

# RELEVANCIA DE LOS PROCESOS DE AUTODEPURACIÓN EN LA REGENERACIÓN Y REUTILIZACIÓN DE AGUAS RESIDUALES

Arias, J.D.; Benítez, G.A.; Rivas, E.M.; Wrent, P.; de Silóniz y M.I. y Peinado, J. M.

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040 Madrid.  
(peinado@bio.ucm.es)

## RESUMEN

La autodepuración es un sistema de eliminación de patógenos, sencillo, económico y de escaso impacto ambiental. Presenta como inconvenientes su lentitud y escasa fiabilidad, ligada a la complejidad biológica del proceso y su gran dependencia de numerosas variables ambientales. La elaboración de un modelo matemático predictivo facilitaría su integración dentro de un tratamiento terciario integral y la evaluación cuantitativa de riesgos. En este trabajo mostramos la aplicabilidad de un modelo matemático a los datos de supervivencia de *E. coli* en efluentes secundarios y terciarios. El modelo se basa en dos premisas: 1) La heterogeneidad de la supervivencia de cada una de las células en la población y 2) que esa heterogeneidad puede ser descrita por una distribución estadística de tipo Weibull. En nuestro laboratorio hemos analizado cuantitativamente la capacidad de autodepuración de diversos efluentes utilizando este modelo, que ha mostrado su versatilidad para describir las diferentes cinéticas encontradas. Hemos desarrollado también tratamientos para diferenciar los efectos de los potenciales mecanismos biológicos subyacentes. La filtración disminuye la capacidad de autodepuración y un corto tratamiento térmico puede llegar a suprimirla. Estos datos permiten predecir que los tratamientos terciarios tendrían un efecto similar. La hipótesis ha sido confirmada analizando efluentes producto de microfiltración y ósmosis inversa. Con estos resultados podemos concluir que un agua desprovista de capacidad autodepuradora es un agua indefensa ante posibles recontaminaciones, algo que habrá que tener en cuenta no solo en la elección de los tratamientos terciarios más adecuados, sino también en el análisis cuantitativo de riesgos en su reutilización.

**Palabras clave:** Autodepuración, Modelo Weibull, Efluentes terciarios, Reutilización de agua

## 1. INTRODUCCIÓN

La autodepuración o autoregeneración de aguas contaminadas es un proceso que consiste en la inactivación selectiva de las bacterias patógenas presentes en el agua, sin necesidad de ninguna intervención externa. Se trata de un proceso biológico conocido desde hace más de 100 años, gracias a los trabajos, entre otros, del Dr. E. H. Hankin. Este médico inglés, estudioso del cólera en la India, describió que la bacteria *Vibrio cholerae*, causante de la enfermedad mortal del cólera, moría a las tres horas de ser inoculada en agua del Ganges, la misma bacteria continuaba viva después de 48 horas en agua destilada (Hankin, 1896).

El aprovechamiento tecnológico de este fenómeno ha sido un objetivo perseguido desde hace largo tiempo. Las ventajas fundamentales son su simplicidad técnica, economía y escaso impacto ambiental. Los inconvenientes son su lentitud, pero sobre todo su limitada fiabilidad, que está ligada a la complejidad biológica del proceso y su gran dependencia de numerosas variables ambientales, características que tornan muy difícil la predicción de los resultados de su aplicación. Crane y Moore (1985) publicaron una lista de hasta 20 factores diferentes que afectan el proceso, que van desde el estado fisiológico de las bacterias patógenas y su interacción con el resto de la microbiota presente a la tecnología de aplicación, pasando lógicamente por la estructura físico-química del sistema y las condiciones ambientales presentes.

El desarrollo de las aplicaciones tecnológicas potenciales que ofrece el proceso biológico de la autodepuración, requiere la elaboración de un modelo matemático predictivo de la inactivación bacteriana que nos permita, en primer lugar, integrarlo dentro del proceso de tratamiento terciario integral. En segundo lugar también es importante un modelo predictivo para la evaluación cuantitativa de riesgos, un abordaje esencial en la reutilización de las aguas regeneradas. Y en tercer lugar, y no por ello menos importante, un modelo matemático, no puramente empírico, sino relativamente estructurado, es decir, con una estructura matemática basada en los fenómenos biológicos responsables del proceso puede ser una herramienta metodológica muy eficaz para analizar y comprender de forma sistemática los mecanismos

subyacentes. Numerosos modelos matemáticos han sido utilizados para describir la supervivencia de bacterias coliformes en diversos tipos de aguas, revisados por Crane y Moore (1985). La conclusión fundamental que se obtiene de estos estudios es la gran variedad de formas de las curvas de inactivación que han sido descritas, para cada una de las cuales se postula un modelo matemático diferente. Sin embargo, cuando las aguas tienen un mismo origen, las cinéticas son semejantes, como mostró González (1995). Esos resultados apoyan la hipótesis de que la cinética observada depende de las características biológicas y fisicoquímicas del agua, que podrían tener una mayor dependencia geográfica que temporal. Todas estas consideraciones constituyen la base para la definición de los objetivos de este trabajo que detallamos a continuación.

## 2. OBJETIVOS

1. Desarrollar y validar un modelo matemático general, que describa las diferentes cinéticas de inactivación observadas en los diversos efluentes, secundarios y terciarios, y que esté basado, al menos parcialmente, en las características de los mecanismos biológicos subyacentes al proceso.

2. Cuantificar la capacidad de autodepuración de efluentes con diferentes tratamientos experimentales, utilizando el modelo validado, y relacionar los cambios observados en los parámetros del modelo con los tratamientos aplicados.

3. Cuantificar y analizar el efecto de los tratamientos terciarios industriales sobre la capacidad de autodepuración.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 *Desarrollo y validación de un modelo matemático que describa la cinética de inactivación de E.coli en aguas.*

El modelo asume que la inactivación microbiana es el resultado de la incapacidad de la célula para resistir la agresión impuesta por algún tipo de estrés, después de cierto tiempo. Y asume también que la población es heterogénea, es decir, que cada célula tarda un tiempo diferente en morir. Si la población es suficientemente grande, de forma que la distribución de los tiempos de muerte celulares pueda ser caracterizada por una función continua, la curva de supervivencia puede ser descrita por una ecuación conocida como la función de distribución de Weibull:

$$N/N_0 = \exp(-bt^n)$$

Tomando logaritmos obtenemos

$$\log N = \log N_0 - bt^n$$

en la que  $b=B/\ln 10$ . Obtenemos por tanto una ecuación sencilla con sólo dos parámetros,  $b$ , que suele ser llamado coeficiente de localización y  $n$ , llamado coeficiente de forma ya que la curva correspondiente a la ecuación es convexa cuando  $n$  es mayor que 1 y cóncava cuando es menor que 1. Cuando  $n$  es igual a 1 la ecuación de Weibull se convierte en la típica ecuación exponencial negativa. La cinética de inactivación de primer orden se puede considerar por tanto como un caso específico de la ecuación de Weibull en el que  $n$  es igual a 1. El valor de  $n$  representa también la distribución de la sensibilidad de las células al factor que causa su inactivación. Cuando  $n$  es menor que 1, esta sensibilidad es grande y por tanto las más sensibles o accesibles al factor morirán rápidamente, acumulándose las más resistentes que tardarán en morir más, dando lugar a la cola en el gráfico de la supervivencia. Un valor de  $n$  mayor que uno implica un mecanismo de inactivación diferente, en el que las células tardan menos tiempo en morir a medida que pasa el tiempo. Una posible explicación biológica de este mecanismo sería la acumulación de daños celulares, que se irían acumulando hasta tornar la célula inviable.

La validez del modelo anterior para medir la capacidad de autodepuración de una agua se puede medir inoculándole una población de *Escherichia coli* o cualquier otra especie que queramos ensayar, hasta alcanzar una población inicial cercana a las  $10^7$  UFC/ml. La inoculación se realiza para elevar la población

inicial de los efluentes secundarios, que no suele superar las  $10^2$  UFC/ml, y poder estudiar la cinética de desaparición con mayor precisión, ya que el análisis microbiológico de poblaciones pequeñas, cercanas al límite de detección de los métodos empleados, implica una mayor incertidumbre de los datos. Se incubó en ausencia de luz, con agitación y a temperatura controlada ( $28^{\circ}\text{C}$ ) para mantener constante el efecto inducido por estas variables ambientales (Barcina y otr., 1986; González, 1995). El recuento de viables se realiza por siembra de 1 ml de efluente en placas de Chromocult, un medio de cultivo diferencial para *E. coli*. Se utilizaron efluentes secundarios de las EDAR de Madrid, recogidos en verano (MAD1) y otoño (MAD2) y de invierno en Cantabria (CAN1). Los resultados de varios experimentos de este tipo se muestran en la figura 1, donde se compara la pérdida de viabilidad de la población natural de los efluentes secundarios a lo largo del tiempo, con la mostrada en los mismos efluentes inoculados con  $10^7$  UFC/ml. Las curvas continuas son el resultado del ajuste del modelo Weibull a los datos experimentales. Puede observarse que el modelo describe con bastante exactitud la inactivación de las células en todos los casos. Además, los parámetros de las ecuaciones de los efluentes sin inocular y los correspondientes inoculados muestran valores semejantes. Podemos concluir por tanto, que tanto el sistema experimental empleado para medir la capacidad de depuración natural de los efluentes, como el modelo matemático desarrollado para describir cuantitativamente los resultados, son científicamente válidos.

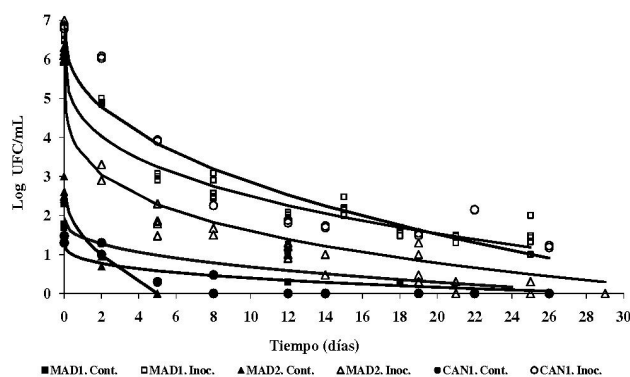


Figura 1. Cinética de la inactivación de *E. coli* en efluentes secundarios (Control) e inoculados (Inoc.). La línea continua representa el ajuste del modelo matemático tipo Weibull. Los efluentes proceden de las EDAR de Madrid (MAD) y Cantabria (CAN).

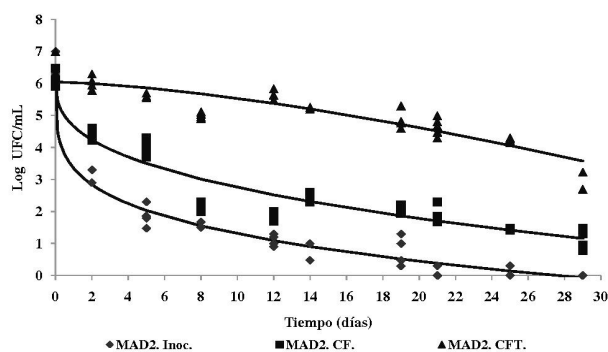


Figura 2. Efecto de la eliminación de los factores inactivantes sobre la cinética de inactivación de *E. coli* en efluentes secundarios inoculados de una EDAR de Madrid (MAD2). Efluente sin tratamiento (Inoc.). Efluente centrifugado y filtrado (CF). Efluente centrifugado, filtrado y tratado térmicamente (CFT). La línea continua representa el ajuste del modelo matemático tipo Weibull.

### 3.2. Efecto de la eliminación de la microbiota acompañante y de los compuestos termosensibles sobre la capacidad de autodepuración de los efluentes secundarios.

Para comprobar nuestra hipótesis de que las diferentes cinéticas encontradas en la literatura se deben a la acción predominante de factores diversos con mecanismos de acción diferentes procedimos a eliminar secuencialmente estos factores. Para eliminar la microbiota acompañante, centrifugamos (3500 rpm, 10 minutos) y filtramos (Millipore,  $0,22 \mu\text{m}$ ) los efluentes (CF). Para inactivar compuestos termosensibles calentamos los efluentes centrifugados y filtrados a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos (CFT). Estos efluentes tratados y los efluentes sin tratar como control, fueron inoculados e incubados como hemos descrito más arriba para medir su capacidad de autodepuración. Los resultados se muestran en las figuras 2 y 3. Podemos concluir que la eliminación progresiva de los factores de inactivación hace disminuir, como era de esperar, la capacidad de autodepuración. Además, el cambio de forma de las curvas, que pasan de pronunciadamente cóncavas en los efluentes secundarios sin tratar a mostrar cierta convexidad en los efluentes tratados térmicamente, apoya nuestra hipótesis de que las diferentes cinéticas observadas se

deben a la acción de los diferentes factores inactivadores presentes. Nuestra hipótesis actual, basada en las cinéticas mostradas (Figs. 2 y 3), apunta a que la predación por protozoos, la competición por nutrientes y en general las interacciones con el resto de la microbiota presente, sería el factor predominante en los efluentes naturales estudiados, con una cinética cóncava ( $n < 1$ ) que corresponde a una gran sensibilidad de la mayoría de las células a este factor. La cola de supervivientes que aparece se debería, bien a la resistencia de algunas células o a la menor accesibilidad de éstas. La inactivación que se mantiene cuando se elimina la microbiota acompañante tiene que ser debido a otro mecanismo puesto que muestra una cinética diferente. Nuestra hipótesis es que se trata de la mortalidad natural de las células, que se debería a una acumulación de fallos metabólicos y por tanto mostraría una cinética convexa ( $n > 1$ ). Comparando los efectos de la inactivación térmica en los efluentes de Madrid y Cantabria, observamos que en el caso de Cantabria se mantiene algo de inactivación mientras que en el otro efluente ha desaparecido por completo. Esta diferencia podría ser explicada si admitimos que el proceso de muerte implica una cierta actividad metabólica, que las condiciones de un efluente podrían permitir y las del otro no. Es una hipótesis que estamos estudiando pero que está fuertemente apoyada por el hecho de que las bacterias se mantienen viables, algunas durante años en agua destilada estéril. (Liao C.-H y Schollenberger, 2003)

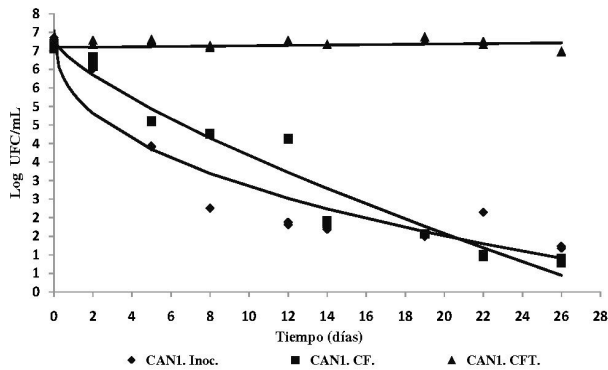


Figura 3. Efluente secundario de Cantabria inoculado (CAN1. Inoc.) y efecto de los tratamientos experimentales del mismo (centrifugación y filtración, CF y centrifugación y filtración más tratamiento térmico, CFT) sobre la cinética de inactivación de *E.coli*. La línea continua representa el ajuste del modelo matemático tipo Weibull.

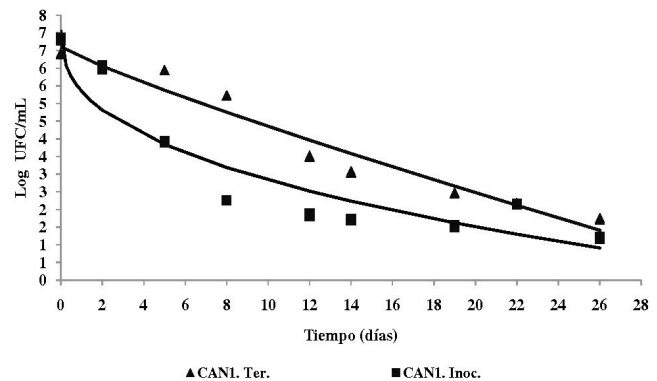


Figura 4. Efecto de un tratamiento terciario (microfiltración) realizado en la EDAR de Cantabria (CAN1) sobre el mismo efluente secundario de la figura 3. El tratamiento experimental equivalente sería la centrifugación y filtración (CF). La línea continua representa el ajuste del modelo matemático tipo Weibull.

### 3.3 Efecto de un tratamiento terciario (microfiltración) sobre la capacidad depuradora de un efluente secundario.

Los resultados anteriores apuntaban a que los tratamientos terciarios harían disminuir la capacidad de autodepuración del agua. Hemos iniciado una serie de experimentos para cuantificar éste efecto. Aquí mostramos (Fig. 4) el efecto de un tratamiento de microfiltración sobre la capacidad autodepuradora de un efluente de la EDAR de Cantabria. Como era de esperar, el tratamiento disminuye esa capacidad y el efecto sobre la cinética de inactivación es semejante al observado con el tratamiento experimental con centrifugación y filtración que habíamos observado en el laboratorio. Nos parece importante resaltar este resultado porque, aunque a primera vista los tratamientos que limpian el agua de bacterias de forma no selectiva nos pueden parecer positivos, tienen el inconveniente de disminuir su capacidad de autodepuración de patógenos. Cuanto más limpia esté el agua, más indefensa estará frente a un posible recontaminación. Es un hecho que habrá que tener en cuenta en el análisis de riesgos, especialmente en algunos usos, como el rellenado de acuíferos en los que la recontaminación por filtración de fecales pueda ocurrir.

#### 4. CONCLUSIONES

1. Metodológicamente, el modelo matemático basado en la distribución de Weibull que proponemos puede ser empleado para describir la cinética de inactivación de las bacterias entéricas en aguas residuales, con la ventaja de que una sola ecuación permite describir las diferentes formas cinéticas observadas en los distintos tipos de aguas.
2. Científicamente, los resultados de la aplicación del modelo, apoyan la hipótesis de que las diferentes cinéticas de inactivación observadas se deben a la acción de diferentes factores.
3. Tecnológicamente, hemos comprobado que una regeneración exhaustiva elimina los factores de autodepuración del agua, tornándolo indefensa antes potenciales recontaminaciones, lo que constituye un riesgo potencia que debe ser tenido en cuenta, por ejemplo en el rellenado de acuíferos cercanos a núcleos urbanos.

Agradecimientos a la Prof. Raquel Ibáñez. Ingeniería Química, Universidad de Cantabria por habernos facilitado los efluentes secundarios y terciarios de la EDAR de Cantabria. Este trabajo, incluido dentro del proyecto TRAGUA (CSD2006-00044), ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología a través del programa CONSOLIDER.

#### REFERENCIAS

- Barcina, I.; González, J.M.; Iriberry, J. and Egea, L. (1991): Role of protozoo in the regulation of enteric bacteria population in sea water. *Marine Microbila Food Webs*, 5: 179-187.
- Crane, S.R., Moore, J.A. (1985): Modelling enteric bacteria die-off : a Review. *Water, Air and Soil Pollution* 27:411-439.
- González, J.M. (1995): Modelling enteric bacteria survival in aquatic systems. *Hydrobiologia*. 316:109-116.
- Hankin, E.H. (1896): L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibrion du cholera. *Annales de l'Institut Pasteur*, 10: 511-
- Liao, C.-H. and Schollenberger, L.M. (2003): Survability and long term preservation of bacteria in water in phosphate-buffered saline. *Letters in Applied Microbiology*, 37: 45-50.