

Primeros resultados del estudio de la persistencia de *Salmonella* en la zona no saturada del suelo agrícola

M.P. Palacios¹; P. Lupiola²; E. Del Nero¹; A. Pardo¹; F. Rodríguez³; M.L. Pita⁴ y M.T. Tejedor²

1. Agronomía. Dpto. Producción Animal. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
2. Microbiología. Dpto. Ciencias Clínicas. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
3. Granja Agrícola Experimental del Cabildo de Gran Canaria.
4. Servicio Canario de Salud. Dirección General de Salud Pública.

RESUMEN. El riego con aguas municipales depuradas supone el uso de un recurso no convencional que puede equilibrar el balance hídrico de una zona, pero debe ir acompañado de un cuidadoso control sanitario y medioambiental a fin de minimizar los posibles riesgos para la salud y el medio ambiente. Aunque normalmente se utilizan indicadores de contaminación bacterianos, sólo algunos géneros resultan patógenos. *Salmonella* es uno de los que con mayor frecuencia se encuentra asociado a brotes de enfermedades de origen hídrico.

El objetivo de este estudio ha sido analizar la persistencia de *Salmonella* en la zona no saturada de un suelo agrícola y en un cultivo establecido en dicho suelo, cuando se riega con agua depurada a la que se ha añadido artificialmente esta bacteria. Asimismo se ha intentado correlacionar diversos parámetros meteorológicos con los niveles de *Salmonella* encontrados. Para ello se ha puesto a punto una metodología propia, cuyos primeros resultados parecen demostrar que este género es capaz de sobrevivir tanto en suelo como en planta. La radiación solar parece ser el principal parámetro responsable de la muerte de las bacterias, recuperándose las colonias durante la noche.

ABSTRACT. Municipal reclaimed water is a non-conventional resource. Using it for agricultural irrigation the hydrological unbalanced situation of a zone can disappear. However, to decrease the sanitary and environmental risks associated with its use, a carefully control must be applied. Although the use of many bacteria indicators is extended, only limited genera of them are pathogenic. *Salmonella* is one of the most spread pathogenic genera associated with water illness.

The aim of this study is to analyze the *Salmonella* ability to survive in the non saturated zone of agricultural soils, and on the plants growing in it when irrigated using reclaimed water artificially inoculated with these bacteria. A preliminary study of the climatic factors implied in the *Salmonella* survival is presented too. Solar radiation seems to be the main factor implied in *Salmonella* mortality.

la búsqueda de recursos no convencionales. El riego con aguas municipales depuradas es una alternativa interesante, pero debe ir acompañada de un cuidadoso control sanitario y medioambiental a fin de minimizar los posibles riesgos para la salud y el medio ambiente (Angelakis *et al.*, 1999).

Aunque normalmente se utilizan indicadores de contaminación bacterianos, sólo algunos géneros resultan patógenos. El número y tipo de microorganismos presentes en las aguas residuales están determinados por diferentes factores, entre ellos, el clima, la estación del año, los hábitos sanitarios de la población y la incidencia de determinadas enfermedades en la misma. *Salmonella* es uno de los géneros bacterianos que con mayor frecuencia se encuentran asociados a brotes de enfermedades de origen hídrico (Fernández-Crehuet y Espigares, 1995). La detección de su presencia, independientemente de la cantidad encontrada, hace que los productos en los que se detecta se consideren contaminados e inutilizables, por el alto riesgo que supone para la salud pública.

El hábitat natural de *Salmonella* es el tracto gastrointestinal de los humanos y de diversos animales. Por ello, se presupone que su persistencia y multiplicación en el ambiente están muy limitadas. Sin embargo, los suelos agrícolas presentan características que podrían ser adecuadas para estas bacterias, especialmente cuando son regados con aguas depuradas, dada la elevada concentración de nutrientes y los valores de humedad y temperatura existentes (Byappanahalli y Fujioka, 1998).

Para detectar la presencia de esta bacteria se utilizan medios enriquecidos líquidos y, por tanto, con ellos resulta imposible realizar su cuantificación. Utilizando un medio de cultivo en placa no convencional puede abordarse su cuantificación aunque sus poblaciones pueden quedar enmascaradas por el crecimiento de otros géneros bacterianos componentes de la flora natural del suelo.

El objetivo de este estudio ha sido analizar la persistencia de *Salmonella* en suelos agrícolas y en los cultivos establecidos en ellos, cuando son regados con aguas depuradas a las que se ha añadido artificialmente esta bacteria. Asimismo se intenta correlacionar diversos parámetros meteorológicos con los niveles de *Salmonella* encontrados.

1.- Introducción.

En las zonas áridas y semiáridas del mundo, la escasez de agua hace necesario un uso racional de la misma e impulsa

2.- Material y Métodos.

2.1.- Características del cultivo.

Se han utilizado maceteros de 80 cm de altura y 93 cm de diámetro, rellenos con tierra de cultivo 9 meses antes de la realización del primer ensayo, y sembrados con alfalfa (*Medicago sativa*) 3 meses antes del primero de ellos. Las características principales del suelo utilizado son: textura franco-arcillosa con arcillas expansibles, 1.1% de materia orgánica, pH 7.6, 1.8 dS/m de conductividad eléctrica en extracto saturado, 4.62% de caliza, 38 ppm de nitratos, 83 ppm de fósforo (método Olsen), 5.8 meq/100 g de potasio, 17.2 meq/100 g de calcio, 7.8 meq/100 g de sodio, y niveles bajos de microelementos.

2.2.- Variables atmosféricas.

Se utiliza una Estación Meteorológica Automática (EMA) que cuenta con los siguientes sensores: radiación neta, termómetro seco y húmedo para el cálculo de la humedad relativa y temperatura ambiental, sensor de medida de velocidad y dirección del viento y pluviómetro. La EMA está programada para la obtención de datos de cada uno de los sensores cada 5 segundos, almacenando la media de los valores obtenidos cada 15 minutos.

2.3.- Riego.

Al agua con que se regaron los maceteros se añadió *Salmonella* a una concentración final de 124.000 ± 8.000 unidades formadoras de colonias por mL (u.f.c./mL) en el primer ensayo y de 560.000 ± 85.000 u.f.c./mL en el segundo. Se estableció asimismo un macetero control en el que se realizaron los riegos con agua del mismo origen, a la que no se añadió *Salmonella*. Antes de añadir *Salmonella* artificialmente se confirmó su ausencia en agua, suelo y planta.

2.4.- Análisis microbiológicos.

Se realizaron dos ensayos separados cinco meses (Diciembre / Mayo), cambiando en parte la metodología en el segundo, recogiendo las muestras a los siguientes intervalos tras el riego (en horas): 3,5, 11 (justo antes de anochecer), 22 (justo al amanecer), 46, 166, 214, 310, 358. Las muestras fueron siempre compuestas. La temperatura de incubación fue siempre 37° C excepto en los casos en que se indica lo contrario.

2.4.1.- Planta.

Se tomaron muestras de planta regada con agua con y sin *Salmonella*. Se pesaron 25 g. de alfalfa y se resuspendieron en 225 mL de agua de peptona tamponada, homogeneizando posteriormente en un Stomacher. A continuación se realizaron las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} en Triptona Sal y se sembraron 100 μ L de cada dilución para

recuento en Agar Verde Brillante y Agar McConkey (primer ensayo) y en Agar Verde Brillante y Agar Rapaport (segundo ensayo). En el segundo ensayo se midió presencia/ausencia de *Salmonella* además de sembrar para recuento (Sanchís *et al.*, 1994; Pascual, 1992). Para realizar las pruebas de presencia/ausencia se realizó un preenriquecimiento en agua de peptona tamponada a 37°C durante 18 ± 2 horas y a continuación un enriquecimiento selectivo en Caldo de Rapaport durante 18 ± 2 horas, seguido de siembra en Agar Verde Brillante (a 43°C) y Agar Rapaport.

2.4.2.- Suelo.

Se tomaron muestras de superficie y a dos profundidades (15 cm. y 45 cm.) en maceteros regados con agua con y sin *Salmonella*. En el primer ensayo (diciembre) se pesaron 25 g. de suelo y se homogeneizaron en 225 mL de Agua de Peptona tamponada. Se realizaron las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} y se sembraron 100 μ L para recuento en Agar Verde Brillante y Agar McConkey. El método se modificó en el segundo ensayo (mayo) de manera que se realizaron las mismas diluciones pero el recuento se realizó en Agar Verde Brillante (43°C) y Agar Rapaport. En este segundo ensayo se estudió también presencia/ausencia de *Salmonella*, utilizando la misma metodología que para las muestras de planta.

En el segundo ensayo se colocaron además placas Petri abiertas con suelo esterilizado en autoclave y placas cerradas con suelo sin esterilizar, sobre un macetero en condiciones de campo. El objeto de la utilización de estas placas fue el de analizar comparativamente el efecto que sobre la persistencia y multiplicación de *Salmonella* en suelo ejercen la radiación solar y la flora microbiana habitual del suelo. A todas estas placas se les añadió agua con la concentración de *Salmonella* descrita. En ambos casos se realizó el recuento y la determinación de presencia/ausencia de *Salmonella* por los métodos descritos.

2.4.3.- Identificación bioquímica.

Las presuntas colonias de *Salmonella* aisladas en los diferentes medios de cultivo fueron confirmadas mediante el sistema API 20E y su biotipo comparado con el de la cepa de *Salmonella* añadida.

3.- Resultados.

Las condiciones climáticas durante los días en los que se realizó este ensayo se presentan en los Figuras 1 y 2. Se observa que la duración del día durante este periodo era muy corta y que los valores de radiación recibida hasta la finalización del mismo no son muy elevados (Figura 1). Para el cálculo de la radiación acumulada no se tienen en cuenta los valores negativos de radiación instantánea, que se explican al tratarse de un sensor que mide radiación neta

(incidente menos reflejada). Las condiciones de humedad atmosférica y temperatura son favorables aunque no siempre óptimas para el crecimiento de *Salmonella* en todo el periodo de estudio, ya que las humedades relativas superan siempre el 30%, llegando en ocasiones al 100% y las temperaturas nunca descienden de 9 °C ni superan los 27°C .

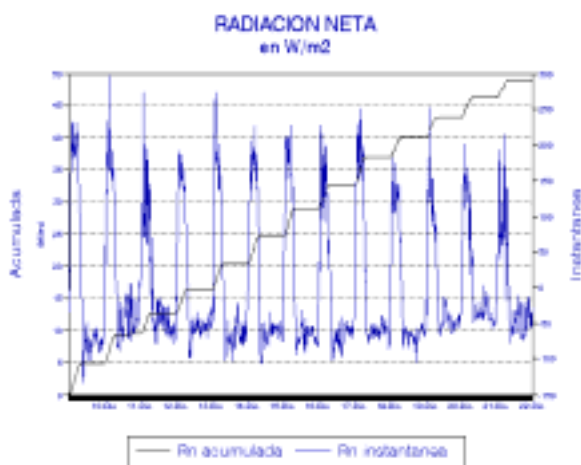


Fig.1. Radiación neta instantánea y acumulada durante los días en los que duró el ensayo.

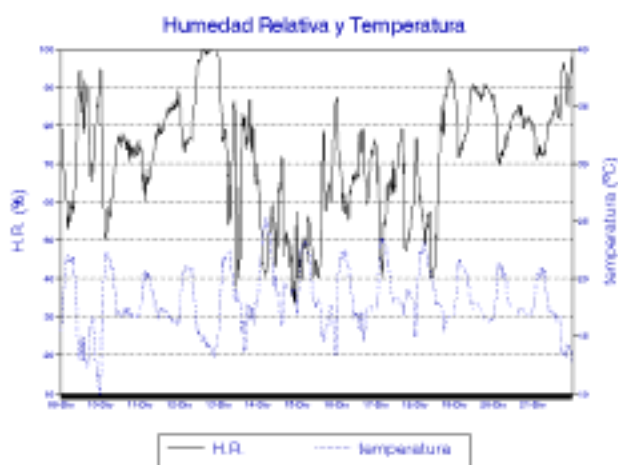


Fig.2. Humedad relativa y temperatura del aire durante los días que duró el ensayo.

En todos los ensayos en que se llevó a cabo el riego con agua convencional sin *Salmonella*, los análisis microbiológicos confirmaron la ausencia de colonias de esta bacteria en todas las muestras de agua, suelo y planta.

En el segundo ensayo (mayo), se encontró presencia de *Salmonella* en todas las muestras (planta, superficie de suelo, profundidad 15 y 45 cm, placas abiertas y cerradas) que fueron regadas con agua a la que se había añadido esta bacteria, en todos los días en que se realizó el muestreo.

Los resultados de las siembras para el recuento de los ensayos de diciembre y mayo, en las muestras regadas con agua a la que se añadió artificialmente *Salmonella*, se recogen en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Resultados de las siembras para el recuento obtenidos en el primer ensayo (diciembre 1998), expresados en miles de u.f.c. *Salmonella*/mL (agua de riego inoculada: 124.000±8.000):

| Tiempo desde el riego (días) | PLANTA | SUELO (prof. Muestra) | | |
|------------------------------|--------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| | | Muestra superficial | Muestra a 15 cm | Muestra a 45 cm |
| 0 | 12±20 | | | |
| 1 | 40±10 | | | |
| 2 | FM | FM | | |
| 7 | | FM | FM | FM |
| 12 | | FM | FM | FM |

Siendo FM: Flora mixta habitual

Tabla 2. Resultados de las siembras para el recuento obtenidos en el segundo ensayo (abril 1999), expresados en miles de u.f.c. *Salmonella*/mL (agua de riego inoculada: 565.000±85.000):

| Tiempo desde el riego (horas) | PLANTA | SUELO (prof. Muestra) | | | Suelo estéril en placa Petri abierta | Suelo no estéril en placa Petri cerrada |
|-------------------------------|----------|-----------------------|-----------------|-----------------|--------------------------------------|---|
| | | Muestra (superficial) | Muestra (15 cm) | Muestra (45 cm) | | |
| 0 | 470±90 | | | | | |
| 3,5 | < 30 | | | | | |
| 11 | FM | | | | | |
| 22 | 36.5±1.5 | 135±25 | | | 50±10 1.590±90 | |
| 46 | < 30 | < 30 | | | 33±7 3.000±500 | |
| 166 | FM | < 30 | < 30 | FM | < 30 FM | |
| 214 | FM | | | | | |
| 310 | | | | | < 30 < 30 | |
| 358 | | < 30 | < 30 | FM | FM | |

FM: Flora mixta habitual

4.- Discusión.

El suelo puede jugar un importante papel en la contaminación bacteriana de los vegetales, debido al contacto directo entre suelo y planta. Este papel es aún más importante cuando el riego se lleva a cabo con agua depurada.

Pese a que los resultados obtenidos en el primer ensayo (Tabla 1) parecían indicar la desaparición de la *Salmonella* a partir del segundo día después del riego, las pruebas de presencia/ausencia realizadas en el segundo ensayo demostraron lo contrario. Cuando se realizan siembras para el recuento en placas, el crecimiento de la flora mixta habitual dificulta la detección de *Salmonella*. Sin embargo, cuando se realizaron las pruebas de presencia/ausencia en el segundo ensayo, se detectó la presencia de dicha bacteria. Así, se ha detectado presencia de *Salmonella* en plantas de alfalfa 10 días después del riego con agua a la que se había añadido esta bacteria, lo que indica que puede persistir durante un periodo relativamente largo, pese a que en los resultados sobre placa (de las siembras para el recuento) a partir del segundo día sólo se encontraba flora mixta habitual (Tabla 2), por lo que se ha constatado la importancia de realizar pruebas de presencia-ausencia. Esto está en concordancia con los resultados de diversos autores (Abdel-Monem y Dowidar, 1990; Turpin *et al.*, 1993; Hassen *et al.*, 1996) quienes han demostrado la presencia y

persistencia de *Salmonella* y otras bacterias entéricas en suelos, especialmente en los destinados a usos agrícolas.

En estos ensayos, la concentración de *Salmonella* era mayor en la superficie del suelo y disminuía con la profundidad, debido al efecto filtrante del suelo, lo que coincide con los resultados de otros autores (Al-Nakshabandi *et al.*, 1997). Aún así, se detectaba la presencia de esta bacteria a profundidades de 15 y 45 cm, 15 días después del riego (Tabla 2). Sin embargo, los resultados del conteo nos parecen extraños, lo que nos hace sospechar que puede existir un problema de metodología en la toma de muestras de suelo a esas profundidades. Otros autores (Rosas *et al.*, 1984) han demostrado la presencia de un número significativo de bacterias incluso a una profundidad de 120 cm, atribuyéndola a la porosidad del suelo y a la infiltración de agua contaminada. En algunos casos el número de u.f.c. de *Salmonella* disminuía hasta quedar su crecimiento enmascarado por el crecimiento de la flora mixta habitual del suelo (que aparece en las tablas como FM). Sin embargo, su persistencia se ponía de manifiesto al realizar las pruebas de presencia/ausencia, como ocurría en las muestras vegetales.

Asimismo, se observaron oscilaciones en el número de u.f.c./mL de *Salmonella* que se detectaban tanto en planta como en suelo, que podrían deberse a otros factores además de a la radiación solar. Así, como se observa en la columna de resultados obtenidos en planta de la Tabla 2, existe una disminución del número de colonias durante las horas en las que se recibe radiación solar, que disminuyen hasta quedar enmascaradas por la flora mixta habitual del suelo. Sin embargo, en las muestras recogidas en el amanecer del día siguiente, el número de colonias ha aumentado. Esto podría deberse a que durante la noche, en ausencia de radiación, y en un ambiente húmedo favorable, las *Salmonella* viables se multiplicaron. Tras el análisis de estos resultados preliminares, el desarrollo de la población de *Salmonella* en el tiempo parece que podría aproximarse a una curva del tipo "vibración forzada amortiguada", en la cual la amortiguación es debida a la acción periódica de la radiación solar.

En los ensayos en placas, los resultados obtenidos muestran un aumento del número de colonias en las placas con suelo sin esterilizar y cerradas, aumento que es exclusivo de este tratamiento frente al resto, en las que se observa una disminución estando todas situadas en similares condiciones ambientales. Este hecho parece indicar que el efecto de la radiación solar en la persistencia de *Salmonella* es muy superior al de la competencia con la flora microbiana del suelo. Otros autores (Turpin *et al.*, 1993) encuentran mayor crecimiento en suelo estéril que en suelo no estéril, pero no anulan en ninguno de los dos casos la influencia de la radiación solar, por lo que sus resultados son los esperados cuando se elimina la competencia de la flora habitual de suelo.

El mayor número de u.f.c./mL obtenido tras 22 horas de realizado el riego en muestras de suelo superficial (no esterilizado) y las muestras en placa abierta con suelo estéril pueden deberse a la mayor desecación que se produce en las placas frente a la del suelo en el macetero.

5.- Conclusiones.

Se ha demostrado que la metodología puesta a punto para el conteo de *Salmonella* en placa (Agar-Rapaport) resulta adecuada.

Se ha demostrado que la *Salmonella* es capaz de sobrevivir en suelo y planta al menos hasta 13 y 10 días respectivamente, después de realizado el riego con agua inoculada artificialmente con gran cantidad de esta bacteria. También, se ha puesto de manifiesto la importancia de realizar pruebas de presencia/ausencia, ya que en las muestras en las que sólo se observaba flora mixta habitual, se detectó siempre presencia de *Salmonella*.

Se ha demostrado el efecto de la radiación solar sobre la disminución del número de u.f.c./mL y la capacidad de recuperación de estas bacteria patógenas durante la noche.

Agradecimientos: Esta investigación ha sido financiada por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, proyecto HID97-1203-CO2-01 y 02.

Referencias.

- Abdel Monem, M.H. y Dowidar, A. 1990. Recovering of *Salmonella* from soil in Eastern region of Saudi Arabia Kingdom. *J. Egypt Public Health Assoc.*, 65: 61-75.
- Al-Nakshabandi, G.A., Saqqar, M.M., Shatanawi, M.R., Fayyad, M., Al-Horani, H. 1997. Some environmental problems associated with the use of treated wastewater for irrigation in Jordan. *Agricultural Water Management*, 34: 81-94.
- Angelakis, A.N., Marcos do Monte, M.H.F., Bontoux, L., Asano, T. 1999. The status of wastewater reuse practice in the Mediterranean basin: need for guidelines. *Wat. Res.* 33(10):2201-2217.
- Byappanahalli, M.N. y Fujioka, R.S. 1998. Evidence that tropical soil environment can support the growth of *Escherichia col.* *Wat. Sci. Tech.*, 38: 171-174.
- Fernández-Crehuet, M. Y Espigares, M. 1995. Contaminación del agua: Contaminación biológica. En: *Estudio Sanitario del Agua*. J.A. Pérez y M. Espigares (eds.). Capítulo 4. pp.: 51-66. Ed. Universidad de Granada.
- Hassen, A.; Jedidi, N.; Kallali, H.; Boudabous, A. y Ennabli, M. 1996. Isolation of *Salmonella* in wastewaters and study of indicator bacteria survival in soils. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 73: 173-177.
- Pascual, M.R. 1992. *Microbiología Alimentaria: Microbiología analítica para alimentos y bebidas*. Ed. Díaz de Santos.
- Rosas, I.; Báez, A. y Coutiño, M. 1984. Bacteriological Quality of Crops Irrigated with Wastewater in the Xochimilco Plots, Mexico City, Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 1074-1079.
- Sanchís, V.; Allaert, C.; Sala, N. y Torres, M. 1994. *Prácticas Microbiología de Alimentos*. Ed. Universidad de Lleida.
- Turpin, P.E.; Maycroft, K.A.; Rowlands, C.L. y Wellington, E.M. 1993. Viable but non-culturable salmonellas in soils. *J. Appl. Bacteriol.*, 74: 421-427.