

Aislamiento de *Bacillus subtilis* como indicador en la desinfección de aguas residuales mediante radiación gamma"

Mata J. M⁽¹⁾; Colín C. A⁽¹⁾; López V. H⁽²⁾; Breña V. M⁽²⁾; Carrasco Á. H⁽²⁾; Pavón R. S⁽²⁾

¹ Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México,
Paseo Colon esq. Tolloca S/N; Toluca, Estado de México, C.P. 5000.

² Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares



MX0300196

Resumen

En el intento por tener mas alternativas de desinfección de aguas residuales se aisló *Bacillus subtilis* a través de radiación gamma como un bioindicador de éstas, ya que resulto ser resistente a la dosis de 5 kGy, comparando esto con otros microorganismos usuales como bioindicadores *E. coli*, y *S. typhimurium*, quienes resultan ser más sensibles a dicha dosis.

Introducción

Uno de los grandes problemas por lo que atraviesan los países en vías de desarrollo como México, es que han sido blancos directos de epidemias y pandemias causadas por microorganismos patógenos presentes en los alimentos y aguas contaminadas, lo cual a traído como consecuencia la pérdida de vidas humanas.

Los contaminantes que llegan al agua son diversos y pueden alterar las características biológicas, físicas y químicas de los acuíferos ello repercute en el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos y terrestres. Dentro de las alteraciones físicas se encuentra el color, sabor, temperatura, conductividad, en las químicas se encuentra la materia orgánica biodegradable, materiales oxidables, nitrógeno, fósforo, aniones como (cloruros, nitratos, fosfatos, sulfuros, cianuros, fluoruros), cationes (sodio, calcio, magnesio, amonio) metales pesados. Y dentro de las alteraciones biológicas del agua se encuentran las bacterias, virus, protozoarios, helmintos etc.

Necesariamente la reutilización del agua residual debe contar con un sistema de desinfección con el fin de reducir los riesgos a la salud a causa de microorganismos patógenos. Actualmente la escasez del agua en muchas regiones del mundo, ha llevado a la búsqueda de nuevos métodos de tratamiento, que sumados al convencional, permite el reuso del agua tratada.

Por ello, como alternativa de tratamiento del agua residual encaminada a la restauración de la calidad, actualmente se ha enfocado la atención en la radiación.

La radiación, es un proceso innovador, que descompone las sustancias químicas, a la vez que provoca la muerte de microorganismos.

Su inversión inicial como tecnología es alta para la instalación, siendo el costo por m³ de tratamiento 66% menor en comparación con agentes como cloro, yodo y ozono. (McKeown, 1996).

Este trabajo se enfoca específicamente a la desinfección por irradiación. Para conocer mejor del tema es necesario saber que la tecnología de la radiación es una alternativa que nos puede ayudar a restaurar los problemas ambientales, presenta las ventajas de ser ambientalmente y humanamente segura, económicamente competitiva y altamente eficaz.

Las principales fuentes de radiación; ultravioleta (UV), radiación gamma (⁶⁰Co), rayos X y electrones de alta energía (e⁻) (Sawai et al, 1993; Moreno et al, 1992).

Actualmente en muchos países como Alemania, Canadá, Estados Unidos, Japón y México entre otros, han investigado el tratamiento por irradiación de aguas y lodos residuales, con propósitos múltiples y específicos para la desinfección.

Al interaccionar la radiación con el agua, se producen radicales, iones y moléculas que llevan a cabo la ruptura de los enlaces de esta forma se alteran las especies químicas presentes y forma nuevas estructuras que afectan a los microorganismos

Los efectos químicos y biológicos producidos por la radiación ionizante se debe fundamentalmente a los electrones primarios y secundarios. Las células bacterias contienen 80% de agua, la radiación actúa principalmente por el efecto indirecto, a través de la radiolisis del agua, la formación del radical libres, hidroxilo (OH), átomos de hidrógeno (H) y electrones acuosos (e_{aq}) son altamente reactivos y capaces de producir una gran variedad de lesiones letales sobre el ADN, proteínas y otras moléculas presentes en las células, provocando reacciones de oxidación, reducción, disociación o degradación (Lester, 1977, Yonghwi and Wayne, 1995



El análisis de contaminación biológica del agua se realiza utilizando un organismo indicador (común) y por detección de un microorganismo específico aislados del agua residual. Un buen indicador es aquel que está junto con los otros microorganismos de interés y ausente cuando se hayan eliminado

La selección de indicadores depende del tiempo de supervivencia, ya que es muy significativo y son utilizados como guía para valorar la eficiencia de un determinado tratamiento, por ello, es importante la búsqueda de indicadores que permitan detectar y enumerar los patógenos contaminantes (Borrego and Morifigo, 1987; Buttiaux and Mossel, 1981).

Los microorganismos que suelen emplearse para tal fin son (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Clostridium perfringens*) (AWWA, WPCF, 1992; WHO, 1996).

Algunos microorganismos han demostrado ser resistentes a la radiación ionizante. Dentro de los cuales se encuentra *Deinococcus radiodurans*, *Deinococcus proteolyticus*, *Pseudomonas radiora*, *Methylobacterium extorquens*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* Ayhan, H Tutler (1994), Wacket (1998), Hiroshi Watanabe, et al (1984), Fatima Nogueira et al (1998).

Como antecedentes, se tiene las investigaciones realizadas en el ININ en colaboración con la UAEM y la empresa Reciclagua, en los que se ha determinado la eficiencia de la radiación gamma (^{60}Co) en la eliminación de materia orgánica no biodegradable y coliformes en el aguas residual, de muestras con y sin tratamiento biológico. Los resultados obtenidos señalan una eliminación del 98% de coliformes (Martínez, 1987).

Moreno y Colín (1992, 1995) Al exponer muestras de agua residual procedentes de la 1 y 2 etapa del sistema de tratamiento a 10 kGy eliminaron 5 ordenes de magnitud, mientras que para los lodos residuales irradiados a 7 kGy fue de 6 ordenes de magnitud

Metodología

Se tomaron muestras del efluente después del tratamiento biológico de la planta tratadora de aguas residuales reciclagua, en un contenedor estéril de 2L. Las muestras fueron guardadas a $-10\text{ }^{\circ}C$.

Posteriormente se colocaron en tubos de 10 mL y se irradiaron a 5 kGy, en el irradiador de fuente gammas y finalmente por siembra en placa se realizó la cuenta total microbiana de aquí se selecciono el microorganismo y se prosigió a observar su morfología por tinción para posteriormente realizar su identificación, por pruebas bioquímicas según el manual Bergey's. La cepa microbiana se cultivo en medio nutritivo y sembró periódicamente para los posteriores estudios. La cepa aislada se cultivo a $37^{\circ}C$ por 24 hr con agitación rotatoria a 150 rpm en medio nutritivo posteriormente se tomo una alícuota de 0.1 mL y se colocó en un matraz de boca larga con 10 mL de medio nutritivo

Se mantuvo a $37\text{ }^{\circ}C$ por 24 hr hasta tener una concentración de 1.36×10^9 UFC/mL En el irradiador modelo JS 6500 fuente de radiación gamma (^{60}Co). Se colocaron las muestras en un soporte y posteriormente fueron irradiadas de 1-10 kG, se incubaron a $31\text{ }^{\circ}C$, 24 hr., terminado el tiempo se realizó cuenta de colonias, finalmente se calculo la fracción de supervivencia con respecto a la dosis irradiada. Cabe señalar que todos los análisis se realizaron por triplicado

Resultados y discusión

El microorganismo aislado que resulto ser resistente a 5 kGy, Se identifico según el manual de Bergey's como *Bacillus subtilis*.

Al irradiar dicha especie a diferentes dosis de radiación se encontró que a 10 kGy resulta ser resistente (ver figura 1), considerando la estructura esporulada que le da la resistencia a su estructura celular, y que no es un microorganismo patógeno para el hombre

Dosis (kGy)	UFC/mL	Fracción de supervivencia
0	1.36E+09	1
1	1.73E+08	0.1273
2	2.72E+07	0.01512

3	4.08E+06	0.0023
4	512300	3.78E-04
5	73030	5.39E-05
6	10940	8.07E-06
7	1620	1.20E-06
8	206	1.52E-07
9	32	2.36E-08
10	4	2.95E-09

Conclusión

Los datos obtenidos nos indican que el microorganismo identificado como *B subtilis* de la muestra de agua residual resistente hasta 10 kGy de radiación. Considerando que *E.coli* de una población inicial de 1.16×10^9 UFC/mL con 5 kGy no hubo sobrevivencia, al igual que *Salmonella typhimurium* a 1.12×10^9 UFC/mL disminuyó a 2.9×10^5 UFC/mL a la misma dosis (Becerril, 1995). Ahora con *B subtilis* de 1.36×10^9 a la misma dosis su densidad celular decrece a 7.3×10^4 UFC/mL. Por su mejor respuesta a la radiación *Bsubtilis* mejora las expectativas como indicador.

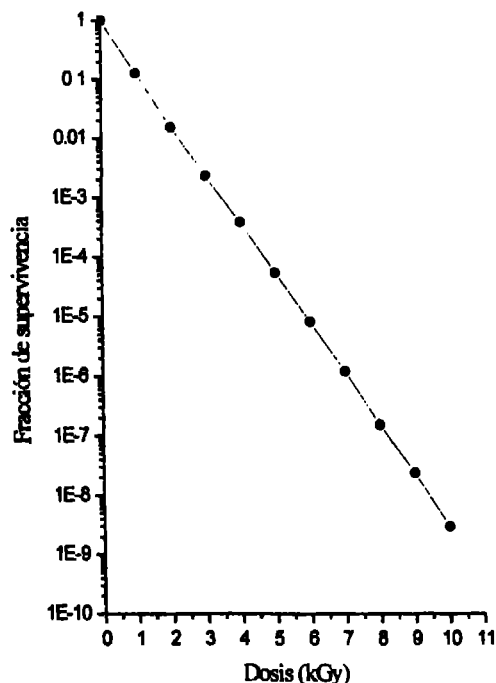


Fig 1. Fracción de supervivencia de *B.subtilis* irradiado Gamma⁶⁰Co

Agradecimientos

Al M.en C. Arturo Colín C, Ing. Héctor López V ; M. en C. Matilde Breña V, M en C.Héctor Carrasco Á y al M. SP.Sergio Pavón R

Referencias

- America Waste Water Association (AWWA) 1991. *Water Quality and Treatment A Handbook of Community Water Supplies, Fourth Edition* Mc Graw-Hill, Inc. Estados Unidos de América .
- APHA(1985), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16 th edition*, America Public Health Association". Washington D.C.
- Ayhan H., Tutler H. (1994) *Determination of the inhibition (D₁₀ Radiation Doses) of some Gram Negative and Gram Positive Bacteria in Peptone Saline Water.*
- Becerril S. M. G (1995), *Bacillus cereus como indicador en la eliminación de enterobacterias patógenas por irradiación gamma con cobalto -60.* Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UAEM. Toluca. México.
- Bræg Rs. Murria. E.G.D and Smith N.R. (1973) *Bergey's Manual of Determinative bacteriology.* The Wilkins. Company. Company. 336, 617.671.
- Buttlauz R.and Mossel P.A. (1981) *The significance of various organisms of faecal origin in foods and drinking water.* J. Appl Bacteriol. Vol. 24, pp 353-354.
- Colín C. A. (1994) *Evaluación de radiación en lodos residuales.* Tesis de Maestría, Facultad de Química, UAEM, Toluca. México.
- Hiroschi W., Massaki T. (1984) *Desinfection of Sewage Sludge cake by Gamma irradiation.* Radiat .Phys. Chem. Vol 24, No 1, pp 41-44.
- Mckeon, J. (1996). *New regulation on toxic chemicals are leaving space for new radiation technologies.* Impela News. AELC. Vol. 3. No. 2 pp 1-4.
- Mejía Z. E. (2000). *Bacillus cereus como indicador de desinfección de aguas residuales con electrones de alta energía.* Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UAEM, Toluca. México.
- Merck (1989). *Análisis microbiológico del agua.* Ed, Merck. Alemania
- Metcalf y Hedí, Inc 1991. *Wastewater Engineering Treatment, Disposal and Reuse 3rd ed.* Mc Graw-Hill. Inc. USA. Pp 881-884
- Moreno J., Colln A y Vázquez O. (1992). *Remoción de fenoles , detergentes y coliformes presentes en aguas*

residuales por medio de irradiación. Rev Int. Contam Ambient Vol. 8. No 1, pp29-35.

Sawai T, Seriguchi M and Shimokawa T. (1993). Radiation Treatment of municipal effluent Radiat Phys. Chem. Vol. 42 No 4-6, pp723-726.

Tchobanoglous G. (1985). Ingeniería sanitaria. Tratamiento, evacuación y reutilización de aguas residuales. Labor S. A Barcelona pp 314.

Wacket Larry (1998). Radiation-resistant, pollutant-eating bacteria. Profesor de Bioquímica, (612) 625-785. Internet.