- ✓ Ausencia de relación entre parámetros físico-químicos y microbiológicos
- ✓ Mayor sensibilidad de los parámetros microbiológicos
- ✓ Ensayos basados en la cultivabilidad infraestiman la densidad bacteriana antes y después del tratamiento

Causas de la infraestimación

- ✓ Formación de células viables no cultivables
- ✓ Eliminación real del sistema (p.e. depredación)
- ✓ Traspase de biomasa microbiana a los flóculos

Objetivo de nuestro trabajo

Conocer el destino de los microorganismos durante el tratamiento de las aguas residuales, empleando como modelo *Escherichia coli* (bacteria indicadora de contaminación fecal)

Herramientas

Miniplanta de tratamiento de aguas residuales



Reactor biológico



Tanque de sedimentación

Herramientas

Microorganismos manipulados genéticamente que expresan proteínas fluorescentes

Cepa

Origen

E. coli EGFP

Cormack *et al.* (1996)

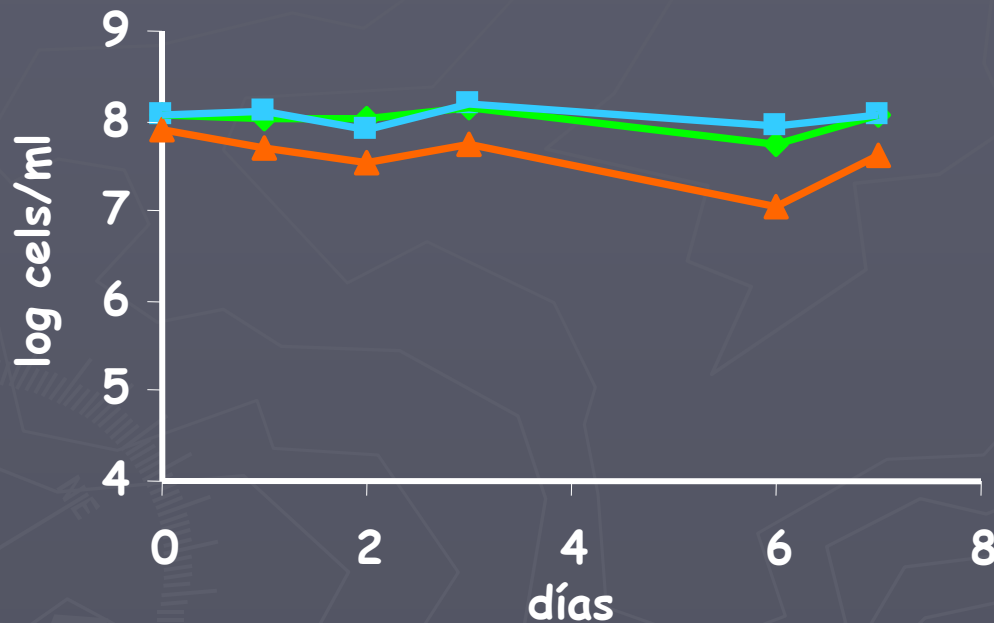
E. coli pGen222

V. de Lorenzo

E. coli MC1061 (dsRed)

Hakkila *et al.* (2003)

Microcosmos de agua residual en ausencia de la microbiota natural (sistemas cerrados)



Bacterias totales
Bacterias totales que fluorescen
Bacterias cultivables

La permanencia en agua residual:

- ✓ no altera la expresión de la proteína GFP
- ✓ no provoca variaciones en densidad, actividad o cultivabilidad

Microcosmos de agua residual en presencia de la microbiota natural (sistemas cerrados)



En presencia de la microbiota natural:

- ✓ *E. coli* no adopta el fenotipo VNC
- ✓ la microbiota natural provoca la disminución de la población de *E. coli*

Microcosmos de agua residual en presencia de la microbiota natural (miniplanta = sistema abierto)



Parámetros de funcionamiento en condiciones de equilibrio:

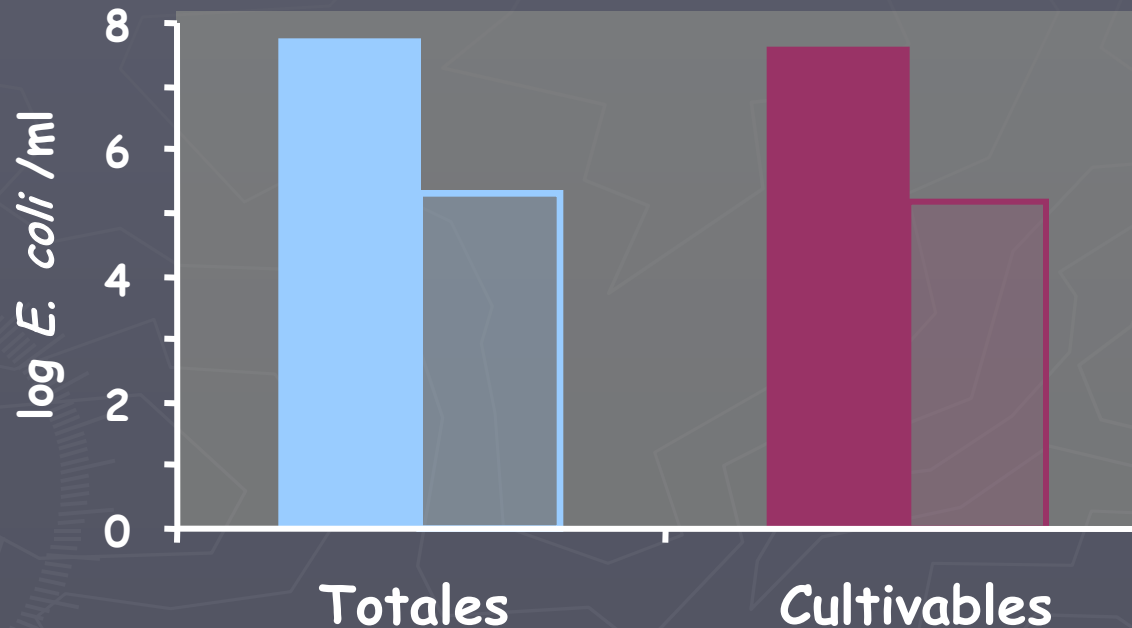
Caudal, 400 ml/h

Caudal de recirculación, 2-3 l/h

DBO Agua Decantada, 70 mg/l

DBO Agua Tratada, 5 mg/l

Microcosmos de agua residual en presencia de la microbiota natural (miniplanta = sistema abierto)



Eficacia > 99%

Microcosmos de agua residual en presencia de la microbiota natural (miniplanta = sistema abierto)

Nuestros resultados muestran:

- ✓ Reducción del número de *E. coli* totales y cultivables
- ✓ No se induce la transición al estado VNC durante la permanencia en la miniplanta

Microcosmos de agua residual en presencia de la microbiota natural (miniplanta = sistema abierto)

La reducción en la población de *E. coli* durante el tratamiento puede atribuirse a:

- procesos físico-químicos (adhesión y floculación)
- procesos microbiológicos (depredación por protozoos)

El análisis de los dos tipos de experiencias parece resaltar el papel de los protozoos en la retirada de las bacterias intestinales de los efluentes.

Herramientas

Microorganismos manipulados genéticamente que expresan proteínas fluorescentes

Cepa

Origen

E. coli EGFP

Cormack *et al.* (1996)

E. coli pGen222

V. de Lorenzo

E. coli MC1061 (dsRed)

Hakkila *et al.* (2003)

E. coli ABC_{GFP}

Nuestro grupo

Protocolo de obtención de la cepa *E. coli* ABC_{GFP}

Agua bruta EDAR Crispijana



Aislamiento *E. coli*



Selección

E. coli ABC
Amp^s Gn^s Clf^s

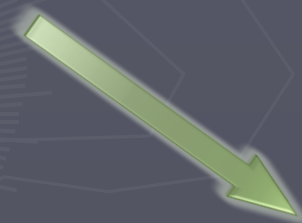
E. coli prk600
lac⁺ Clf^r

E. coli 118λpir
lac⁻ Amp^r Gn^r

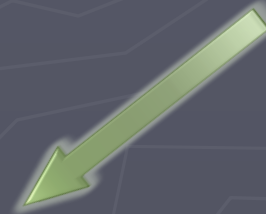


Conjugación

E. coli 118 λpir /prk600
lac⁻ Amp^r Gn^r Clf^r

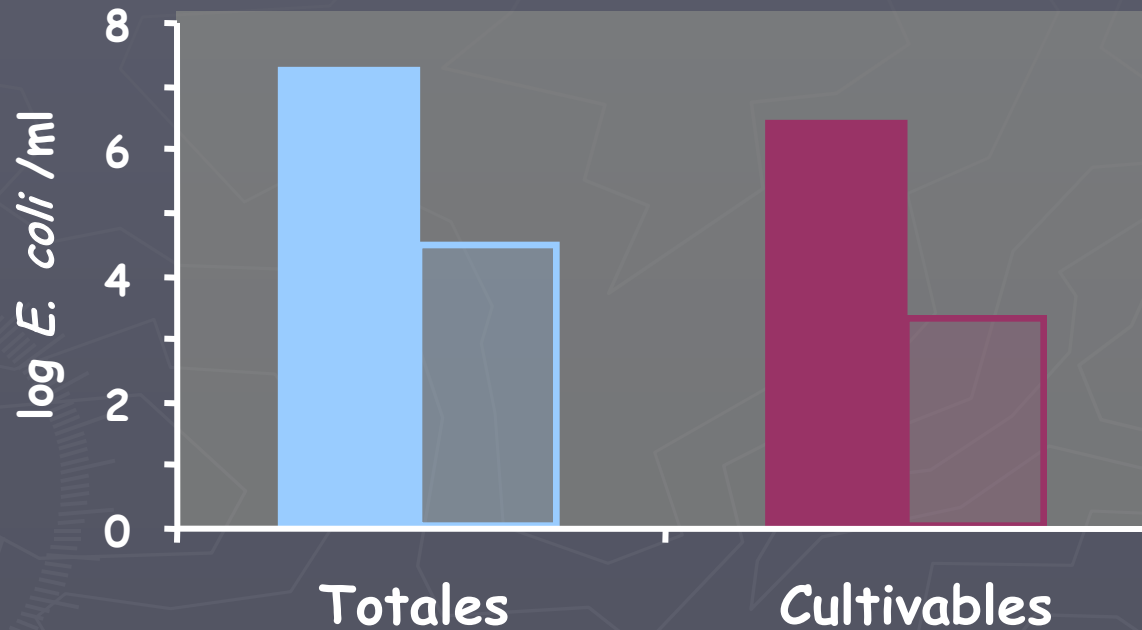


Conjugación



E. coli ABC_{GFP}
lac⁺ Amp^s Gn^r Clf^r

Microcosmos de agua residual en presencia de la microbiota natural (miniplanta = sistema abierto)



Eficacia > 99%

Conclusión

Las bacterias que expresan proteínas fluorescentes constituyen herramientas idóneas para estudiar el comportamiento de las bacterias intestinales en las EDARs