



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

MASTER EN INGENIERIA AMBIENTAL

MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Inactivación de virus en fangos activos: decaimiento de bacteriófagos con y sin envoltura vírica

Autor: D^a. Cristina Martínez Fraile
Tutor 1: D. Pedro Antonio García Encina
Tutor 2: D. Andrés Felipe Torres Franco

Valladolid, Julio, 2022



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

MASTER EN INGENIERIA AMBIENTAL



RESUMEN

Los ensayos sobre indicadores virales en el agua residual resultan en un aporte interesante para conocer su evolución en este medio y determinar las posibilidades de depuración de la contaminación viral en estaciones depuradoras.

En esta investigación se llevó a cabo un ensayo comparativo para estudiar la degradación de dos indicadores virales en agua residual y en una tecnología de tratamiento con fangos. Además, se contrastó el decaimiento del título viral atendiendo a sus diferencias estructurales. Se evaluó por un lado la evolución del Phi6, virus con envoltura lipídica y por otro la evolución del MS2, virus sin envoltura.

Los resultados mostraron que el sistema de tratamiento biológico es más eficiente para la eliminación de ambos virus. Por otro lado, el virus MS2 resultó más resistente a la degradación, mientras el Phi6 decaería 2.24 y 3.5 veces más rápido en agua residual y en el tratamiento con fangos activos respectivamente.

Palabras clave: depuración, bacteriófagos, fangos activos, agua residual, envoltura vírica.

ABSTRACT

Research on viral indicators in wastewater constitutes an interesting contribution to the understanding of phages elimination in wastewater treatment plants.

In this research, a comparative test involving two system configurations was carried out to study the evolution of two viral indicators in wastewater and over an active sludge matrix. In addition, the decay of the viral titer was contrasted in regards to their structural differences. The evolution of Phi6, an enveloped virus, and of MS2, a non-enveloped virus, were recorded.

The results showed that the biological treatment posed a more efficient method for the elimination of both viruses. On the other hand, MS2 was found to be more resistant in both media, while Phi6 decayed 2.24 and 3.5 times faster in wastewater and activated sludge treatment respectively.

Keywords: water treatment, bacteriophages, active sludge, wastewater, viral envelope.



Contenidos

1. INTRODUCCIÓN	1
1.3. Los virus subrogados y su importancia.....	3
1.5. Métodos de cultivos en microbiología	6
1.6. La eliminación de virus en el agua residual	8
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1. Virus y hospedadores de este estudio	13
2.2. Medios de cultivo	13
2.3. Activación del inóculo.....	15
2.3.1. Procedimiento de activación de <i>Pseudomonas sp.</i> y <i>Eshcerichia coli</i>	15
2.3.2. Activación y amplificación del Phi6 y el MS2.....	16
2.4. Titulación de fagos por el método de las diluciones seriadas	17
2.5. Ensayo de resistencia de indicadores virales en reactores batch de fangos activos.....	20
2.5.1. Montaje experimental, inóculo y aclimatación	20
2.5.2. Muestreo y tratamiento de muestras para la titulación de fagos	22
2.5.3. Procedimientos analíticos.....	23
2.6. Tratamiento de datos.....	24
2.6.1. Unidades formadoras de colonias y recuperación de fagos	24
2.6.2. Análisis de las constantes cinéticas	25
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
3.1.1. Control del medio y las condiciones de operación en los biorreactores	27
3.1.2. Evolución del Phi6: supervivencia de virus con envoltura lipídica	30
3.1.3. Evolución del MS2: supervivencia de virus sin envoltura.....	33
4. CONCLUSIONES.....	37
5. BIBLIOGRAFÍA	39



1. INTRODUCCIÓN



1.1. Situación actual de la contaminación acuática

La creciente actividad antropogénica en pleno siglo 21 ha agravado la explotación de los recursos y acelerado la contaminación de los sistemas naturales, entre ellos los cuerpos de agua, siendo la emisión de aguas residuales la principal causa de contaminación [1].

El crecimiento poblacional y la intensificación de las actividades industriales han incrementado los volúmenes de aguas residuales vertidos a los cuerpos receptores, desencadenando consecuencias severas en los ecosistemas naturales y, en consecuencia, sobre la salud humana. Los impactos más destacados incluyen la pérdida de los ecosistemas marinos, erosión, eutrofización, infiltración a las aguas subterráneas, contaminación de especies acuáticas y, en consecuencia, un incremento en las patologías relacionadas con el ciclo del agua y padecidas por personas y animales [1]–[3]. A raíz de esta problemática, el tratamiento de los residuos domésticos y las aguas residuales urbanas han sido un foco del desarrollo tecnológico en la época actual. Aun así, en el 2020 el porcentaje de agua residual tratada a nivel mundial correspondía solo a un 52% de una producción total, que asciende hasta los $359.4 \times 10^9 \text{ m}^3 \text{ año}^{-1}$ [4].

Reducir las emisiones de contaminantes orgánicos y productos químicos en el agua residual, mejorando el alcance y disponibilidad de las tecnologías de tratamiento de aguas residuales, es uno de los desafíos de la política ambiental a día de hoy. Otro aspecto clave en el que se debe progresar consiste en mejorar la comprensión de los contaminantes emergentes y los agentes patógenos en el agua residual, incluyendo, entre otros, microcontaminantes químicos, genes de resistencia microbiana (GRAs) y virus [5].

Para abordar estos desafíos, se han definido, dentro del conjunto de los 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible (SDG por sus siglas en inglés), los siguientes objetivos: número seis, agua limpia y saneamiento; número 13, acción por el clima; y número 14, vida submarina. Estas metas, aprobadas por la ONU en el 2015, establecen las pautas para lograr una sociedad sostenible en el 2030 [6].

1.2. Virus en aguas residuales

Los virus prevalecen en el medio ambiente y muchos de ellos se detectan en medios como el agua residual en cantidades significativas. De esta forma, en muestras de aguas residuales recolectadas de diversos países se han encontrado adenovirus, enterovirus, astrovirus, norovirus, rotavirus, entre otros. Los virus que detectados en el agua residual suelen ser virus humanos relacionados con enfermedades gastrointestinales y, por norma general, solo sobreviven por largos periodos si sus hospedadores están presentes en el agua contaminada. Por el contrario, la ausencia de hospedadores conlleva que los virus no puedan sobrevivir forma infecciosa mucho tiempo. Para los virus entéricos se han encontrado más de 140 serotipos en muestras de agua residual y se sabe que estos sí pueden persistir por periodos prolongados de semanas e incluso meses [7].



Por otro lado, también es importante distinguir entre virus con envoltura y sin envoltura. La envoltura vírica consiste en una membrana lipídica que proviene en gran parte de la membrana celular del organismo infectado y está conformada por fosfolípidos y proteínas, sobre estos elementos se unen también glicoproteínas virales cuya función es identificar los puntos receptores en el hospedador [8]. La envoltura vírica plantea una estructura de bicapa lipídica flexible y sensible a la desecación, esta membrana manifiesta la necesidad de reflexionar sobre cómo puede verse afectada la supervivencia de los virus por el hecho de estar encapsulados [9].

De forma paralela a la problemática ambiental surge, en enero de 2020, la pandemia del COVID-19 causada por el virus SARS-CoV-2 que también ha sido detectado en aguas residuales de todo el mundo. Este virus se incluye dentro de la amplia familia de los *Coronaviridae*, que abarca viriones con envolturas esféricas o cilíndricas (subfamilias coronavirus y torovirus respectivamente) de tamaños comprendidos entre los 118 y los 140 nm y con una cadena simple de ARN [10], [11]. A este grupo de patógenos se les asocia generalmente con enfermedades leves del sistema respiratorio, pudiendo llegar ciertos virus a suponer un peligro grave para la salud a través de los síndromes SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) y MERS (Middle East Respiratory Syndrome) [11].

Aunque el SARS-CoV-2 se encuentra mayormente inactivo en el agua residual [12], otras enfermedades virales podrían estar asociadas a la contaminación del agua. Por ejemplo, la gastroenteritis y algunos tipos de hepatitis, generalmente asociada al consumo de agua o alimentos contaminados, son algunas de las enfermedades de mayor importancia clínica en relación a las aguas residuales. Otras afecciones que presentan relación con las aguas con contaminación fecal serían la meningitis, la miocarditis, ciertos tipos de parálisis y enfermedades respiratorias, incluso algunas clases de cáncer podrían también guardar relación con la contaminación del agua [13].

1.3. Los virus subrogados y su importancia

El desarrollo de un tratamiento contra el potencialmente mortífero COVID-19 ha concentrado los esfuerzos de la comunidad científica a nivel mundial en el estudio del SARS-CoV-2, sin embargo, los requisitos de seguridad para su estudio demandan laboratorios certificados con un nivel de bioseguridad 3 o superior (BSL-3 o P3). Esto también se extiende a otros patógenos altamente infecciosos que se transmiten por el agua y no es recomendable estudiar en laboratorios con nivel de bioseguridad 1, aquí cabe mencionar los virus causantes de enfermedades como la poliomielitis, la hepatitis, el ébola etc. Estas precauciones, aunque imprescindibles, retrasan el estudio de su eliminación en estaciones depuradoras de aguas residuales [14].

En respuesta a esta dificultad que acompaña al estudio de ciertos patógenos peligrosos, los virus subrogados posibilitan la investigación de estos patógenos en laboratorios bajo condiciones ordinarias de seguridad. Por definición, el término subrogado hace referencia a un organismo, partícula o sustancia empleada en el estudio del comportamiento de un patógeno en un entorno específico, es un sustituto para el organismo de interés cuando su manipulación se ve limitada [15].

La elección de un subrogado adecuado es clave como etapa previa al estudio de un patógeno que sostenga riesgos graves para la salud, se deberá escoger un sistema suficientemente representativo del organismo de estudio para reducir la incertidumbre; ya que, trabajar sobre un subrogado deficiente podría llevar, por ejemplo, a subestimar la resistencia del patógeno a un determinado agente externo. Generalmente, se tienen en cuenta criterios biológicos, morfológicos y de interacción con el entorno (p.ej. mecanismo de transmisión y medio en el que se propaga el fago) para la elección del subrogado de estudio [15].

En el caso del SARS-CoV-2 la literatura muestra varios subrogados potenciales, de los cuales la mayoría son virus con envoltura: el coronavirus del ratón, MHV; el virus del moteado suave del pimiento, PMMoV; el coronavirus humano, HCoV-NL63; y el bacteriófago Phi6. Otro virus de uso extendido en los estudios sobre el SARS-CoV-2 sería el MS2 de la *Escherichia coli*, aunque este no comparte la envoltura en torno al cápside que presentan el resto de los virus mencionados, aun así, el MS2, se muestra como un subrogado adecuado para muchos virus y en especial virus entéricos que afectan al tracto gastrointestinal de los animales y son muy persistentes. El MS2 ha sido evaluado por varios autores en estudios sobre el SARS-CoV-2, por ejemplo para probar la eficacia de agentes desinfectantes [16], [17].

En adición al análisis del comportamiento de todos estos patógenos y sus subrogados, también es interesante la comparación entre viriones con envoltura y sin envoltura. Los textos científicos establecen que los virus sin envoltura son, por norma general, notablemente más resistentes en el agua residual, sin embargo, esta comparación está sujeta a la naturaleza de los virus específicos que son objeto de estudio en cada proyecto [18]. Finalmente, de entre todos estos virus, el presente estudio se enfoca en la observación del Phi6 y el MS2 los cuales requieren un nivel de contingencia BSL-1 [16], [19], [20].

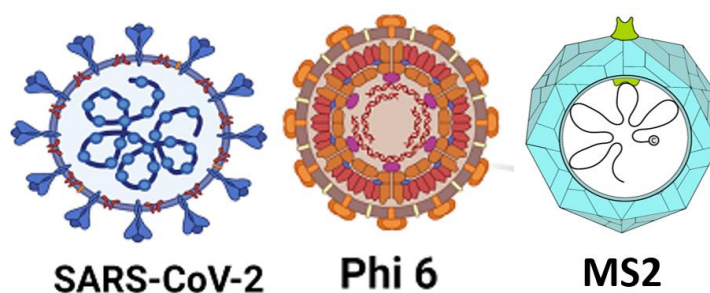


Figura 1 Vista esquemática de tres viriones, de izquierda a derecha, SARS-CoV-2, Phi 6 y MS2 [21], [22].

Un subrogado de virus con envoltura es el bacteriófago Phi6 de la familia *Cystoviridae* se presenta en forma de ARN bicatenario envuelto en una cápside nucleoprotéica de forma esférica que comprende un diámetro de 60 nm, como se ha mencionado también presenta envoltura lipídica. Este virus es inocuo para los humanos y, sin embargo, guarda muchos parecidos con los virus encapsulados que infectan a multitud de mamíferos. Además, el



estudio y cultivo del Phi6 sobre su hospedador, *Pseudomonas syringae*, es rápido y económico [23].

Por otro lado, el bacteriófago MS2, dentro de los virus *Leviviridae*, es un subrogado de virus sin envoltura que tampoco presenta riesgo alguno para las personas ya que infecta bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (como huésped es común cultivar *Escherichia coli*) y se caracteriza por la forma icosaédrica de su cápside [24].

La siguiente tabla compara algunas de las características más representativas de los viriones de estudios y también en relación al SARS-CoV-2.

Tabla 1 Características de los subrogados empleados en comparación con el SARS-CoV-2 [16].

Virus	Familia	Huésped	Membrana/ envoltura lipídica	Cápside	Genoma segmentado	Material genético	Tamaño del genoma
SARS-CoV-2	Coronaviridae	Humano	Si	Icosaédrico	No	(+)ssARN	29.9 kb
Phi6	Cystoviridae	<i>Pseudomonas</i> spp.	Si	Icosaédrico	No	(+)ssARN	13.3 kb
MS2	Leviviridae	Enterobacteriaceae	No	Icosaédrico	No	(+)ssARN	3.5 kb

Por otro lado, el genoma de los virus caracterizados en la tabla 1 consiste en ARN, en los tres casos un ARN de una única hebra (ss, single stranded) que adopta la forma de una hélice enrollada en sentido positivo. Esta coincidencia indica que la estrategia de replicación sería común a los tres virus, sin embargo, hay que matizar que el genoma de otros virus puede ser muy diferente, existen por ejemplo virus que consisten en ADN o virus cuyo material genético se encuentra segmentado. [25]. En muestras de aguas residual y de fangos de depuradora es posible encontrar todo tipo de variedades en cuanto a agentes virales, virus de ADN y ARN, con envoltura viral y sin ella, y otras agrupaciones [26].

1.4. Técnicas de determinación de virus en aguas residuales

Existen diversas publicaciones que tratan el tema de la detección de virus en matrices acuosas. La elección de un método específico para la detección de virus estará sujeta a la naturaleza del propio virus, así como las características del estudio y la instalaciones del laboratorio.

Una de las principales técnicas de determinación y cuantificación de virus es la técnica qPCR que supone un método cuantitativo el cual va más allá de la reacción en cadena de la polimerasa, empleada en amplificación de muestras. Siguiendo este método, se toman los productos de la reacción PCR y se vinculan a colorantes fluorescentes o sondas fluorogénicas y a partir de los cebadores vinculados se lleva a cabo una determinación de las emisiones fluorescentes. La técnica qPCR se basa entonces en la correlación que se puede establecer entre la intensidad de la señal y la amplificación del producto de la PCR después de cada ciclo. Este método de alta sensibilidad posibilita la cuantificación de las



secuencias objetivo, pero en estudios de viabilidad viral no es suficiente solo determinar la presencia del material genético, se precisa distinguir entre aquellos virus activos e inactivos [9].

Otros ejemplos de técnicas extendidas en el campo de la determinación de virus podrían ser la citometría de flujo (FCM por sus siglas en inglés) o la técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay que se traduce en ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). La metodología FCM pasa por diluir una muestra viral en un buffer con colorantes fluorescentes y luego crear un flujo de la solución que obliga a las partículas virales a pasar en fila, de una en una, por un haz de luz monocromático originado por un láser de argón. Después, se analiza la dispersión de la luz resultante y esto permite cuantificar con exactitud las partículas virales de una muestra. Por otro lado, la técnica conocida como ELISA hace que el ADN o ARN viral se vincule a un anticuerpo específico, la actividad enzimática resultante de esto ocasiona un cambio de coloración en la matriz que se puede analizar para cuantificar el virus [9].

Para evaluar el título o concentración de virus viables, capaces de infectar un organismo, en una muestra es imprescindible la proliferación del fago sobre una bacteria específica. La naturaleza de los bacteriófagos condiciona su función reproductiva haciendo indispensable la presencia de una célula hospedadora, por lo tanto, la producción de estos virus involucrará una etapa inicial de crecimiento del hospedador y una etapa de infección. El proceso se simplifica al considerar que las condiciones de entorno que favorecen la propagación del fago coinciden con las requeridas por las bacterias en su crecimiento, a mayores, durante la fase de infección, se puede realizar en paralelo el crecimiento de los microorganismos y de los virus [27].

Una vez crecidas las células hospedadoras, la bacteria junto con el virus se cultivan por métodos semejantes a los que se han discutido anteriormente. Se recomienda un cultivo sobre gel de agarosa para obtener altos títulos del fago, esta técnica permite además distinguir fácilmente la lisis del hospedador, proceso por el que la pared celular de peptidoglucano de la bacteria es atacada y se liberan nuevos viriones, resultantes de la replicación del virus, al exterior. El cultivo en matraces o botellas también puede emplearse para el crecimiento de bacteriófagos, en este caso la bacteria esta diluida y la producción de bacteriófago en relación al volumen de caldo de cultivo empleado será menor. La ventaja que presenta trabajar en botellas es que permiten establecer condiciones uniformes y agregar nuevos nutrientes para mantener el crecimiento del cultivo [28].

1.5. Métodos de cultivos en microbiología

El estudio de viabilidad de distintos subrogados para analizar la supervivencia viran en un entorno como las agua residuales requiere de técnicas de cultivo para la proliferación tanto de virus como de las bacterias hospedadoras.

El cultivo de bacterias reúne métodos para lograr la propagación de las células bacterianas en un medio que soporte sus necesidades metabólicas y bajo unas condiciones controladas. Los constituyentes necesarios para el medio incluyen iones (generalmente



K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻), buffers, amino ácidos, vitaminas y carbohidratos, estos últimos a modo de fuente de energía [29], [30]. Este medio se puede clasificar conforme a distintos criterios, por ejemplo, atendiendo a su composición un medio puede ser definido o complejo, un medio es definido cuando se conocen todos los constituyentes y sus respectivas concentraciones; por el contrario, un medio complejo será aquel que se sintetice a partir de un serum natural con una alta variedad de sustancias y elementos traza para los que se desconoce su concentración [29].

También se puede hacer una distinción entre cultivos en fase líquida y fase sólida o semisólida:

Un medio líquido, o caldo de cultivo, facilita a los organismos en suspensión el acceso a los nutrientes, una agitación controlada puede potenciar esta transferencia de alimento. Un medio líquido también ayuda a distribuir los residuos y restos celulares adecuadamente y, generalmente, permitirá obtener mayor masa de microorganismos [31]. Cuando se necesita conservar un organismo a largo plazo, los medios líquidos permiten la adición de glicerol, lo que a su vez permite congelar el cultivo a temperaturas tan bajas como -80 °C, el glicerol es un alcohol capaz de proteger a las células de la lisis por el estrés de temperaturas adversas [30].

Por otro lado, los cultivo sólidos, útiles para estudiar y seleccionar colonias están muy extendidos. Para trabajar en un medio sólido se debe transformar el medio empleando un agente solidificante como el agar o la gelatina, de estos el más extendido es el agar, dado que es un polisacárido inerte con un empleo muy sencillo [30]. Finalmente, los medios semisólidos consisten simplemente en medios elaborados a partir de concentraciones muy bajas de agar, logrando así que el medio no termine de solidificarse a temperaturas ambiente y los microorganismos tengan mejor movilidad dentro del cultivo, son útiles precisamente para estudios de movilidad microbiana [32].

El objetivo de los cultivos bacteriológicos puede ser el de amplificar un cultivo diverso en el que conviven distintas colonias de microorganismos (enfoque poblacional) o el de obtener un cultivo aislado solo con el espécimen de interés (enfoque tradicional).

El cultivo puro, también llamado cultivo axénico, de bacterias está muy extendido como parte esencial de los estudios en materia de virulencia, secuenciación del genoma, resistencia a antibióticos, etc. [33]. Un cultivo puro puede originarse partiendo de un único organismo, en cuyo caso todas las células desarrolladas son clones genéticos [34].

En lo que respecta a los cultivos mixtos o de enriquecimiento, estos consideran un consorcio microbiano y permiten extrapolar los resultados de su estudio al entorno natural donde conviven todo tipo de microorganismos. En el crecimiento de cultivos mixtos cada especie adquiere un papel en el ciclo de los nutrientes, esto hace posible que en determinadas configuraciones se puede mantener un sistema microbiano autónomo, es el caso de la Columna de Winogradsky, constituida por una columna donde se adiciona carbono orgánico y una fuente de azufre, mantenida solo por la entrada de luz y oxígeno [35], [36].

La determinación del título viral de una muestra con bacteriófagos se realiza a través de su inoculación en una placa de agar doble en conjunto con su hospedero. En este estudio el cultivo de fagos será imprescindible para completar la titulación de muestras virales y



para amplificar las existencias de fagos. El método en el que se fomentan estos procedimientos será una adaptación del el del doble agar (Protocolo 9224 B, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater [37]) que será recurrente en este estudio tanto para la amplificación como para la titulación de los fagos.

El método del doble agar es una técnica para cultivos sólidos en placas de agar que cuenta con la peculiaridad de emplear dos capas de agar, la primera se compone de medio con agar a una concentración de hasta el 3% (capa de agar duro); y la segunda, a modo de capa superior, consistiría en medio con una concentración de agar del 0.6% (capa de agar blando). El agar blando permite la difusión de las bacterias hasta ocupar todo el “césped” de la parte superior y favorece que los virus se vinculen a su hospedador. El montaje de la capa superior como fase final representa la etapa más compleja, ya que los microorganismos son agregados como parte de esta capa. La técnica del doble agar se ha ajustado a las condiciones de trabajo y las necesidades de los ensayos realizados, en la presentación de los materiales y métodos abarcados por este trabajo se profundizará más sobre la metodología empleada para el montaje de placas con doble capa de agar.

Aprovechando la técnica del doble agar, se llevarán a cabo procesos de amplificación (titering-up) y de titulación de los fagos, desarrollados también en apartados posteriores. En las pruebas de titulación se buscan resultados de PFU/mL, PFU hace referencia a número de unidades formadoras de placas, es decir, se cuantifican los virus capaces de llevar a cabo un ciclo de infección completo.

1.6. La eliminación de virus en el agua residual

En el ciclo del agua, y como etapa clave para preservar los espacios naturales, se establece la depuración de aguas residuales conformada por varias etapas para tratar las aguas negras y devolverlas a su cauce natural cumpliendo las regulaciones en materia ambiental. En territorio nacional el Real Decreto 509/1996, del 15 de marzo, establece las normas de calidad a considerar en el tratamiento de aguas residuales urbanas [38].

Por norma general, una depuradora urbana incorpora tres fases comenzando con un pretratamiento donde se concentra la eliminación de gruesos y la homogeneización del caudal de entrada. A continuación del pretratamiento, el tratamiento primario lo conforman operaciones físicas o físico-químicas, estas se relacionan con la eliminación de partículas sedimentable, grasas y arenas. El posterior tratamiento secundario es indispensable para reducir los contaminantes orgánicos, caracterizados como DQO, DBO y nutrientes, incluye etapas biológicas llevadas a cabo por bacterias incorporadas en procesos aerobios o anaerobios [39].

Como última etapa puede plantearse el tratamiento terciario, cuando los tratamientos anteriores ya han sido optimizados, pero no satisfacen las exigencias de calidad en el vertido. El tratamiento terciario puede aplicar distintos métodos de limpieza como la ultrafiltración o la desinfección por lámparas ultravioletas [39].

Estos sistemas para la depuración de aguas, si bien son capaces de neutralizar los principales contaminantes del agua, no están orientados a la eliminación de patógenos.



Este punto servirá para presentar la contaminación del agua por patógenos virales, un riesgo biológico que no recibe tanta atención en la limpieza de aguas, pese a ser los virus entéricos causantes de la mayoría de las enfermedades ligadas al agua.

La presencia de patógenos en las aguas residuales urbanas se relaciona con la contaminación fecal causada principalmente por desechos humanos que se concentran en las aguas negras, en otras palabras, los virus y bacterias vinculados a esta fuente de contaminación son los mismos que pueden estudiarse en relación a la microbiota del aparato digestivo [40].

El vínculo que muchos microorganismos mantienen con las aguas residuales, un medio que favorece la propagación de muchos patógenos, los convierte en indicadores biológicos de la calidad del agua, de esta forma la presencia de estos puede ser un indicio de que el caudal de agua tratado o el medio de descarga no está libre de contaminantes orgánicos [41]. El empleo de fagos como indicadores de agua residual presenta ciertas ventajas con respecto a otros métodos: los fagos presentan gran especificidad por el hospedador que infectan y distinguen entre células viables y no viables, los dispositivos de detección de virus tienen mejor tiempo de respuesta que los de bacterias y, finalmente, los virus tienen mayor capacidad de resistencia a entornos severos [42].

Otro punto clave del seguimiento de virus en el agua residual es que, aparte de corroborar la calidad del efluente tratado, puede aportar información valiosa para estudiar la población afectada por un determinado patógeno. Este método ha permitido rastrear patógenos como el polio, pero el mayor interés lo ha adquirido recientemente como resultado de la pandemia del SARS-CoV-2 [43].

Se ha constatado a través de varios estudios que este virus está presente en muestras de agua residual, alcanzando también aguas superficiales. El hallazgo de coronavirus en muestras del alcantarillado se explica por el hecho de que, pese a ser un virus que ataca órganos del sistema respiratorio, llega a tener mayor presencia en el tejido intestinal, así lo han demostrado pruebas sobre pacientes infectados durante la epidemia de SARS-CoV del 2003. El SARS-CoV-2 puede replicarse en el sistema digestivo y de esta forma alcanzar altos títulos incluso antes de que se manifiesten los primeros síntomas [44].

Los estudios de detección de virus en el agua residual ofrecen una visión panorámica de cómo está afectando una enfermedad viral a la población, incluyendo los casos asintomáticos, así ha quedado reflejado en reportes como el ofrecido por un sofisticado sistema de monitorización en Países Bajos (Figura 2) [43].

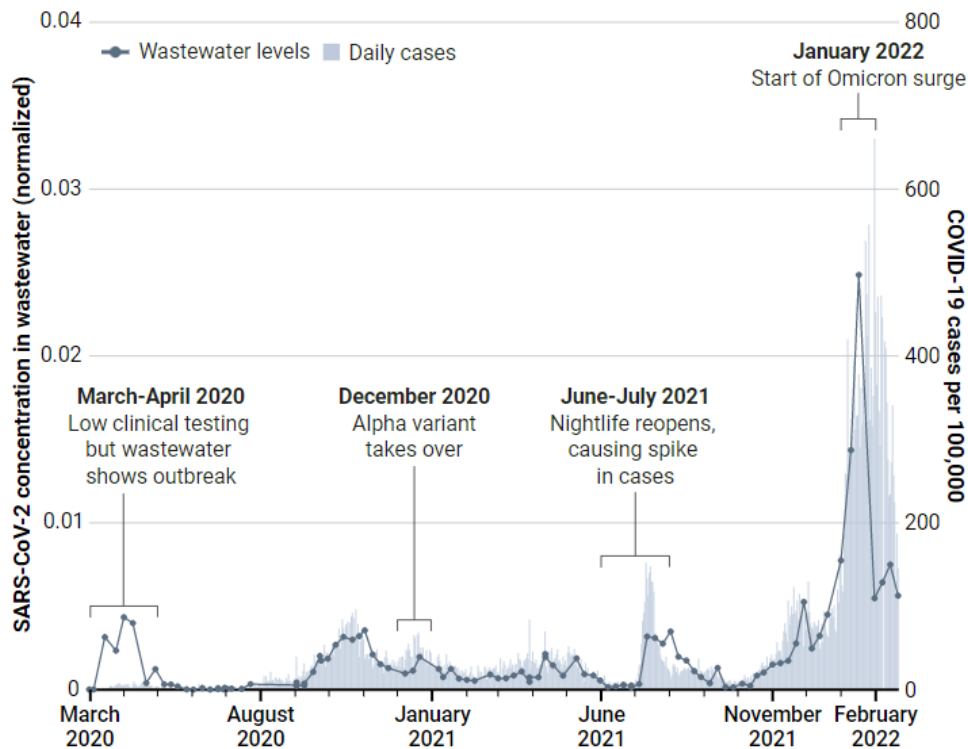


Figura 2 Relación entre la concentración de SARS-CoV-2 en el agua residual urbana y la población infectada [43].

Por otro lado, muchos estudios se han interesado también por la supervivencia de los fagos en el agua residual, debido a sus diferentes atributos físicos unos fagos tendrán mayor prevalencia en el agua residual que otros. Dentro del grupo de los coronavirus se observan tiempos bajos de supervivencia en el agua residual, con resultados de decaimiento ($T_{99.9}$, tiempo hasta la inactivación del 99.9% de los virus) de entre 2 y 4 días [42].

Al igual que sucede con el SARS-CoV-2 muchos virus se inactivan con relativa rapidez al estar en contacto con el agua, o agua residual, también es interesante preguntarse qué sucede con los patógenos en el transcurso del agua por una estación de tratamiento. La concentración media de partículas virales en los procesos de tratamiento de agua residual se ha reportado similar a la concentración viral en la materia fecal y dos órdenes de magnitud por encima de lo observado en muestras de agua dulce. Los sistemas de depuración como los fangos activos, piscinas de oxidación, filtros de carbón activo y procesos de coagulación pueden eliminar entre el 50 y el 90% de los agentes virales del agua; no obstante, hay que tener presente que la degradación del 90% de los agentes virales solo corresponde a reducir en un exponente el título viral [45].



1.7. Objetivos del estudio

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la eliminación de indicadores virales, Phi6 y MS2, dos virus que son además subrogados del SARS-CoV-2, y de los que se desea comparar su resistencia teniendo en cuenta las diferencias estructurales de ambos virus.

Mediante una tecnología de tratamiento que se asemeja a los procesos desarrollados en estaciones depuradoras, concretamente a los fangos activos, se desea comprobar la efectividad del tratamiento para la degradación del Phi6, un virus con envoltura, y la degradación del MS2, un virus sin envoltura.

Diseñando ensayos a escala de laboratorio y con la ayuda de técnicas de cultivo de microorganismos, bacterias y sus correspondientes bacteriófagos, se plantea una experiencia que permite la observación del decaimiento viral de ambos virus en agua residual sintética y en reactores aerobios operados en batch con un cultivo de fangos activos.

Los objetivos específicos de este estudio podrían resumirse en los siguientes puntos:

- Conocer y asentar las técnicas estándar que hacen posible el cultivo, la amplificación y la titulación de bacterias y fagos.
- Evaluar la inactivación de virus por una tecnología de fangos activos.
- Comparar la resistencia de los bacteriófagos Phi6 y el MS2 a los tratamientos de aguas residuales y extraer hipótesis sobre la inactivación del SARS-CoV-2 en el agua residual.



2. MATERIALES Y MÉTODOS



2.1. Virus y hospedadores de este estudio

Se adquirieron muestras de los microorganismos a DSMZ (DSMZ, Leibniz Institute, Alemania) en su estado congelado/liofilizado: *Pseudomonas sp.* (código en catálogo DSM N° 21482) corresponden a la cepa HER1102 y *Escherichia coli* (código en catálogo DSM N° 5695) pertenece a la cepa Lederberg W1485.

Como parte de los subrogados de estudio se adquirió el Phi6 (código en catálogo DSM N° 21518) de la cepa HER 102 y el MS2 (código en catálogo DSM N° 13767) con designación de cepa NCCB 3463.

2.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo son una parte importante en la preparación de cualquier prueba o ensayo para el estudio de microorganismos. Siguiendo las indicaciones del proveedor DSMZ, se prepararon los siguientes medios que sustentan el crecimiento de los virus subrogados de trabajo: medio TSB (*Tryptone soya broth*) para el cultivo de *Pseudomonas sp.* y medio NZCYM para el cultivo de *Escherichia coli* [46], [47].

El TSB es un medio nutricional compatible con el cultivo de una amplia variedad de microorganismos, es muy común su uso en el crecimiento de bacterias tanto aerobias como anaerobias facultativas, la receta empleada que se toma de DSMZ está basada en el producto del fabricante Oxoid (Alemania). Por otro lado, se elaboró medio NZCYM sobre el que fue necesario adicionar 2.0 mg/L de estreptomomicina, un antibiótico aminoglucósido que actúa como bactericida, al inhibir la síntesis de ciertas proteínas, para minimizar de esta forma el riesgo de contaminación en los cultivos de *E. coli*.

En el proceso de elaboración se pesaron los reactivos en cantidades exactas y se diluyeron en el volumen necesario de agua destilada. Las cantidades de cada compuesto son las que pueden verse en la siguiente tabla (Tabla 2), finalmente el pH fue ajustado en torno a los valores que se dan debajo, para ello se emplearon diluciones concentradas de HCl y NaOH. Todos los medios de cultivo y medios con agar, para la preparación de placas, fueron autoclavados (hasta los 120 °C en Autoclave Raypa series AES) para lograr unas condiciones estériles y así poder conservar los medios e impedir su contaminación.



Tabla 2 Receta a seguir en la elaboración de medio TSB y medio NZCYM.

545. Tryptone soya broth (TSB) (pH 7.3) <i>Pseudomonas sp. y Phi6</i>			544. Medio NZCYM (pH 7.5) <i>Escherichia coli y MS2</i>	
Compuesto		g/L agua	Compuesto	g/L agua
Peptona de caseína		17	Hidrolizado de caseína	10
Peptona de harina de soja		3	NaCl	5
D(+)-Glucosa		2.5	Casaminoácidos	1
NaCl		5	Extracto de levadura	5
K ₂ HPO ₄		2.5	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2
			Maltosa	2

Otra elaboración imprescindible en este trabajo consistió en un buffer para la conservación y el cultivo de los fagos (Tabla 3). Preparado el buffer es recomendable filtrarlo con filtros estériles de 0.22 µm antes de su empleo.

Tabla 3 Buffer SM para dilución de los bacteriófagos.

Buffer para conservar los fagos (pH 7.5)		
Compuesto	Cantidad/100 mL	Unidades
NaCl	0.584	g
Tris (1M)	5	mL
MgSO ₄ (1M)	0.8	mL

Por otro lado, se elaboró un agua residual sintética para llevar a cabo las experiencias de degradación de virus, para ello se siguió la receta mostrada en la Tabla 4 que ha sido empleada también por otros autores [48].

Tabla 4 Composición para el agua residual sintética.

Agua residual sintética	
Compuesto	g/L agua
Caseina (extracto de carne)	0.11
Peptona	0.16
Urea	0.03
NaCl	0.007
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.004
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.002
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.000005
K ₂ HPO ₄	0.028
Glucosa	0.25

2.3. Activación del inóculo

En el inicio, las operaciones en el laboratorio se centraron en activar los microorganismos adquiridos de DSMZ que se conservaban liofilizados o congelados. Una vez activadas las bacterias se generaron gliceroles del cultivo original y cultivos con el menor número de ciclos posibles empleando glicerol 40% en una proporción 1:1. En un paso posterior se dio paso a la activación y amplificación de los fagos empleando el microorganismo hospedador correspondiente.

Este apartado explica los métodos empleados para la activación y crecimiento de los distintos inóculos.

2.3.1. Procedimiento de activación de *Pseudomonas sp.* y *Eshcerichia coli*

La bacteria se recibió en su estado durmiente en forma de un pellet de biomasa liofilizada, con tal de poder ser conservada hasta su uso. Para activar los microorganismos se tomó cuidadosamente el vial con el pellet y se adicionaron 0.5 mL de medio, después se cerró nuevamente la cápsula y se dio tiempo para la rehidratación de los microorganismos dejando las bacterias reposar durante 30 minutos su caldo de cultivo. Posteriormente, se tomó la mitad de este volumen, unos 0.25 mL, y se transfirió a un nuevo recipiente con 5 mL de medio, reinoculando así las bacterias. La mitad restante fue inoculada por agotamiento en placas de Petri con el medio correspondiente (agar 3%) para verificar el crecimiento de las cepas.



Figura 3 Procedimiento de activación de *Pseudomonas sp.* partiendo de un pellet de biomasa liofilizado.



De esta forma se obtuvo el primer ciclo del cultivo en medio líquido, las condiciones de crecimiento que se mantuvieron para *Pseudomonas sp.* fueron temperatura 25 °C (Estufa bacteriológica y de cultivo modelo Incudigit, J.P. Selecta) y agitación 150 rpm, a través de un agitador magnético en el medio; por otro lado, la *E. coli* precisa de temperaturas de 37 °C (cámara caliente) y agitación en agitador de plataforma móvil a aproximadamente 150 rpm (Brunswick scientific digital gyrototy platform, modelo G-10).

El crecimiento en medio líquido fue supervisado a través de la densidad óptica de la muestra, esta medida se obtuvo a través de la absorbancia a 600 nm utilizando para ello un espectrofotómetro Shimadzu UV-2550 UV / Vis (Shimadzu, Japón). Las muestras, tomadas una vez transcurrido cierto tiempo después de la inoculación, se analizaron en cubetas de poliestireno óptico, transparentes a la longitud de onda empleada (trasparencia óptima en el rango 300-800 nm). Como blanco se empleó el medio de cultivo correspondiente.

Alcanzados tiempos entre 2-12 horas de activación de los gliceroles y alta densidad de los cultivos, no obstante, se realizaron repiques para su empleo como inóculo en cultivos virales. *Pseudomonas sp* y *E. coli* fueron inoculadas en etapa exponencial, con densidades ópticas en el rango de 0.2 - 0.3 (OD₆₀₀). A partir de las cepas desarrolladas se pudo llevar a cabo la consiguiente activación de los fagos.

2.3.2. Activación y amplificación del Phi6 y el MS2

Para estos procedimientos se aplicó el método del doble agar. Para ello, se prepararon alícuotas de 5 mL de medio con agar 0.6% en tubos de cultivo estériles, enfriados posteriormente en baño maría antes de ser inoculados en placas sobre la capa de medio al 3% de agar (10-15 mL). El control de la temperatura del baño era un aspecto sobre el que se debía poner suma atención, se recomienda no inocular a temperaturas mayores de 50 °C, que amenazarían a los microorganismos, pero temperaturas inferiores a 40 °C pueden dar lugar a la solidificación del medio con agar. En este estudio se inóculo a temperaturas alrededor de los 47 °C que, por distintas experiencias, mostraron los mejores resultados. En el momento de la inoculación se agregaron a los 5 mL de medio líquido al 0.6% de agar 200 µL de la bacteria (OD₆₀₀=0.3) y 100 µL del fago correspondiente (para el cultivo de *E. coli* y su lisis con MS2 se agregó antibiótico, estreptomina, en primer lugar). Luego, se aplicó el vortex para homogeneizar el inóculo y, en el proceso de adición sobre el agar duro, se distribuyó el 0.6% realizando movimientos circulares en la placa antes de la solidificación del agar.

A través de esta técnica de cultivo se obtuvieron placas de cultivos microbianos aptas para la observación de las bacterias, la lisis celular y la titulación de los fagos. Por un lado, se empezó trabajando la técnica para obtener placas de agar con un césped uniforme y bien consolidado para el crecimiento de las *Pseudomonas* y la *E. coli*, logrado este primer objetivo se continuó empleando el método del doble agar para el cultivo simultaneo de bacterias y fagos.

El Phi6 fue adquirido como una suspensión con título 1x10⁹ PFU/mL (unidades formadoras de placas por mL) y sencillamente se conservó a 4°C para su posterior uso, por su parte el

MS2 se encontraba inicialmente deshidratado sobre un filtro y para obtener un stock fue necesaria una primera lisis en pacas.

En este proceso de activación del MS2 se montaron placas por el método del doble agar, colocando el filtro en el centro de la placa y agregando la bacteria y medio (2-5 ml) para humedecer el MS2. Después, tras la aparición de lisis, fue necesario agregar unos 5 mL de buffer y mantener la placa en agitación durante 4 horas, a continuación, se raspó el agar blando y se llevó a cabo una centrifugación (4000g x 20 min) junto con el buffer que estaba en contacto con el cultivo. Para purificar el cultivo se necesitó una última etapa de filtración donde se filtró el sobrenadante empleando filtros estériles de 0.22 μm .

Tras activar los virus adquiridos de DSMZ se valoró realizar amplificaciones de los dos subrogados, lo que permitiría aumentar el stock de partida para los ensayos y a la vez mantener el título viral.

Este proceso de amplificación es semejante al proceso de activación descrito para activación del MS2. En primer lugar, se partió del microorganismo en su cultivo líquido ($\text{OD}_{600}=0.3$) y se montaron placas siguiendo el procedimiento de la doble capa de agar, tras observarse lisis se agregó buffer y, como se ha descrito anteriormente, se deja la placa en agitación durante algunas horas (Figura 4). El siguiente paso consistía en tomar con un asa de siembra el agar blando y traspasarlo a un tubo falcón junto con el buffer, para después centrifugar todo ello y filtrar el sobrenadante (4000g x 20 min y filtros de 0.22 μm).

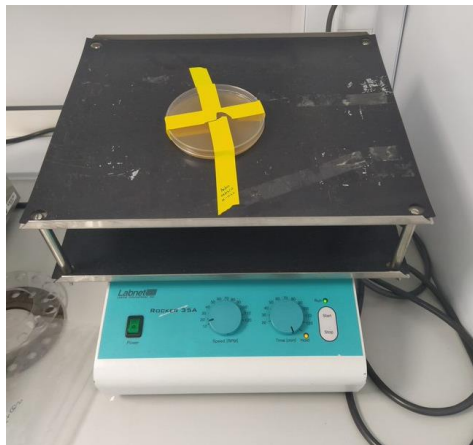


Figura 4 Agitador regulable para placas de cultivo. La placa permanecía en agitación durante cuatro horas y los microorganismos entraban en contacto con el buffer.

2.4. Titulación de fagos por el método de las diluciones seriadas

Para evaluar cuantitativamente la persistencia de los virus en el agua residual y bajo distintas condiciones de tratamiento se aplicaron diluciones seriadas para la inoculación de las muestras de agar doble. Este método ofrece información del título viral de un fago al contar los halos que representan los fagos que han completado un ciclo total de lisis en

las condiciones establecidas para el cultivo. Esta técnica, de fácil aplicación, presenta bajos costes asociados y una alta eficiencia aplicable en el estudio de muchos bacteriófagos.

Para llevar a cabo las diluciones seriadas se partió de una muestra con los microorganismos a cuantificar y se tomó una alícuota para diluir en buffer obteniendo como resultado una dilución 1:10; es decir, se redujo un orden de magnitud la cuantía de virus. Se procedió de la misma manera partiendo de esta primera dilución y se fueron obteniendo nuevos volúmenes, cada vez con una menor concentración viral, y nuevas muestras con factores de dilución 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , etc (Figura 5). Para las diluciones se empleó el buffer SM presentado anteriormente en el texto y se trabajó en volúmenes entre los 200 μ L y 1000 μ L.

Las placas se inocularon con distintas diluciones por el método del doble agar (Protocolo 9224 B, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater [37]) permitiendo la determinación del título viral en la muestra evaluada. Tomando diluciones mayores la determinación del número de PFU era más sencilla, al observarse menos halos en el césped, hasta eliminar por completo la presencia de virus, por otro lado, al tomar una dilución escasa se podría dar la lisis total de las bacterias (Figura 6 y Figura 7).

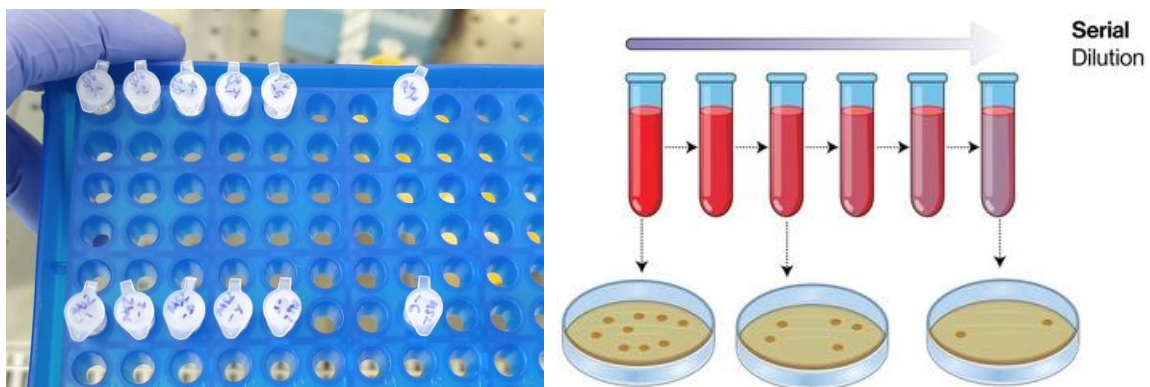


Figura 5 Diluciones seriadas, el título del virus estudiado se reduce con cada dilución.

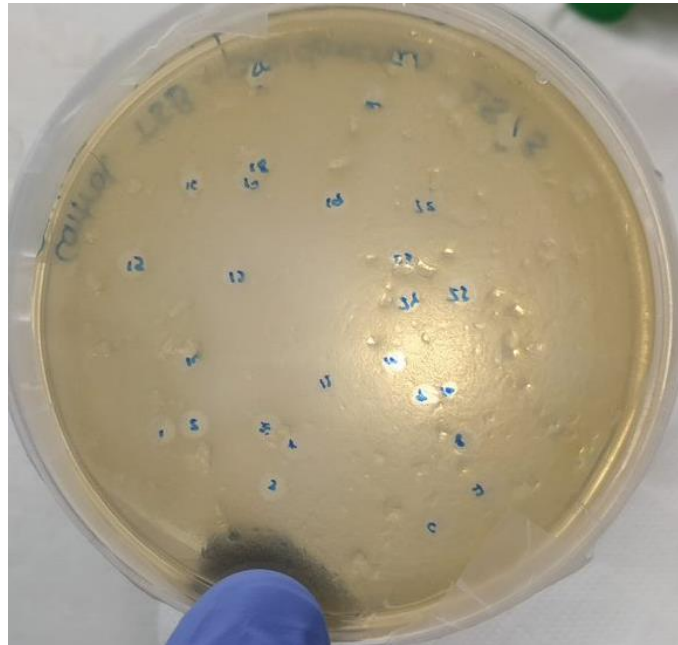


Figura 6 Placa a partir de una muestra diluida de Phi6 que permite contar los halos, cada halo representa un pfu (unidad formadora de placa).

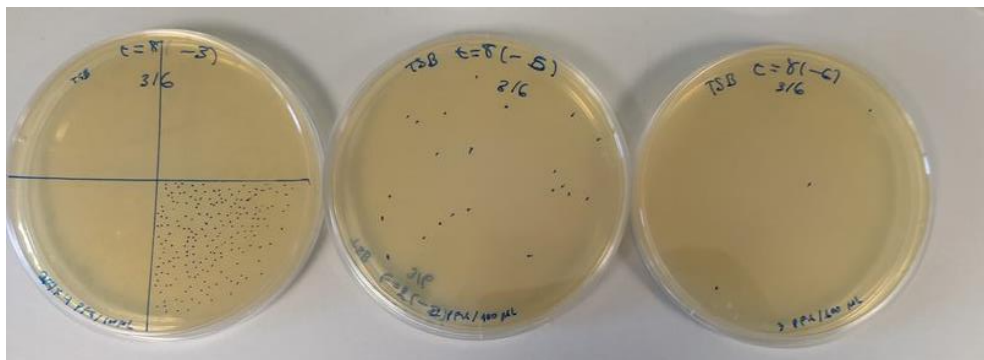


Figura 7 Placas de Phi6 en césped de *Pseudomonas montadas* con distintas diluciones de una misma muestra, de izquierda a derecha se pueden observar diluciones en 10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-6} .



2.5. Ensayo de resistencia de indicadores virales en reactores batch de fangos activos

Se diseñó un ensayo en reactores batch para determinar cómo afecta un tratamiento de fangos activos a la supervivencia de los virus, tomando de referencia el decaimiento que presentarían solo encontrándose en agua residual sin estar expuestos a un tratamiento para la depuración de agua.

2.5.1. Montaje experimental, inóculo y aclimatación

- Montaje experimental

El montaje consistió en 4 reactores en batch, pudiendo así comparar el decaimiento de los virus en dos controles con agua residual sintética y en dos reactores con fango anaerobio de la depuradora, cada uno en duplicados. Los cuatro reactores fueron iguales, empleando botellas de vidrio de dos litros que operaban en un volumen de 0.5 L para el caso del agua residual y con 1 L las que simulan el proceso aerobio de los fangos activos.

Para los reactores con fango activo, se buscaba mantener una concentración de O_2 disuelto (DO) de 2 mg/L. Para ello se inyectó una corriente de aire de caudal 0.2 L/min, regulada por un rotámetro con splitter. El aire se bombeaba mediante un compresor y se introducía en las botellas indicadas a través de difusores de burbuja fina para promover el contacto entre la fase gaseosa y la fase líquida. Adicionalmente, se introdujeron agitadores magnéticos para mejorar la agitación y homogeneización del licor mezcla.

El día que finalmente dio comienzo el experimento se completó el montaje experimental con las cuatro botellas: ARS1, reactor con 0.5 L de agua residual sintética; y ARS2, replica semejante al reactor anterior; R1, reactor operando con 1 L de agua residual y una concentración de fangos de 1 g/L; y R2, su duplicado. El montaje experimental completo es el mostrado en la siguiente figura (Figura 8).

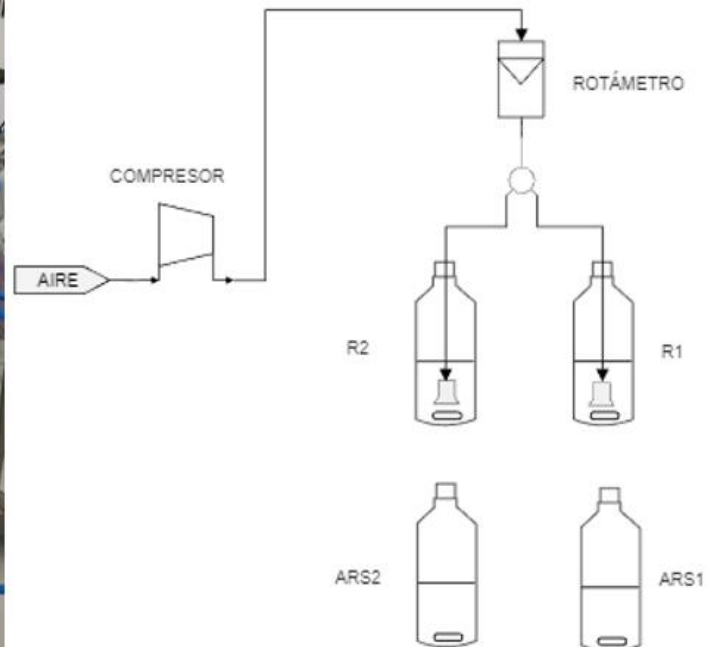
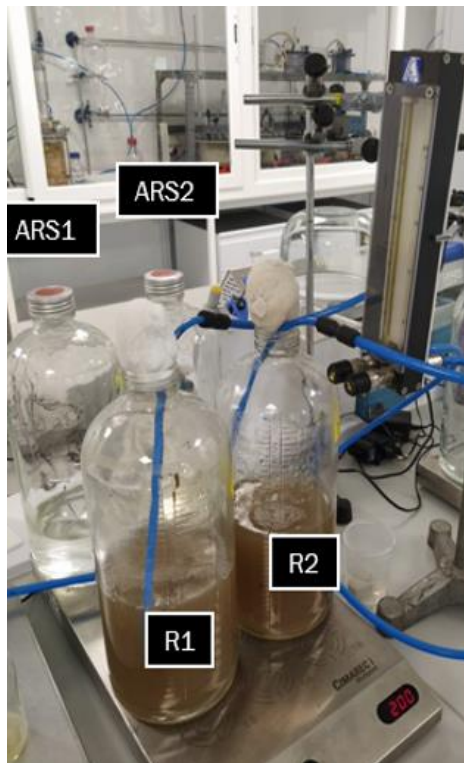


Figura 8 Montaje experimental. El diagrama del proceso muestra el montaje con las cuatro botellas y los equipos para manejar un caudal continuo de aire incluyendo un compresor, un rotámetro, un splitter y dos difusores.

- Inóculo

El inóculo se realizó a partir de una dilución 1:2 de fangos activos en ARS (0.5 L de cada uno), alcanzando concentraciones de SST y SSV de 1.78 y 1.23 g /L, respectivamente. Esta mezcla fue separada posteriormente en dos botellas de 1L, conformando los reactores R1 y R2 que fueron mantenidos en aireación por 48h. Al cabo de este periodo, R1 y R2 fueron nuevamente mezclados en una única botella se la que posteriormente se tomó 1 L para dividir equitativamente en dos reactores, adicionando nuevamente 500 mL de ARS para completar volúmenes de 1 L. La Figura 9 muestra cómo se llevó a cabo la aclimatación de los fangos.

El inóculo de los dos virus se realizó de forma simultánea. Logrando una dilución 1:1000, se inoculó 1 mL del stock de cada virus en R1 y R2 y 0.5 mL en ARS1 y ARS2.



Figura 9 Proceso de aclimatación de los fangos, da inicio 48 horas antes del experimento.

2.5.2. Muestreo y tratamiento de muestras para la titulación de fagos

Se establecieron los siguientes tiempos de muestreo: $t=0h$, $t=6h$, $t=12h$, $t=24h$ y cada 24 horas a partir del primer día hasta observar el decaimiento total o concluir el experimento.

El tratamiento de las muestras es específico de los análisis que se requería realizar, como se explica en detalle más adelante, pero para el montaje de placas y las consiguientes técnicas de conteo fue prioritario filtrar las muestras y seguir ciertos pasos para poder purificar las muestras de los reactores con la que se deben inocular las placas.

En cada tiempo se tomaron muestras de 35 mL de cada botella en tubos falcon estériles de 50 mL. Para ARS1 y ARS2 (controles), el muestreo se llevó a cabo dentro de la cabina de flujo laminar, en volúmenes de 1 mL (aprox.). Las muestras fueron filtradas en filtros de $0.22\ \mu\text{m}$ (Merck SLGPM33RS). Las muestras de R1 y R2 fueron cuantificadas en términos de partículas virales en la fracción soluble y en los sólidos del licor mezcla, siguiendo el procedimiento descrito por Espinosa et. Al [49].

Para ello, las muestras de 2 mL tomadas de cada reactor fueron centrifugadas a $4000g \times 20\ \text{min}$ y 4°C para realizar una separación inicial de las fracciones sólida y soluble. La fracción soluble fue filtrada en filtros de $0.22\ \mu\text{m}$ (Merck SLGPM33RS) y el título viral determinado con la técnica del doble agar. El pellet obtenido en la primera centrifugación fue resuspendido en 1 mL de beef extract 10% (pH 7.2) y llevado a agitación en agitador (incubador-shaker LABNET VORTEMP 56 EVC) durante 20 min, a 120 rpm y temperatura ambiente. Posteriormente, el pellet fue nuevamente separado por centrifugación a $4000g \times 20\ \text{min}$ y 4°C . La solución de beef extract con el contenido de partículas virales



desprendidas del pellet fue nuevamente filtrado en de 0.22 μm y cuantificado por la técnica del doble agar.

Finalmente, todas las muestras fueron congeladas a -20°C para la determinación posterior de TOC, IC y TN.

2.5.3. Procedimientos analíticos

Determinación del oxígeno disuelto

Esta medida se realizaba diariamente con un oxímetro OXI 3310 (WTW, Alemania) que es posible calibrar en presencia de oxígeno atmosférico y da una medida exacta de la concentración de oxígeno disuelto y de la temperatura.

Determinación de pH

Las muestras de los cuatro reactores se analizaron para obtener la medida del pH empleando un equipo pH BASIC 20, Crison (Barcelona, España) previamente calibrado con patrones de pH 4, 7 y 10.

Determinación del carbón orgánico total y nitrógeno total

El nitrógeno total (NT) y el carbono orgánico total (COT) se determinaron con un equipo de análisis TOC-VCSH (Shimadzu, Japón) equipado con un módulo de quimioluminiscencia TNM-1.

Para poder analizar el carbón y el nitrógeno las muestras fueron previamente filtradas con filtros de tamaño de poro 0.45 μm y posteriormente diluidas para obtener resultados dentro del rango de la curva de calibración del equipo (0-100 mg/L). Por otro lado, se preparó un blanco con agua destilada y patrones, tanto de 100 mg L⁻¹ de carbono orgánico como de nitrógeno.

Determinación de la biomasa

Los sólidos suspendidos volátiles y los sólidos suspendidos totales se determinaron de acuerdo a los métodos estándar [50]. En este procedimiento se filtra un pequeño volumen de muestra, en función de la concentración de biomasa que presente, utilizando unos filtros previamente pesados (tamaño de poro de 0.45 μm). Los sólidos retenido en el filtro, conocidos como sólidos suspendidos, se llevan una estufa que trabaja a 105 $^{\circ}\text{C}$ para eliminar la humedad, tras 24 se obtiene el nuevo peso del filtro en una balanza analítica, dato necesario para obtener la masa que representan los sólidos suspendidos totales. Después, los filtros serían introducidos en la mufla (a 550 $^{\circ}\text{C}$) durante una hora para eliminar esta vez los sólidos suspendidos volátiles, la parte orgánica de los sólidos suspendidos, quedando en el filtro solo los sólidos suspendidos fijos. La diferencia de los sólidos suspendidos totales y los sólidos suspendidos fijos permite calcular el valor de los sólidos suspendidos volátiles.

2.6. Tratamiento de datos

Los datos recogidos en el ensayo anterior fueron analizados y se usaron en la elaboración de graficas como refuerzo visual. Fue necesario procesar los datos obtenidos del conteo de placas para, partiendo solo del número de halos identificados en una placa, conocer la concentración viral de la muestra empleada.

2.6.1. Unidades formadoras de colonias y recuperación de fagos

El cálculo de los PFU/mL dependerá en cada caso de la dilución empleada, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$[\text{Virus}] = \frac{N^{\circ} \text{ de halos} \cdot 10^{n^{\circ} \text{ de diluciones}}}{V_m}$$

Donde:

V_m : volumen (0.1 mL) de muestra con el que se inocula

[Virus]: concentración de virus (PFU/mL)

Para determinar la recuperación de los fagos del medio de los reactores, se emplearon las siguientes fórmulas:

- En ARS1/ARS2 (control)

$$\% \text{ recuperado} = \frac{[\text{Virus en } t = 0] \cdot V_r}{[\text{Virus en el stock}] \cdot V_i}$$

- En R1/R2 (degradación en fangos aerobio)

$$\% \text{ recuperado} = \frac{([\text{Virus en } t = 0]_{\text{soluble}} + [\text{Virus en } t = 0]_{\text{sólidos)}) \cdot V_r}{[\text{Virus en el stock}] \cdot V_i}$$

Donde:

V_r : volumen de los reactores (500 mL o 1000 mL)

V_i : volumen del inóculo inicial (0.5 mL o 1 mL)

Los resultados de cuantificación viral que se muestran en este trabajo están basados en el promedio y la desviación estándar para cada muestra y su réplica.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{N}}$$



Donde:

N: número de replicas

\bar{x} : promedio de las réplicas

x_i : valor de la réplica "i"

σ : desviación estandar

2.6.2. Análisis de las constantes cinéticas

Las cinéticas de degradación de los fagos se ajustan a ecuaciones de orden uno:

$$-\frac{d[\text{Virus}]}{dt} = k \cdot [\text{Virus}]$$

$$\ln \frac{[\text{Virus}]_t}{[\text{Virus}]_0} = -k \cdot t$$

Donde:

t: tiempo

k : constante de decaimiento

$[\text{Virus}]_t$: concentración de virus en el tiempo *t*

$[\text{Virus}]_0$: concentración inicial de virus

Tras linealizar la función, la pendiente en esta última ecuación desvelaría la constante de decaimiento del virus.



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Resultados del ensayo aerobio para la degradación de indicadores virales

Para la discusión de las observaciones se toman en consideración dos sistemas que forman el experimento, presentando valores promedios tanto para el control (botellas ARS1/ARS2) y el reactor con el fango aerobio (botellas R1/R2).

3.1.1. Control del medio y las condiciones de operación en los biorreactores

- Comportamiento de la biomasa

El comportamiento de la biomasa fue evaluado a través de los sólidos suspendidos totales (SST) y volátiles (SSV) del licor mezcla en los reactores de fangos activos (Tabla 5). Las concentraciones en $t=0$ h sugieren que el periodo de aclimatación no generó cambios importantes en las concentraciones de sólidos del inóculo. Durante el periodo experimental, hubo una pérdida marginal de sólidos en la biomasa según se evidencia en las concentraciones en $t=144$ h, fomentada probablemente por el rápido consumo inicial del sustrato y el probable predominio de metabolismo endógeno a lo largo del ensayo. A pesar de ello, las concentraciones de SST y SSV durante la aclimatación y ensayo estuvieron cercanas a lo reportado para estaciones depuradoras de fangos activos en la modalidad convencional, con concentraciones de entre 1.5 y 2 g SSVML/L o superiores [51].

Tabla 5 Registro de los sólidos totales y sólidos suspendidos en R1 y R2 en los tiempos de inicio y finalización del experimento.

Tiempo (h)	Promedio reactores R1/R2	
	SST (g/L)	SSV (g/L)
0	0.96 ± 0.05	0.70 ± 0.03
144	0.74 ± 0.01	0.54 ± 0.00

- Resultados de pH y oxígeno disuelto

Al inicio del experimento, el pH presentó una diferencia de aproximadamente 0.5 unidades entre el control de agua residual sintética y el tratamiento con fangos activos (Figura 10a). A partir de $t=48$ h se observó decaimiento del pH en el control y en el reactor hasta valores medios de 6.9 y 5.9, respectivamente, los cuales se mantuvieron relativamente constantes hasta el final del experimento. Estos valores se encuentran levemente por debajo del rango óptimo recomendado para que la biomasa aerobia sobreviva y se prolifere en un proceso de fangos activos, que están entre 6 y 8 [52]. Los valores menores en el reactor (duplicados R1/R2) en comparación al control (duplicados ARS1/ARS2) estuvieron asociados probablemente a la disolución de CO_2 producto de la respiración bacteriana [53]

y al consumo parcial de la alcalinidad inicial, como resultado de reacciones metabólicas (e.g. la nitrificación) [52]. Las concentraciones de oxígeno disuelto (Figura 10b), presentaron valores mayores al mínimo establecido convencionalmente de 2 mg/L [54], corroborando que los fangos activos mantuvieron concentraciones adecuadas de oxígeno para los procesos aerobios, presentando apenas pequeñas variaciones durante el experimento.

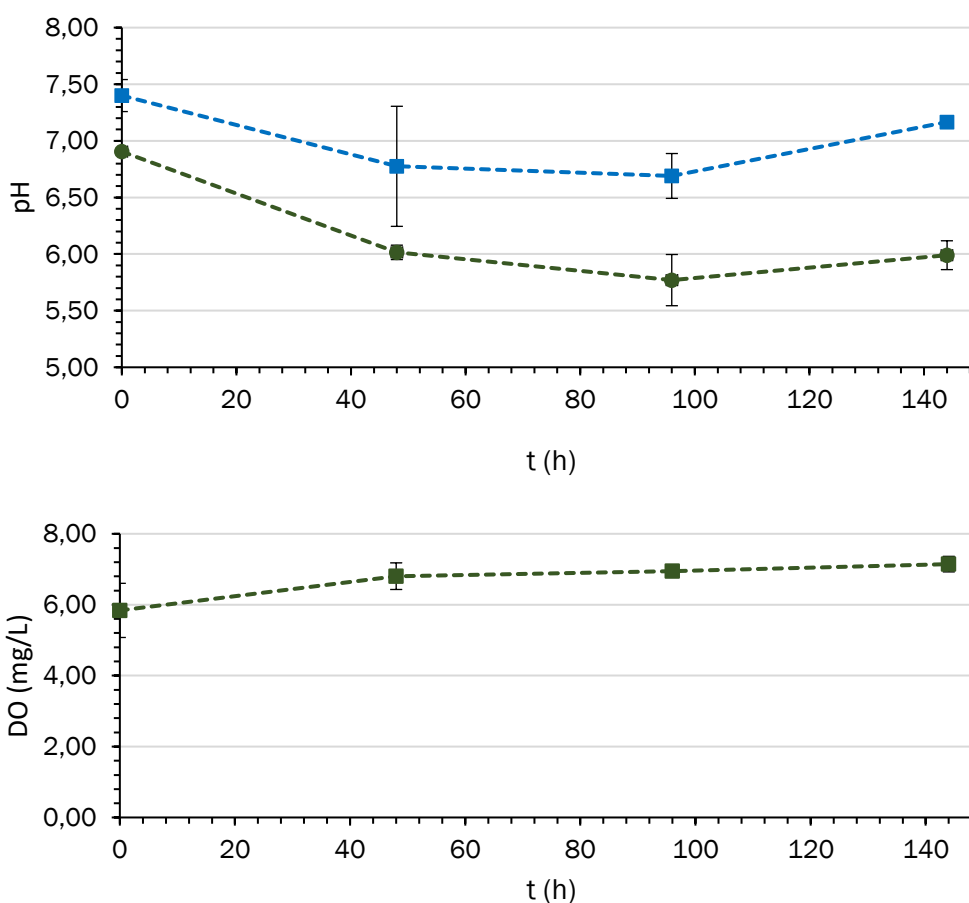


Figura 8 Resultados de (a) pH y (b) Oxígeno disuelto a lo largo del experimento (■ ARS1/ARS2, ■ R1/R2).

- Eliminación de Carbono orgánico total (COT) y nitrógeno total (NT)

El COT es la medida asociada a concentración de carbono en la materia orgánica disuelta en el medio. Atendiendo a la preparación del agua residual sintética, la fuente principal de carbono orgánico la conforma la glucosa, las proteínas también contribuyen a aumentar el valor de este parámetro. Los fangos recibidos de la estación depuradora pueden presentar otras medidas de COT atribuidas a compuestos más variados que un medio sintético, además las propias células (SSVLM) acaban aportando a esta medida del carbono

orgánico en disolución, ya sea a través de la excreción de metabolitos o como resultado de la lisis celular.

A lo largo del experimento se observó el consumo del COT (Figura 11a) en el reactor de fangos activos, a pesar de un leve efecto de dilución inicial en comparación con el control, siendo relativamente rápido durante las primeras 48h y manteniéndose estable hasta el final del experimento. La eficiencia máxima de eliminación de COT fue en promedio de 80.3% en el reactor, lo que se encuentra dentro de los rangos esperados para fangos activos [54]. En el control de agua residual se observó también un descenso parcial del COT, concentrado entre los tiempos 48h y 96h, conllevando una reducción promedio del 44.3%. Las mayores eficiencias de eliminación de COT en el reactor en comparación con el control demostraron la acción metabólica aerobia de los microorganismos en el fango activo. Hay que aclarar que también se observó crecimiento microbiano sobre el medio del control (en forma de contaminación tanto en ARS1 y ARS2), siendo esta la principal causa de degradación de COT en el control.

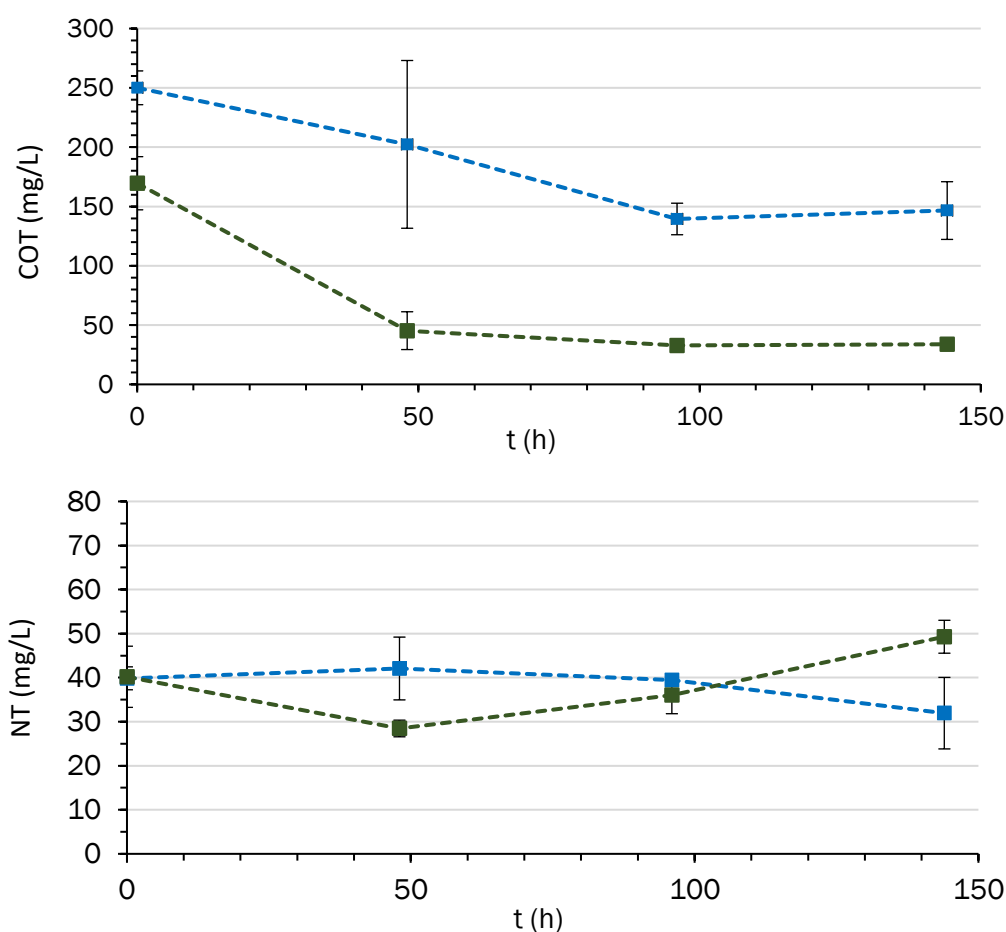


Figura 11 Variación del (a) carbono orgánico total (COT) y (b) nitrógeno total (NT) a lo largo del experimento (■ ARS1/ARS2, ■ R1/R2).



En relación al NT, se evidenciaron concentraciones más o menos constantes de nitrógeno en el licor mezcla (Figura 11b), las botellas duplicadas mantuvieron un comportamiento muy parecido y el nitrógeno permanece en un intervalo de entre 26 y 52 mg/L. El ligero incremento en el nitrógeno del reactor que se aprecia hacia el final del experimento, desde el tiempo 96 en adelante, puede justificarse como una consecuencia de la acumulación de nitratos, generados por reacciones de nitrificación, y estabilización de la biomasa asociada al metabolismo endógeno.

3.1.2. Evolución del Phi6: supervivencia de virus con envoltura lipídica

El bacteriófago Phi6, caracterizado por la presencia de una envoltura formada por una doble capa lipídica en torno a su cápside presentó decaimiento del título viral medido como PFU/mL en el tratamiento con fangos activos (fracción soluble y sólidos) y control (Figura 12). Los resultados evidenciaron un rápido decaimiento del virus a partir, con pérdida total de viabilidad a partir de $t=12h$ en sólidos y fracción soluble de los duplicados del tratamiento con fango activo y a partir de $t=24h$ en los duplicados del control con agua residual sintética. El decaimiento más rápido en el tratamiento con fangos activo sugiere que esta tecnología puede contribuir a la eliminación de virus con envoltura lipídica entorno a la cápside, en las primeras 24 horas del ensayo ya se observarías pérdidas de 3 logs sobre el control, mientras que en el reactor de fangos ya se había llegado a un decaimiento total.

Por otro lado, considerando la diferencia entre el título del stock viral adicionado (para este se detectó una concentración de 1.64×10^9 PFU/mL) y las concentraciones en $t=0h$, se encontraron eficiencias de recuperación de $75\% \pm 5$ y $0.3\% \pm 0.3$ en el control y tratamiento con fangos activados respectivamente. Estos resultados sugieren una pérdida casi inmediata de aproximadamente el 99.7% del título viral a la entrada en contacto con el tratamiento de fangos activos, que puede estar justificada por una posible rápida adsorción y degradación en la estructura de flóculos conformados por la biomasa, también por la presencia de solventes y otros químicos que ataquen la envoltura del Phi6 en el medio suministrado por la depuradora.

En adición, la supervivencia de la fracción adherida en los sólidos resultó mucho menor que en la fracción soluble, como se evidencia en los menores títulos obtenidos en comparación a la fracción soluble entre $t=0h$ y $t=12h$. La detección de apenas 0.06% del virus en la fracción sólida en $t=0h$ diverge de valores previamente reportados de hasta un 22% de Phi6 adsorbido sobre los sólidos en el agua residual según Ye et al [18] asociados a un equilibrio de adsorción que no se establece de forma instantánea; sin embargo, las matrices de agua en esta comparativa guardan diferencias significativas en cuanto al tipo de sólidos presentes, siendo los biosólidos y los microorganismos más predominantes en el medio con fango aerobio. Por otro lado, Alamin et al [20] sugirió que el Phi6 se distribuye concentrándose en la fase líquida y no se detectaría más de un 0.8% de los viriones como parte del análisis a los sólidos, lo que concuerda mejor con los resultados de este trabajo [20].

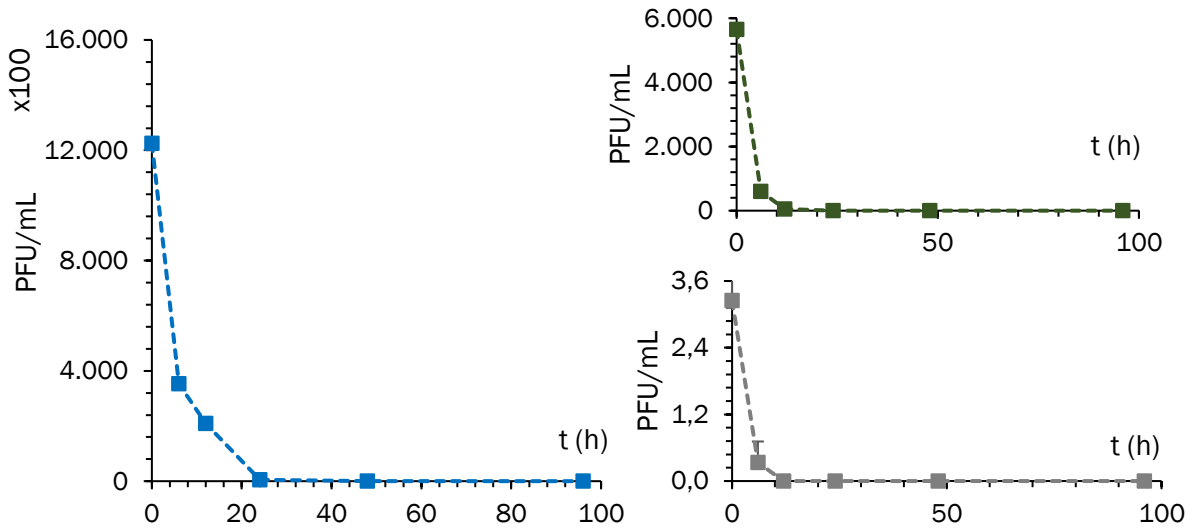


Figura 12 Decaimiento del Phi6 en el control (a) y el reactor (b), (■ ARS1/ARS2, ■ R1/R2 sólidos, ■ R1/R2 soluble).

Una evaluación más detallada del decaimiento del Phi6 se obtiene al aplicar una transformación logarítmica, permitiendo comparar a cada tiempo el título del Phi6 en cada reactor, así como en la fracción sólida del tratamiento biológico (Figura 13a) y permitiendo el ajuste a una cinética de primer orden para cada curva de decaimiento (Figura 13b). Los parámetros cinéticos obtenidos se resumen en la Tabla 6. Los tiempos hasta observarse una reducción en la concentración de virus de un 90% y un 99% (T_{90} y T_{99} respectivamente) corroboran que el virus decae con rapidez, la degradación en el tratamiento biológico fue 2.53 veces más rápida que en agua residual.

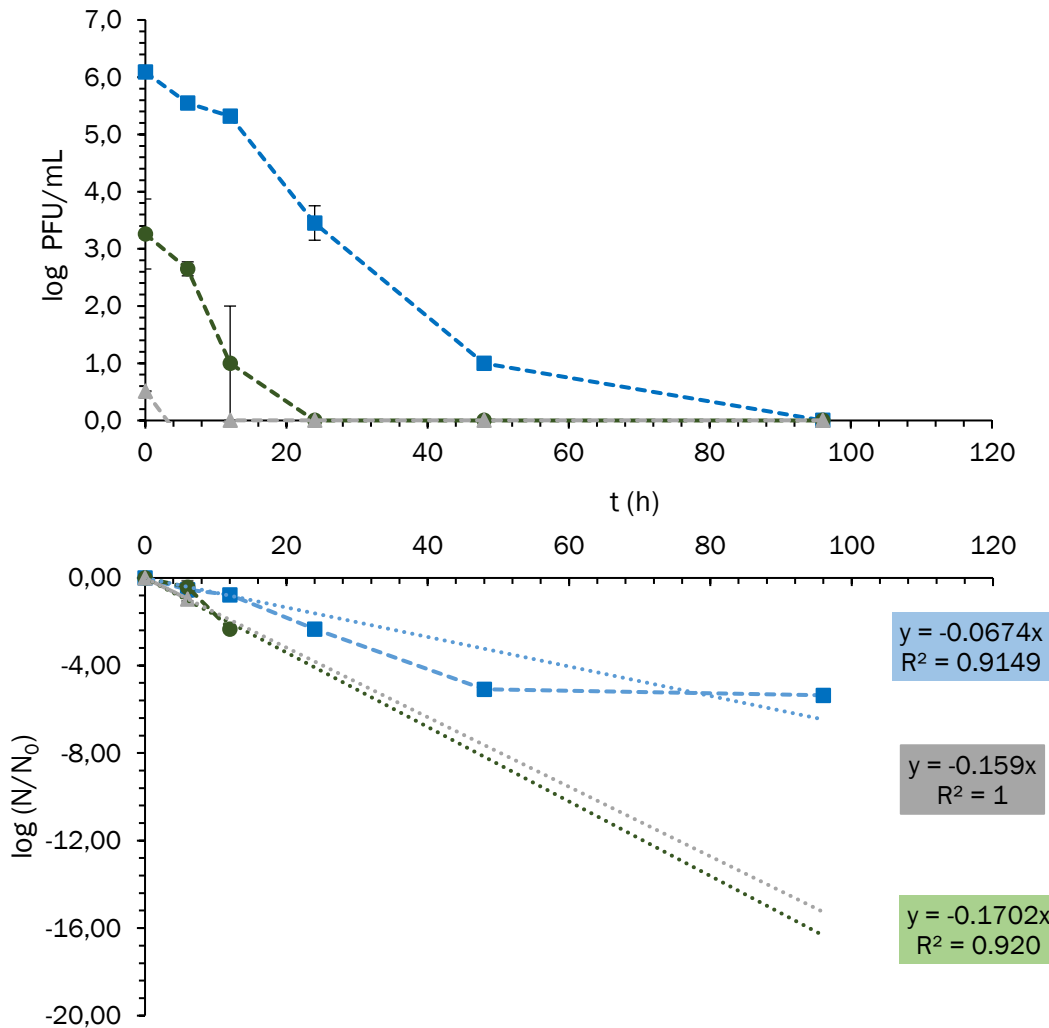


Figura 13 Decaimiento del Phi6 a lo largo del experimento en escala logarítmica (a) y ajuste cinético de los resultados (b), (■ ARS1/ARS2, ■ R1/R2 sólidos, ■ R1/R2 soluble).

Tabla 6 Parámetros cinéticos en la inactivación del Phi6.

		K (h ⁻¹)	T ₉₀ (h)	T ₉₉ (h)	R ²
Phi6 (25 °C)	ARS1/ARS2	0.0674	34.1630	68.3240	0.9149
	R1/R2 soluble	0.1702	13.5287	27.0574	0.9206
	R1/R2 sólido	0.1590	14.4817	28.9633	1.0000

La supervivencia del Phi6, y en general, de los virus con envoltura, es muy variable según lo establecido en la bibliografía y depende estrechamente de la temperatura y la composición del medio [23], será interesante comparar las cinéticas resultantes en este estudio con las sugeridas por otros autores.



Algunos trabajos han aportado unas cinéticas parecidas para la degradación del Phi6 en agua residual bruta, con una $K(h^{-1})=0.317$ (25 °C) y un $T_{90}=7h$ que estarían en el orden de los datos reflejados en la Tabla 6, pero implicando una degradación más rápida [18]. Estos datos aportados por Ye et al [18] se ciñen a la inactivación de virus en el agua residual, con procesos de recuperación viral que alcanzan eficiencias muy elevadas, otros autores que llevaron a cabo esta determinación para el Phi6 en el agua residual han hallado tiempos hasta la inactivación total de $7\pm 0.4h$ (a 25 °C), Mohan et al [55].

Por otro lado, Yang et al [56] observaron el decaimiento de varios virus sobre una matriz con fangos en condiciones semejantes al medio de estudio del reactor (pH de 6.75 ± 0.05 , COT de 64.2 ± 6.19 mg/L y sólidos totales 1.52 ± 0.31 mg/L, valor ligeramente superior al recogido por este estudio). Estos autores reportaron constantes de decaimiento del Phi6, en la fracción soluble y en la fracción sólida respectivamente, de $K(h^{-1})=0.101\pm 0.012$ y $K(h^{-1})=0.245\pm 0.049$, para ensayos realizados también a 25°C. En cuanto a los tiempos de inactivación, Yang et al presentan, para la fracción soluble $T_{90}=23h$ y $T_{99}=45h$ y para la fracción sólida $T_{90}=10h$ y $T_{99}=19h$. Los resultados son similares a los mostrados en la tabla 6, aunque hay que señalar que obtuvieron una cinética más rápida en la fracción sólida. La hipótesis más sensata a la vista de estas diferencias estaría fomentada en la actividad biológica de los biosólidos (el consorcio microbiano será específico de cada investigación) y la elevada concentración de oxígeno bajo la que operó el reactor en el presente trabajo.

Trabajos como el de Bivins et al se centran en la persistencia del SARS-CoV-19 en el agua residual, los resultados que presentan predicen un T_{90} comprendido entre 38.4h y 50.4h [12], es decir un valor muy cercano al tiempo de decaimiento T_{90} de este estudio para los reactores control con agua residual ($T_{90}=34.16$ h).

En el siguiente apartado se contrastarán los resultados de decaimiento observados para el Phi6 con los obtenidos para el MS2, sobre el que hay que matizar nuevamente la ausencia de envoltura vírica.

3.1.3. Evolución del MS2: supervivencia de virus sin envoltura

En relación con la supervivencia del MS2, virus que no presenta envoltura externa, la Figura 14 a y b muestra la evolución del MS2 activo en el control de agua residual, así como en las fracciones soluble y sólida del tratamiento con fangos activos (para R1 y R2). El título inicial sería ligeramente mayor en el control para el primer muestreo, con datos en $t=0h$ de 2.22×10^8 PFU/mL y 2.05×10^8 PFU/mL para el control y el reactor respectivamente, a partir de esto se deduce una recuperación del fago del 86.7% en el control y de 80.1% en el reactor. Sobre el inóculo también se pudo verificar la presencia de colifagos a través del método del doble agar, se halló una concentración de 7.00×10^2 PFU/mL en fase acuosa y una concentración de 2.05×10^3 PFU/mL sobre los sólidos. Estos resultados evidencian la presencia del hospedador *E.coli* en los fangos de depuradora.

Se puede observar como el virus decae algo más rápido en el tratamiento de los fangos activos, aunque será necesario llevar a cabo un ajuste cinético para verificar la eficacia del tratamiento.

En la muestra $t=144\text{h}$ el título del fago MS2 era de 1.335×10^3 PFU/mL (para los controles el valor resultó superior a esta cifra), lo que significa que no se llegó a observar el decaimiento total del MS2 en la experimentación. Se observa que el título viral se estabiliza en los últimos puntos muestrales del experimento y que para el tiempo final de muestreo se recogen los datos: 8.064×10^3 PFU/mL, promedio para el control; y 1.335×10^3 PFU/mL, promedio para el tratamiento aerobio. El cómputo global indica una degradación final del MS2 equivalente a 3.4 logs para el control y 5.2 logs para los fangos activos.

Contrario a lo esperado, se observó un aumento en el título de viriones de MS2 ligados a los sólidos. Esto podría deberse a distintos motivos, principalmente la proliferación virus junto al crecimiento del hospedador en el medio. La *E.coli* presente como parte del consorcio microbiano del reactor puede ser justificación suficiente para el crecimiento viral detectado en los sólidos que está en 1.43 logs. De cualquier forma, los datos en la fracción sólida deben ser tomados con cautela, sobre todo al mostrarse un crecimiento del MS2 en los sólidos que llega a sobrepasar el título en la disolución. Por otro lado, el porcentaje de virus adsorbido sobre los sólidos resulta insignificante en las primeras muestras, mientras que al final del experimento el 88% del MS2 se habría hallado sobre los sólidos. Existen estudios que muestran que el MS2 se adsorbe en menor proporción que el Phi6 a los sólidos en suspensión, con solo un 6% del MS2 en el agua residual se adsorberá a los sólidos [18].

Por otro lado, la Figura 15 presenta el título viral de las muestras aplicando logaritmos (\log PFU/mL). A partir del ajuste de una cinética de primer orden (Figura 15), se calcularon los parámetros cinéticos de decaimiento para la fracción soluble del tratamiento con fangos activos y el control de agua residual, asumiendo una cinética de primer orden (Tabla 7) para el caso. Para este colifago el tratamiento por fangos activos ha supuesto una degradación 1.5 veces más rápida que en el medio solo con agua residual sintética.

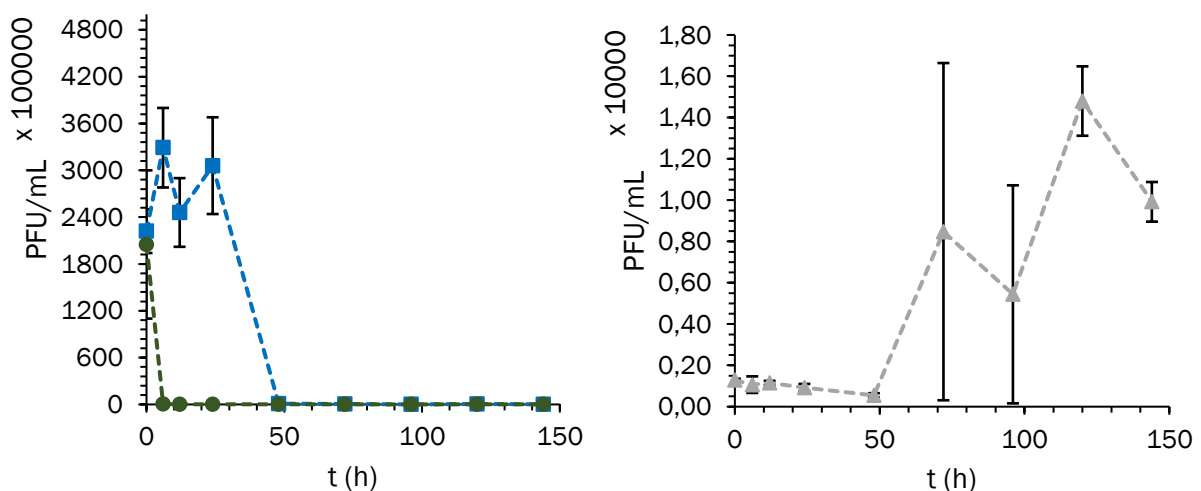


Figura 14 Decaimiento del MS2 en el control (a) y el reactor, tanto la fracción soluble (a) como la fracción líquida (b) (■ ARS1/ARS2, ■ R1/R2 sólidos, ■ R1/R2 soluble).

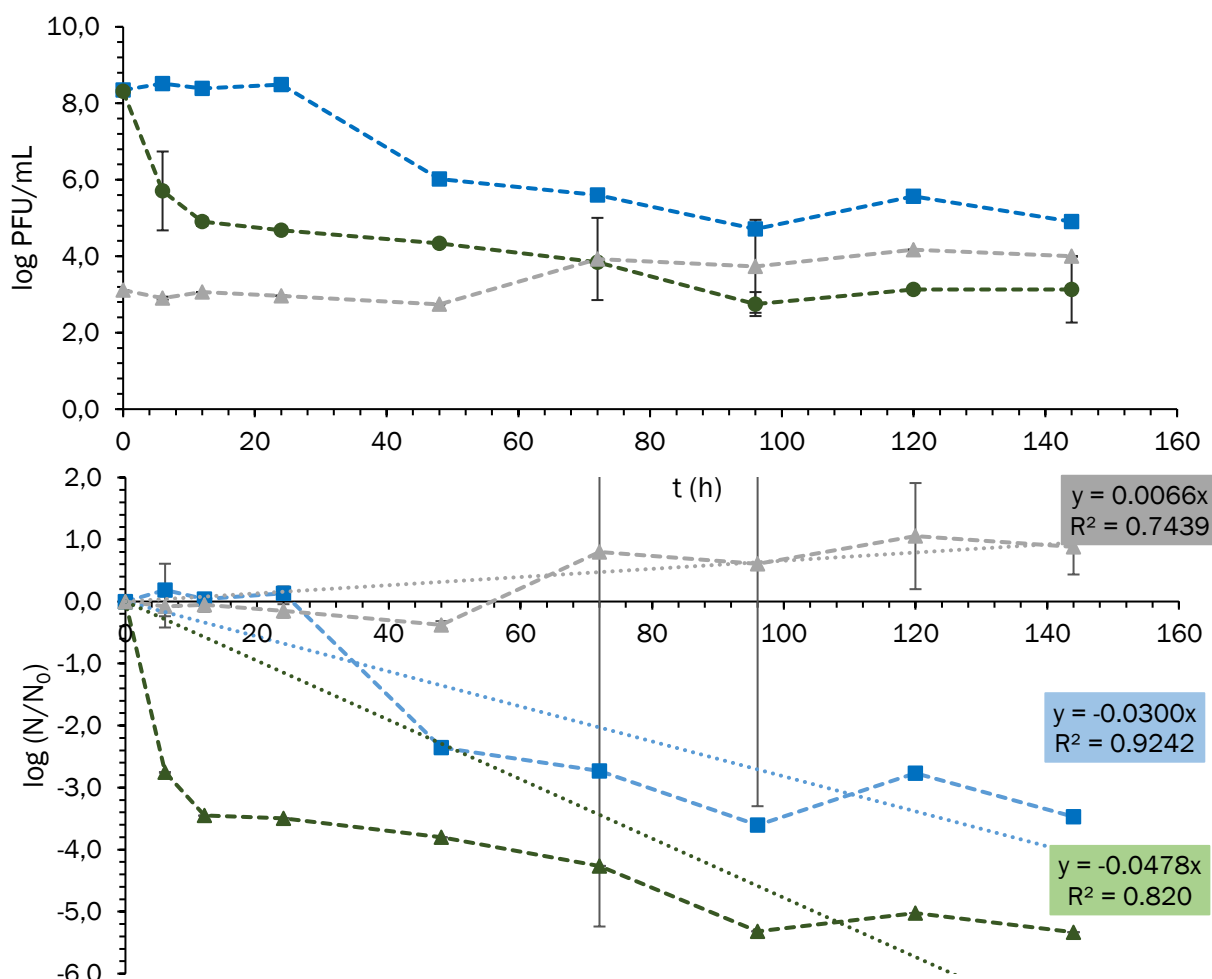


Figura 15 Degradación el MS2 a lo largo del ensayo (a) y ajuste del decaimiento del MS2 a una cinética de primer orden (b), (■ ARS1/ARS2, ▲ R1/R2 sólidos, ● R1/R2 soluble).

Tabla 7 Parámetros cinéticos en la inactivación del MS2.

		K (h ⁻¹)	T ₉₀ (h)	T ₉₉ (h)	R ²
MS2	ARS1/ARS2	0.0300	76.7528	153.5057	0.9277
	R1/R2 soluble	0.0478	48.17124	96.34247	0.8204
	R1/R2 sólido	0.0066	348.8765	697.7531	0.7439

Por otro lado, las tasas de inactivación determinadas en este ensayo, $K(h^{-1})=0.032$ en el caso de ARS1/ARS2 y $K(h^{-1})=0.0478$ para R1/R2, promedios entre los duplicados, se acercan a los aportados por estudios sobre el agua residual (Ye et al [18]) que han encontrado que el MS2 se degrada con una cinética $K(h^{-1})=0.022$, T₉₀ y T₉₉ resultarían entonces 104.66h y 209.33h respectivamente, lo que apunta a una inactivación más lenta del MS2 en el agua residual [18]. Otro estudio por Mohan et al que aborda el decaimiento del MS2 encuentra que la inactivación de este virus en el agua residual requiere de $121 \pm 36h$, a una temperatura de 25°C, un tiempo cercano al T₉₉ antes obtenido [55].



Finalmente, de mayor interés es la comparación con el trabajo de Yang et, como fue ocurrió con el Phi6, que determinó la inactivación del MS2 en condiciones parejas con este estudio. En esta bibliografía se observó un decaimiento para el MS2 que respondía a unas constantes cinéticas a 25°C de $K(h^{-1})=0.021\pm 0.002$ y $K(h^{-1})=0.158\pm 0.005$, para la fracción soluble y la sólida respectivamente. Los tiempos de inactivación serían en el caso de $T_{90}=111h$ y $T_{99}=219h$ (fracción soluble) y $T_{90}=14h$ y $T_{99}=29h$ (fracción sólida). Los resultados, en comparación a los del presente estudio, predicen un decaimiento considerablemente más lento en el medio líquido, en cuanto a los sólidos Yang et al no reportan una proliferación del MS2 en esta fracción [56].

Comparando ahora el comportamiento de los dos virus, MS2 y Phi6, los resultados de este ensayo apuntan a que el virus sin envoltura, el colifago MS2, presenta mayor supervivencia en los entornos examinados. Los mecanismos de degradación de los fagos se relacionan, como se ha podido comprobar, con su adsorción en fangos y biosólidos, sobre los flóculos de bacterias se produce un fenómeno de adsorción reversible que puede contribuir a eliminar una parte importante de virus en el agua residual. En cuanto a los virus en disolución en la fase acuosa, el principal método de eliminación sería a través de predación o por la acción de enzimas en el medio. En la eliminación por predación, los protozoos y los metazoos serían los principales agentes en la inactivación de los viriones [57], [58].

El Phi6 es, con diferencia, el menos resistente de los dos viriones, por lo que a raíz de esto se deduciría que los virus con envoltura se degradan con mayor facilidad en presencia de un medio líquido. La causa de esto radicaría en las discrepancias estructurales que diferencian a los virus encapsulados de los que no presentan envoltura, así la presencia de envoltura afectaría a los mecanismos de inactivación de los virus y por extensión a la supervivencia de los mismos.

Los virus que presentan una envoltura externa al cápside la adquieren a partir de la membrana de fosfolípidos de la bacteria hospedadora y está documentado que al degradarse su envoltura el virus pierde definitivamente su capacidad infecciosa. Esto se debe a que las proteínas de fusión por las que un virus se une a un determinado receptor, logrando así infectar una célula, se encuentran sobre la envoltura del virus, no sería el caso para los virus sin envoltura vírica, que solo presentan las proteínas de fusión sobre su cápside. Lo que sucede entonces, y se ha visto reflejado en los resultados anteriores, es que la envoltura viral (estructura de bicapa lipídica) es menos resistente en comparación al cápside (estructura proteica) que todos los virus presentan, esto se puede concluir para medios con agua residual y fangos de depuradora [23], [59], [60].

Si el tiempo que transcurre para las aguas residuales en el alcantarillado, hasta que comienza su depuración en una EDAR, no supera las 24 horas [18] y el tiempo hidráulico de residencia para los fangos activos está comprendido entre 5 y 36 horas [61], esto supondría que el Phi6 sufriría un decaimiento prácticamente completo en el curso del agua residual y su tratamiento; sin embargo, una fracción importante del MS2 podría conservar su actividad incluso tras el tratamiento aerobio.



4. CONCLUSIONES



En este estudio se evaluó la persistencia de dos bacteriófagos, el Phi6 que infecta *Pseudomonas sp.* y el MS2 que se hospeda sobre la *Escherichia coli*, en medio acuoso mediante dos configuraciones para comparar la resistencia viral sobre una matriz de agua residual sintética y una matriz con fangos aerobios. La comparación se extiende a la diferencias morfológicas, presencia o ausencia de estructura viral, de los virus estudiados y como de determinantes son para la supervivencia de ambos virus. En este caso el Phi presenta una envoltura lipídica en torno a su cápside, y sobre esta las proteínas de fusión que permiten la infección de las células hospedadoras, por parte del MS2 se destaca la ausencia de envoltura, las proteínas de fusión se localizarían sobre la cápside del virus.

Para este trabajo se adaptó el método del doble agar (Protocolo 9224 B de los métodos estándar), la herramienta principal en este estudio que resultó altamente eficiente, aunque laboriosa, y se emplearon diluciones seriadas para la titulación y cuantificación de las muertes de fagos. Empleando estos procedimientos durante el ensayo se obtuvieron datos para el control de agua residual y el reactor de fangos activos, se trabajó con duplicados para ambos montajes, los datos de cada muestra desde el tiempo cero y el último punto del experimento (total 144 horas) fueron analizados y ajustados según una cinética de degradación de orden uno para comparar la evolución de ambos virus.

En primer lugar, de la comparación entre las dos configuraciones, se concluyó que la presencia de fangos activos contribuye a reducir los tiempos de degradación de los fagos. Los resultados respaldan una eliminación 1.59 veces más rápida del MS2 y 2.5 veces más rápida para el Phi6 en el reactor biológico.

Por otro lado, el MS2 resultó notablemente más resistente tanto en el agua residual como en la matriz con sólidos y biosólidos de depuradora, mientras que sobre el Phi6 se observó un decaimiento más rápido. Según los resultados, el decaimiento del Phi6 sería 2.24 veces más rápido en el agua residual sintética y hasta 3.50 veces más rápido en el reactor con fangos aerobio. Se ha encontrado también que una fracción del MS2 podría preservarse activa durante periodos de varios días en el agua residual, incluso a su paso por procesos de tratamiento biológicos. Por parte de Phi6, hay que destacar que los resultados obtenidos lo reafirman como un subrogado apropiado para el SARS-CoV-19, como han expuesto otros autores, resultando tiempos de degradación en el agua residual similares para estos dos virus.

La cuantificación de virus en el agua residual presenta un gran potencial para comprender las posibilidades de eliminación de la contaminación viral en este medio, la cual puede culminar en problemas de salud sobre la población, como es sabido que ocurre con ciertos virus. A mayores, los análisis de contaminación microbiana en el agua residual pueden ofrecer resultados para mejorar los estudio estadísticos que determinan la población afectada por un patógeno viral en un determinado momento. Los trabajos sobre indicadores virales en el agua residual están cobrando relevancia día a día y es necesario seguir investigando sobre los virus en el agua residual y sus subrogados para mejorar la comprensión de la comunidad científica en este campo.



5. BIBLIOGRAFÍA



- [1] «Introducción a la contaminación por aguas residuales», *Reef Resilience Network*. <https://reefresilience.org/management-strategies/wastewater-pollution/wastewater-pollution-introduction/> (accedido 13 de mayo de 2022).
- [2] O. US EPA, «The Sources and Solutions: Wastewater», 12 de marzo de 2013. <https://www.epa.gov/nutrientpollution/sources-and-solutions-wastewater> (accedido 13 de mayo de 2022).
- [3] D. DeSilva *et al.*, «Sustainable management of leakage from wastewater pipelines», *Water Sci. Technol.*, vol. 52, n.º 12, pp. 189-198, dic. 2005, doi: 10.2166/wst.2005.0459.
- [4] E. R. Jones, M. T. H. van Vliet, M. Qadir, y M. F. P. Bierkens, «Country-level and gridded estimates of wastewater production, collection, treatment and reuse», *Earth Syst. Sci. Data*, vol. 13, n.º 2, pp. 237-254, feb. 2021, doi: 10.5194/essd-13-237-2021.
- [5] Whalley, Caroline, «Urban waste water treatment for 21st century challenges — European Environment Agency». <https://www.eea.europa.eu/publications/urban-waste-water-treatment-for> (accedido 13 de mayo de 2022).
- [6] D. Sabev, «Sustainable Development Goals», *International Partnerships - European Commission*, 2 de julio de 2019. https://ec.europa.eu/international-partnerships/sustainable-development-goals_en (accedido 13 de mayo de 2022).
- [7] A. C. Espinosa-García, C. F. Arias-Ortíz, y M. Mazari-Hiriart, «Virus en sistemas acuáticos e implicaciones en salud pública», *Hidrobiológica*, vol. 14, n.º 2, pp. 166-178, 2004.
- [8] S. C. Harrison, «Mechanism of membrane fusion by viral envelope proteins», *Adv. Virus Res.*, vol. 64, pp. 231-261, 2005, doi: 10.1016/S0065-3527(05)64007-9.
- [9] M. V. A. Corpuz *et al.*, «Viruses in wastewater: occurrence, abundance and detection methods», *Sci. Total Environ.*, vol. 745, p. 140910, nov. 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140910.
- [10] M. Baghchechi, N. Jaipaul, y S. E. Jacob, «The rise and evolution of COVID-19», *Int. J. Womens Dermatol.*, vol. 6, n.º 4, pp. 248-254, sep. 2020, doi: 10.1016/j.ijwd.2020.06.006.
- [11] S. Payne, «Family Coronaviridae», *Viruses*, pp. 149-158, 2017, doi: 10.1016/B978-0-12-803109-4.00017-9.
- [12] A. Bivins *et al.*, «Persistence of SARS-CoV-2 in Water and Wastewater», *Environ. Sci. Technol. Lett.*, vol. 7, n.º 12, pp. 937-942, dic. 2020, doi: 10.1021/acs.estlett.0c00730.
- [13] Sílvia Bofill-Mas, Iñar Clemente-Casares, Néstor Albiñana-Giménez, Carlos Maluquer de Motes Porta, Ayalkibet Hundesa Gonfa, y Rosina Girones Llop, «Efectos sobre la salud de la contaminación de agua y alimentos por virus emergentes humanos», 2005.
- [14] Mary Parker, «What is a BSL-3 Lab? Decoding the terms for containing germs», *Eureka, a dose of science*. <https://www.criver.com/eureka/what-bsl-3-lab> (accedido 17 de mayo de 2022).
- [15] R. G. Sinclair, J. B. Rose, S. A. Hashsham, C. P. Gerba, y C. N. Haas, «Criteria for Selection of Surrogates Used To Study the Fate and Control of Pathogens in the Environment», *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, n.º 6, pp. 1969-1977, mar. 2012, doi: 10.1128/AEM.06582-11.
- [16] G. M. String, M. R. White, D. M. Gute, E. Mühlberger, y D. S. Lantagne, «Selection of a SARS-CoV-2 Surrogate for Use in Surface Disinfection Efficacy Studies with Chlorine and Antimicrobial Surfaces», *Environ. Sci. Technol. Lett.*, p. acs.estlett.1c00593, oct. 2021, doi: 10.1021/acs.estlett.1c00593.
- [17] «Virus entéricos», Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2013.
- [18] Y. Ye, R. M. Ellenberg, K. E. Graham, y K. R. Wigginton, «Survivability, Partitioning, and Recovery of Enveloped Viruses in Untreated Municipal Wastewater», *Environ. Sci. Technol.*, vol. 50, n.º 10, pp. 5077-5085, may 2016, doi: 10.1021/acs.est.6b00876.
- [19] A. Chakraborty y A. Diwan, «NL63: A Better Surrogate Virus for studying SARS-CoV-2», p. 9, 2020.
- [20] Md. Alamin, S. Tsuji, A. Hata, H. Hara-Yamamura, y R. Honda, «Selection of surrogate viruses for process control in detection of SARS-CoV-2 in wastewater», *Sci. Total Environ.*, vol. 823, p. 153737, jun. 2022, doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.153737.
- [21] A. Tuñón-Molina, M. Martí, Y. Muramoto, T. Noda, K. Takayama, y Á. Serrano-Aroca, «Antimicrobial Face Shield: Next Generation of Facial Protective Equipment against SARS-CoV-2 and Multidrug-Resistant Bacteria», ago. 2021, doi: 10.20944/preprints202108.0329.v1.
- [22] J. Callanan, S. R. Stockdale, A. Shkoporov, L. A. Draper, R. P. Ross, y C. Hill, «RNA Phage Biology in a Metagenomic Era», *Viruses*, vol. 10, n.º 7, Art. n.º 7, jul. 2018, doi: 10.3390/v10070386.
- [23] N. Aquino de Carvalho, E. N. Stachler, N. Cimabue, y K. Bibby, «Evaluation of Phi6 Persistence and Suitability as an Enveloped Virus Surrogate», *Environ. Sci. Technol.*, vol. 51, n.º 15, pp. 8692-8700, ago. 2017, doi: 10.1021/acs.est.7b01296.



- [24] K. Valegård, L. Liljas, K. Fridborg, y T. Unge, «The three-dimensional structure of the bacterial virus MS2», *Nature*, vol. 345, n.º 6270, pp. 36-41, may 1990, doi: 10.1038/345036a0.
- [25] H. Gelderblom, «Structure and Classification of Viruses», 1996.
- [26] K. Bibby y J. Peccia, «Identification of Viral Pathogen Diversity in Sewage Sludge by Metagenome Analysis», *Environ. Sci. Technol.*, vol. 47, n.º 4, pp. 1945-1951, feb. 2013, doi: 10.1021/es305181x.
- [27] R. García, S. Latz, J. Romero, G. Higuera, K. García, y R. Bastías, «Bacteriophage Production Models: An Overview», *Front. Microbiol.*, vol. 10, 2019, Accedido: 30 de mayo de 2022. [En línea]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.01187>
- [28] K. Sargeant, «Chapter XIV The Deep Culture of Bacteriophage», en *Methods in Microbiology*, vol. 1, J. R. Norris y D. W. Ribbons, Eds. Academic Press, 1969, pp. 505-520. doi: 10.1016/S0580-9517(08)70145-4.
- [29] W. T. Godbey, «Chapter 7 - Cell culture and the eukaryotic cells used in biotechnology», en *Biotechnology and its Applications (Second Edition)*, W. T. Godbey, Ed. Academic Press, 2022, pp. 175-186. doi: 10.1016/B978-0-12-817726-6.00007-1.
- [30] Steward, Karen, «An Introduction to Culturing Bacteria», *from Technology Networks*. <http://www.technologynetworks.com/immunology/articles/an-introduction-to-culturing-bacteria-355566> (accedido 29 de mayo de 2022).
- [31] H. Ahern, «Bacteriological Culture Methods», Accedido: 29 de mayo de 2022. [En línea]. Disponible en: <https://milnepublishing.geneseo.edu/suny-microbiology-lab/chapter/bacteriological-culture-methods/>
- [32] Felix Tovar, «Medios de cultivo», *conalepfelixtovar*, 26 de septiembre de 2012. <https://conalepfelixtovar.wordpress.com/2012/09/26/medios-de-cultivo/> (accedido 4 de julio de 2022).
- [33] Nima Rezaei, «Encyclopedia of Infection and Immunity», 2022.
- [34] «Pure Culture», *Biology LibreTexts*, 11 de mayo de 2017. [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_\(Boundless\)/6%3A_Culturing_Microorganisms/6.4%3A_Microbial_Culture_Methods/6.4B%3A_Pure_Culture](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_(Boundless)/6%3A_Culturing_Microorganisms/6.4%3A_Microbial_Culture_Methods/6.4B%3A_Pure_Culture) (accedido 29 de mayo de 2022).
- [35] S. Uniyal, M. Verma, y S. Parmar, «Chapter 6 - Fungi mediated pollutant degradation and bioelectricity generation: An overview of current status», en *Fungi Bio-Prospects in Sustainable Agriculture, Environment and Nano-technology*, V. K. Sharma, M. P. Shah, S. Parmar, y A. Kumar, Eds. Academic Press, 2021, pp. 101-119. doi: 10.1016/B978-0-12-821925-6.00006-X.
- [36] J. S. Knapp y K. C. A. Bromley-Challoner, «34 - Recalcitrant organic compounds», en *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, D. Mara y N. Horan, Eds. London: Academic Press, 2003, pp. 559-595. doi: 10.1016/B978-012470100-7/50035-2.
- [37] Rodger B. Baird, Andrew D. Eaton, y Eugene W. Rice, *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association; N.º 23 edición (31 julio 2017).
- [38] Ministerio de Obras Públicas, Transportes y Medio Ambiente, *Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto-ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas*, vol. BOE-A-1996-7159. 1996, pp. 12038-12041. Accedido: 19 de marzo de 2022. [En línea]. Disponible en: <https://www.boe.es/eli/es/rd/1996/03/15/509>
- [39] «Wastewater and Sewage Treatment», *Biology LibreTexts*, 3 de julio de 2018. [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_\(Boundless\)/17%3A_Industrial_Microbiology/17.3%3A_Wastewater_Treatment_and_Water_Purification/17.3B%3A_Wastewater_and_Sewage_Treatment](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_(Boundless)/17%3A_Industrial_Microbiology/17.3%3A_Wastewater_Treatment_and_Water_Purification/17.3B%3A_Wastewater_and_Sewage_Treatment) (accedido 8 de junio de 2022).
- [40] H. N. Tran *et al.*, «SARS-CoV-2 coronavirus in water and wastewater: A critical review about presence and concern», *Environ. Res.*, vol. 193, p. 110265, feb. 2021, doi: 10.1016/j.envres.2020.110265.
- [41] M. Ji, Z. Liu, K. Sun, Z. Li, X. Fan, y Q. Li, «Bacteriophages in water pollution control: Advantages and limitations», *Front. Environ. Sci. Eng.*, vol. 15, n.º 5, p. 84, dic. 2020, doi: 10.1007/s11783-020-1378-y.
- [42] P. M. Gundy, C. P. Gerba, y I. L. Pepper, «Survival of Coronaviruses in Water and Wastewater», *Food Environ. Virol.*, vol. 1, n.º 1, p. 10, 2009, doi: 10.1007/s12560-008-9001-6.
- [43] Vogel, Gretchen, «Pandemic signals from the sewer—what virus levels in wastewater tell us», 9 de julio de 2022. <https://www.science.org/content/article/pandemic-signals-sewer-what-virus-levels-wastewater-tell-us> (accedido 8 de junio de 2022).
- [44] V. Runa, J. Wenk, S. Bengtsson, B. V. Jones, y A. B. Lanham, «Bacteriophages in Biological Wastewater Treatment Systems: Occurrence, Characterization, and Function», *Front. Microbiol.*, vol. 12, 2021,



- Accedido: 8 de junio de 2022. [En línea]. Disponible en:
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2021.730071>
- [45] Z. Aghalari, H.-U. Dahms, M. Sillanpää, J. E. Sosa-Hernandez, y R. Parra-Saldívar, «Effectiveness of wastewater treatment systems in removing microbial agents: a systematic review», *Glob. Health*, vol. 16, n.º 1, p. 13, feb. 2020, doi: 10.1186/s12992-020-0546-y.
- [46] «DSMZ product *Pseudomonas* sp. DSM 21482». <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-21482> (accedido 11 de junio de 2022).
- [47] «DSMZ product *Escherichia coli* DSM 5695». <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-5695> (accedido 11 de junio de 2022).
- [48] O. Frutos, G. Quijano, R. Perez, y R. Muñoz, «Simultaneous biological nitrous oxide abatement and wastewater treatment in a denitrifying off-gas bioscrubber», *Chem. Eng. J.*, vol. 288, dic. 2015, doi: 10.1016/j.cej.2015.11.088.
- [49] M. F. Espinosa *et al.*, «Reduction and partitioning of viral and bacterial indicators in a UASB reactor followed by high rate algal ponds treating domestic sewage», *Sci. Total Environ.*, vol. 760, p. 144309, mar. 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144309.
- [50] Ritter, Joseph, *American Water Works Association, Water Quality - Principles and Practices of Water Supply Operations, Volume 4-American Water Works Association*. 2010.
- [51] Emma Haun, Katharina Ulbricht, Karl-Heinz Rosewinkel, y Regina Nogueira, «Virus elimination in activated sludge systems: from batch tests to mathematical modeling».
- [52] R. Hreiz, M. A. Latifi, y N. Roche, «Optimal design and operation of activated sludge processes: State-of-the-art», *Chem. Eng. J.*, vol. 281, pp. 900-920, dic. 2015, doi: 10.1016/j.cej.2015.06.125.
- [53] K. Soetaert, A. F. Hofmann, J. J. Middelburg, F. J. R. Meysman, y J. Greenwood, «The effect of biogeochemical processes on pH», *Mar. Chem.*, vol. 105, n.º 1, pp. 30-51, abr. 2007, doi: 10.1016/j.marchem.2006.12.012.
- [54] S. Rigopoulos y P. Linke, «Systematic development of optimal activated sludge process designs», *Comput. Chem. Eng.*, vol. 26, n.º 4, pp. 585-597, may 2002, doi: 10.1016/S0098-1354(01)00782-7.
- [55] S. V. Mohan, M. Hemalatha, H. Kopperi, I. Ranjith, y A. K. Kumar, «SARS-CoV-2 in environmental perspective: Occurrence, persistence, surveillance, inactivation and challenges», *Chem. Eng. J.*, vol. 405, p. 126893, feb. 2021, doi: 10.1016/j.cej.2020.126893.
- [56] W. Yang, C. Cai, y X. Dai, «Interactions between virus surrogates and sewage sludge vary by viral analyte: Recovery, persistence, and sorption», *Water Res.*, vol. 210, p. 117995, feb. 2022, doi: 10.1016/j.watres.2021.117995.
- [57] T.-D. Kim y H. Unno, «The roles of microbes in the removal and inactivation of viruses in a biological wastewater treatment system», *Water Sci. Technol.*, vol. 33, n.º 10, pp. 243-250, ene. 1996, doi: 10.1016/0273-1223(96)00426-X.
- [58] Y. Zhu, R. Chen, Y.-Y. Li, y D. Sano, «Virus removal by membrane bioreactors: A review of mechanism investigation and modeling efforts», *Water Res.*, vol. 188, p. 116522, ene. 2021, doi: 10.1016/j.watres.2020.116522.
- [59] B. Anderson-Coughlin y K.E. Kniel, «Why are viruses with an envelope less stable on surfaces and more susceptible to disinfectants than viruses without an envelope?» Department of Animal and Food Science University of Delaware.
- [60] A. I. Silverman y A. B. Boehm, «Systematic Review and Meta-Analysis of the Persistence and Disinfection of Human Coronaviruses and Their Viral Surrogates in Water and Wastewater», *Environ. Sci. Technol. Lett.*, p. acs.estlett.0c00313, may 2020, doi: 10.1021/acs.estlett.0c00313.
- [61] M. Petrovic, S. Pérez, y D. Barcelo, «Chapter 21 - Conclusions and Future Research Needs», en *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. 62, M. Petrovic, D. Barcelo, y S. Pérez, Eds. Elsevier, 2013, pp. 705-718. doi: 10.1016/B978-0-444-62657-8.00021-5.