

Kasmera 42(1): 52 - 65, enero-junio 2014
ISSN 00755222 / Depósito legal 196202ZU39

Detección de virus entéricos en un sistema piloto de tratamiento de aguas residuales municipales

Detection of Enteric Viruses in a Pilot System for Municipal Wastewater Treatment

**Romero R.^{1*}, Galindo A.², Díaz-Suárez O.³,
Rivero Z.⁴, Bracho M.¹, Soler M.³, Suárez M.³**

¹Centro de Investigaciones del Agua, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

²Universidad de la Guajira. Riohacha, Colombia.

³Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette”. Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

⁴Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

*romeror2809@hotmail.com

Resumen

Se evaluó un sistema piloto de tratamiento de aguas residuales municipales para verificar su capacidad de remoción de patógenos virales. La presencia de Adenovirus, Calicivirus, Enterovirus, Virus de Hepatitis A y Virus de Hepatitis E. Se determinó mediante RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa). Además se examinó la eficacia de los colifagos como indicadores y se verificó la presencia de indicadores bacterianos clásicos. Se obtuvo un 100% de positividad para la presencia de todos los virus en la entrada y salida del sistema, por lo que el sistema no es capaz de eliminarlos. Los colifagos no fueron removidos por este sistema, pero sirvieron como indicadores para la presencia de virus entéricos en el mismo. Los indicadores bacterianos redujeron su número a su paso por el sistema, pero aún al final del sistema, los coliformes se encontraban en números por encima de los límites establecidos por las leyes venezolanas. Por lo tanto, sería necesario agregar otros pasos al sistema, para poder obtener un efluente que cumpla las leyes y que garantice la ausencia de virus entéricos.

Palabras clave: Tratamiento del agua, aguas residuales, virus, PCR, colifagos, coliformes.

Recibido: 30-01-14 / Aceptado: 18-04-14

Abstract

A pilot system for treating municipal waste was evaluated to verify its ability to remove viral pathogens. The presence of Adenovirus, Calicivirus, Enterovirus and Hepatitis A and E was determined using RT-PCR. The efficiency of coliphages as indicators and the presence of classic bacterial indicators were also investigated. A 100% positivity was obtained for the presence of all viruses at the entrance and exit of the system; therefore, the system was not able to remove them. Coliphages weren't removed by the system, but they were effective as indicators of enteric viral presence in it. Bacterial indicators reduced their number going through the system, but even at the end of the system, coliforms had numbers above the limits dictated by Venezuelan law. Therefore, it would be necessary to add additional steps to the system in order to obtain an effluent that meets the laws and to ensure the absence of enteric viruses.

Keywords: Water treatment, waste water, virus, PCR, coliphages, coliforms.

Introducción

En la ciudad de Maracaibo no existen plantas de tratamiento funcionales que disminuyan la descarga de materia orgánica (especialmente los compuestos que contienen fósforo y nitrógeno, que contribuyen a la eutrofización del Sistema de Maracaibo) ni la carga microbiológica (virus, parásitos y bacterias) que es descargada a los cuerpos de agua. Esto conlleva a altas tasas de enfermedades transmitidas por el agua (ETAs) en esta localidad, siendo de vital importancia encontrar un método de tratamiento de aguas servidas que disminuya la carga microbiológica presente en estas aguas (2, 14).

Los procesos tradicionales de tratamiento de las aguas residuales municipales, también pueden contribuir a la contaminación de los cuerpos de agua y a la transmisión de enfermedades relacionadas con ésta, ya que estos tratamientos no son capaces de eliminar los microorganismos patógenos de las mismas. Esto hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas que incluyan más de un proceso de tratamiento, además de la optimización de éstos para evaluar su eficacia en la remoción de patógenos (5).

Para el tratamiento de las aguas residuales existen diversos procesos y operacio-

nes unitarias que con una adecuada selección pueden resolver la mayoría de las necesidades de disposición final o reaprovechamiento. En términos generales existen procesos físicoquímicos y biológicos (9). Los procesos biológicos son más efectivos para la disminución de los compuestos predominantes en las aguas residuales. Estos procesos biológicos pueden realizarse en un ambiente aerobio o anaerobio, y basado en la tecnología anaerobia, el Reactor Anaerobio de Lecho de Flujo Ascendente (UASB, por sus siglas en inglés) se considera como uno de los más aplicados mundialmente en el tratamiento de aguas residuales industriales y domésticas (3).

A pesar de sus grandes ventajas, los reactores UASB producen efluentes que apenas cumplen las normas de la descarga usuales establecidas por las entidades ambientales de cada país. Por consiguiente los efluentes de los reactores UASB normalmente requieren un post tratamiento como una medida para adaptar el efluente tratado a los requisitos de la legislación medioambientales de cada país y así proteger los cuerpos de agua receptores (3).

Son varios los procesos de tratamiento que se han estudiado como alternativa para el pos-tratamiento de los efluentes de los reactores anaerobios; lodos activados, filtro

biológico, sistema de contacto biológico a través de rotación (biodiscos), la constante para cada uno de estos casos es una mejora sustancial del efluente final que se logra en cada uno de estos sistemas (3, 16, 17).

La finalidad de los tratamientos antes mencionados es mejorar la calidad de los efluentes de aguas servidas que serán vertidos a las aguas del sistema de Maracaibo. Las leyes venezolanas hacen constar que estos vertidos deben cumplir ciertos parámetros, que deben ser: menos de 1000 número más probable (NMP) de coliformes totales medidas en 90% de las muestras con un volumen de 100 ml, y en ningún caso deben sobrepasar los 5000 NMP en 100 ml. Estos parámetros aplican para cuerpos de aguas como ríos, lagos, estuarios y embalses y para descargas en medios marinos-costeros. Para los vertidos en redes cloacales, no existen parámetros microbiológicos (5). Los virus y parásitos no se encuentran contemplados en las normas venezolanas, pero se considera que en las aguas servidas, la presencia de una partícula viral es capaz de producir enfermedades (7).

Los resultados de esta investigación permitieron identificar la presencia de virus entéricos (Enterovirus, Adenovirus, Calicivirus, Virus de la Hepatitis A, Virus de la Hepatitis E y Colifagos Somáticos y F-específicos), parásitos y bacterias coliformes en un sistema de piloto de tratamiento de aguas, para evidenciar su eficacia en la remoción de microorganismos. Este conocimiento podrá utilizarse para contribuir a la creación de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales eficientes con miras a controlar la contaminación microbiana, logrando así disminuir el índice de enfermedades de transmisión hídrica que se están presentando en la región y así mejorar la calidad de vida de los pobladores.

Materiales y métodos

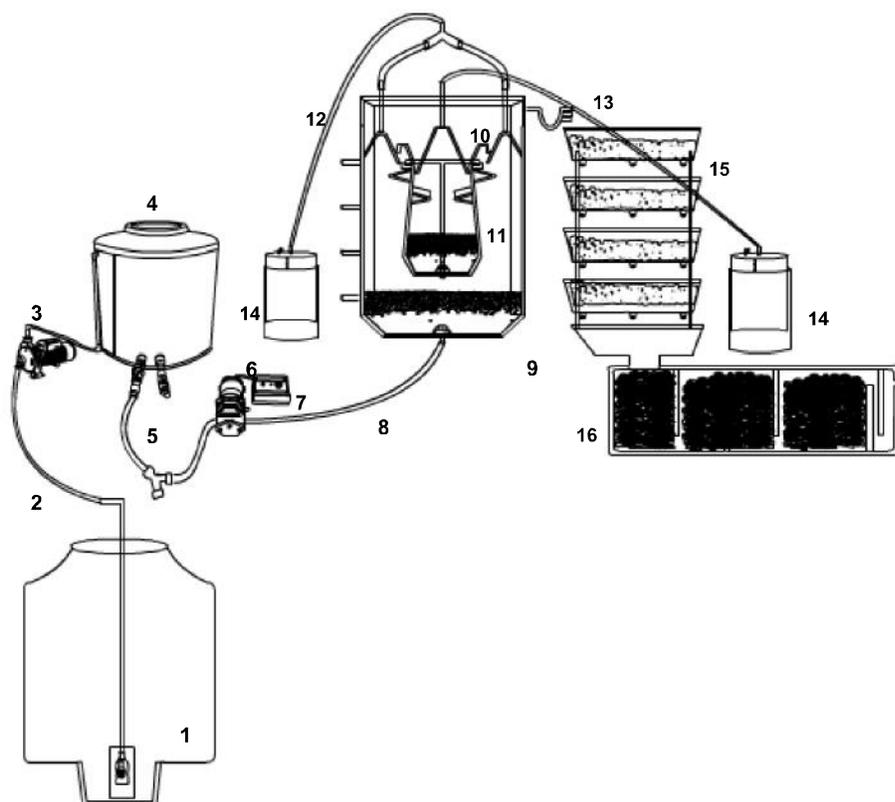
1. Descripción de las muestras estudiadas

Las muestras se tomaron de un sistema experimental de tratamiento de aguas residuales municipales, este sistema tiene como objetivo eliminar las sustancias contaminantes (específicamente compuestos con fósforo y nitrógeno) y los microorganismos causantes de enfermedades. Esto se logró mediante la degradación de los compuestos químicos por acción bacteriana, luego se sedimentaron los residuos sólidos, además de eliminar los compuestos orgánicos degradados, y por último, mediante un filtro biológico, se pretende eliminar los microorganismos patógenos.

Las aguas residuales son almacenadas en un tanque al entrar al área universitaria, como se aprecia en la Figura 1, Número 1. Luego, las aguas son transportadas a un tanque perteneciente al sistema, identificado en la Figura con el número 4 (2 y 3 corresponden a la tubería y bomba que transportan el agua al segundo tanque). Del tanque del sistema, las aguas pasan por una manguera (5) y un regulador de caudal (7), conectado a la electricidad, que regula la cantidad de agua que entra al sistema, con ayuda de una bomba peristáltica (6).

El sistema consta de las siguientes partes:

- Reactor anaeróbico de doble cámara (RADCA) con un volumen de 534 litros (9), que constará de dos cámaras:
 - Cámara uno (R1) (10): tiene un volumen de 304 litros aproximadamente, y fluye hacia:
 - Cámara dos (R2) (11): Con un volumen de 229,5 litros aproximadamente.
- Las cámaras del reactor fueron cargadas con lodo granular proveniente de una industria cervecera. El biogás producido en las cámaras del sistema fue transpor-



1).Manjón donde se toma el agua residual, 2).tubería que conduce AR. a la bomba periférica, 3). Bomba periférica de 3/4", 4). Tanque de almacenamiento del AR., 5).manquera conducción AR., 6). Bomba peristáltica, 7). Regulador de caudal, 8). Manquera de conducción AR., 9). Reactor RADCA, 10). Cámara uno, 11). Cámara dos, 12). Mangueras de conducción de biogás, 13).Salida efluente RADCA, 14). Dispositivo para medir volumen de biogás, 15). Sistema de aeración, 16). Filtro biológico.

Figura 1. Esquema de la planta de tratamiento.

tado por mangueras (12 y 13) a instrumentos de medición (14).

- Sistema de Aireación (Bandejas) (15): Integrado por cinco bandejas, con canales con orificios en su parte inferior. Estas bandejas están montadas en una estructura metálica. El agua cae en forma de cascada. En la parte inferior de las bandejas se encuentra una capa de grava. La muestra fue tomada de la última bandeja, que no tendrá orificios ni grava en el fondo. La aireación permite la remoción de la materia orgánica res-

tante, además de la eliminación de los nutrientes, principalmente, nitrógeno y fósforo.

- Filtro biológico (16): Con un volumen útil de 530 litros, de los cuales se espera ocupar 70 litros con el material de soporte (conchas de ostras marinas). Este filtro propició la remoción de microorganismos de las aguas residuales. El efluente fue colectado para su estudio.

Todos estos sistemas fueron construidos en material acrílico y soportados por estructuras metálicas.

Toma de muestras

Las muestras consistieron en agua tratada proveniente de un sistema de tratamiento en serie instalado en el Centro de Investigación del Agua (CIA), dentro de la Ciudad Universitaria perteneciente a la Universidad del Zulia. El agua residual que entró al sistema fue agua residual del colector C, ubicado en el CIA, tomándose volúmenes de agua (4 litros) que fueron trasladados al sistema, ubicado cerca de la entrada del conector en condiciones ambientales.

Las muestras se tomaron de los cinco puntos que constituyen el sistema: Entrada (Afluente) (punto 1 en el esquema), Reactor 1 (10), Reactor 2 (11), Bandejas (15) y Filtro (Efluente) (16), para estudiar si existe la remoción de patógenos y, si existe, en que punto de sistema se produce. Las muestras se tomaron a diferentes tiempos de retención (tiempo en el que las aguas residuales permanecen en el reactor) y se tomaron varias réplicas de cada tiempo de retención, para observar la remoción de microorganismos en cada tiempo. En total, se realizaron 14 muestreos entre los meses de marzo y noviembre de 2010, con 3 réplicas de cada tiempo de retención (4, 6, 8 y 12 horas), y 2 réplicas del tiempo de retención de 10 horas (por problemas del sistema, no pudo colectarse la tercera réplica).

2. Detección de virus entéricos

Antes de la extracción de ácido nucleico, se realizó la filtración de las muestras mediante un sweenex con una membrana de 0,22µm, para purificar las muestras de células bacterianas y su correspondiente material genético. Los virus entéricos a examinar fueron: Enterovirus, Calicivirus, Virus de la Hepatitis A, Virus de la Hepatitis E, y Adenovirus.

2.1 Extracción del ácido nucleico viral

Se utilizó el método de la extracción con fenol-cloroformo, un método ideado por Piotr Chomzynski y Nicoleta Sacchi, publicado en 1987 (4). Este método es eficaz para la extracción de ADN y ARN mediante el mismo procedimiento. Generalmente, se procesa primero la parte acuosa, ya que contiene el ARN, que es más lábil, y luego se procesan la interfase y la fase orgánica, que contienen el ADN y las proteínas, ya que el ADN es mucho más estable. En esta metodología se utiliza el reactivo comercial Trizol, que es una mezcla de fenol e isotiocianato de guanidina.

2.2 Oligonucleótidos iniciadores para la detección de Virus Entéricos

Los oligonucleótidos iniciadores (primers) que se emplearon en esta investigación fueron diseñados en base a regiones altamente conservadas de los genomas de virus entéricos (región 5' no codificante del genoma viral), lo que permitió la detección de múltiples miembros de cada grupo de virus. Los primers utilizados son de eficiencia y sensibilidad comprobada, y fue evaluada a partir de diluciones seriadas de varios miembros de la familia de cada virus, pudiéndose detectar todos por PCR en concentraciones de 1 a 10 partículas virales (11, 12, 13). Los oligonucleótidos utilizados, su nombre, constitución y longitud del fragmento a amplificar se encuentran en la Tabla 1.

2.3 Detección de los Marcadores Moleculares por Amplificación Enzimática

2.3.1 Síntesis de ADNc

La mezcla de reacción para la transcripción reversa del ARN viral constó de 2µl de muestra, que se desnaturalizaron a 70°C por 10 minutos, se centrifugaron por 5 segundos y se enfriaron para luego agregarse a un tubo

Tabla 1. Primers utilizados para este estudio.

| Virus | Primer | Secuencia | Blanco | Amplicón (pb) |
|-------------|--------|--------------------------------|------------------------|---------------|
| Enterovirus | Ent 1 | 5'-CGGTACCTTTGTAGCGCCTGT-3' | 5' NTR ¹ | 533 pb |
| | Ent 2 | 5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA -3' | 5' NTR | |
| Adenovirus | ADH | 5'-CCGAGTGGTCTTACATGCACAATC-3' | 5' NTR | 301 pb |
| | 40 | 3' | | |
| | ADH | 5'-CAGCACGCCGCGGGCTGTCAAAGT-3' | 5'NTR | |
| | 41 | 3' | | |
| Hepatitis A | HAV1 | 5'-TTGGAACGTACCTTGCAGTG-3' | 5'NTR | 368pb |
| | HAV2 | 5'-CTGAGTACCTCAGAGGCAAAC-3' | 5'NTR | |
| Hepatitis E | HEV1 | 5'-CCTCGAAGCCAGTAAGTGC GGTC-3' | 5'NTR | 456pb |
| | HEV2 | 5'-GGCTCCTGGCATCATTACTG-3' | 5'NTR | |
| Calicivirus | 289 | 5'-TGACAAATGTAATCATCACCATA-3' | 5'NTR | 470pb |
| | 290 | 5'-GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC-3' | 5'NTR | |

¹NTR: Non Translated Region, Zona no Traducida (por sus siglas en inglés).

de reacción. Éste se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se retrotranscribió con el ciclo siguiente en el termociclador: 42°C por 1 hora; 95°C por 5 min y 4°C por 5 min. Después de la retrotranscripción el producto se diluyó en 80µl de agua ultrapura, ya que la concentración de cloruro de magnesio es muy alta y puede inhibir el PCR si no es diluido.

2.3.2 Reacción de amplificación (PCR)

Se utilizó el siguiente programa para Enterovirus, Adenovirus, Hepatitis A y Hepatitis E: un precalentamiento a 95°C, luego 40 ciclos a 92 °C durante 90 seg, 55 °C por 90 seg y 72 °C por 120 seg y una extensión final de 72 °C por 5 minutos.

Para la amplificación del genoma de Calicivirus, se utilizó un programa diferente, que consistió en un precalentamiento a 45°C por 45 seg, seguido por 120 seg a 94°C, luego

40 ciclos de 94°C por 60 seg, 50°C por 60 seg y 72°C por 60 seg. La extensión final se realizó a 72°C por 10 minutos.

La visualización de los productos de PCR se llevó a cabo por electroforesis en geles de agarosa 1%, al cual se le agregaron 5µl de bromuro de etidio. Luego se programó la fuente de poder a 50 mA de corriente, y un voltaje de 100 V por una hora y se realizó la electroforesis. Se observó luego el gel en un transiluminador y fue fotografiado

Como muestras de referencia y controles positivos durante la estandarización de las reacciones de amplificación de los marcadores moleculares específicos para la detección de virus entéricos, se empleó la vacuna del poliovirus como control positivo para Enterovirus, una suspensión de heces de ganado porcino para Calicivirus, y una suspensión de aguas servidas provenientes de un matadero zuliano para los Virus de Hepatitis y Adenovirus.

3. Detección de organismos indicadores

3.1 Cuantificación de colifagos somáticos y F- específicos

La detección de colifagos es considerada un indicador económico y rápido de la presencia de virus entéricos.

3.1.1 Colifagos somáticos

Se realizó la detección de fagos de *Escherichia coli* C, para cada muestra y por duplicado, por la técnica de capa simple, según lo dispuesto en el procedimiento 9211 D de la American Public Health Association (1), utilizando como cepa hospedadora a *E. coli* ATCC 15597.

3.1.2 Colifagos F-específicos

Se realizó para cada muestra y por duplicado la detección de fagos de *E. coli* F-específicos por la técnica de doble capa de agar utilizando como cepa hospedadora la cepa de *E. coli* ATCC 700891 ampicilina resistente, y según lo dispuesto en el procedimiento 9224 C de la APHA, 2005 (1).

3.2 Detección de indicadores bacterianos de contaminación fecal.

Para establecer la relación existente entre la presencia de de Enterovirus humanos y animales con la presencia de los indicadores de contaminación fecal clásicos, se analizaron los datos arrojados durante la determinación de la presencia y concentración de coliformes totales y fecales llevada a cabo inmediatamente después de la toma de las muestras. La determinación de los indicadores bacterianos se realizó por la técnica de tubos múltiples de fermentación, o número más probable (NMP/100 ml) (1). Las muestras de agua se analizaron tomando los volúmenes requeridos directamente a partir del envase en el que fueron colectadas.

4. Análisis estadístico de los resultados obtenidos.

Se utilizaron pruebas estadísticas descriptivas para evaluar los resultados. Estos análisis fueron realizados según correspondieran.

Resultados

La presencia de partículas virales de los virus entéricos examinados (Enterovirus, Adenovirus, Hepatitis A, Hepatitis E y Calicivirus) fue del 100 por ciento en las muestras examinadas. Todas las muestras fueron positivas para la presencia de todos los virus examinados.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de colifagos somáticos y colifagos F- específicos. No se observa reducción de órdenes logarítmicos en las muestras del sistema, por lo tanto, se puede afirmar que el sistema no es capaz de reducir la cantidad de colifagos somáticos o F-específicos en las muestras examinadas.

El número de bacterias coliformes que entra al sistema es muy alto, como se observa en la Tabla 3, con órdenes de hasta 10⁸ (100.000.000), lo cual es de esperarse, porque se trata de aguas servidas contaminadas con materia fecal humana, y posiblemente, de otros animales de sangre caliente.

En 3 muestras (15/03, 16/03 y 9/11) se observa la reducción de 2 órdenes logarítmicos en la cantidad de coliformes totales presentes (10⁸-10⁶ ó 10⁷-10⁵), lo cual indica que, en su paso durante el sistema, se eliminó una cantidad importante de coliformes totales. Sin embargo, para estas muestras, los coliformes termotolerantes no demostraron esta tendencia a la disminución, presentando comportamientos diferentes en cada muestra.

Tabla 2. Presencia de Colifagos Somáticos y F-específicos en las Muestras de Agua Residual Municipal Tratadas en el Sistema Piloto.

| Datos de la Muestra | | | | Colifagos (UFP x 100 ml) | |
|---------------------|---------|-----------------------------|-----------|-----------------------------|-------------------------|
| Fecha | Volumen | Tiempo de Retención (horas) | Muestra | Colifagos Somáticos | Colifagos F-específicos |
| 15/03/2010 | 4 | 10 | Entrada | 1×10^4 | 7×10^4 |
| | | | Reactor 1 | 8×10^4 | 7×10^4 |
| | | | Reactor 2 | 1×10^5 | 8×10^4 |
| | | | Bandejas | 4×10^4 | 1×10^5 |
| | | | Filtro | 3×10^4 | $1,3 \times 10^5$ |
| 16/03/2010 | 4 | 10 | Entrada | 9×10^4 | $1,5 \times 10^5$ |
| | | | Reactor 1 | 3×10^5 | 0 |
| | | | Reactor 2 | 5×10^4 | 5×10^4 |
| | | | Bandejas | 9×10^4 | 5×10^4 |
| | | | Filtro | 7×10^4 | 7×10^4 |
| 09/04/2010 | 4 | 8 | Entrada | 2×10^4 | 3×10^4 |
| | | | Reactor 1 | 8×10^4 | 2×10^4 |
| | | | Reactor 2 | 3×10^4 | 1×10^4 |
| | | | Bandejas | 1×10^4 | 3×10^4 |
| | | | Filtro | 4×10^4 | 5×10^4 |
| 14/04/2010 | 4 | 8 | Entrada | 2×10^5 | 9×10^4 |
| | | | Reactor 1 | 7×10^4 | $3,5 \times 10^5$ |
| | | | Reactor 2 | 5×10^4 | 2×10^4 |
| | | | Bandejas | 0 | 1×10^4 |
| | | | Filtro | 9×10^4 | 2×10^4 |
| 15/04/2010 | 4 | 8 | Entrada | $1,7 \times 10^5$ | $1,8 \times 10^5$ |
| | | | Reactor 1 | 8×10^4 | 2×10^5 |
| | | | Reactor 2 | 3×10^4 | 3×10^4 |
| | | | Bandejas | 9×10^4 | 5×10^4 |
| | | | Filtro | 5×10^4 | 6×10^4 |
| 5/05/2010 | 4 | 6 | Entrada | 6×10^4 | 8×10^4 |
| | | | Reactor 1 | 8×10^4 | 4×10^4 |
| | | | Reactor 2 | 2×10^4 | 3×10^4 |
| | | | Bandejas | 7×10^4 | 0 |
| | | | Filtro | 5×10^4 | 2×10^4 |
| 7/05/2010 | 4 | 6 | Entrada | 9×10^4 | $1,3 \times 10^5$ |
| | | | Reactor 1 | 1×10^4 | 3×10^4 |
| | | | Reactor 2 | 4×10^4 | 3×10^4 |
| | | | Bandejas | 1×10^5 | 4×10^4 |
| | | | Filtro | 4×10^4 | 3×10^4 |

Tabla 2 (Continuación).

| Fecha | Datos de la Muestra | | Muestra | Colifagos (UFP x 100 ml) | |
|------------|---------------------|-----------------------------|-----------|-----------------------------|-------------------------|
| | Volumen | Tiempo de Retención (horas) | | Colifagos Somáticos | Colifagos F-específicos |
| 19/05/2010 | 4 | 6 | Entrada | 6×10^5 | $1,5 \times 10^5$ |
| | | | Reactor 1 | 8×10^5 | 4×10^4 |
| | | | Reactor 2 | $1,3 \times 10^5$ | 5×10^4 |
| | | | Bandejas | 5×10^4 | 8×10^4 |
| | | | Filtro | 8×10^4 | 3×10^4 |
| 11/10/2010 | 4 | 4 | Entrada | 9×10^4 | 3×10^5 |
| | | | Reactor 1 | 4×10^4 | $1,6 \times 10^5$ |
| | | | Reactor 2 | 6×10^4 | 6×10^4 |
| | | | Bandejas | 1×10^4 | 2×10^4 |
| | | | Filtro | 3×10^4 | 2×10^4 |
| 13/10/2010 | 4 | 4 | Entrada | 5×10^4 | 1×10^5 |
| | | | Reactor 1 | 9×10^4 | 1×10^4 |
| | | | Reactor 2 | 7×10^4 | 5×10^4 |
| | | | Bandejas | 2×10^4 | 8×10^4 |
| | | | Filtro | 1×10^4 | 3×10^4 |
| 14/10/2010 | 4 | 4 | Entrada | 6×10^5 | 7×10^4 |
| | | | Reactor 1 | 8×10^4 | 5×10^4 |
| | | | Reactor 2 | 0 | 9×10^4 |
| | | | Bandejas | 3×10^4 | 5×10^4 |
| | | | Filtro | 2×10^4 | 1×10^4 |
| 8/11/2010 | 4 | 12 | Entrada | 5×10^4 | 5×10^4 |
| | | | Reactor 1 | 7×10^4 | 5×10^4 |
| | | | Reactor 2 | 1×10^4 | 2×10^4 |
| | | | Bandejas | 6×10^4 | 9×10^4 |
| | | | Filtro | 2×10^4 | 4×10^4 |
| 9/11/2010 | 4 | 12 | Entrada | 9×10^4 | 8×10^4 |
| | | | Reactor 1 | 1×10^5 | 3×10^4 |
| | | | Reactor 2 | 6×10^4 | 3×10^4 |
| | | | Bandejas | 8×10^4 | 7×10^4 |
| | | | Filtro | 7×10^4 | 6×10^4 |
| 10/11/2010 | 4 | 12 | Entrada | 3×10^4 | 2×10^4 |
| | | | Reactor 1 | 7×10^4 | 2×10^4 |
| | | | Reactor 2 | 2×10^4 | 1×10^4 |
| | | | Bandejas | 1×10^4 | 4×10^4 |
| | | | Filtro | 9×10^4 | 6×10^4 |

Tabla 3. Presencia de Coliformes Totales y Termotolerantes en las Muestras de Agua Residual Municipal Tratadas en el Sistema Piloto.

| Fecha | Datos de la Muestra | | | Número más probable (por 100 ml) | |
|------------|---------------------|-----------------------------|-----------|----------------------------------|----------------------------|
| | Volumen (litros) | Tiempo de Retención (horas) | Muestra | Coliformes Totales | Coliformes Termotolerantes |
| 15/03/2010 | 4 | 10 | Entrada | $9,2 \times 10^7$ | $4,7 \times 10^6$ |
| | | | Reactor 1 | $1,6 \times 10^8$ | $5,4 \times 10^6$ |
| | | | Reactor 2 | $2,2 \times 10^7$ | $3,9 \times 10^6$ |
| | | | Bandejas | $2,2 \times 10^7$ | 4×10^6 |
| | | | Filtro | $3,3 \times 10^6$ | $1,7 \times 10^6$ |
| 16/03/2010 | 4 | 10 | Entrada | $1,6 \times 10^8$ | $4,7 \times 10^6$ |
| | | | Reactor 1 | $>1,6 \times 10^7$ | $5,4 \times 10^6$ |
| | | | Reactor 2 | $5,4 \times 10^6$ | $2,1 \times 10^6$ |
| | | | Bandejas | $1,6 \times 10^7$ | $5,4 \times 10^5$ |
| | | | Filtro | $1,7 \times 10^6$ | $1,7 \times 10^5$ |
| 09/04/2010 | 4 | 8 | Entrada | $1,6 \times 10^8$ | $1,7 \times 10^7$ |
| | | | Reactor 1 | $5,4 \times 10^7$ | $1,7 \times 10^6$ |
| | | | Reactor 2 | $1,7 \times 10^7$ | $2,1 \times 10^6$ |
| | | | Bandejas | $3,5 \times 10^7$ | $2,7 \times 10^6$ |
| | | | Filtro | $5,4 \times 10^7$ | 4×10^6 |
| 14/04/2010 | 4 | 8 | Entrada | $2,8 \times 10^7$ | $7,9 \times 10^6$ |
| | | | Reactor 1 | $>1,6 \times 10^7$ | $1,4 \times 10^7$ |
| | | | Reactor 2 | $5,4 \times 10^7$ | $2,2 \times 10^7$ |
| | | | Bandejas | $9,2 \times 10^7$ | $1,7 \times 10^7$ |
| | | | Filtro | $5,4 \times 10^6$ | $1,7 \times 10^6$ |
| 15/04/2010 | 4 | 8 | Entrada | $2,8 \times 10^7$ | 7×10^6 |
| | | | Reactor 1 | $>1,6 \times 10^7$ | $3,5 \times 10^7$ |
| | | | Reactor 2 | $2,8 \times 10^7$ | 4×10^6 |
| | | | Bandejas | $3,5 \times 10^7$ | 4×10^6 |
| | | | Filtro | $3,5 \times 10^7$ | $7,9 \times 10^6$ |
| 5/05/2010 | 4 | 6 | Entrada | $5,4 \times 10^7$ | $2,2 \times 10^7$ |
| | | | Reactor 1 | $5,4 \times 10^7$ | $2,4 \times 10^6$ |
| | | | Reactor 2 | $3,5 \times 10^7$ | $4,5 \times 10^6$ |
| | | | Bandejas | $1,4 \times 10^7$ | $3,3 \times 10^6$ |
| | | | Filtro | 7×10^6 | $1,4 \times 10^6$ |
| 7/05/2010 | 4 | 6 | Entrada | $1,6 \times 10^8$ | $1,4 \times 10^7$ |
| | | | Reactor 1 | $1,6 \times 10^8$ | $5,4 \times 10^6$ |
| | | | Reactor 2 | $1,7 \times 10^7$ | 4×10^6 |
| | | | Bandejas | $1,7 \times 10^7$ | $2,6 \times 10^6$ |
| | | | Filtro | $>1,6 \times 10^7$ | $1,4 \times 10^6$ |

Tabla 3 (Continuación).

| Fecha | Datos de la Muestra | | | Número más probable (por 100 ml) | |
|------------|---------------------|-----------------------------|-----------|----------------------------------|----------------------------|
| | Volumen (litros) | Tiempo de Retención (horas) | Muestra | Coliformes Totales | Coliformes Termotolerantes |
| 20/05/2010 | 4 | 6 | Entrada | $1,6 \times 10^8$ | $2,2 \times 10^7$ |
| | | | Reactor 1 | $>1,6 \times 10^8$ | $2,4 \times 10^7$ |
| | | | Reactor 2 | $1,7 \times 10^7$ | $3,3 \times 10^6$ |
| | | | Bandejas | $>1,6 \times 10^8$ | $2,1 \times 10^6$ |
| | | | Filtro | $1,7 \times 10^7$ | $4,9 \times 10^6$ |
| 11/10/2010 | 4 | 4 | Entrada | $9,2 \times 10^7$ | $5,4 \times 10^7$ |
| | | | Reactor 1 | $3,5 \times 10^7$ | $2,4 \times 10^7$ |
| | | | Reactor 2 | $2,2 \times 10^7$ | $1,7 \times 10^7$ |
| | | | Bandejas | $1,7 \times 10^7$ | $1,3 \times 10^7$ |
| | | | Filtro | $1,7 \times 10^7$ | $1,1 \times 10^7$ |
| 13/10/2010 | 4 | 4 | Entrada | $1,6 \times 10^8$ | $9,2 \times 10^7$ |
| | | | Reactor 1 | $5,4 \times 10^7$ | $2,4 \times 10^7$ |
| | | | Reactor 2 | $1,7 \times 10^7$ | $1,7 \times 10^7$ |
| | | | Bandejas | $1,7 \times 10^7$ | $1,1 \times 10^7$ |
| | | | Filtro | $1,7 \times 10^7$ | $1,1 \times 10^7$ |
| 14/10/2010 | 4 | 4 | Entrada | $9,2 \times 10^7$ | $3,5 \times 10^7$ |
| | | | Reactor 1 | $1,7 \times 10^7$ | $1,1 \times 10^7$ |
| | | | Reactor 2 | $5,4 \times 10^7$ | $3,5 \times 10^7$ |
| | | | Bandejas | $1,7 \times 10^7$ | $1,1 \times 10^7$ |
| | | | Filtro | $1,7 \times 10^7$ | $1,3 \times 10^7$ |
| 8/11/2010 | 4 | 12 | Entrada | $1,7 \times 10^7$ | 7×10^6 |
| | | | Reactor 1 | $3,5 \times 10^7$ | $6,1 \times 10^6$ |
| | | | Reactor 2 | $1,7 \times 10^7$ | $3,9 \times 10^6$ |
| | | | Bandejas | $5,4 \times 10^7$ | 4×10^6 |
| | | | Filtro | 7×10^6 | $2,1 \times 10^6$ |
| 9/11/2010 | 4 | 12 | Entrada | $2,8 \times 10^7$ | $1,4 \times 10^7$ |
| | | | Reactor 1 | $6,1 \times 10^6$ | 2×10^6 |
| | | | Reactor 2 | $5,4 \times 10^6$ | $1,7 \times 10^6$ |
| | | | Bandejas | $1,7 \times 10^7$ | $3,9 \times 10^6$ |
| | | | Filtro | $4,7 \times 10^5$ | $2,1 \times 10^5$ |
| 10/11/2010 | 4 | 12 | Entrada | $1,7 \times 10^7$ | 7×10^6 |
| | | | Reactor 1 | $3,5 \times 10^6$ | $6,1 \times 10^5$ |
| | | | Reactor 2 | $1,7 \times 10^7$ | $3,9 \times 10^6$ |
| | | | Bandejas | $5,4 \times 10^7$ | 4×10^6 |
| | | | Filtro | 7×10^6 | $2,1 \times 10^6$ |

Para los coliformes termotolerantes, la tendencia mayoritaria fue a la reducción de un solo orden logarítmico, de 10^7 a 10^6 , o de 10^6 a 10^5 , lo cual demuestra que los coliformes termotolerantes son más resistentes al paso por el sistema de purificación. Otra indicación de esto es que en 5 muestras el orden logarítmico de los coliformes termotolerantes se mantuvo igual en su paso por el sistema.

Discusión

La presencia de partículas virales fue del 100 por ciento en todas las muestras examinadas, en la mayoría de los estudios hechos con aguas servidas, la presencia viral, aunque variable, alcanza porcentajes de hasta 80% de positividad, según Vecchia y col, 2012 (18). En un estudio realizado por investigadores del IVIC (Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas) en 2009, en las aguas servidas que desembocan al río Guaire, se encontró el 75% de muestras positivas para la presencia de Enterovirus, y 50% de positividad para las muestras de Adenovirus (15). Esto indica que los virus se encuentran circulando en grandes cantidades en el ambiente, y esto a su vez revela que pudiera encontrarse una alta tasa de individuos con patologías gastrointestinales derivadas de la acción de estos virus en su organismo.

Esta alta tasa de contaminación viral presenta una tarea complicada para este sistema de depuración de aguas servidas, dado que las partículas virales, además de ser muy pequeñas, son capaces de adherirse a partículas disueltas en el agua, y de esta forma pueden pasar por el sistema sin ser inactivadas o destruidas por sustancias presentes en las aguas residuales, o por efecto de otros organismos.

Según Okoh y col (10), los tratamientos que existen actualmente para la depuración de aguas servidas, como los reactores de lo-

dos activados, lagunas de oxidación, tratamientos con carbón activado, filtración, coagulación con cal hidratada y clorinación sólo eliminan entre 50 a 90% de los virus presentes en las aguas servidas, permitiendo que una carga viral significativa se libere en el efluente. Debido a la estabilidad y persistencia de los virus entéricos, estos son capaces de llegar a través de procesos como la escorrentía a las fuentes de aguas potables y recreacionales, y en algunos casos, a los alimentos. Considerando que hasta el momento, sólo se utilizan indicadores bacterianos para monitorear la calidad de los vertidos de aguas servidas al ambiente, y que se han presentado brotes de enfermedades virales en aguas que cumplen los reglamentos vigentes para la presencia de bacterias indicadoras, se ha de concluir que los indicadores bacterianos son insuficientes para monitorear la calidad de los tratamientos de aguas servidas.

La alta positividad de las muestras obtenidas puede explicarse si se toman en cuenta las cifras de Okoh y col (10), debido a que en este estudio sólo se pudo mostrar la presencia o ausencia de partículas virales en las aguas servidas, por lo tanto, no es posible discernir si la cantidad de partículas virales presentes en las aguas luego de ser depuradas por el sistema fue menor, probando la eficacia del mismo. Sin embargo, debido a que la presencia de una partícula viral podría ocasionar infecciones, particularmente en poblaciones de riesgo (personas inmunosuprimidas, ancianos y niños pequeños), la presencia de partículas virales en todas las muestras es alarmante, ya que las aguas, aunque presentaran bajas cantidades de compuestos nitrogenados o de coliformes, todavía presentarían un problema de salud pública al contener virus entéricos.

Según el trabajo de Limsawat y Ohgaki (7), el ARN viral liberado a las aguas servidas sin una cápside proteica, se degrada en pocos

minutos debido a las sustancias presentes en éstas. Por lo tanto, los resultados positivos obtenidos indican que el material genético presente en las aguas servidas está contenido de una cápside, y por lo tanto, es considerado como un virus capaz de infectar.

No se observa reducción de órdenes logarítmicos en las muestras del sistema, por lo tanto, se puede afirmar que el sistema no es capaz de reducir la cantidad de colifagos somáticos o F-específicos en las muestras examinadas. Myrmel y col (8) demostraron un resultado similar en una planta de tratamiento de aguas que sólo realizaba un tratamiento primario (el tratamiento primario de las aguas residuales consiste en una sedimentación de las aguas para descartar los desechos sólidos y para que los desechos como aceites floten a la superficie y puedan ser eliminados).

Myrmel y col (8) demuestran, sin embargo, que en plantas de tratamiento con tratamientos secundarios (lodos activados, sedimentación y biofilm) tampoco se observa una reducción significativa en el número de colifagos presentes en la entrada y la salida del sistema, lo que indica que serían necesarios tratamientos terciarios y de desinfección como la cloración, ozonización, tratamiento con luz UV o tratamientos como la ósmosis inversa para disminuir el número de colifagos presentes en las aguas servidas.

En las muestras de colifagos se observan, en algunos casos, descensos de un orden logarítmico, sin embargo, estos descensos no siguen un patrón definido, y en algunos casos, se presenta el aumento dentro del sistema de tratamiento, por lo cual no se puede afirmar que el sistema sea responsable por la eliminación de los colifagos. En relación a la presencia de virus entéricos, se evidencia el mismo patrón en el comportamiento de las muestras a través del sistema, es decir, no se detectan cambios en las cantidades de colifa-

gos presentes en el afluente y en el efluente del sistema, por tanto, en el caso de éste, podríamos apreciar una correlación entre el número de colifagos presentes y la presencia de virus entéricos, pudiendo entonces utilizar los colifagos como indicadores.

Los tiempos de retención más eficientes para la remoción de coliformes totales fueron los de 10 y 12 horas, observándose en ambos una reducción de 2 órdenes logarítmicos. Para los coliformes termotolerantes, sólo en una muestra con el tiempo de retención de 12 horas se observó una reducción de 2 órdenes logarítmicos. Esto indica que sería necesario experimentar, dentro de los límites del sistema, con tiempos de retención más altos, para constatar si existe una reducción más significativa del número de coliformes totales y termotolerantes.

A pesar de los resultados que se presentan en la reducción de coliformes totales y termotolerantes, es necesario indicar que el efluente del sistema, aunque se haya visto reducido el número de bacterias presentes, no está apto para ser vertido a las aguas del sistema de Maracaibo, ya que según la Gaceta Oficial de 1995 para el vertido de aguas servidas en este sistema, los órdenes logarítmicos de los coliformes totales no deben exceder los 1×10^3 NMP en 100 ml.

Los resultados de este estudio indican que este sistema, aunque fue capaz de reducir hasta dos órdenes logarítmicos la cantidad de bacterias indicadoras, no afectó la presencia, ni la cantidad de los virus entéricos ni de los colifagos utilizados como indicadores de la presencia viral. Además, aunque se observó la reducción de las bacterias indicadoras, el efluente del sistema no cumple con las normas establecidas en las leyes venezolanas para el vertido de aguas en cuerpos como el Sistema de Maracaibo. Por lo tanto, sería necesario agregar otros pasos al sistema, para poder obtener un efluente que cumpla las leyes y que garantice la ausencia de virus entéricos.

Referencias bibliográficas

- (1) American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th Edition. APHA, Inc. New York. 2005.
- (2) Boletín Epidemiológico Semanal del Ministerio del Poder Popular para la Salud, semana 19 de 2008.
- (3) Chernicharo M., Nascimento L. Feasibility of a pilot-scale UASB/trickling filter system for domestic sewage treatment, *Water Sci. Technol.* 2001;44:221-228.
- (4) Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162: 156-159.
- (5) Gaceta Oficial de la República de Venezuela Caracas, 18 de Diciembre de 1995. N° 5.021. Año CXXIII - MESIII.
- (6) Griffin J., Plummer J., Long S. Torque Teno Virus: an Improved Indicator for Viral Pathogens in Drinking Waters. *Virology J.* 2008; 5: 112.
- (7) Limsawat S., Ohgaki S. Fate of Liberated Viral RNA in Wastewater Determined by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63: 2932-2933.
- (8) Myrmel M., Berg e, Grinde B., Rimstad E. Enteric Viruses in Inlet and Outlet Samples from Sewage Treatment Plants. *J. Water Health.* 2006; 4: 197-209.
- (9) Nayola H. Tendencia en el Tratamiento de Aguas Residuales Domesticas en Latinoamérica. En: Seminario Internacional Sobre Métodos Naturales para el tratamiento de Aguas Residuales, Cali-Colombia. 2003: 2.
- (10) Okoh A., Sibanda T. y Gusha S. Inadequately treated Wastewater as a Source of Human Enteric Viruses in the Environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2010; 7: 2620-2637.
- (11) Pina S., Puig M., Lucena F., Jofre J., Girones R. Viral Pollution in the Environment and in Shellfish: Human Adenovirus Detection by PCR as an Index of Human Viruses *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64 (9): 3376-3382.
- (12) Pina, S. Detección y caracterización de virus patógenos humanos en muestras ambientales y moluscos bivalvos. Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor en Biología de la Universidad de Barcelona, España. 2001: Pp. 280.
- (13) Puig M., Jofre J., Lucena F., Allard A., Wadell G., Girones R. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60(8):2963-2970.
- (14) Rincón W., Acurero A., Serrano E., Quintero M., Beauchamp S. Enteroparásitos Asociados a Diarrea Aguda en Niños Menores de 12 Años de edad. *Kasmera.* 2006; 34: 31-39.
- (15) Rodríguez-Díaz J., Querales L., Caraballo L., Vizzi E., Liprandi F., Takiff H., Betancourt W. Detection and Characterization of Waterborne Gastroenteritis Viruses in Urban Sewage and Sewage-Polluted River Waters in Caracas, Venezuela. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75: 387-394.
- (16) Sperling V., Freire C., Chernicharo M. Performance evaluation of an UASB-activated sludge system treating municipal wastewater, *Water Sci. Technol.* 2001: 43:323-328.
- (17) Tawfik B., Klapwijk J., Van Buuren D., Gohary G., Lettinga F. Potentials of using a rotating biological contactor (RBC) for post-treatment of anaerobically pre-treated domestic wastewater, *Biochem. Eng. J.* 2005; 25:89-98.
- (18) Vecchia A., Fleck J., Kluge M., Comerlato J., Bergamaschi B., Luz R., Arantes T., Silva J., Thewes M., Spilki F. Assessment of Enteric Viruses in a Sewage Treatment Plant Located in Porto Alegre, Southern Brazil. *Braz. J. Biol.* 2012; 72: 839-846.