

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN DE AEROBIOS TOTALES Y DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN UN SUELO TRATADO CON LODO DE DEPURADORA URBANA

I.B. Estrada de Luis, M.V. Gil Matellanes, A. Aller Urdiales y A. Morán Palao

Instituto de Recursos Naturales. Universidad de León. Avda. de Portugal, nº 41,24071 – León. dfqamp@unileon.es

RESUMEN. Se ha estudiado dentro de la aplicación de lodos de depuradora de aguas residuales al suelo, la influencia de la temperatura en la evolución de la población de aerobios totales y de microorganismos patógenos de origen fecal, tales como coliformes fecales, *Escherichia coli* y estreptococos fecales, así como la relación entre el crecimiento o decrecimiento de dichas poblaciones con la variación del pH, tanto en muestras de suelo sin lodo o de referencia, como en las muestras de suelo más lodo, durante un periodo de incubación de 80 días.

Se ha trabajado en condiciones de laboratorio, manteniendo constantes tres temperaturas de incubación diferentes (15, 25 y 35°C), y con un contenido de humedad constante en las muestras del 10%.

Con este trabajo se ha visto que la temperatura y los días de incubación, influyen considerablemente en la evolución de las poblaciones microbianas estudiadas.

Después de los 20 primeros días de incubación de las muestras en estas condiciones, las poblaciones de microorganismos patógenos estudiados están por debajo de los límites de detección.

ABSTRACT. It has been studied during the application of sewage sludge to the soil, the influence of temperature in the evolution of total aerobe microorganisms and faecal pathogen microorganisms such as faecal coliforms, *Escherichia coli* and faecal streptococcus and the connection between the growth and the decrease of this microbial population with pH, in soil samples with and without sewage sludge, over an incubation period of 80 days. Samples at laboratory conditions were maintained at incubation temperatures (15, 25 and 35°C) and moisture content (10%) constant.

In this work it has been shown that the temperature and the incubation days have a great influence in the evolution of the microbial population.

After 20 days of samples incubation at specified conditions, the faecal pathogen microorganisms are under detection limits.

1. Introducción

El reciclaje de lodos de distintos orígenes como fertilizante en terrenos agrícolas, forestales o espacios degradados, es la vía de eliminación más aceptada hoy en día, ya que ofrece la posibilidad de que estos residuos se conviertan en recursos (López Mosquera *et al.*, 2000). Sin embargo, su empleo conlleva ciertos riesgos que es necesario evaluar, como son la incorporación al medio de metales pesados (O'Riordan *et al.*, 1994; Berti *et al.*, 1998), compuestos orgánicos tóxicos (Kirchmann *et al.*, 1991; Wild *et al.*, 1992; Beck *et al.*, 1995), sales (Guidi *et al.*, 1982; Rodgers *et al.*, 1995) o patógenos (Costa *et al.*, 1987; Felipó, 1995).

En este trabajo vamos a fijarnos sólo en la evolución de algunos microorganismos patógenos en el suelo.

La supervivencia de bacterias en el suelo está influenciada por muchos parámetros tales como la temperatura, el contenido de humedad, el pH, la composición del suelo, y la presencia de otros microorganismos (Wessendorf *et al.*, 1989; Mawdsley *et al.*, 1995).

La dinámica de las poblaciones de coliformes fecales depende del fenómeno de mortalidad y del traslado por lixiviación (Trevisan *et al.*, 2002).

Las bajas temperaturas favorecen la supervivencia de las bacterias en un suelo (Gerba *et al.*, 1975). A medida que la temperatura aumenta, el grado de supervivencia de las bacterias en el suelo tiende a disminuir.

2. Material y métodos

El suelo utilizado es de textura franco arcillo arenosa, ligeramente ácido (pH 5,84), y se le adicionó lodo de depuradora urbana sometido a un tratamiento anaerobio seguido de deshidratación mecánica.

El suelo se tamizó con un tamiz de 4 mm de luz.

El lodo adicionado tenía un pH básico (8,98) y su contenido en metales pesados cumplía los límites máximos admisibles para su aplicación en agricultura indicados en la legislación europea vigente.

La dosis de lodo aplicada se calculó en función de las unidades de nitrógeno que aportaba dicho lodo, y fue de 15 t ha⁻¹. El lodo fue adicionado al suelo de forma manual,

mezclándolo hasta lograr una distribución lo más homogénea posible, para posteriormente homogeneizarlo con un homogeneizador de suelos.

De la mezcla de suelo más lodo se tomaron submuestras de 100g (peso fresco) que fueron colocadas dentro de unos recipientes cilíndricos de polietileno de 125 mL de capacidad, que incorporaban una tapa de rosca del mismo material. También se colocaron muestras de 100g (peso fresco) de suelo solo que se utilizaba como muestras de referencia, para el mismo contenido de humedad (10%), y sometidos a las mismas temperaturas de incubación que las muestras de suelo más lodo (15, 25 y 35°C).

La humedad de las muestras se mantuvo constante a lo largo del ensayo, calculando diariamente la pérdida de agua por diferencia de peso, utilizando para ello una balanza de precisión Mettler Toledo AG204 y añadiendo el agua que se había evaporado mediante micropipetas Eppendorf Research de 0,1; 1 y 5 mL. Las puntas de las micropipetas y el agua que se utilizaba para ajustar humedad, eran previamente esterilizadas en un autoclave Raypa sterilmatic AE-75DRY.

El período de incubación para todas las muestras fue de 80 días, tomando muestras los días 0, 5, 10, 20, 40, 60 y 80. El día 0 coincide con el día en que se inicia el ensayo y por lo tanto con el día en que se aporta el lodo al suelo. Todas las muestras se incubaron en oscuridad.

Para determinar el pH, se preparó una suspensión suelo/agua (1:2,5 p/v). La medida del pH se realizó con un pHmetro CRISON GLP22, previamente calibrado.

Para la determinación de los análisis microbiológicos se siguió la normativa ISO correspondiente en cada caso, siendo la "Norma internacional standard ISO/FDIS 9308-1:2000(E). Water quality-Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria", la utilizada para la determinación de coliformes fecales y de *Escherichia coli*; la "Norma española UNE-EN ISO 6222:1999. Calidad del agua. Enumeración de microorganismos cultivables. Recuento de colonias por siembra en medio de cultivo de agar nutritivo", la utilizada para la determinación de aerobios totales; y la "Legislación ambiental, publicada en el BOE número 193 de 13-08-1983", junto con la "Norma internacional standard ISO 7899-2", la utilizada para la determinación de estreptococos fecales.

Las poblaciones iniciales de aerobios totales, coliformes fecales, *Escherichia coli* y estreptococos fecales, para el suelo y el lodo, se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Poblaciones iniciales en el suelo y el lodo

Poblaciones	Suelo (ufc/g mat. seca)	Lodo (ufc/g mat. seca)
Aerobios totales	$4,3 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^7$
Coliformes fecales	ND	$1,6 \cdot 10^6$
<i>Escherichia coli</i>	ND	$5,5 \cdot 10^5$
Estreptococos fecales	ND	$9,4 \cdot 10^4$

ND = No detectado

Las pruebas se hicieron por triplicado, y posteriormente, los análisis microbiológicos se hicieron por duplicado para cada muestra.

Las poblaciones microbianas estudiadas, así como los factores y las variables que pueden influir en ellas, fueron examinados mediante análisis de varianza (ANOVA) con el SPSS software. A estos resultados se les aplicó el test de Duncan para comprobar si las diferencias eran significativas o no, para un nivel de significación $p = 0,05$.

3. Resultados y discusión

En la Fig. 1, se muestra la evolución de la población de aerobios totales en las muestras de suelo solo y de suelo más lodo, para las tres temperaturas de incubación objeto de estudio, con un contenido de humedad en las muestras del 10%.

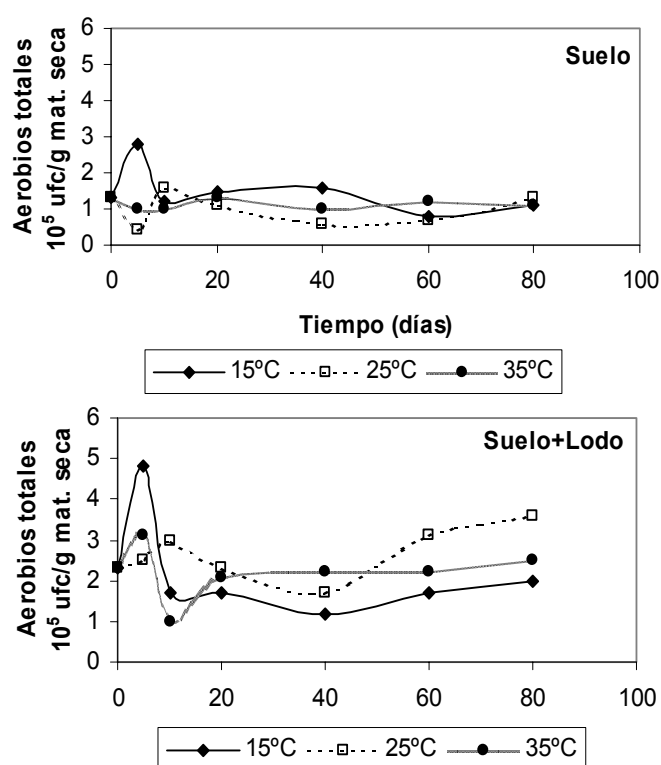


Fig. 1. Evolución de aerobios totales

Como puede verse en dicha figura, las mayores poblaciones se alcanzan en las muestras que tienen lodo, ya que este tipo de lodo en un suelo incrementa la actividad y diversidad de las poblaciones microbianas del suelo. Esto también se observa en la tabla 2, correspondiente a los resultados del ANOVA, en la que se ve que la presencia de lodo en las muestras es significativo para la población de aerobios totales.

Al final del período de incubación, la población de aerobios totales en la muestra de suelo más lodo a 25°C, presenta un crecimiento ligeramente ascendente, que también tiende a apreciarse en la muestra de suelo solo para la misma temperatura de incubación, aunque en mucha menor medida.

Tabla 2. Resultado ANOVA

		(ufc/g materia seca)			
		Aerobios totales	Coliformes fecales	<i>E. coli</i>	Estreptococos fecales
Día incubación	0	1,8.10 ⁵ a	70 b	< 30 a	< 30 b
	5	2,4.10 ⁵ a	4,1.10 ² a	2,5.10 ² a	1,3.10 ² a
	10	1,6.10 ⁵ a	< 30 b	< 30 a	< 30 b
	20	1,7.10 ⁵ a	< 30 b	< 30 a	< 30 b
	40	1,4.10 ⁵ a	< 30 b	< 30 a	< 30 b
	60	1,6.10 ⁵ a	< 30 b	< 30 a	< 30 b
Tª incubación	80	1,9.10 ⁵ a	< 30 b	< 30 a	< 30 b
	15	1,8.10 ⁵ a	58 a	< 30 a	36 a
	25	1,8.10 ⁵ a	1,5.10 ² a	1,1.10 ² a	< 30 a
Presencia de lodo	35	1,7.10 ⁵ a	< 30 a	< 30 a	< 30 a
		*	ns	ns	ns
pH		ns	ns	ns	ns

* = Significativo para $p = 0,05$, ns = No significativo para $p = 0,05$
 Los valores seguidos de distintas letras son significativamente diferentes para un nivel de significación $p = 0,05$, según el test de Duncan

En las Fig(s). 2 y 3, se muestra la evolución de las poblaciones de coliformes fecales y de *Escherichia coli* en las muestras de suelo solo y de suelo más lodo, para las tres temperaturas de incubación objeto de estudio, con un contenido de humedad en las muestras del 10%. Con la adición de lodo se incrementan las poblaciones de coliformes fecales y de *Escherichia coli*, debido a que este tipo de microorganismos suelen estar presentes en los lodos procedentes de depuradora urbana.

En las Fig(s). 2 y 3, se aprecia como las mayores poblaciones tanto de coliformes fecales como de *Escherichia coli*, en las muestras de suelo más lodo, se alcanzan para la temperatura de 25°C y el día 5 de incubación, mientras que para las muestras de suelo solo la máxima población de coliformes fecales se alcanza también para el día 5 de incubación, pero para la temperatura de 15°C.

En la Fig. 4, se muestra la evolución de la población de estreptococos fecales en las muestras de suelo solo y de suelo más lodo, para las tres temperaturas de incubación objeto de estudio, con un contenido de humedad en las muestras del 10%. La población máxima de estreptococos fecales se alcanza, también, para la muestra de suelo más lodo, en el día 5 de incubación, y en este caso para la temperatura de 15°C.

Como se ve en las figuras, el día de incubación es muy significativo para las poblaciones microbianas estudiadas, alcanzándose las mayores poblaciones para el día 5. Esto puede deberse a que las bacterias generalmente sufren un período de latencia o de aclimatación, en el que se van adaptando progresivamente a las condiciones del medio donde se encuentran; después, suelen tener una fase de crecimiento logarítmico, en el que las bacterias empiezan a dividirse y aumentar en número a una velocidad constante, como consecuencia de la disponibilidad de aporte nutritivo (siendo mayor este aporte en el caso en el que se adiciona lodo, ya que cuenta con los nutrientes propios del suelo y con los adicionados con los lodos), alcanzándose para el día 5 las poblaciones totalmente desarrolladas

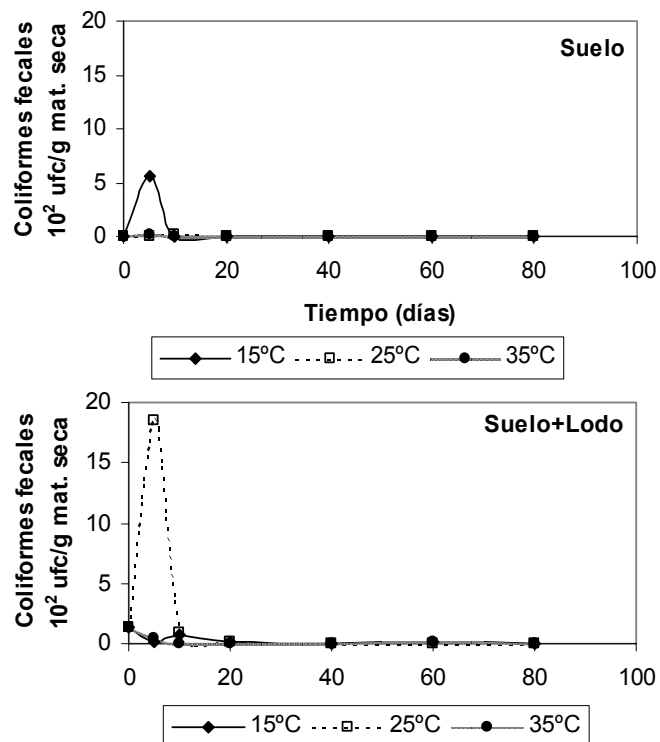
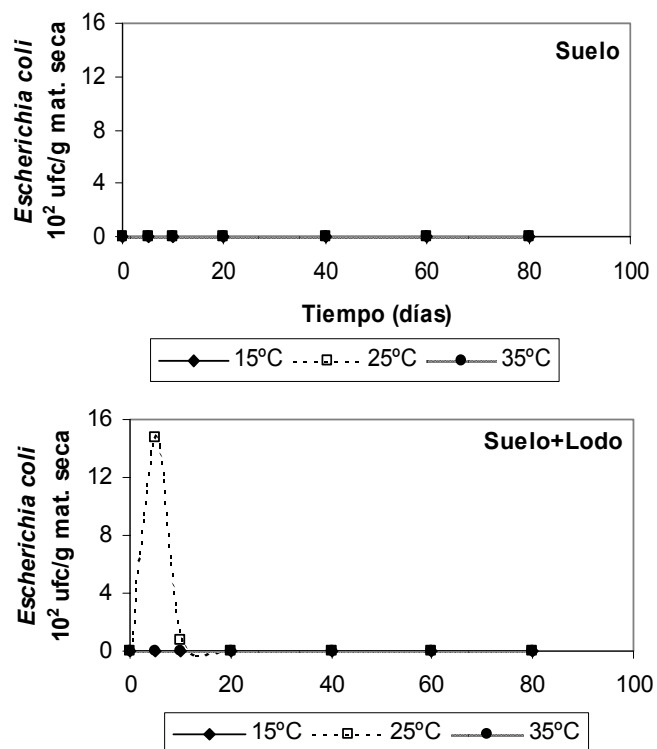


Fig. 2. Evolución de coliformes fecales

Fig. 3. Evolución de *Escherichia coli*

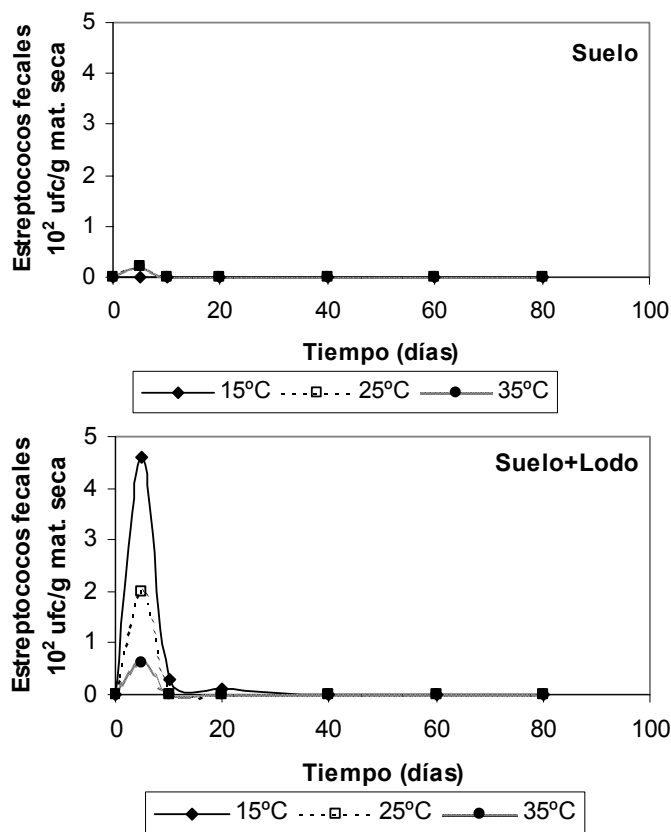


Fig. 4. Evolución de estreptococos fecales

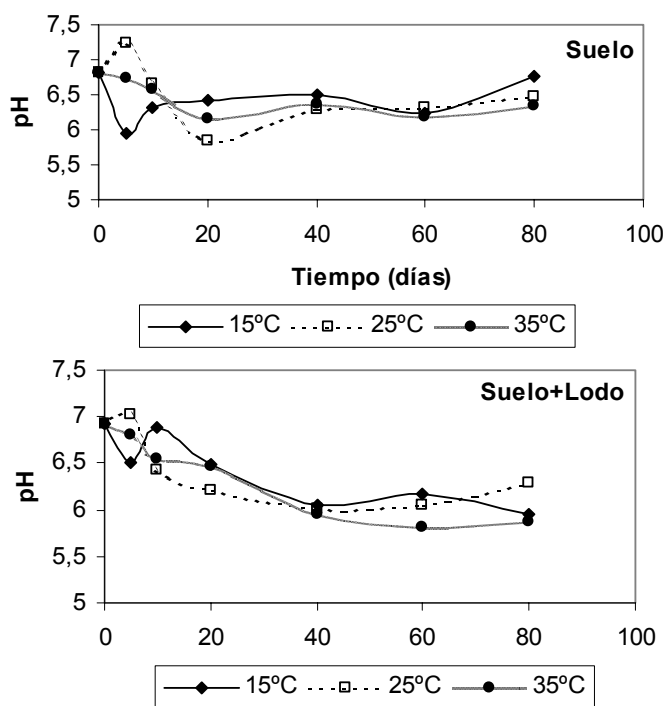


Fig. 5. Evolución del pH

Como también se aprecia en la tabla 2, el día de incubación presenta diferencias significativas en las poblaciones de coliformes y de estreptococos fecales, alcanzándose las mayores poblaciones para todos los microorganismos estudiados, el día 5 de incubación, como puede verse en dicha tabla.

A partir del día 20 de incubación, no se detecta presencia de ninguno de los microorganismos patógenos estudiados, estando, por lo tanto, las poblaciones de coliformes fecales, *Escherichia coli* y estreptococos fecales por debajo de los límites de detección para las tres temperaturas estudiadas, tanto en las muestras de suelo sólo como en las de suelo más lodo, al final del ensayo (día 80 de incubación).

En la Fig. 5, se muestra la evolución del pH de las muestras de suelo sólo y de suelo más lodo, para las tres temperaturas de incubación y con una humedad del 10%.

Como se puede ver en ella, el pH evoluciona de forma similar en las muestras de suelo sólo y en las de suelo con lodo, aunque es ligeramente superior en las muestras con lodo al inicio del ensayo, pero a partir del día 20 de incubación, el pH desciende en dichas muestras respecto al que se obtiene en las muestras sin lodo.

Observando las Fig(s) 1, 2, 3, 4 y 5, no se aprecian relaciones muy marcadas entre el crecimiento y decrecimiento de los microorganismos estudiados, con la evolución del pH, para una humedad en las muestras del 10%, obteniéndose en los resultados del ANOVA (tabla 2) que el pH no es significativo para ninguna de las poblaciones microbianas estudiadas.

La temperatura de incubación no presenta diferencias significativas (para un nivel de significación $p = 0,05$) para ninguna de las poblaciones estudiadas, pero se obtienen las menores poblaciones para la temperatura de 35°C.

4. Conclusiones

El aporte del lodo al suelo origina un incremento inicial en la población de aerobios totales y de microorganismos patógenos, encontrándose estos últimos por debajo de los límites de detección tanto en las muestras de suelo como en las suelo más lodo, a partir del día 20 de incubación.

La temperatura de incubación de las muestras es un factor que influye en la actividad microbiana, permitiendo que aumenten o disminuyan dichas poblaciones en función del rango de temperatura óptimo propio de la especie microbiana de que se trate, así las poblaciones de aerobios totales y de estreptococos fecales son máximas a la temperatura de 15°C, mientras que las poblaciones de coliformes fecales y de *Escherichia coli* se desarrollan mejor a mayores temperaturas.

El tiempo de incubación afecta a la evolución de las poblaciones microbianas estudiadas, presentando una evolución creciente hasta el día 5 de incubación, momento en el cual se alcanza el máximo en las poblaciones microbianas estudiadas, a partir de aquí, empiezan a decrecer rápidamente hasta el día 10 de incubación.

Agradecimientos. Agradecemos la concesión del proyecto de la Junta de Castilla y León LE 34/01.

Referencias

- Beck A.J., Alcock R.E., Wilson S.C., Wang M.J., Wild S.R., Sewart A.P., Jones K.C. (1995). Long-term persistence of organic chemicals in sewage sludge-amended agricultural land: a soil quality perspective. *Advances in Agronomy* 55, pp. 345-391.
- Berti W.R., Jacobs L.W. (1998). Distribution of trace elements in soil from repeated sewage sludge applications. *J. Environ. Qual.* 27, pp. 1280-1286.
- Costa F., Hernández M.T., Moreno J.L. (1987). Utilización agrícola de lodos de depuradora. *CSIC, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, España.*
- Felipó Oriol M.T. (1995). Reutilización de residuos urbanos y posible contaminación. *En: Jornadas técnicas de Gestión y utilización de residuos urbanos para la agricultura. Ed. Aedos. Mundi Prensa. Madrid, pp. 27-36.*
- Gerba C.P., Wallis C., Melnick J.L. (1975). Fate of wastewater bacteria and viruses in soil. *ASCE Journal of Irrigation and Drainage Division, IR3*: pp. 157-174.
- Guidi G., Pagliari M., Giachetti M. (1982). Modifications of some physical and chemical soil properties following sludge and compost applications. *In: The influence of sewage sludge on physical and biological properties of soils Catroux. P.L'Hermite y E. Suess, eds. Dordrecht, Holanda, pp. 122-130.*
- Kirchmann H., Tengsved A. (1991). Organic pollutants in sewage sludge. 2. Analysis of barley grains grown on sludge fertilized soil. *Swedish J. Agric. Res.* 21, pp. 115-119.
- Legislación ambiental. Disposiciones publicadas en el Boletín Oficial del Estado. BOE número 193 de 13-8-1983.
- Orden de 27 de Julio de 1983, por la que se aprueban métodos oficiales de análisis microbiológicos para aguas potables de consumo público. Disponible desde Internet en: <http://www.gencat.es/mediamb/lleis/boe/aigua/agua036.htm>.
- López Mosquera M.E., Bande M.J., Seoane S. (2000). Evaluación del efecto salino en un suelo fertilizado con lodos de industria láctea. *Edafología*, volumen 7-1, Abril 2000, pp. 73-83.
- Mawdsley J.L., Bardgett R.D., Merry R.J., Pain B.F., Theodorou M.K. (1995). Pathogens in livestock waste, their potential for movement through soil and environmental pollution. *Appl. Soil Ecol.* 2, pp. 1-15.
- Norma internacional standard ISO 7899-2:2000 (E). Water quality-Detection and enumeration of intestinal enterococci. *Second edition 15-04-2000.*
- Norma internacional standard ISO/FDIS 9308-1:2000(E). Water quality-Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria.
- Norma española UNE-EN ISO 6222:1999. Calidad del agua. Enumeración de microorganismos cultivables. Recuento de colonias por siembra en medio de cultivo de agar nutritivo.
- O'Riordan E.G., Dodd V.A., Fleming G.A., Tunney H. (1994). Repeated application of a metal rich sewage sludge to grassland. 1. Effects on metal levels in soil. *Irish J. Agr. Food. Res.* 33, pp. 41-51.
- Rodgers C.S., Anderson R.C. (1995). Plant growth inhibition by soluble salts in sewage sludge-amended mine spoils. *J. Environ. Qual.* 24, pp. 627-630.
- Trevisan D., Vansteelant J.Y., Dorioz J.M. (2002). Survival and leaching of faecal bacteria after slurry spreading on mountain hay meadows: consequences for the management of water contamination risk. *Water Research* 36, pp. 275-283.
- Wessendorf J., Lingens F. (1989). Effect of culture and soil conditions on survival of *Pseudomonas fluorescens* R1 in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, pp. 97-102.
- Wild S.R., Jones K.C. (1992). Organic chemicals entering agricultural soils in sewage-sludge: screening for their potential to transfer to crop plants and livestock. *Sci. Total Environ.* 119, pp. 85-119.

