

*anales  
científicos  
U.N.A.*



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

**La Molina**

**LIMA-PERU**

Publicación financiada por el Proyecto PADI.  
Actividad 11: Apoyo a la UNALM

**1981 - 1985**

**Vol. XXI**

## INHIBICION DE ENTEROBACTERIAS EN SUELO REGADO CON AGUAS ESPECIALMENTE TRATADAS

CARLOS NAKARINO<sup>1</sup>

JORGE JHONCON<sup>2</sup>

MARCEL GUTIERREZ CORREA<sup>3</sup>

### RESUMEN

Las aguas servidas pueden ser reutilizadas después de tratamientos especiales, p. ej., en lagunas de sedimentación. Existe la posibilidad que microorganismos patógenos puedan sobrevivir a estos tratamientos. El objetivo de este trabajo fue determinar si las enterobacterias residuales provenientes de las lagunas de sedimentación, pueden ser controladas en el suelo por microhongos nativos cuando estas aguas son utilizadas para el riego de cultivos.

Se realizaron dos experimentos. En el primero la humedad fue el factor limitante y, en el segundo, la humedad fue mantenida a niveles constantes. Los resultados indican la posibilidad de control en el suelo de las enterobacterias residuales. Se discuten los posibles mecanismos de inhibición.

### SUMMARY

Sewage may be reutilized after special treatments (for example, in sedimentation ponds). The possibility exists that pathogenic microorganisms may survive these treatments. The objective of this research was to determine whether the residual enterobacteria, originating from sedimentation ponds, are controlled in soil by resident microfungi when treated water is used for herbaceous crops irrigation.

Two experiments were performed. One under dry conditions and the other one maintaining constant moisture levels. Results indicate a probable control of residual enterobacteria in soil. Possible inhibitive mechanism are discussed.

### INTRODUCCION

La escasez de agua ha creado serios problemas a la población mundial. Uno de los más fructíferos intentos hacia la solución del problema se basa en la reutilización del recurso agua (Gaudy y Gaudy, 1966). El agua destinada al consumo humano puede ser reutilizada después de tratamientos especiales como filtros de goteo, fango activado, digestión anaeróbica o lagunas de sedimentación (Gaudy y Gaudy, 1966; Kabler, 1962).

El metabolismo microbiano es el mecanismo básico en la purificación natural de las aguas contaminadas. La purificación de tales aguas por medio de tratamientos biológicos no es, en este aspecto, esencialmente diferente de la autopurificación natural de ríos o lagunas (Kabler, 1962).

El tratamiento biológico por filtros de goteo, digestión anaeróbica o lagunas de sedimentación reduce marcadamente los microorganismos patógenos de las aguas servidas. Sin embargo, esta reducción pue-

- 
1. Departamento de Construcciones Rurales, U.N.A.
  2. Departamento de Ciencias Matemáticas y Naturales, Universidad Nacional de Educación, La Cantuta.
  3. Laboratorio de Micología, Departamento de Biología, Universidad Nacional Agraria, Apartado 456 - La Molina, Lima —Perú.

de no ser totalmente efectiva (Kabler, 1962). Esto dificultaría el uso de aguas tratadas, tanto para el consumo humano directo como para el riego de cultivos intensivos de plantas de porte bajo. Aun así, existe la posibilidad de que los microorganismos patógenos sobrevivientes a los tratamientos puedan ser controlados en el suelo, por microorganismos nativos (Alexander, 1971, 1964).

El objetivo de este trabajo fue determinar si las enterobacterias residuales, provenientes de las lagunas de sedimentación, pueden ser controladas en el suelo por microorganismos nativos.

## MATERIALES Y METODOS

### -Lugar de muestreo

Las lagunas de sedimentación están localizadas en el distrito de San Juan de Miraflores, Lima (Perú). Las aguas servidas son colectadas en una primera laguna (primaria) donde permanecen por una semana aproximadamente. Durante este tiempo se produce una intensa actividad microbiana tendiente a la mineralización de la materia orgánica. Luego, las aguas pasan a una segunda laguna (secundaria) donde la actividad microbiana y la mineralización son relativamente más lentas.

La zona experimental presenta un área aproximada de 100 m<sup>2</sup> y el suelo presenta una textura arenosa con escasa cobertura vegetal (gráfico 1).

### - Muestras de suelo

Las muestras de suelo fueron tomadas de la capa superficial (0-7 cm) y colocadas dentro de frascos estériles para los análisis microbiológicos. Otras muestras fueron tomadas para determinar el contenido de humedad por el método gravimétrico (105° C x 24h).

Para el suelo bajo tratamiento (regado con agua de la laguna secundaria) y suelo control (sin riego) fueron tomadas cinco muestras.

### - Análisis microbiológicos

#### Coliformes:

Dado que uno de los mejores índices de pureza microbiológica del agua es la determinación de coliformes (Kabler, 1962) hemos preferido, en este trabajo, utilizar su detección como índice de enterobacterias las cuales tienen representantes patógenos o potencialmente patógenos. Se ha empleado la prueba de colimetría con cinco tubos (Mossel y Quevedo, 1965).

#### Bacterias heterotróficas totales:

Para su detección se ha empleado el conteo por el método de diluciones en placas (Holm y Jensen, 1972) con agar nutritivo, NA (Bacto-Nutrient Agar, Difco).

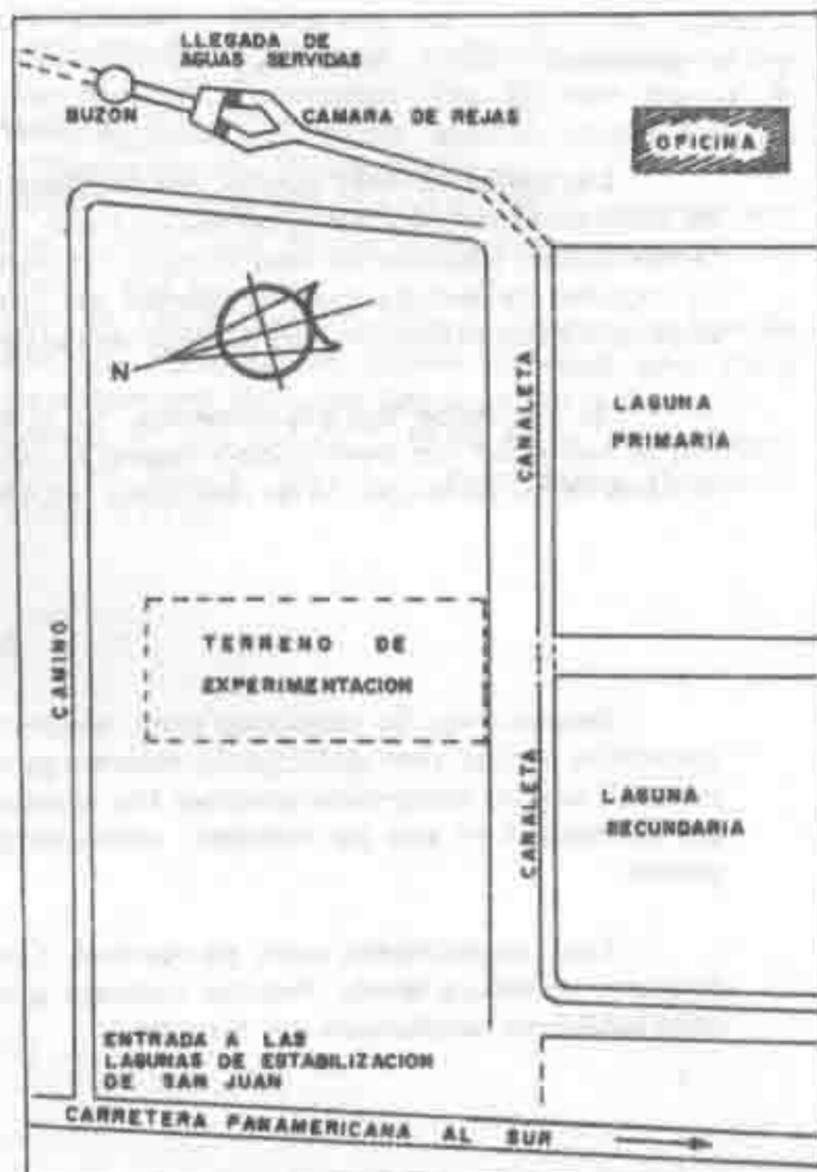


GRAFICO N°1-PLANO DE UBICACION DEL AREA DE EXPERIMENTACION.

#### Microhongos:

Fue empleado el método de diluciones en placa (Holm y Jensen, 1972) con agar papa dextrosa (PDA) suplementado con oxitetraciclina hasta una concentración final de 0.01 gr/lit (Batista y Pérez, 1964).

#### Antibiosis:

Los aislamientos más frecuentes de hongos fueron probados para determinar su capacidad de producir antibióticos *in vitro*. Los aislamientos fueron sembrados por incorporación en placas petri con PDA e incubadas a 30°C durante 3 días. A partir de estas placas se obtuvieron bloques de 0.5 cm de diámetro, los cuales fueron colocados sobre

placas con NA conteniendo bacterias Gram (-): *Salmonella anatum*, *S. typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris*, *P. morgani* y *E. coli*; Gram (+) : *Staphylococcus aureus*; luego de incubación a 37°C durante 24 h, se determinó la presencia de antibiosis por la formación de un halo de inhibición alrededor de los bloques de micelio-agar.

- **Tratamientos**

El suelo bajo tratamiento fue sometido a dos experimentos (gráfico 2). En el primer caso, el suelo fue regado por inundación (Llanos y Kjöller, 1976) durante cinco días consecutivos y un riego accidental después de trece días. Esto permitió hacer de la humedad un factor crítico, con el objeto de observar su efecto sobre los microorganismos nativos del suelo y sobre los coliformes provenientes del agua sedimentable.

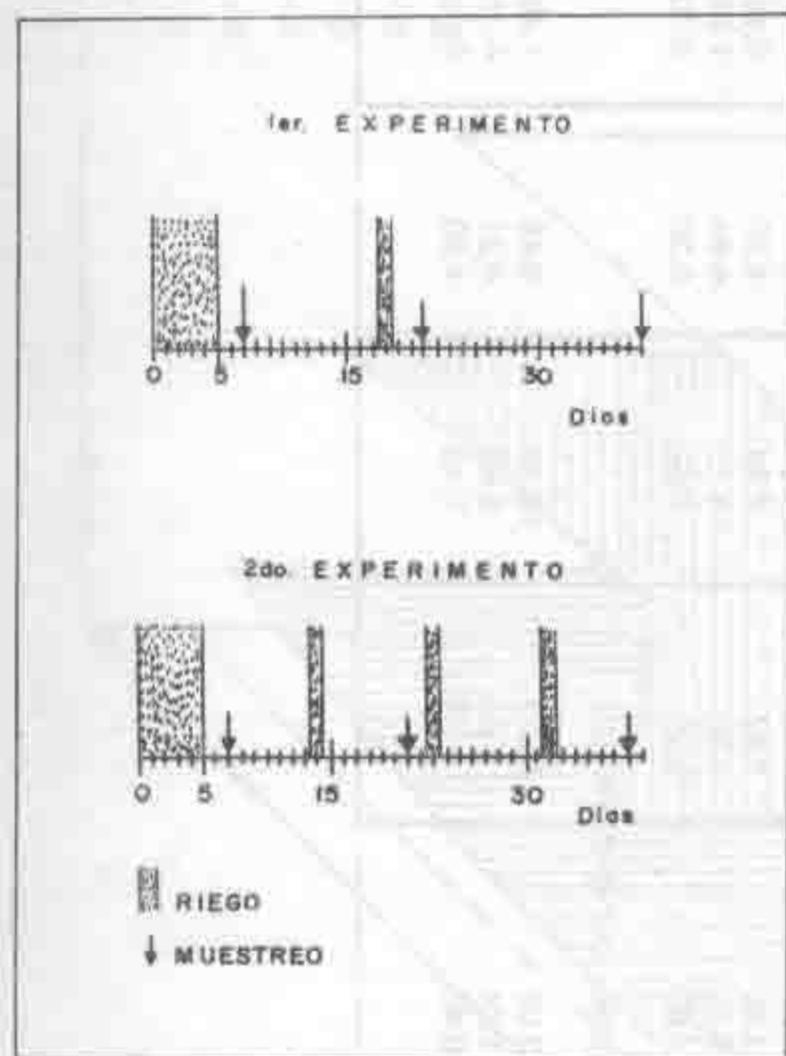


GRAFICO 2.- FRECUENCIA DE RIEGOS Y MUESTREOS.

En el segundo caso, se trató de mantener la humedad en niveles relativamente estables, con el objeto de determinar el efecto de los hongos nativos sobre los coliformes agregados al suelo. Ade-

más, en este experimento fueron realizados análisis físico-químicos del suelo (por el Departamento de Suelos de la Universidad Nacional Agraria).

Con el objeto de determinar el comportamiento de la microflora nativa, en ninguno de los dos experimentos el suelo control fue sometido a riego.

- **Frecuencia de muestreos**

El trabajo fue realizado entre los meses de febrero a abril de 1978, con un intervalo de un mes entre cada experimento.

En el gráfico 2 se muestran las frecuencias de riego y muestreos para los dos experimentos. En ambos casos se han realizado tres muestreos espaciados quincenalmente.

**RESULTADOS Y DISCUSION**

- **Primer Experimento:**

Los resultados obtenidos para este experimento se muestran en el cuadro 1. Se puede observar que las bacterias (Heterotróficas totales y coliformes) presentan un incremento notable respecto a las encontradas en el suelo control. Sin embargo, este incremento está sujeto al contenido de humedad del suelo (gráfico 3). Es interesante observar que, si bien las bacterias totales presentan un aumento en el segundo muestreo (16 días después del riego inicial), la población final  $2.83 \times 10^6$  unidades formadoras de colonia (ufc)/gr de suelo seco (ss) es muy similar a la obtenida en el primer muestreo ( $2.95 \times 10^6$  ufc/gr ss).

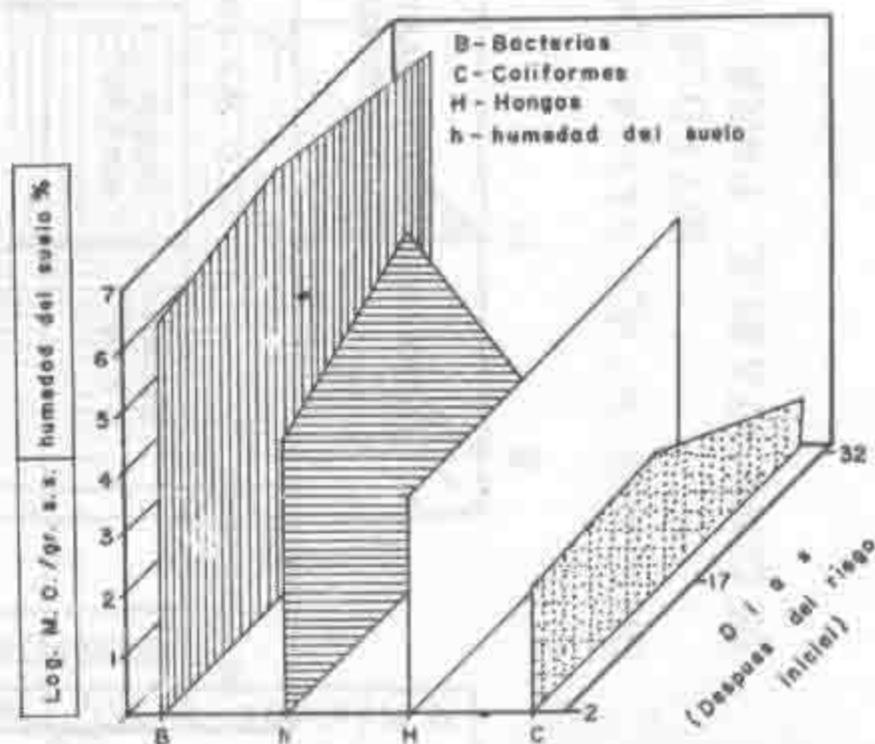


GRAFICO N° 3.- VARIACION DE MICROORGANISMOS Y HUMEDAL EN SUELO REGADO CON AGUAS SEDIMENTABLES PARA EL 1er. EXPERIMENTO

CUADRO 1

VARIACION DE MICROORGANISMOS (POR GRAMO DE SUELO SECO) EN SUELOS REGADOS CON AGUA SEDIMENTABLE (PROMEDIO DE CINCO REPETICIONES).

MUESTREOS	SUELO BAJO TRATAMIENTO					SUELO CONTROL				
	Bacterias X 10 <sup>6</sup>	Hongos ufc X 10 <sup>3</sup>	Coliformes X 10	Humedad del suelo (o/o)	Bacterias X 10 <sup>5</sup>	Hongos ufc X 10 <sup>3</sup>	Coliformes	Humedad del suelo (o/o)		
	1er. EXPERIMENTO									
I	2.95	3.92	9.84	4.53	0.85	1.00	0.00	0.05		
II	9.09	4.25	18.73	5.94	1.85	1.10	0.00	0.06		
III	2.83	5.61	0.52	0.30	3.30	2.56	0.00	0.05		
	2do. EXPERIMENTO									
I	2.09	10.31	19.25	6.46	1.45	1.40	0.00	0.05		
II	1.74	1.54	8.93	4.21	4.70	1.00	0.00	0.04		
III	0.49	4.28	1.43	4.60	0.90	0.50	0.00	0.02		

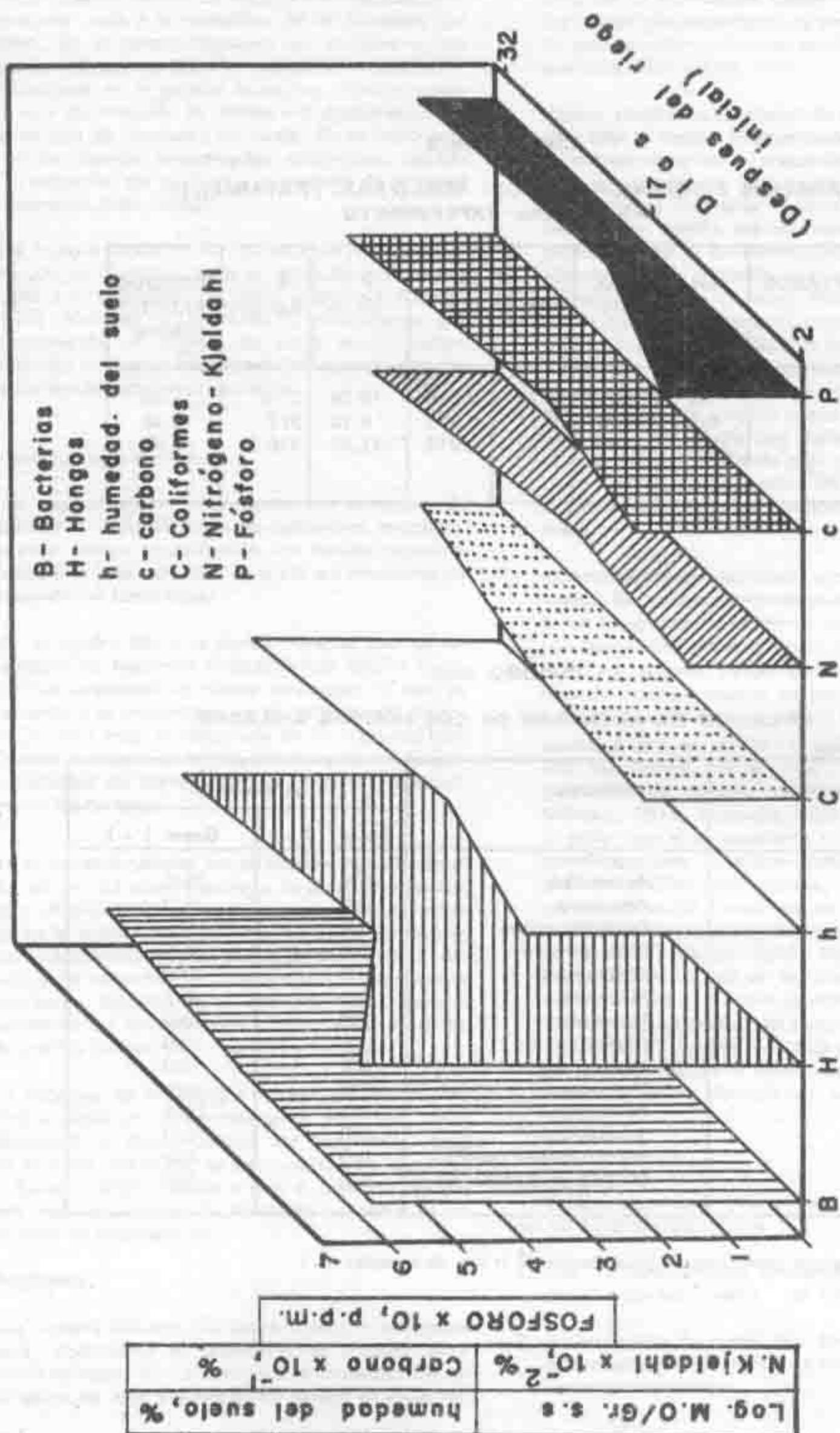


GRAFICO N° 4.- VARIACION DE MICROORGANISMOS, HUMEDAD, CARBONO, NITROGENO Y FÓSFORO EN SUELO REGADO CON AGUA SEDIMENTABLE PARA EL 2° EXPERIMENTO.

CUADRO No. 2

ANALISIS FISICO-QUIMICOS DEL SUELO BAJO TRATAMIENTO  
PARA EL 2do. EXPERIMENTO

MUESTREOS	pH	M.O. o/o	C o/o	N o/o	P p.p.m.	K Kg/Ha	CONDUC ELECT. mmhos/ cm.
I	7.8	0.41	0.24	0.016	19.75	3.74	1.08
II	8.4	0.30	0.17	0.013	8.10	317	0.78
III	8.4	0.38	0.22	0.018	11.33	316	0.85

CUADRO No.3

## RELACION DE ANTIBIOSIS DE LOS HONGOS AISLADOS

Aislamientos	Géneros	Antibiosis <sup>+</sup>	
		Gram (+)	Gram (-)
48	<i>Aspergillus</i>	20/4	29/5
4	<i>Alternaria</i>	0/0	0/0
13	<i>Cephalosporium</i>	0/0	0/0
8	<i>Cladosporium</i>	0/0	0/0
3	<i>Chaetomium</i>	0/0	0/0
19	<i>Fusarium</i>	0/0	0/0
7	<i>Humicola</i>	0/0	0/0
2	<i>Hyalodendron</i>	0/0	0/0
17	<i>Mucor</i>	0/0	0/0
4	<i>Nigrospora</i>	0/0	0/0
40	<i>Penicillium</i>	19/2	19/2
3	<i>Sepedonium</i>	0/0	0/0
4	SPHAEROPSIDALES	0/0	0/0
5	MYCELIA STERILIA	0/0	0/0

<sup>+</sup> Expresada como No. de aislamientos (+) / No. de especies (+)

La variación de coliformes en este experimento sigue el mismo patrón de las bacterias totales, pero se ajusta más a la variación de la humedad del suelo. En el tercer muestreo los coliformes han disminuido en un 95 o/o respecto a la población encontrada en el primer muestreo. Aparentemente, esta disminución es debida a la disminución del contenido de humedad del suelo. En el suelo control no fueron encontrados coliformes, debido a la sequedad del suelo o a la ausencia de animales mayores (Kabler, 1962).

Los hongos tuvieron un incremento menos notable que las bacterias, pero su variación está menos ligada a la humedad del suelo (Lighthart y Bond, 1976). McIlveen y Cole (1977), encontraron que la población de hongos de suelo en un campo cultivado con maíz no incrementó cuando este fue suplementado con aguas servidas.

#### Segundo Experimento:

Este experimento fue plateado con el objeto de verificar si la disminución de coliformes, encontrada en el primer experimento, fue debida exclusivamente a la baja humedad de suelo o a relaciones de amensalismo (antibiosis).

En el cuadro No. 1 se puede observar que las variaciones de bacterias heterotróficas totales y coliformes presentan la misma tendencia, la cual es diferente a la encontrada en el primer experimento. De otro lado, la tendencia de estos grupos bacterianos no sigue el mismo patrón presentado por la humedad del suelo (gráfico 4), el cual sí es seguido por los hongos.

En el tercer muestreo los coliformes han disminuido en un 93 o/o respecto a la población inicial. Esta disminución es muy parecida a la encontrada en el primer experimento (95 o/o). Sin embargo, esta disminución no puede ser explicada en términos de humedad del suelo ni disponibilidad de nutrientes (cuadro 2), puesto que, estos factores presentan un comportamiento inverso al presentado por los coliformes (y bacterias totales).

La variación de los hongos a través de este experimento sigue un comportamiento similar al de la humedad y disponibilidad de nutrientes. Esto no está, en absoluto, en desacuerdo con Lighthart y Bond (1976), debido a que si bien los hongos son más xerofíticos, la humedad aumenta su capacidad de proliferación.

#### Antibiosis

Los hongos aislados del suelo fueron investigados para determinar su capacidad de producir antibiosis *in vitro*. En el cuadro 3 se muestran los resultados de este experimento, donde se observan

que solamente algunas especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* fueron capaces de producir sustancias antibacterianas de amplio espectro, esto ha sido también observado en aislamientos de otros suelos (Eicker, 1975).

¿Estos resultados de antibiosis *in vitro* pueden ser aplicados al suelo? El significado de los fenómenos de competencia en los mecanismos de autorregulación que gobiernan la composición de una comunidad clímax han sido sujetos a reexaminación (Alexander, 1964). Ha sido demostrado que antibióticos como la estreptomycin y tetraciclina son adsorbidas por la arcilla y no son biológicamente activos (Martin y Gottlieb, 1952; Siminoff y Gottlieb, 1951) y, en general, que los antibióticos no son producidos naturalmente en el suelo (Gottlieb, 1976). Sin embargo, existe también evidencia que indica que la capacidad de producir antibióticos es de significado ecológico y que esta habilidad está asociada con los hongos dominantes en el suelo (Eicker, 1975). Visto de esta manera resulta difícil interpolar los resultados de antibiosis obtenidos *in vitro* a las condiciones naturales dadas en el suelo.

¿Cómo puede ser explicada la microbiostasis en el suelo? Se conoce que propágulos microbianos, tanto de hongos como bacterias, no prosperan cuando son inoculados al suelo (Hora, *et al.*, 1977; Davis, 1975 a,b; Brown, 1973). De otro lado esporas viables de muchos hongos no germinan en un suelo natural excepto en la vecindad de nutrientes apropiados (Hora, *et al.*, 1977) pudiéndose establecer una correlación positiva entre la fungistasis y la población de hongos en el suelo (Kanaujia y Mishra, 1977; Kanaujia, 1976) y, por lo menos *in vitro*, que el antagonismo entre *Fusarium* y *Helminthosporium* es influenciado fuertemente por el sustrato (Gutiérrez-Correa, 1975). La bacteriostasis en el suelo parece ser de origen biológico y está ligada con la nutrición bacteriana (Ko y Chow, 1978, 1977; Brown, 1973). Hasta el momento la microbiostasis puede ser explicada basándose entre las interacciones entre los inhibidores de origen biológico y nutrientes del suelo (Hora, *et al.*, 1977; Davis, 1976). La inhibición de coliformes obtenida en nuestro trabajo es mejor explicada teniendo en cuenta la última hipótesis con la inclusión de la humedad.

#### CONCLUSIONES

Podemos concluir, por lo menos para las condiciones de nuestro trabajo, que:

1. Las enterobacterias residuales provenientes de aguas tratadas pueden ser inhibidas en el suelo.
2. El complejo formado por hongos, nutrientes y humedad del suelo tienen un efecto inhibitor sobre las enterobacterias.

## BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER, M. 1964. Biochemical ecology of soil microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* 18:217-252.
- . 1971. Biochemical ecology of microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* 25: 361-392.
- BATISTA, A. CH. and M.J. PEREZ MACIEL. 1964. Fungi of Aspergillales from soils of the Federal Territory of Rondonia Univ. Recife Inst. Micol. Publicacao 409: 1-13.
- BROWN, M.E. 1973. Soil bacteriostasis: Limitation in growth of soil and rhizosphere bacteria. *Can. J. Microbiol.* 19:195-199.
- DAVIS, R.D. 1975 a. Bacteriostasis in soils sterilized by gamma irradiation and in reinoculated sterilized soils. *Can. J. Microbiol.* 21: 481-484.
- . 1975b. Soil bacteriostasis: inhibition of spore germination and microcolony development in agar discs incubated on nonsterile soils. *Can. J. Microbiol.* 21: 1270-1272.
- . 1976. Soil bacteriostasis: Relation to bacterial nutrition and active soil inhibition. *Soil Biol. Biochem.* 8: 429-423.
- EICKER, Albert. 1975. A survey of the antimycotic and antibacterial activity of soil microfungi from Transvaal. *J. S. Afric. Bot.* 41: 187-198.
- GAUDY, A.F., Jr. and E.T. GAUDY. 1966. Microbiology of waste waters. *Ann. Rev. Microbiol.* 20: 319-336.
- GOTTLIEB, David. 1976. The production and role of antibiotic in soil. *J. Antibiot. (Tokyo)* 29: 987-1000.
- EICKER, ALBERT. 1975. A survey of the antimycotic and antibacterial activity of soil microfungi from Transvaal. *J. S. Afric. Bot.* 41: 187-198.
- GAUDY, A.F., Jr. and E.T. GAUDY. 1966. Microbiology of waste waters. *Ann. Rev. Microbiol.* 20: 319-336.
- GOTTLIEB, DAVID 1976. The production and role of antibiotic in soil. *J. Antibiot. (Tokyo)* 29: 987-1000.
- GUTIERREZ-CORREA, MARCEL 1975. Estudio del antagonismo entre *Fusarium sp.* y *Helminthosporium sativum* in vitro : Influencia del sustrato y temperatura. *Anales Científicos UNA* 13: 23-29.
- HOLM, E. and V. JENSEN, 1972. Aerobic chemo-organotrophic bacteria of a Danish beech forest. *Oikos* 23 : 248-260.
- HORA, T.S., R. BAKER and G.J. GRIFFIN. 1977. Experimental evaluation of hypotheses explaining the nature of soil fungistasis. *Phytopathology* 67 : 373-379.
- KABLER, P.W. 1962. Purification and sanitary control of water (potable and waste). *Ann. Rev. Microbiol.* 16: 127-140.
- KANAUJIA, R.S. 1976. Observations on soil fungistasis, VI. Fungistasis of amended soils. *Bangladesh J. Bot.* 5: 1-7.
- . and R.R. MISHRA. 1977. Observations on soil fungistasis. I. Survey of fungistasis in U.P. soils. *Acta Bot. Indica* 5: 169-173.
- KO, W.H. and F. K. CHOW. 1977. Characteristics of bacteriostasis in natural soils. *J. Gen. Microbiol.* 102 : 295-298.
- . 1978. Soil fungistasis: Role of volatile inhibitors in two soils. *J. Gen. Microbiol.* 104: 75-78.
- LIGHTHART, B. and H. BOND. 1976. Design and preliminary results from soil/litter microcosms. *Intern. J. Environ. Studies* 10: 51-58.
- LLANOS, C. and A. KJOLLER. 1976. Changes in the flora of soil fungi following oil waste application. *Oikos* 27 : 377-382.
- MARTIN, NORMA and DAVID GOTTLIEB. 1952. The production and role of antibiotics in the soil. III. Terramycin and Aureomycin. *Phytopathology* 42 : 294-296.
- McILVEEN, W. D. and H. COLE Jr. 1977. Influence of sewage sludge soil amendment on various biological components of the corn field ecosystem. *Agric. Environ.* 3: 349-361.
- MOSSEL, D.A. y F. QUEVEDO. Modos operatorios recomendados para el control higiénico de los alimentos. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 1965.
- SIMINOFF, P. and DAVID GOTTLIEB. 1951. The production and role of antibiotics in the soil. I. The fate of streptomycin. *Phytopathology* 41: 420-430.