

Higiene y Sanidad Ambiental, **16** (4): 1467-1475 (2016)

Estudio de la capacidad de un sustrato arcilloso para la retención de microorganismos de origen fecal

STUDY OF THE CAPACITY OF A CLAY SUBSTRATE FOR RETENTION OF FAECAL MICROORGANISMS

Mariano GÓMEZ LÓPEZ¹, Manuel ARAUJO PRADO², Joaquín GARRIDO VÁZQUEZ²

¹ LABAQUA S.A., Laboratorio de Santiago de Compostela (España).

E- mail: mariano.gomez@labaqua.com

² Instituto de Investigación e Análise Alimentarios. Universidade de Santiago de Compostela (España).

RESUMEN

La restauración de los terrenos afectados por actividades extractivas mediante la reutilización de los fangos de depuración como abono para la regeneración de la cubierta vegetal de canteras ya agotadas puede ser una salida válida a considerar, tanto desde el punto de vista de la gestión de la EDAR, como desde una perspectiva medioambiental.

El estudio de la capacidad del sustrato arcilloso para retener bacteria se llevó a cabo empleando microorganismos indicadores de contaminación fecal, tales como *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*. Además se realizaron experimentos de retención de esporas de *Clostridium perfringens* y de células vegetativas *Salmonella enteritidis*. *S. enteritidis* es un patógeno transmitido por vía oral fecal, mientras *Clostridium perfringens*, es considerado un indicador específico de contaminación fecal, en particular, de virus y quistes u oquistes de protozoos.

Palabras clave: Sustrato arcilloso, contaminación fecal, microorganismos indicadores.

ABSTRACT

The restoration of land affected by mining activities through the reuse of sewage sludge as fertilizer for the regeneration of plant cover quarries and out can be a valid path to consider, both from the point of view of the management of the WWTP as from an environmental perspective.

The study of the ability of a clay substrate to bacteria retain was conducted using faecal indicator microorganisms, such as *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* contamination. Moreover retention experiments *Clostridium perfringens* spores and vegetative cells of *Salmonella enteritidis* were performed. *S. enteritidis* is a fecal borne pathogen orally, while *Clostridium perfringens*, is considered a specific indicator of fecal contamination, in particular viruses and cysts or oocysts protozoa.

Keywords: Clay substrate, fecal contamination, indicator microorganisms.

INTRODUCCIÓN

La tecnología más común para el tratamiento de aguas residuales municipales aplicada en Europa, es el proceso de lodos activos, un proceso biológico que consume grandes cantidades de energía y genera

grandes cantidades de lodos orgánicos. Estos lodos, separados del agua tratada en la última etapa del proceso, contienen más del 90 % de agua y son altamente biodegradables. Para facilitar el manejo y la eliminación de los lodos se suelen aplicar procesos de desecación. Hasta ahora, las principales vías de

eliminación han sido transportar los lodos a vertederos, esparcirlos en la tierra, verterlos al mar (sobre todo en el Reino Unido) e incinerarlos.

Sin embargo, los tiempos están cambiando y están apareciendo restricciones sobre todas las vías de eliminación de los lodos. Una legislación sobre eliminación de residuos más restrictiva, junto con la preocupación por los posibles riesgos medioambientales y sanitarios que conlleva esparcir los lodos en tierras de cultivo, están haciendo más agudo el problema de la eliminación de los lodos. Simultáneamente, continúan construyéndose plantas de tratamiento de aguas residuales con lodos activos, en cumplimiento de la directiva sobre aguas residuales, y, previsiblemente, continuarán funcionando como "fábricas de lodos" a largo plazo, con una producción imparable. Es, por tanto, esencial encontrar modos de eliminación factibles, seguros y sostenibles para los lodos residuales.

La restauración de los terrenos afectados por actividades extractivas mediante la reutilización de los fangos de depuración como abono para la regeneración de la cubierta vegetal de canteras ya agotadas puede ser una salida válida a considerar, tanto desde el punto de vista de la gestión de la EDAR, como desde una perspectiva medioambiental.

No obstante, debe de tenerse en cuenta que la aplicación de un fango de depuración sobre una cantera supone toda una serie de interacciones, no solo con el sustrato receptor sino también con el acuífero subyacente, la vegetación colonizadora y el entorno medioambiental en general, que es necesario valorar cuidadosamente antes de llevar a cabo este proceso de restauración.

Los principales contaminantes que se generan durante la reutilización de aguas residuales o lodos de depuración pueden dividirse en dos tipos: agentes biológicos y agentes químicos. Con mayor frecuencia, los agentes biológicos son los que poseen un mayor riesgo para la salud de las personas. Los agentes patógenos más importantes que existen en el agua y que se han encontrado en los lodos son las bacterias (como *Salmonella* spp), los virus (sobre todo, enterovirus), los protozoos, los trematodos, los cestodos y los nematodos. Como resultado, para que cualquier vertido de los lodos sea seguro se precisa la eliminación, o al menos una inactivación suficiente, de estos agentes patógenos. En caso contrario, debe garantizarse que el suelo sobre el que se deposite el lodo sea capaz de retener estos microorganismos, si no se quiere correr el riesgo de contaminar las aguas subterráneas.

El suelo en el que se depositan las aguas residuales o los lodos de depuración puede considerarse como un medio continuo y poroso biológicamente vivo que controla los procesos de filtración del fluido que fluye a través de él. La alta área de superficie específica de las partículas de suelo establece un excelente medio para una gran variedad de complejos procesos, muchos de los cuales intervienen en el proceso de purificación (Oron y cols., 1995). Estos

procesos conducen a la degradación de los microorganismos, a la adsorción por las partículas del suelo y, eventualmente, a la adsorción a las raíces de las plantas. La eficiencia de los fenómenos de adsorción, inactivación y unión a las partículas del suelo depende de las características del suelo, de la calidad del agua residual o de los lodos y de las tasas de aplicación. La eficiencia de la filtración del suelo y, por tanto, la eliminación de los microorganismos viene definida por varias propiedades (Oron y cols., 1995):

- Distribución de las partículas y tamaño medio, que influyen en la capacidad de almacenamiento mecánico de las partículas suspendidas.
- Contenido de humedad y frecuencia de fluctuación, que influyen en la viabilidad de los microorganismos.
- Contenido en aire, que afecta a la actividad biológica y química.
- Contenido en materia orgánica, que puede influir en la actividad de los microorganismos en el suelo.
- Reactividad del suelo determinada por el pH.
- Propiedades de adsorción, relacionadas con la composición y área específica de las partículas de suelo.
- Respuesta magnética o eléctrica de las partículas del suelo a las partículas contenidas en el efluente.

De acuerdo con diversos trabajos científicos, la retención de bacterias en el suelo o en otro tipo de medio poroso está controlada principalmente por las tensiones físicas y la adsorción a la superficie. La capacidad de retención de las bacterias por filtración es inversamente proporcional al tamaño de las partículas y a la tasa del flujo de agua. La adsorción de las bacterias está influenciada por diversos factores, tales como la carga neta superficial del medio poroso y de las bacterias, la hidrofobicidad de la superficie celular, la presencia de polisacáridos extracelulares y la fuerza iónica de la solución acuosa (Bai y cols., 1997). Aunque está demostrado el movimiento de los microorganismos en el suelo, numerosos estudios han demostrado que esta movilidad en condiciones naturales es muy baja. Así, Wollum y Cassel (1978) mostraron que el 90% de las bacterias añadidas a una columna de arena quedaron retenidas en los tres primeros centímetros. De forma similar, Harvey y col. (1991) hallaron que más del 99% de las bacterias inyectadas en un acuífero de arena no alcanzaron un pozo a 1,7 m del lugar de la inyección.

El trabajo se ha programado para llevarlo a cabo en dos fases. La primera fase consistió en realizar diversas pruebas con diferentes tipos de columnas descritas en la bibliografía especializada, con el objeto de seleccionar aquellas columnas que mejor se adaptaran al tipo de sustrato que se pretendía emplear.

La segunda fase correspondió a los diferentes experimentos que permitieron determinar la capacidad de retención de este sustrato arcilloso de diver-

dos tipos de microorganismos, incluidos bacterias y virus (bacteriófagos).

El estudio de la capacidad del sustrato arcilloso para retener bacterias se llevó a cabo empleando microorganismos indicadores de contaminación fecal, tales como *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*. Además se realizaron experimentos de retención de esporas de *Clostridium perfringens* y de células vegetativas de *Salmonella enteritidis*. *S. enteritidis* es un patógeno transmitido por vía oral fecal, mientras *Clostridium perfringens* es considerado un indicador específico de contaminación fecal, en particular, de virus y quistes u oquistes de protozoos.

La contaminación por virus de las aguas subterráneas es más difícil de estudiar que la contaminación bacteriana, en particular, porque los principales virus que causan enfermedades transmitidas por el agua (rotavirus, adenovirus, virus Norwalk y virus de la hepatitis A) son más difíciles de determinar (Sinton y cols., 1997). De esta forma, aunque se han llevado a cabo algunos estudios con estos virus en aguas subterráneas, muchos investigadores han empleado enterovirus (son los virus humanos que se cultivan con mayor facilidad) o bacteriófagos. Este último grupo incluye dos tipos de bacteriófagos: colifagos somáticos, que atacan la pared celular de *E. coli*, y son empleados como indicadores de contaminación fecal (APHA, 1998); fagos F-específicos, que atacan a los pili sexuales "F" de un hospedador adecuado, y son empleados como modelo de virus entéricos (Havelaar y cols., 1993). Un gran número de estudios con fagos F-específicos han incluido colifagos F-RNA, particularmente MS2. Estos colifagos exhiben tasas de supervivencia en aguas subterráneas similares a los enterovirus (Yates y cols., 1985) y tienen una morfología similar a los rotavirus y adenovirus (IAWPRC, 1991).

En base a lo expuesto se llevaron a cabo experimentos con dos tipos de bacteriófagos: MS2 y ϕ X174.

MATERIAL Y MÉTODOS

Suelo

El suelo seleccionado se recogió en una fosa de textura arcillosa resultante de la extracción de arcillas localizada en Xunqueira de Espadañedo (Orense).

Previamente a los ensayos, el suelo fue pasado a través de un tamiz con un tamaño de poro de 2 mm, separando las partículas de tamaño mayor a 2 mm. Posteriormente, se lavó con agua destilada y se secó a 100°C durante 24 h, sin ningún tratamiento adicional para evitar posibles cambios (Bai y cols., 1997). Las características del sustrato arcilloso se encuentran definidas en la tabla 1.

Microorganismos

El análisis de la capacidad de retención de microorganismos del sustrato seleccionado se llevó a

Tabla 1. Características del sustrato arcilloso procedente de Xunqueira de Espadañedo.

Fracción de sólidos	0,050-0,125 mm	8,65%
	0,125-0,250 mm	8,45%
	0,250-0,500 mm	9,85%
	0,500-1.000 mm	9,50%
	1.000-2.000 mm	7,15%
pH	7,84	
Porosidad	42%	
Densidad	1,193 gr/mL	
Material	Limo arcilloso	

cabo mediante el empleo de diferentes suspensiones de microorganismos, entre los que se incluyeron bacterias indicadoras de contaminación fecal y de la presencia de patógenos de origen fecal, bacterias patógenas y virus bacterianos.

Las cepas bacterianas que se han utilizado en los ensayos fueron suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo y correspondieron a las siguientes: *Escherichia coli* CECT 425, *Enterococcus faecalis* CECT 967, *Clostridium perfringens* CECT 376 y *Salmonella* spp CECT 556.

Las suspensiones bacterianas de las cepas de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Salmonella* spp se han preparado, empleando como diluyente agua de peptona al 0,1 %, a partir de cultivos de una noche de estas cepas en caldo tripticosa soja a 37°C. El recuento de estos microorganismos se llevó a cabo mediante la técnica de siembra por inclusión en agar tripticosa soja, tras la incubación de las placas a 37°C/24 h.

Las suspensiones de esporas de *Clostridium perfringens* se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito por Smith (1985). Brevemente, las esporas de *Clostridium perfringens* se obtuvieron tras la inoculación de medio de esporulación Duncan-Strong con cultivos crecidos en caldo tioglicolato y la incubación a 35°C/72 h. Las esporas se recogieron mediante centrifugación (10.000×g/15min/4°C), lavado dos veces en agua de peptona (0,1 %), resuspensión en etanol a 50% durante 15 min para destruir las formas vegetativas, lavado tres veces en agua de peptona (0,1 %) y almacenamiento en leche estéril a 4°C. Las diferentes concentraciones de esporas se prepararon mediante diluciones seriadas en agua de peptona (0,1 %). Los recuentos de esporas de *Clostridium perfringens* se llevaron a cabo mediante la siembra por inclusión en agar triptosa sulfito cicloserina, tras la incubación de las placas a 37°C/24 h en anaerobiosis.

Como modelo de virus en este estudio se han empleado dos bacteriófagos: MS2 y ϕ X174, suministrados por la Colección Alemana de Cultivos Tipo.

La cepa de bacteriófago ϕ X174 DSM 4497 es un virus icosaédrico, de 23 nm de diámetro, con DNA monocatenario y con un punto isoeléctrico de 6,6. El hospedador empleado para el cultivo de este virus fue la cepa de *E. coli* DSM 13127, procedente de la Colección Alemana de Cultivos Tipo.

La cepa de bacteriófago MS2 DSM 13767 es un virus icosaédrico (diámetro medio de unos 25 nm) con RNA monocatenario y con un punto isoeléctrico de 3,9. El hospedador empleado para el cultivo de este virus fue la cepa de *E. coli* DSM 5695, procedente de la Colección Alemana de Cultivos Tipo.

Las suspensiones de bacteriófagos se han obtenido a partir de un stock preparado previamente, de acuerdo con las especificaciones de la Colección Alemana de Cultivos Tipo. Dicho stock se obtuvo tras cultivar los bacteriófagos mediante el ensayo de la doble capa de agar (APHA, 1998) con la cepa hospedadora correspondiente, empleando agar tripticasa soja para la cepa MS2 y agar Luria para la cepa ϕ X174. Tras la incubación de las placas a 35°C/12 h, se escogieron aquellas con placas de lisis confluentes. Sobre estas placas se añadió tampón salino (Na_2HPO_4 , 7 g; KH_2PO_4 , 3 g; NaCl, 5 g; MgSO_4 0,1M, 10 ml; CaCl_2 0,1M, 10 ml; H_2O destilada, 1000 ml), tras lo cual se mantuvieron en agitación durante 6 h. Posteriormente, se recogió la solución, se centrifugó (5.000×g/10 min) y filtró a través de membranas de 0,45 μm de diámetro de poro. El stock así preparado se almacenó a 4 °C.

A partir de stock de bacteriófagos se prepararon las suspensiones mediante diluciones apropiadas en el mismo tampón salino descrito previamente. Los recuentos de bacteriófagos se llevaron a cabo mediante la técnica de la doble capa de agar descrita previamente.

Columnas de suelo

Para la preparación de las columnas de suelo se emplearon dos tipos de cilindros de vidrio borosilicato: uno de 20 cm de longitud y 1,5 cm de diámetro (GlassEcono-Column, Bio-Rad) y otro de 20 cm de longitud y 1,6 cm de diámetro con un adaptador interno (Referencia C 16/20, Amersham Pharmacia Biotech), que se puede modificar la longitud de la columna mediante el adaptador ó émbolo interno (Figura 1). Este último tipo resultó ser el más efectivo para llevar a cabo los ensayos.

Los cilindros han sido esterilizados a 121 °C durante 20 minutos antes de cada ensayo. A continuación se rellenaron empaquetando suelo seco uniformemente, para evitar flujos predeterminados. El suelo se depositó en condiciones de saturación, facilitando su manejo y su distribución en el interior del tubo para conseguir una distribución homogénea en el interior de la columna. Posteriormente se hizo pasar un flujo de agua o solución salina hasta alcanzar, en

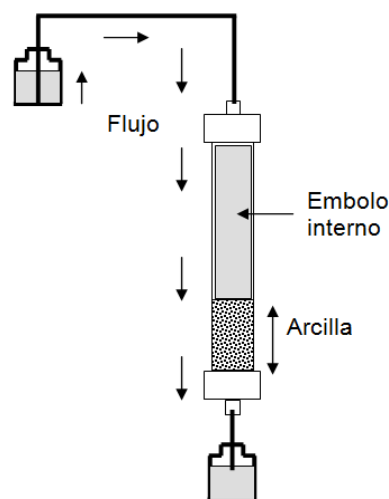


Figura 1. Diagrama esquemático de la columna de suelo

condiciones de saturación, un flujo constante. Este flujo se mantuvo a tasa constante mediante un recipiente con la solución localizado a la altura de la columna y conectado con ella mediante un tubo (Figura 1).

Debido a las características del suelo, el flujo de agua a través de la columna es muy lento de modo que es difícil establecer un flujo o caudal definido. Por ello, se han llevado a cabo los ensayos dejando que la solución fluya por gravedad y recogiendo el volumen inicial. Todos los experimentos con las columnas se llevaron a cabo a una temperatura de 4 °C y a un tiempo no superior a 48 horas.

Antes de iniciar los experimentos de retención, se realizaron pruebas previas para comprobar que, tanto el cilindro como el tubo, no retenían microorganismos (bacterias o virus).

Los experimentos de retención de bacterias y virus se llevaron a cabo preparando diferentes suspensiones de microorganismos en un volumen final de 10 ml (agua de peptona al 0.1 % para bacterias y tampón salino para virus). Una vez preparadas las suspensiones de microorganismos, el recipiente con los 10 ml de solución se colocó a la altura de la columna, como había sido determinado previamente; y, tras la conexión a la misma, se permitió que toda la solución fluyera a través de la columna, recogiénola por completo por el otro extremo. La solución recogida se sometió a análisis para determinar el recuento de los diferentes microorganismos ensayados, mediante los métodos de recuento descritos con anterioridad.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y a 4°C para minimizar la inactivación de los microorganismos debido a altas temperaturas. A partir de los resultados obtenidos se determinó la canti-

dad de microorganismos que no habían sido retenidos y los porcentajes de retención para los distintos microorganismos.

Experimentos de adsorción de virus mediante cultivos "batch"

La adsorción al sustrato arcilloso de las dos cepas de bacteriófagos empleadas en este trabajo se determinó también mediante la técnica estándar de equilibrio en "batch".

Los experimentos "batch" han sido llevado a cabo en tubos de centrífuga de tipo Pyrex estériles, en los que se preparó una mezcla de suelo y tampón con diferentes concentraciones de bacteriófagos (entre 10^{10} y 10^4 UFC/ml) a una proporción de 1:1 (peso/volumen) (Thompson y cols., 1998; YanJin y cols., 1997). Los tubos, una vez preparados, se agitaron a 90 rpm/min y 22,4 °C durante periodos de tiempo de 1 min, 10 min, 30 min, 60 min, 90 min y 120 min. Posteriormente, se centrifugaron a 3.000 g/15 min en refrigeración (7°C) para separar el suelo de la solución tampón y virus no adsorbidos al suelo. El sobrenadante así obtenido, se ensayó mediante el método de la doble capa de agar para el recuento de los bacteriófagos. Al mismo tiempo se emplean controles a los mismos tiempos de agitación y centrifugación para descartar muerte del virus, inactivación o adsorción a las paredes del tubo.

La concentración de bacteriófagos adsorbida se calculó mediante la diferencia entre la concentración inicial en la suspensión original y la que resulte después de la agitación y centrifugación (es decir, la concentración determinada a partir del sobrenadante):

$$\text{Adsorción} = (S_0 - S) / M,$$

siendo S_0 la suspensión inicial de bacteriófagos (UFC/ml), S el resultado del sobrenadante ensayado (UFC/ml) y M la masa total de suelo por unidad de volumen de la suspensión de bacteriófagos (g/ml). (Mills y cols., 1994; Powelson y Yerba, 1994; Thompson y cols., 1998).

Una vez conocido el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio, se determinó la isoterma de adsorción empleando el mismo tipo de tubos con la misma mezcla de suelo y suspensión de virus. En este caso, los tubos se agitaron durante 10 minutos a una temperatura 22°C y a una velocidad de 90 rpm/min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se exponen los resultados obtenidos del estudio de la capacidad del sustrato arcilloso para retener diferentes tipos de cepas bacterianas y virus. Los estudios de retención de bacterias se han llevado a cabo exclusivamente con las columnas de suelo diseñadas en el laboratorio. Por el contrario, el análisis de la capacidad del sustrato arcilloso para retener virus se ha llevado a cabo mediante el empleo de cultivos "batch" y de las columnas de suelo.

Tabla 2. Retención de *Escherichia coli* obtenida con las columnas del sustrato arcilloso.

Suspensión inicial ensayada (UFC/ml)	Concentración final en la solución recogida tras el paso por la columna (UFC/ml)	Retención (%)
$3,3 \times 10^9$	$1,4 \times 10^4$	99,9996
$2,6 \times 10^9$	$< 10^3$	99,9999
$1,7 \times 10^9$	$1,9 \times 10^2$	99,9999
$9,7 \times 10^8$	< 10	100,00
$6,3 \times 10^6$	< 10	100,00

Tabla 3. Retención de *Salmonella* spp obtenida con las columnas del sustrato arcilloso.

Suspensión inicial ensayada (UFC/ml)	Concentración final en la solución recogida tras el paso por la columna (UFC/ml)	Retención (%)
$5,8 \times 10^8$	$5,3 \times 10^2$	99,9999
$2,8 \times 10^8$	$1,7 \times 10^2$	99,9999
$8,7 \times 10^7$	$0,9 \times 10^2$	99,9996
$2,5 \times 10^7$	< 10	100,00

Retención de bacterias del sustrato arcilloso obtenida mediante el empleo de columnas de suelo

Los resultados de retención de *E. coli* obtenidos en las columnas del sustrato arcilloso se muestran en la tabla 2. Los datos presentados en esta tabla, indican en primer lugar que el sustrato introducido en las diferentes columnas es capaz de retener una concentración de *E. coli* superior a $9,7 \times 10^8$ UFC/ml. Cuando se hizo fluir a través de las columnas de arcilla una suspensión de *E. coli* con una concentración inferior a 10^9 UFC/ml, la retención fue del 100 %. De acuerdo con la tabla 2, concentraciones superiores a 10^9 UFC/ml no son completamente retenidas por la columna, aunque puede observarse que el porcentaje de retención fue superior al 99,999 %.

En la tabla 3 se representan los resultados de retención obtenidos con distintas suspensiones celulares de *Salmonella* spp. Las columnas de sustrato arcilloso empleadas en este trabajo retuvieron concentraciones de *Salmonella* spp superiores a $2,5 \times 10^7$ UFC/ml con una eficacia del 100 %. Si comparamos los resultados de la tabla 3 con los resultados presentados en la tabla 2, puede deducirse

Tabla 4. Retención de *Enterococcus faecalis* obtenida con las columnas del sustrato arcilloso

Suspensión inicial ensayada (UFC/ml)	Concentración final en la solución recogida tras el paso por la columna (UFC/ml)	Retención (%)
$2,8 \times 10^9$	< 10	100,00
$1,1 \times 10^9$	< 10	100,00
$2,3 \times 10^8$	< 10	100,00
$5,4 \times 10^7$	< 10	100,00

Tabla 5. Retención de esporas de *Clostridium perfringens* obtenida con las columnas del sustrato arcilloso

Suspensión inicial ensayada (UFC/ml)	Concentración final en la solución recogida tras el paso por la columna (UFC/ml)	Retención (%)
$2,3 \times 10^6$	< 10	100,00
$1,6 \times 10^6$	< 10	100,00
$1,3 \times 10^6$	< 10	100,00
$3,9 \times 10^4$	< 10	100,00

que la capacidad de retención de este sustrato fue mayor con suspensiones de *E. coli* que con *Salmonella* spp. No obstante, en la tabla 3 puede observarse que la tasa de retención de *Salmonella* spp de la columna empleada en este trabajo fue superior al 99,999 %, aun cuando se considere la concentración más elevada de *Salmonella* spp ensayada ($>5 \times 10^8$ UFC/ml).

La capacidad de las columnas utilizadas para retener bacterias Gram-positivas también fue muy elevada e incluso superior a la obtenida con bacterias Gram-negativas. La tabla 4 pone de manifiesto que el suelo empaquetado en las columnas fue capaz de retener con una eficacia del 100 % niveles de *Enterococcus faecalis* superiores a $2,8 \times 10^9$ UFC/ml, que fue la concentración más alta ensayada en este trabajo.

Una elevada tasa de retención también se obtuvo cuando en los experimentos con las columnas se emplearon suspensiones de esporas de *Clostridium perfringens* (Tabla 5). De acuerdo con los datos mostrados en esta tabla, las columnas de sustrato arcilloso preparadas empaquetando 10 g del mismo fueron capaces de retener suspensiones de esporas superiores a $2,3 \times 10^6$ UFC/ml presentes en la solución

de 10 ml que se hizo pasar a través de dichas columnas. En este caso, por cuestiones técnicas no fue posible ensayar suspensiones con concentraciones mayores de esporas. No obstante, se puede deducir que la columna diseñada con el sustrato arcilloso tiene una alta capacidad para retener tanto células vegetativas, como esporas bacterianas.

Retención de virus del sustrato arcilloso

Adsorción de bacteriófagos mediante el empleo de cultivos en "batch"

Los resultados de la cinética de absorción de bacteriófagos ϕ X174 al sustrato arcilloso se muestran en la Figura 2. En esta gráfica, puede observarse que con independencia de la concentración inicial de bacteriófagos ($8,7 \times 10^8$, $3,2 \times 10^6$ y $3,5 \times 10^4$ UFP/ml) empleada en los ensayos, la adsorción a las partículas de suelo se produce durante el primer minuto de contacto. Tras este periodo de tiempo, no se observan variaciones significativas en la adsorción tras 60 minutos de agitación.

Los resultados de la cinética de absorción de bacteriófagos MS2 al sustrato arcilloso se muestran en la Figura 3. En esta gráfica, puede observarse que partiendo de una concentración inicial de bacteriófagos 8×10^{10} UFP/ml empleada en los ensayos, la adsorción a las partículas de suelo se produce durante los primeros 10 minutos de contacto. Tras este periodo de tiempo, no se observan variaciones significativas en la adsorción tras 120 minutos de agitación.

Una vez conocida la cinética de adsorción de los dos tipos de bacteriófagos, se han llevado a cabo ensayos con suspensiones de bacteriófagos a concentraciones que oscilaron entre 10^9 y 10^4 UFC/ml para calcular las isotermas de adsorción. Los tubos con la mezcla de suelo y suspensión de virus se mantuvieron en este caso en agitación durante 10 minutos.

Las isotermas de adsorción obtenidas con los bacteriófagos ϕ X174y MS2 se muestran en las Figuras 4 y 5.

Los resultados mostrados por las isotermas de adsorción indican que hasta suspensiones de 10^{10} UFP/ml, la adsorción es lineal y que el suelo aún no se encuentra saturado completamente de bacteriófagos. Aunque se observa una relación lineal para los dos tipos de virus, se aprecian diferencias entre ellos.

El porcentaje de adsorción de bacteriófagos MS2 fue superior al observado con bacteriófagos ϕ X174. Este fue prácticamente del 100% cuando se han empleado suspensiones inferiores a 10^6 UFP/ml, aunque a medida que aumenta la concentración de bacteriófagos MS2 disminuye la adsorción, quizás debido a una saturación del suelo empleado.

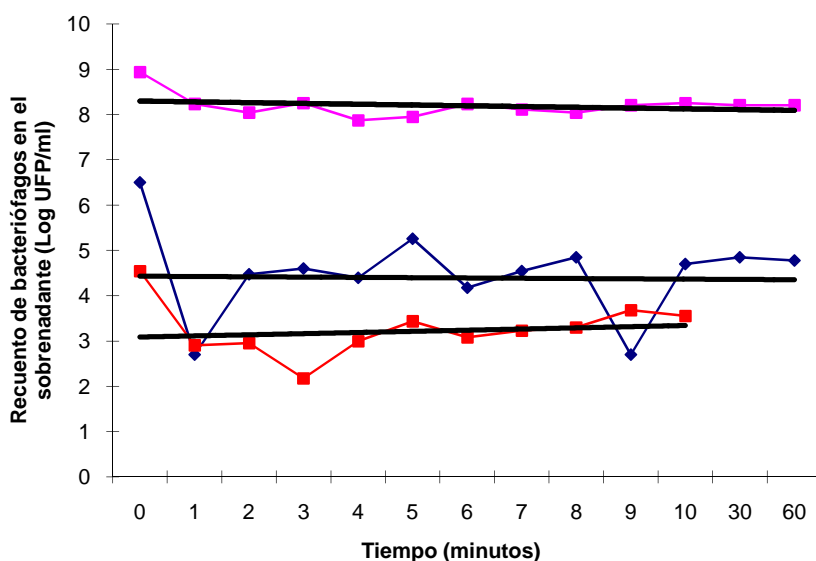


Figura 2. Recuento de bacteriófagos ϕ X174 obtenidos a partir del sobrenadante resultante de la centrifugación de una mezcla de sustrato arcilloso y diferentes suspensiones del fago, tras una hora de agitación a 22,4 °C.

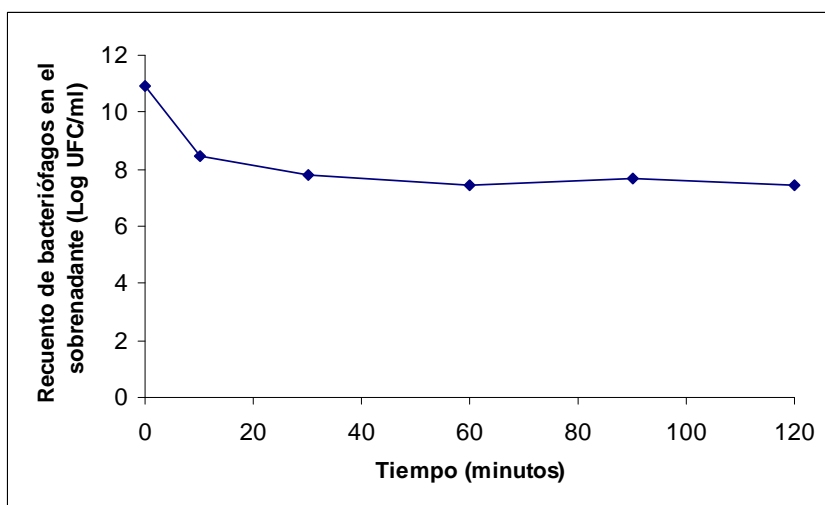


Figura 3. Recuento de bacteriófagos MS2 obtenidos a partir del sobrenadante resultante de la centrifugación de una mezcla de sustrato arcilloso y diferentes suspensiones del fago, tras dos horas de agitación a 22,4 °C.

La menor adsorción de bacteriófagos ϕ X174 al sustrato arcilloso ensayado puede tener relación con el punto isoeléctrico del microorganismo. Varios estudios (Dowd y col., 1998) demostraron que la adsorción se produce por interacciones de cargas entre las partículas de suelo y los microorganismos. Las partículas virales se componen de numerosas proteínas ionizables, que se unen al sustrato por intercambio de cargas iónicas. La adsorción aumenta al disminuir el punto isoeléctrico de los bacteriófagos. Los bacteriófagos MS2 tienen un punto

isoeléctrico más bajo que los bacteriófagos ϕ X174, lo que puede explicar su mayor adsorción al suelo, tal como parecen demostrar los resultados obtenidos. Como veremos a continuación, esta mayor retención de bacteriófagos MS2 por este sustrato arcilloso se obtuvo cuando los experimentos se llevaron a cabo con columnas de suelo.

En las tablas 6 y 7 se presentan los resultados obtenidos después de permitir el paso de diferentes suspensiones de bacteriófagos a través de las columnas de suelo. Si comparamos los resultados obtenidos con las dos cepas de bacteriófagos, puede deducirse claramente que la retención del fago MS2 fue superior a la obtenida con el fago ϕ X174.

Estos datos confirman los resultados obtenidos con los cultivos "batch". La tasa de retención de bacteriófagos MS2 fue del 100 % cuando se emplearon suspensiones con una concentración inferior a $1,7 \times 10^6$ UFP/ml. Con concentraciones más elevadas, aunque la tasa de retención no fue del 100 %, ésta siguió siendo muy elevada con valores superiores al 99,999 %. En este sentido, la capacidad del suelo para retener bacteriófagos MS2 (colifagos que exhiben tasas de supervivencia en aguas subterráneas similares a los enterovirus y que tienen una morfología similar a los rotavirus y adenovirus) fue similar a la obtenida con bacterias.

Por el contrario, la retención del suelo cuando se emplean suspensiones de bacteriófagos ϕ X174 fue inferior. Con concentraciones relativamente bajas ($5,0 \times 10^4$ UFP/ml), el suelo no retiene el 100 % de virus. No obstante, si lo evaluamos en términos porcentuales, aunque la tasa de retención de este tipo de virus es menor que la observada con el resto de microorganismos ensayados, en la tabla 6 puede observarse que independientemente de la concentración empleada la tasa de retención de bacteriófagos ϕ X174 fue superior al 99 %.

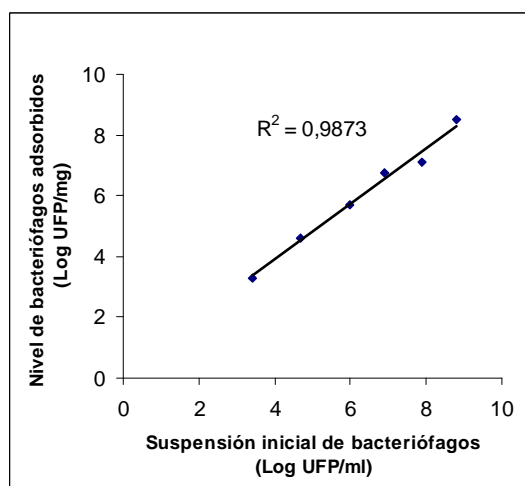


Figura 4. Isoterma de adsorción de bacteriófagos ϕ X174 al sustrato arcilloso empleando una mezcla de suelo y suspensión de fagos a una proporción 1:1 (peso/volumen) y tras 10 minutos de contacto.

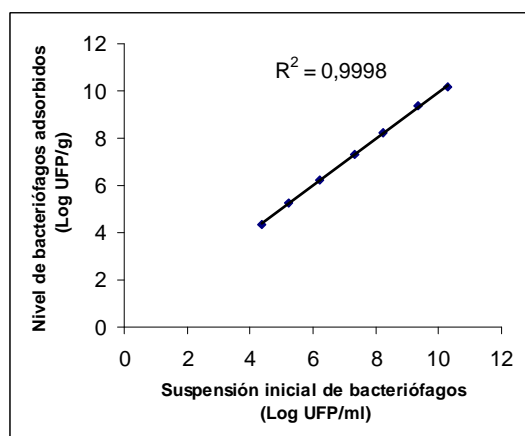


Figura 5. Isoterma de adsorción de bacteriófagos MS2 al sustrato arcilloso empleando una mezcla de suelo y suspensión de fagos a una proporción 1:1 (peso/volumen) y tras 10 minutos de contacto.

Tabla 6. Retención de bacteriófagos ϕ X174 obtenida con las columnas del sustrato arcilloso.

Suspensión inicial ensayada (UFC/ml)	Concentración final en la solución recogida tras el paso por la columna (UFC/ml)	Retención (%)
$9,3 \times 10^7$	$1,1 \times 10^6$	98,8172
$7,0 \times 10^6$	$5,3 \times 10^4$	99,2429
$5,4 \times 10^5$	$1,8 \times 10^3$	99,6667
$5,0 \times 10^4$	$0,33 \times 10^2$	99,9340

Tabla 7. Retención de bacteriófagos MS2 obtenida con las columnas del sustrato arcilloso.

Suspensión inicial ensayada (UFC/ml)	Concentración final en la solución recogida tras el paso por la columna (UFC/ml)	Retención (%)
$1,7 \times 10^8$	$6,6 \times 10^2$	99,9996
$2,2 \times 10^7$	$0,6 \times 10^2$	99,9997
$1,7 \times 10^6$	< 10	100,00
$1,7 \times 10^5$	< 10	100,00
$2,3 \times 10^4$	< 10	100,00

BIBLIOGRAFÍA

- APHA (1988) Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA, AWWA, WEF. 20th Edition. Washington DC.
- Bai, G., Brusseau, M.L., Miller, R.M. (1997) Influence of a Rhamnolipid Biosurfactant on the Transport of Bacteria through a Sandy Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1866-1873.
- Dowd, S.E., Pillai, S.D., Wang, S., Corapcioglu, M.Y. (1998) Delineating the Specific Influence of Virus Isoelectric Point and Size on Virus Adsorption and Transport through Sandy Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:405-410.
- Harvey, R.W., Garabedian, S.P. (1991) Use of colloid filtration theory in modelling movement of bacteria through contaminated sandy aquifer. *Environ. Sci. Technol.* 25:178-185.
- Havelaar, A.H., van Olphen, M., Drost, Y.C. (1993). F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2956-2962.
- IAWPRC (1991) *Water Res.* 25:529.
- Mills, A.L., Herman, J.S., Hornberger, G.M., DeJesús, T.H. (1994) Effect of Solution Ionic Strength and Iron Coatings on Mineral Grains on the Sorption of Bacterial Cells to Quartz Sand. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3300-3306
- Oron, G., Goemans, M., Manor, Y., Feyen, J. (1995) Poliovirus distribution in the soil-plant system under reuse of secondary wastewater. *Water Res.* 29:1069-1078.
- Powelson, D.K., Gerba, C.P. (1994) Virus Removal from Sewage Effluents During Saturated and Unsaturated Flow Through Soil Columns. *Water Res.* 28:2175-2181.
- Sinton, L.W., Finlay, R.K., Pang, L., Scott, D.M. (1997) Transport of Bacteria and Bacteriophages

- in Irrigated Effluent into and through an Alluvial Gravel Aquifer. *Water Air Soil Pollut* 98:17-42.
- Thompson, S.S., Flury, M., Yates, M.V., jury, W.A. (1998) Role of the Air-Water-Solid Interface in Bacteriophage Sorption Experiments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:304-309.
- Wollum, A.G., Cassel, D.K. (1978) Transport of microorganism in sandy columns. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42:72-76.
- Yan Jin, Yates, M.V., Thompson, S.S., Jury, W.A. (1997) Sorption of Viruses during Flow through Saturated Sand Columns. *Environ. Sci. Technol.* 31:548-555
- Yates, M.V., Gerba, C.P., Kelly, L.M. (1985). *Appl. Environ. Microbiol.* 49:778.