

## Amebas de vida libre en aguas residuales y fangos: Su papel como reservorio natural de bacterias potencialmente patógenas

### *Free-Living Amoebas (FLAs) in Sewage and Sludges: Their Role as a Natural Reservoir of Potentially Pathogenic Bacteria*

### *Amebas de vida livre em águas residuais e lamas: Seu papel como reservatório natural de bactérias potencialmente patogénicas*

**María Benito<sup>1,2</sup>, Daniella LaPlante<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Teresa Fernández<sup>1,3</sup>, Natividad Miguel<sup>2</sup>, Ana Marta Lasheras<sup>4</sup>, Jairo Gómez<sup>4</sup>, M<sup>a</sup> Peña Ormad<sup>2</sup>, Encarnación Rubio<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Pilar Goñi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de Zaragoza.

<sup>2</sup> Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón de la Universidad de Zaragoza. Ingeniería Química y Tecnologías de Medio Ambiente. Universidad de Zaragoza.

<sup>3</sup> Departamento de Fisiatría y Enfermería. Universidad de Zaragoza.

<sup>4</sup> Navarra de Infraestructuras Locales S.A (NILSA).

**Cita:** Benito M, LaPlante D, Fernández MT, Miguel N, Lasheras AM, Gómez J, Ormad MP, Rubio E, Goñi MP. Amebas de vida libre en aguas residuales y fangos: Su papel como reservorio natural de bacterias potencialmente patógenas. Rev. salud ambient. 2018; 18(1):69-77.

**Recibido:** 18 de diciembre de 2017. **Aceptado:** 9 de abril de 2018. **Publicado:** 15 de junio de 2018.

**Autor para correspondencia:** María Benito Fernández.

Correo e: [mбенито@unizar.es](mailto:mбенито@unizar.es)

Dpto. Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de Zaragoza. Domingo Miral s/n 50009 - Zaragoza.

**Financiación:** Por la DGA-FSE al grupo de referencia T51\_17R "Agua y Salud Ambiental" y el proyecto CTM2013-41397-R de MINECO-FEDER.

**Declaración de conflicto de intereses:** Los autores declaran que no existen conflictos de intereses que hayan influido en la realización y la preparación de este trabajo.

**Declaraciones de autoría:** Todos los autores contribuyeron al diseño del estudio y la redacción del artículo. Asimismo, todos los autores aprobaron la versión final.

## Resumen

Las amebas de vida libre (AVL) son protozoos ubicuos, presentes en suelos y en ecosistemas acuáticos naturales y artificiales. Participan en los procesos de depuración desarrollados en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR), convirtiéndolas en un nicho ecológico idóneo para la proliferación de AVL, que las colonizan e instauran en ellas su hábitat, ya que se alimentan de bacterias presentes en el medio. Los procesos de depuración biológica no están diseñados con el fin de eliminar la contaminación microbiológica, aunque ayudan a reducir algunas poblaciones bacterianas.

Hasta la fecha, sólo algunas especies y géneros de AVL han sido descritos como patógenos, pero todas ellas suponen un riesgo como reservorio de bacterias patógenas. Su forma quística, les confiere resistencia frente a las condiciones adversas y desinfectantes comunes, permitiéndoles superar los procesos de depuración y potabilización y colonizar sistemas artificiales de agua. En este trabajo, se estudió la presencia de AVL en aguas y fangos de 5 EDAR que vierten sus aguas a la cuenca del Ebro, analizando un total de 20 puntos de muestreo. Para ello, se llevó a cabo el aislamiento AVL y la posterior identificación de género y especie, así como de las bacterias endosimbiontes, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

De las 41 amebas aisladas en el 85 % de las muestras, 21 fueron identificadas genéticamente. Trece de ellas, pertenecieron al género *Acanthamoeba* spp., 6 a *Naegleria* spp. y 2 se identificaron como *Vermamoeba vermiformis*. El 53,66 % de las AVL albergaba en su interior *Mycobacterium* spp., el 29,27 % *Legionella pneumophila* y el 14,63 % *Pseudomonas* spp.

**Palabras clave:** amebas de vida libre; bacterias endosimbiontes; aguas residuales; *Acanthamoeba* spp.; *Naegleria* spp.

## Abstract

Free-living amoebae (FLA) are ubiquitous protozoa, present in soils and in natural and artificial aquatic ecosystems. They take part in the purification processes that take place in Wastewater Treatment Plants (WWTPs), thereby turning these plants into ecological niches suitable for proliferation of FLAs, which they colonize and in which they establish their habitat, since they feed on bacteria present in the environment. Biological purification processes are not designed to remove microbiological contamination, although they help to reduce some microbial populations.

At present only some genera and species of FLAs have been described as pathogenic, but all of them pose a risk as reservoirs of pathogenic bacteria. Their cystic stage gives them resistance to adverse conditions and common disinfectants, allowing them to withstand water purification processes and colonize artificial water systems. The presence of FLAs in waters and sludges from 5 WWTPs that discharge their waters into the Ebro river basin has been studied in this work. To this end, a total of 20 sample points were analysed by isolating the FLAs and subsequently identifying their genus and species. The same was done for endosymbiotic bacteria, by Polymerase Chain Reaction (PCR).

Out of 41 FLAs that were isolated in 85 % of the samples, 21 were genetically identified. Thirteen belonged to the genus *Acanthamoeba* spp., 6 to *Naegleria* spp. and 2 were identified as *Vermamoeba vermiformis*. 53.66 % of FLAs hosted *Mycobacterium* spp., 29.27 % *Legionella pneumophila*, and 14.63 % *Pseudomonas* spp.

**Keywords:** free-living amoebae; endosymbiotic bacteria; wastewater; *Acanthamoeba* spp.; *Naegleria* spp.

## Resumo

As amebas de vida livre (AVL) são protozoários ubíquos, presentes nos solos e nos ecossistemas aquáticos naturais e artificiais. Participam nos processos de depuração desenvolvidos nas Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs), convertendo-as num nicho ecológico propício à proliferação de AVL, que as colonizam e estabelecem aí o seu habitat, dado que se alimentam de bactérias presentes nesse meio ambiente. Os processos de depuração biológica não estão desenhados com o objetivo de eliminar a contaminação microbiológica, embora ajudem a reduzir algumas populações bacterianas.

Até à data, só algumas espécies e géneros de AVL foram descritos como patogénicos, contudo todas elas representam um risco como reservatório de bactérias patogénicas. A sua forma cística confere-lhes resistência às condições adversas e desinfetantes comuns, permitindo-lhes resistir aos processos de depuração e potabilização e, colonizar sistemas artificiais de água. Neste trabalho estudou-se a presença de AVL em águas e lamas de 5 ETARs que realizam descargas na bacia do Ebro, analisando-se um total de 20 pontos de amostragem. Nesse sentido, procedeu-se ao isolamento das AVL e à posterior identificação do género e espécie, assim como das bactérias endossimbóticas, através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).

Das 41 amebas isoladas em 85 % das amostras, 21 foram identificadas geneticamente. Treze delas pertencem ao género *Acanthamoeba* spp., 6 a *Naegleria* spp. e 2 foram identificadas como *Vermamoebavermiformis*. Em 53,66 % das AVL foram encontrados no seu interior *Mycobacterium* spp., em 29,27 % *Legionella pneumophila* e em 14,63 % *Pseudomonas* spp.

**Palavras-chave:** amebas de vida livre; bactérias endossimbóticas; águas residuais; *Acanthamoeba* spp.; *Naegleria* spp.

## INTRODUCCIÓN

Las amebas de vida libre (AVL) son protozoos ubicuos, ampliamente distribuidos en suelo, aire y agua, encontrando en este último medio una gran presencia y diversidad de las mismas. Son capaces de sobrevivir tanto en sistemas de agua naturales, incluyendo agua dulce y marina, como en los sistemas artificiales, por ejemplo piscinas, sistemas de refrigeración o sistemas de tratamiento de aguas<sup>1,2</sup>. Además, su forma de resistencia, el quiste, les confiere protección frente a condiciones ambientales adversas, así como frente a los tratamientos de desinfección convencionales; siendo capaces de resistir a elevadas concentraciones de cloro, lo que favorece su dispersión a través del medio acuático.

Hasta la fecha, sólo *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Vermamoeba vermiformis*, *Paravahlkampfia* spp.,

*Balamuthia mandrillaris* y *Sappiniapedata*<sup>3-5</sup> han sido descritas como amebas de vida libre capaces de causar infecciones en humanos y animales. *Acanthamoeba* spp. es uno de los géneros más abundantes en el medio ambiente, clasificado en la actualidad en 20 genotipos distintos (T1-T20). Los genotipos encontrados con mayor frecuencia en el medio acuático natural y artificial, por orden de prevalencia son: T4, T5, T15, T3, T2 y T11<sup>6</sup>. Varios genotipos de *Acanthamoeba* spp. han sido descritos principalmente como productores de queratitis, pudiendo causar también, de igual manera que *Balamuthia mandrillaris*, encefalitis granulomatosa amebiana e infecciones en piel y pulmones. *Naegleria fowleri*, es la única especie del género *Naegleria* spp. descrita como patógena, siendo agente etiológico de numerosos casos de meningo encefalitis amebiana en humanos. *Vermamoeba vermiformis* también se encuentra como un agente causal potencial de la

queratitis. Por último, tanto en *Paravahlkampfia* spp. como en *Sappiniapedata*, principalmente encontrada en suelos, se ha encontrado un único caso ocasionando patología en humanos, en concreto meningo encefalitis amebiana<sup>5</sup> y encefalitis amebiana<sup>7</sup> respectivamente. Estos dos últimos casos de infección en humanos por AVL, ilustran el potencial que tienen estos protozoos para convertirse en patógenos para el ser humano, de forma ocasional<sup>8</sup>.

Las amebas de vida libre, se alimentan de las bacterias presentes en el medio y en los biofilms, por lo que su presencia en el agua se encuentra relacionada con la concentración bacteriana de la misma<sup>9</sup>. Sin embargo, no todas las bacterias son ingeridas por las amebas, sino que existen también Bacterias Resistentes a la Depredación de las Amebas (BRA), capaces de sobrevivir a la ingestión por parte de las amebas. En este caso, la asociación puede caracterizarse bien por una simbiosis en la que ambos microorganismos se benefician, o bien por una parasitación de las AVL por parte de las bacterias, que quedaban liberadas causando la lisis de la ameba. Este grupo, incluye bacterias como *Mycobacterium* spp., cianobacterias tóxicas, *Pseudomonas* spp., *Legionella pneumophila*, *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli*, *Listeria mono-cytogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Aeromonas hydrophila* o *Vibrio cholera*. Dentro de las BRA, se encuentran aquellas que son capaces de sobrevivir en el interior de las amebas, como *Mycobacterium* spp., otras pueden además multiplicarse en su interior como *Vibrio cholerae* o *Legionella pneumophila*.

La capacidad de las amebas de albergar BRA en su interior, es otro factor a considerar al analizar la virulencia de las AVL, ya que se comportan como portadoras de otros microorganismos patógenos, incluyendo algunas bacterias, actuando como auténticos "Caballos de Troya". Además, la capacidad de algunas de estas bacterias de multiplicarse en su interior, incrementa el potencial infectivo de éstas. La protección de las AVL, permite que estas bacterias puedan completar el ciclo del agua, viajando a través de ríos, pantanos, plantas potabilizadoras yaguas de red, sin verse afectadas por situaciones climáticas extremas o desinfecciones. Cuando llegan a aguas de red, estas bacterias pueden colonizar, los sistemas de agua artificiales, como las torres de refrigeración o sistemas de aire acondicionado<sup>10-12</sup>.

En este contexto, las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) suponen un nicho ecológico idóneo para la proliferación de las AVL, donde incluso pueden tener sus hábitats. De esta manera, las EDAR actúan como reservorio de las AVL, pudiendo aparecer libres en la matriz

de agua/fangos o formando parte de los biofilms, donde estos protozoos participan en los procesos de depuración, principalmente en el tratamiento biológico y procesos de decantación, colaborando así en la clarificación de efluentes. Sin embargo, estos procesos de depuración no están diseñados para eliminar la contaminación microbiológica, encontrando una enorme diversidad de bacterias, parásitos y protozoos potencialmente patógenos en el efluente y también en los fangos que generalmente son utilizados como enmienda agrícola. La normativa española vigente sobre la reutilización de fangos (RD 1310/90 y AAA/1072/2013) establece el registro, en lo que a términos microbiológicos se refiere, de la concentración de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. (presencia o ausencia / 25 g) de los fangos que van a ser reutilizados; mientras que la relativa a la reutilización de efluentes (RD 1620/2007), establece límites de contaminación microbiológica, en función del uso que se le vaya a dar al agua, para algunas bacterias (*Escherichia coli*, *Legionella* spp. y *Salmonella* spp.), nematodos intestinales y algunos cestodos (*Taeniasaginata* y *Taeniasolium*), sin hacer referencia a protozoos. La carga microbiológica del efluente y del fango obtenido durante la depuración, va a depender tanto de los tratamientos desarrollados en la línea de aguas y la de fangos de la EDAR, como de las actividades desarrolladas en el área de cuyas aguas es receptora la depuradora en cuestión y de la carga de población a tratar<sup>13-15</sup>. Por tanto, la salida de AVL supone un riesgo por la patogenicidad de las bacterias albergadas en su interior (BRA), con las que comparte nicho ecológico en las EDAR.

El objetivo de este estudio, es por tanto analizar la presencia de AVL en aguas y fangos de EDAR que vierten sus efluentes a la cuenca del Ebro, estudiando también si las amebas aisladas albergan bacterias potencialmente patógenas en su interior.

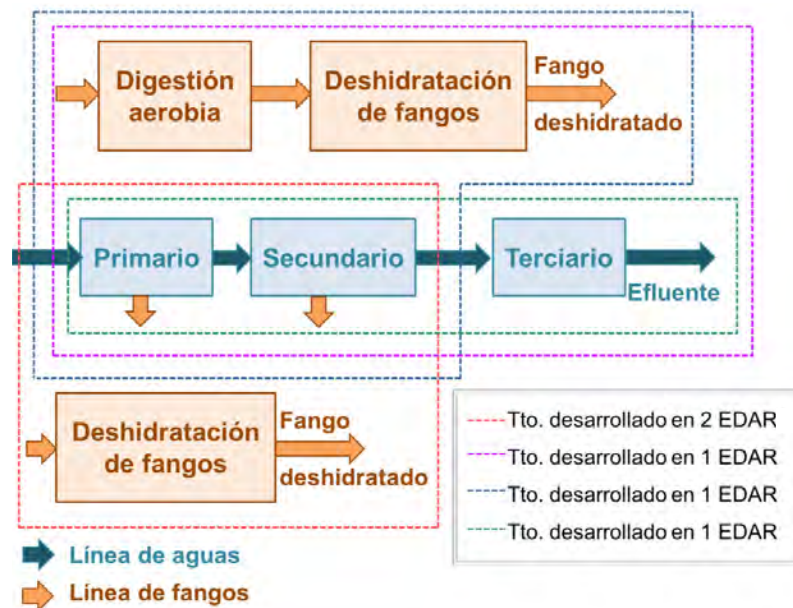
## MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este estudio, se tomaron un total de 20 muestras puntuales de agua y fango correspondientes a la entrada, salida y etapas intermedias que fueron de interés en función del tratamiento desarrollado, en cinco plantas depuradoras localizadas en la Comunidad Foral de Navarra, cuyos efluentes desembocan en la Cuenca Hidrográfica del Ebro. En la tabla 1, se muestran las principales características de cada una de las EDAR. Se tomaron muestras de 5 -20 L, en función de la turbidez del agua, en botes de boca ancha estériles.

Tabla 1. Características de las 5 EDAR objeto de estudio

|        | Tratamiento terciario | Tratamiento de fangos       | Aporte industrial (SÍ/NO) | Carga a tratar | Cauce receptor |
|--------|-----------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------|----------------|
| EDAR 1 | -                     | Digestión aerobia termófila | SÍ                        | 82 500         | Río Ebro       |
| EDAR 2 | Lagunaje              | Digestión aerobia termófila | SÍ                        | 15 900         | Río Ebro       |
| EDAR 3 | -                     | Espesamiento                | NO                        | 4300           | Río Huecha     |
| EDAR 4 | -                     | Espesamiento                | SÍ                        | 19 800         | Río Alhama     |
| EDAR 5 | Filtros de arena      | -                           | NO                        | 350            | Río Esca       |

Figura 1. Diagrama de bloques de los tratamientos (Tto.) de agua y fangos desarrollados en las 5 depuradoras del estudio



Como se observa, dos de las depuradoras cuentan con tratamiento terciario en la línea de aguas, una de ellas mediante lagunaje y la otra emplea un sistema de filtros de arena que se pone en funcionamiento en época estival. En lo que al tratamiento de fangos se refiere, dos de ellas desarrollan digestión aerobia termófila de fangos, otras dos espesamiento de los mismos y la quinta EDAR no los trata in-situ sino que son transportados a otra planta (figura 1). Las muestras fueron tomadas en los meses de abril-julio del año 2015.

Las muestras de agua, fueron trasladadas hasta el laboratorio y conservadas hasta su análisis, en refrigeración. Se filtraron en una rampa de filtración Millipore, utilizando el kit de Embudos de Filtración Microfil® de 250 mL, a través de membranas de nitrato de celulosa de 0,7  $\mu\text{m}$  de Millipore®. Los filtros empleados durante el proceso fueron recogidos en tubos falcon

de 50 mL con una disolución salina estéril (0,9 % NaCl), para su posterior procesamiento una vez finalizado el proceso de filtración de todas las muestras provenientes de la planta analizada. Durante este tiempo, se genera un sedimento en el fondo del mismo, como consecuencia del desprendimiento de material de los filtros.

Las muestras de fango fresco (semi-sólido) fueron de 5 L y las de fango deshidratado (sólido) de 500 g. Las muestras de fango fresco (5 L) fueron centrifugadas por duplicado a 10 000 rpm durante 20 minutos (Beckman J2-21) separando en ambos procesos de centrifugación las fases agua-fango deshidratado, que fueron recogidas en dos recipientes estériles. El agua separada durante el doble proceso de centrifugación se filtra empleando la misma metodología. Los filtros fueron lavados uno a uno mediante agitación en vórtex con una disolución salina estéril (0,9 % NaCl) en presencia de bolas de zirconio.

Las amebas de vida libre fueron cultivadas en placas petri en agar no nutritivo (NNA) con una suspensión bacteriana de *Escherichia coli* (ATCC 25922) inactivada, que sirve como nutriente a las AVL.

Para las muestras de agua, se sembró un filtro que se dejó en contacto con el medio durante 24 horas, una gota del sedimento obtenido y una gota de la solución obtenida del lavado de los filtros. En las de fango, se sembró de nuevo un filtro procedente del agua obtenida tras la separación por centrifugación, una gota de la suspensión del lavado de filtros y una gota de una suspensión de fango deshidratado y suero fisiológico (0,9 % NaCl).

Las placas, se sellaron y se incubaron a 30 °C, observándose al microscopio a diario y considerando positivas aquellas en las que se pudo ver crecimiento de amebas y negativas, si no se encontró ningún crecimiento en 1 mes. El control diario de las placas se realizó por visión directa con ayuda de un microscopio Zeiss 10X.

Al tratarse de muestras ambientales provenientes de una matriz muy compleja como son las aguas residuales, el crecimiento de hongos en las placas está muy favorecido, arruinando el aislamiento de las AVL. Para evitar que esto ocurra, se realizaron un mínimo de cuatro resiembras procurando eliminar esta contaminación, y en caso de que no fuera posible, la muestra se considera como positiva por morfología, pero se desecha y no se continúa con su procesamiento. Esta técnica, garantizó también el aislamiento de un solo género de AVL, evitando así la obtención de muestras mixtas. Si en una placa se observaron trofozoítos o quistes con morfología distinta, se seleccionaron e inocularon en placas distintas. Además, también se consiguió la sustitución de posibles bacterias adheridas por *E. coli*<sup>9,16</sup>. Se considera que este número de resiembras proporcionan un medio lo suficientemente limpio para asumir que las bacterias detectadas por PCR sean bacterias endosimbiontes<sup>17</sup>.

La identificación de género y genotipo se llevó a cabo mediante amplificación por PCR de los genes que codifican el rRNA y posterior secuenciación, siguiendo para *Acanthamoeba*<sup>18</sup> y *Naegleria*<sup>19</sup> los protocolos descritos por Schroeder en 2001 y Pelandakisen 2002 respectivamente, mientras que para el resto de las amebas se aplican PCR más genéricas, como son FLA<sup>20</sup> y EUK<sup>21</sup>. También, se realizó una pentaplex-nested PCR modificada que permite identificar simultáneamente las siguientes bacterias albergadas en el interior de las AVL: *Legionella Pneumophila*, *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., Cianobacterias tóxicas y *Vibrio cholerae*<sup>17</sup>. Sin embargo, dada la baja presencia de esta última bacteria en España,

se realizó la PCR para la identificación simultánea de las cuatro primeras. En todos los casos el producto de ADN obtenido se separó en gel de agarosa al 1,5 %.

Par la extracción de ADN y purificación del mismo se utilizaron los kits comerciales Norgen Biotek Corp Stool ADN Isolation Kit (Ontario, Canada) y GFX™ PCR ADN and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), respectivamente. El ADN purificado se sometió a secuenciación directa en ambas direcciones en el centro de secuenciación y análisis genéticos de Zaragoza (C.A.G.T).

Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa BioEdit® y la herramienta informática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool del National Center for Biotechnology Information, NCBI) para el alineamiento de las secuencias obtenidas con las recogidas en la base de datos GenBank.

## RESULTADOS

Se aislaron amebas de vida libre en el 85 % de las muestras, consiguiendo un total de 41 amebas. De ellas, se identificaron genéticamente 21 AVL, encontrando que 13 pertenecían al género *Acanthamoeba* spp., principalmente al genotipo T4,6 se identificaron como *Naegleria* spp., especies *N. jadinyi* *N. clarki* y por último 2 se identificaron como *Vermamoeba vermiformis* (tabla 2).

Catorce AVL fueron aisladas en las muestras de salida del tratamiento de aguas o efluente, otras 3 en las de salida de la digestión aerobia de fangos y otras 3 más en las muestras procedentes de fango espesado. De estas 20 AVL correspondientes a muestras de salida de EDAR, bien en forma de aguas o de fangos, 8 pudieron ser identificadas genéticamente, de ellas 6 se correspondían con amebas descritas como potencialmente patógenas (*Acanthamoeba* spp. y *Vermamoeba vermiformis*) y las otras 2 con especies no patógenas del género *Naegleria* spp. (tabla 1). Se ha identificado *Acanthamoeba* spp. en el 45 % de las muestras recogidas. Una de las amebas identificadas como *Acanthamoeba* spp. (genotipo T4) corresponde al efluente de la EDAR 5 que dispone de tratamiento terciario (filtros de arena), aguas-abajo de la cual, a escasos kilómetros de la descarga del efluente en el río, se sitúa una zona de baño. Se aislaron e identificaron el mismo número de AVL en el efluente de las depuradoras que cuentan con tratamiento terciario (lagunaje y filtros de arena) como en las que no disponían de él.

Tabla 2. Relación de amebas de vida libre (AVL) aisladas e identificadas y bacterias endosimbiontes (ARB) en cada punto de muestreo, en función de la procedencia de las muestras: muestras de agua de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) con/sin tratamiento terciario y muestras de fango

| Punto de muestreo                               | AVL aisladas (identificadas) | AVL potencialmente patógenas | AVL con BRA en el interior | <i>Mycobacterium</i> spp. | <i>Pseudomonas</i> spp. | <i>Legionella pneumophila</i> |
|---|------------------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| Muestras de agua EDAR con tratamiento terciario |                              |                              |                            |                           |                         |                               |
| Entrada   | 4 (2)                        | 1                            | 1                          | 1                         | 0                       | 0                             |
| Salida  | 7 (3)                        | 3                            | 6                          | 5                         | 0                       | 1                             |
| Intermedia                                      | 5 (4)                        | 2                            | 5                          | 3                         | 1                       | 3                             |
| Muestras de agua EDAR sin tratamiento terciario |                              |                              |                            |                           |                         |                               |
| Entrada   | 6 (2)                        | 2                            | 4                          | 2                         | 3                       | 2                             |
| Salida  | 7 (3)                        | 1                            | 6                          | 5                         | 1                       | 3                             |
| Intermedia                                      | 1 (1)                        | 0                            | 1                          | 1                         | 0                       | 1                             |
| Muestras de fango                               |                              |                              |                            |                           |                         |                               |
| Entrada aerobio                                 | 5 (4)                        | 4                            | 3                          | 3                         | 0                       | 1                             |
| Salida aerobio                                  | 3 (1)                        | 1                            | 1                          | 0                         | 1                       | 1                             |
| Espesado  | 3 (1)                        | 1                            | 0                          | 2                         | 0                       | 1                             |

En la salida de la EDAR 1, que no dispone de tratamiento terciario, se aisló una AVL identificada como *Naegleria* sp. AG-2012. Dicha AVL fue caracterizada (GenBank: JQ678643.1) en un estudio realizado en el año 2012 en esta misma depuradora y únicamente se encontró en la muestra de efluente, sin hacerlo en la muestra puntual del agua de entrada a la planta.

En lo que se refiere a la identificación de bacterias endosimbiontes en el interior de las AVL, se obtuvo un resultado positivo a cualquiera de las bacterias analizadas en 27 (65,85 %) AVL, no detectándose cianobacterias tóxicas en ningún caso. Una ameba de vida libre aislada en el agua de entrada de la EDAR 1, albergaba 3 bacterias en su interior (*L. pneumophila*, *Pseudomonas* spp. y *Mycobacterium* spp.). Once amebas albergaron en su interior 2 bacterias, principalmente *Mycobacterium* spp y *Legionella pneumophila* y otras 15 amebas contenían en su interior una única bacteria. Además, 11 de las 15 AVL identificadas como patógenas, albergan bacterias potencialmente patógenas en su interior.

Un total de 22 AVL dieron un resultado positivo para *Mycobacterium* spp. Se obtuvo también un resultado positivo para *Legionella pneumophila* y *Pseudomonas* spp. en 13 y 6 amebas de vida libre, respectivamente, siendo destacable que 5 de las 6 AVL que albergan *Pseudomonas* spp. en su interior corresponden a muestras de agua y fango de la EDAR 1.

## DISCUSIÓN

Las amebas de vida libre son protozoos ubicuos, por lo que su eliminación de cualquier sistema de agua en imposible. Algunas de las especies potencialmente patógenas, como son *Acanthamoeba* spp. y *Vermamoeba* spp., se han encontrado frecuentemente en aguas naturales españolas<sup>22</sup>.

El menor número de AVL aisladas en el afluente respecto al efluente, puede relacionarse con que la matriz de agua a la entrada a la planta es más compleja, lo que dificulta considerablemente el aislamiento de amebas de vida libre, dada la elevada presencia de hongos y otros microorganismos ambientales como larvas de nematodos que contaminan los cultivos. Sin embargo, las muestras de agua recogidas tras el tratamiento de depuración presentaban menor turbidez, ya que se disminuye considerablemente la carga orgánica del agua, pero también parte de la contaminación microbiológica. A consecuencia de ello, disminuyó el número de cultivos contaminados.

Por otro lado, también hay que considerar que algunas AVL tienen su hábitat en la EDAR, participando en los procesos de depuración y formando parte de la de los microbiota que compone la planta, principalmente los biofilms que en ella se forman. Este hecho, favorece que se encuentre una mayor variedad de estos protozoos en

la salida de la planta si no se desarrolla ningún proceso para su eliminación en la EDAR. En este trabajo, se ha aislado en el efluente de la EDAR 1 una AVL identificada como *Naegleria* sp. AG-2012, caracterizada por primera vez en un estudio realizado en el año 2012 en esta misma depuradora, y que sin embargo, no se identifica en el afluente de la misma. Este hecho puede ser debido a que se trata de una muestra puntual de afluente, donde la matriz es más compleja y por tanto el aislamiento de las amebas también es más complicado dado el exceso de materia orgánica las enmascara. Sin embargo, dado que las AVL son protozoos ambientales que muchas veces encuentran en las depuradoras su nicho ecológico, este resultado sugiere que la AVL tiene su hábitat en la propia EDAR y no en las aguas urbanas y asimilables a urbanas que llegan a ésta.

En el efluente de la EDAR 5, en la que pocos kilómetros aguas-abajo se encuentra una zona de baño, se identificó una AVL como *Acanthamoeba* genotipo T4, descrita principalmente como productora de queratitis<sup>23</sup>. Esto puede suponer un riesgo para aquéllos bañistas que no utilicen protección para los ojos, principalmente para los portadores de lentes de contacto.

El estudio desarrollado por García et ál. sobre la presencia de AVL en embalses (68) y plantas depuradoras (15) de la Comunidad Autónoma de Aragón en el año 2013<sup>22</sup>, consiguió el aislamiento de AVL en el 77,1 % de las muestras. Seis de ellas procedían de plantas depuradoras, lo que implica un menor porcentaje de aislamiento en muestras de EDAR. Las AVL más frecuentemente identificadas fueron *Acanthamoeba* spp., seguido de *Vermamoeba* spp. y *Naegleria* spp. Los resultados obtenidos en este trabajo, son similares a los que aquí se presentan ya que la AVL más frecuentemente identificada es también *Acanthamoeba* spp., pero en este caso, seguida de *Naegleria* y por último *Vermamoeba vermiformis*.

En el año 2013, se llevó a cabo un trabajo en la meseta castellana<sup>24</sup> con el fin de incrementar el conocimiento que hasta entonces se tenía sobre la epidemiología de *Acanthamoeba* spp., analizando aguas de potabilizadoras, depuradoras, embalses, estaciones de aforo y aguas de la orilla de un río de la zona. Se identificó *Acanthamoeba* spp. en el 94,6 % de las muestras. Aunque este porcentaje es mayor al que se ha encontrado en este trabajo, hay que considerar que muchas amebas no pudieron ser identificadas y que de igual manera, es el género que más frecuentemente se ha identificado. Todo esto indica que cada EDAR constituye un ecosistema único, con diferentes poblaciones de AVL.

Se han encontrado bacterias resistentes a la depredación de las amebas en las AVL aisladas en muestras correspondientes a los efluentes de todas las EDAR, identificando *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas* spp. y *Mycobacterium* spp. En el análisis de fangos, se identificó alguna de estas tres BRA en todas las muestras de salida del tratamiento de digestión aerobia en las que se consiguieron aislar AVL (EDAR 1 y 2), *Legionella pneumophila* y *Mycobacterium* spp. en AVL del fango espesado de la EDAR 3, y ninguna en las aisladas en el fango espesado de la EDAR 4.

Por tanto, las AVL encuentran en las EDAR un ecosistema idóneo en el que cohabitan con numerosas bacterias, pudiendo fagocitar algunas de ellas, protegiéndolas de las condiciones menos favorables. Estas AVL, llegan a los cauces naturales mediante la descarga de los efluentes, donde pueden sobrevivir y proliferar, adquiriendo su forma quística cuando las condiciones sean menos favorables. De esta forma, en su recorrido a lo largo del cauce de los ríos, podrían llegar a formar parte de la microbiota del agua captada para la potabilización. Donde, dada su capacidad para superar los procesos de desinfección convencionales<sup>25</sup>, permanecerían en el agua potable. Por todo ello, es en las torres de refrigeración y en general, en sistemas artificiales de agua donde se forman aerosoles, donde se debería prestar especial atención a la presencia de AVL. Ya que, como se ha visto, pueden albergar en su interior una bacteria ambiental como es *L. pneumophila*, que se multiplica en su interior y aumenta su capacidad infectiva, una vez que se produce la lisis de la AVL.

De igual manera, se recomienda que en caso de reutilizar aguas residuales para el riego de jardines privados o zonas verdes urbanas, éste se haga en horario nocturno, para minimizar el contacto con la población. Además, si se reutilizan aguas residuales para el baldeo de calles o lavado industrial de vehículos, se aconseja la protección de las vías respiratorias de los trabajadores, si existe el riesgo de que se formen aerosoles. Estas medidas se deberían hacer extensibles a todos los usos que establece el RD 1620/2017 en los que exista riesgo de aerosolización y contacto de las aguas con la población o de forma general y sencilla, sería recomendable que en todos aquéllos usos para los que el RD 1620/2007 establece el control de *Legionella* spp. (aguas de proceso y limpieza industriales, riego de cultivos, torres de refrigeración y condensadores evaporativos de industrias que no estén ubicadas en zonas urbanas ni cerca de lugares con actividad pública o comercial, etc), también lo hiciera para las AVL.

El estudio sobre embalses y plantas depuradoras

en aguas de Aragón<sup>22</sup> encontró BRA en el 88,4 % de las amebas. En concreto, el 41,9 % contenían *Mycobacterium* spp., el 32,6 % *Pseudomonas* spp. y el 13,9 % *L. pneumophila*. En el presente estudio, *Mycobacterium* spp. fue también la bacteria más frecuentemente encontrada en el interior de las amebas, en concreto en el 53,66 %. Sin embargo, a esta bacteria le sigue *L. pneumophila* (31,70 %) y por último *Pseudomonas* spp. (14,63 %). Estas diferencias podrían deberse, principalmente, a la diferente composición microbiológica de las aguas que se estudian, ya que la AVL va a fagocitar las bacterias presentes en el medio y en este trabajo todas las muestras proceden de aguas residuales, mientras que en el realizado por García et ál., las muestras de EDAR suponen una minoría. No obstante, es preciso considerar que las poblaciones de ARB pueden variar en función del ecosistema en el que se encuentren, dependiendo tanto de factores medioambientales como antropogénicos (temperatura, cantidad y tipo de materia orgánica o situación puntual de la población del área circundante).

Cinco de las 6 AVL que albergan *Pseudomonas* spp. proceden de la EDAR 1, indicando una mayor presencia o concentración de esta bacteria en la depuradora estudiada. Se trata de una bacteria ambiental por lo que no es extraño que aparezca, esta tendencia puede deberse a que las condiciones medioambientales o una mayor aireación, favorezcan su proliferación. Además, su presencia puede ser consecuencia de que las interacciones entre los microbios de la zona lo permiten. La sexta AVL que alberga *Pseudomonas* procede de la depuradora aguas-abajo de la cual se localiza una zona de baño, además albergada en el interior de *Vermamoeba vermiformis*, asociada a la producción de queratitis.

La infección por *Pseudomonas* spp.<sup>26,27</sup>, es la que se ha encontrado más frecuentemente asociada a queratitis amebiana y tanto *Vermamoeba* spp.<sup>28</sup> como *Acanthamoeba* spp.<sup>23</sup> están descritas como productoras de queratitis. En este caso, se tiene una AVL identificada como *Vermamoeba vermiformis* que alberga en su interior *Pseudomonas* spp. pudiendo incrementar de esta forma la virulencia de ambos microorganismos. Hay que tener en cuenta que *Pseudomonas* spp. es una bacteria ambiental por lo que su presencia en estos sistemas está justificada.

## CONCLUSIONES

En las salidas de aguas y fangos de las EDAR se encontraron AVL pertenecientes a géneros potencialmente patógenos, en concreto *Acanthamoeba* spp. y *Vermamoeba* spp, independientemente de si el

proceso de depuración incluye o no un tratamiento terciario como es el filtro de arenas, destinado principalmente a la reducción de patógenos o como el lagunaje, que pretende reducir la carga orgánica. Se aislaron un mayor número de AVL en las muestras de efluente que en las de afluente, lo que se puede asociar a que la matriz de agua de entrada a la planta es más compleja, dificultando el asilamiento. Sin embargo, se demuestra que las AVL tienen su hábitat en las propias EDAR, lo que también podría estar relacionado con la mayor presencia de AVL en los efluentes. Se ha identificado *Pseudomonas* spp. *Mycobacterium* spp. y *L. pneumophila* en AVL aisladas en muestras de efluente; *L. pneumophila* en las aisladas en muestras de salida de la digestión aerobia y *Mycobacterium* spp. y *L. pneumophila* en las de fango espesado; favoreciendo la existencia de un efecto sinérgico entre AVL y BRA en su interior, en caso de que sean potencialmente patógenas.

## AGRADECIMIENTOS

El trabajo ha sido financiado por la DGA-FSE al Grupo de Referencia T51\_17R "Agua y Salud Ambiental" y el Proyecto CTM2013-41397-R de MINECO-FEDER. Los autores agradecen la colaboración de NILSA.

## BIBLIOGRAFÍA

- Coşkun KA, Özçelik S, Tutar L, et ál. Isolation and identification of free-living amoebae from tap water in Sivas, Turkey. *Biomed. Res. Int.* 2013; 2013:675145.
- Abdul Majid MA, Mahboob T, Mong BG, et ál. Pathogenic waterborne free-living amoebae: An update from selected Southeast Asian countries. *PLoSOne* 2017; 12(2):e0169448.
- Fernández MT. Caracterización molecular de Amebas de Vida Libre e identificación de otros parásitos en aguas de red de la provincia de Zaragoza. Asociación con otros microorganismos y riesgos para la Salud Pública. Tesis doctoral. Zaragoza: Universidad de Zaragoza. 2014.
- Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappiniadiploidea*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2007; 50(1):1-26.
- Visvesvara GS, Sriram R, Qvarnstrom Y, et ál. *Paravahlkampfi* *francinae* n. sp. masquerading as an agent of primary amoebic meningo encephalitis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2009; 56(4):357-66.
- Plutzer J, Karanis P. Neglected waterborne parasitic protozoa and their detection in water. *Water Res.* 2016; 101:318-32.
- Gelman BB, Rauf SJ, Nader R, et ál. Amoebic encephalitis due to *Sappiniadiploidea*. *JAMA* 2001; 285(19):2450-1.
- Qvarnstrom Y, da Silva AJ, Schuster FL, et ál. Molecular confirmation of *Sappiniadiploidea* as a causative agent of amoebic encephalitis. *J.*



- Infect. Dis. 2009; 199(8):1139-42.
9. García A, Goñi P, Clavel A, et ál. Potentially pathogenic free-living amoebae (FLA) isolated in Spanish wastewater treatment plants. *Environ. Microbiol. Rep.* 2011; 3(5):622-6.
  10. Goñi P, Fernández MT, Rubio E. Identifying endosymbiont bacteria associated with free-living amoebae. *Environ. Microbiol.* 2014; 16(2):339-49.
  11. Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17(2):413-33.
  12. Pagnier I, Valles C, Raoult D, La Scola B. Isolation of *Vermamoeba vermiformis* and associated bacteria in hospital water. *Microb. Pathog.* 2015; 80:14-20.
  13. Lanao M, Ormad MP, Goñi P, et ál. Inactivation of *Clostridium perfringens* spores and vegetative cells by photolysis and TiO<sub>2</sub> photocatalysis with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Sol. Energy.* 2010; 84(4):703-9.
  14. Mosteo R, Ormad MP, Goñi P, et ál. Identification of pathogen bacteria and protozoa in treated urban wastewaters discharged in the Ebro River (Spain): water reuse possibilities. *Water Sci. Technol.* 2013; 68(3):575-83.
  15. Marín I, Goñi P, Lasheras AM, Ormad MP. Efficiency of a Spanish wastewater treatment plant for removal potentially pathogens: Characterization of bacteria and protozoa along water and sludge treatment lines. *Ecol. Eng.* 2015; 74:28-32.
  16. Page FC. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae: With Instructions for Culture. Ambleside, Cumbria: Fresh water Biological Association. 1988.
  17. Calvo L, Gregorio I, García A, et ál. A new pentaplex-nested PCR to detect five pathogenic bacteria in free living amoebae. *Water Res.* 2013; 47(2):493-502.
  18. Schroeder JM, Booton GC, Hay J, et ál. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(5):1903-11.
  19. Pélandakis M, Pernin P. Use of multiplex PCR and PCR restriction enzyme analysis for detection and exploration of the variability in the free-living amoeba *Naegleria* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68(4):2061-5.
  20. Tsvetkova N, Schild M, Panaiotov S, et ál. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol. Res.* 2004; 92(5): 405-13.
  21. Hirt RP, Healy B, Vossbrinck CR, et ál. A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorphaneatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria. *Curr. Biol.* 1997; 7(12):995-8.
  22. Garcia A, Goñi P, Cieloszyk J, et ál. Identification of free-living amoebae and amoeba-associated bacteria from reservoirs and water treatment plants by molecular techniques. *Environ. Sci. Technol.* 2013; 47(7):3132-40.
  23. Abedkhozasteh H, Niyiyati M, Rezaei S, et ál. Identifying differentially expressed genes in trophozoites and cysts of *Acanthamoeba* T4 genotype: Implications for developing new treatments for *Acanthamoeba* keratitis. *Eur. J. Protistol.* 2015; 51(1):34-41.
  24. Magnet A, Fenoy S, Galván AL, et ál. A year long study of the presence of free living amoeba in Spain. *Water Res.* 2013; 47(19):6966-72.
  25. Delafont V, Mougari F, Cambau E, et ál. First evidence of amoebae-mycobacteria association in drinking water network. *Environ. Sci. Technol.* 2014; 48(20):11872-82.
  26. Sharma R, Jhanji V, Satpathy G, et ál. Coinfection with *Acanthamoeba* and *Pseudomonas* in contact lens-associated keratitis. *Optom. Vis. Sci.* 2013; 90(2):e53-5.
  27. Dini LA, Cockinos C, Frea JA, et ál. Unusual case of *Acanthamoeba polyphaga* and *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in a contact lens wearer from Gauteng, South Africa. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 9(2):826-9.
  28. Abedkhozasteh H, Niyiyati M, Rahimi F, et ál. First Report of *Hartmannella* keratitis in a Cosmetic Soft Contact Lens Wearer in Iran. *Iran J. Parasitol.* 2013; 8(3):481-5.