

CINÉTICA DE PRD1 EN UN PANTANO CONSTRUIDO DE FLUJO SUBSUPERFICIAL

JUAN A. VIDALES CONTRERAS*, RIGOBERTO GONZÁLEZ GONZÁLEZ*, HUMBERTO RODRÍGUEZ FUENTES*

El mayor número de muertes a nivel mundial se debe a las enfermedades gastrointestinales causadas por virus entéricos, comúnmente transmitidos por agua contaminada con heces fecales. Una vez liberados al ambiente por personas enfermas, en concentraciones hasta de 10^{11} partículas virales por gramo de heces fecales, los virus entéricos pueden contaminar cuerpos de agua superficiales o subterráneas y posteriormente causar enfermedades tales como: diarrea, hepatitis A y E, meningitis, poliomielitis, fiebre, y gastroenteritis,¹ entre la población.

Los pantanos construidos son una tecnología emergente de bajo costo para el tratamiento de aguas residuales. Estos ecosistemas son capaces de reducir la carga viral del agua residual filtrándola a través de una cama de grava enraizada con vegetación hidrófita. Sin embargo, se reconoce que su diseño enfrenta imprecisiones que pueden hacer variar ampliamente la eficiencia de remoción de los contaminantes presentes en el agua residual.

Los estudios realizados sobre transporte, sobrevivencia y remoción de virus en pantanos construidos son escasos. Gersberg y cols.² encontró que el 99 % de colifagos nativos fueron removidos en un pantano construido de flujo subsuperficial (PCFSS). Vinluan³ observó, en el mismo tipo de sistemas, 90 % de decaimiento de la carga inicial de MS2 (Male Specific 2, su nombre en inglés), PRD1, y colifagos nativos después de 3.67, 13.38, y 2.05 días, respectivamente. Sólo Chendorain y cols.⁴ analizaron la remoción de virus a través de un estudio de trazadores en pantanos construidos de flujo superficial (PCFS) usando MS2. Sus resultados mostraron que la tasa de remoción varió de 0.076 a 5.81 d^{-1} , siendo considerablemente alta cerca del influente.

Las pruebas de trazadores son la mejor opción para determinar el tiempo de detención y la cantidad de mezcla de los pantanos construidos. Además, permiten modelar el movimiento de los contaminantes y formular criterios para la construcción de estos ecosistemas. La aplicación de modelos como el de convección-dispersión en el diseño de pantanos construidos es potencialmente posible; sin embargo, se carece de información sobre el grado de dispersión de los contaminantes y sus tasas de decaimiento.

El presente artículo se basa en estudios realizados por Vidales,⁵ y reporta la simulación del movimiento de un trazador conservativo y PRD1 (virus modelo) en pantanos construidos en el Desierto de Sonora.

Materiales y métodos

Virus modelo

PRD1 toma su nombre por ser un bacteriófago específico del plásmido RP1, que pertenece al grupo de plásmidos P, con una doble cadena de ADN.⁶ El virus es de 62 nm de tamaño e isoeléctrico a un pH entre 3 y 4. Similar al rotavirus humano,⁷ presenta una membrana lípido-proteica bajo la cápsula proteínica. Diferentes investigadores han usado este virus como modelo en estudios conducidos en suelos y acuíferos,⁸ ya que su medida es similar a adenovirus y rotavirus.

*Facultad de Agronomía, Laboratorio de Remediación Ambiental, UANL. Carretera Zuazua-Marín km 17.5, Marín N.L. México. javidalesc@hotmail.com

Producción y cuantificación de PRD1

El virus fue obtenido del Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad de Arizona y replicado por el método de doble capa⁹ usando *Salmonella typhimurium* como huésped. El virus fue cosechado de la superficie del agar, añadiendo 6 ml de solución buffer-salina por caja petri. Esta suspensión fue añadida, posteriormente, al inicio del experimento, en el influente del pantano para trazar el virus. Las muestras colectadas durante el estudio fueron ensayadas para PRD1 usando el método anterior.

Sitio de estudio

El sitio de estudio (figura 1) fue descrito por Vidales.⁵ Brevemente, el pantano es de flujo subsuperficial, localizado en las Instalaciones de Investigación de Ecosistemas Construidos (CERF, por sus siglas en inglés) en Tucson AZ., USA, es de sección transversal trapezoidal, e impermeabilizado inferior y lateralmente con plástico. Mide 8.2 m en la parte superior, 61 m de largo, y 0.9 m de profundidad. El volumen

poroso estimado de la cama de grava antes de la plantación fue 153 m³ representando 40 % del volumen total. Una tubería con varias aberturas, controladas manualmente, introduce el efluente secundario, libre de cloro, que proviene de las instalaciones para tratamiento de aguas residuales municipales de la Carretera Roger (The Roger Road Municipal Wastewater Treatment Facility, su nombre en inglés). En la descarga, el agua sale del sistema al cubrir un tubo vertical de 0.19 m de diámetro. La flora emergente consiste principalmente de: *Populus fremontii*, *Salix nigra*, *Salix exigua*, *Plantanus wrightii*, *Chilopsis linearis*, *Baccharis glutinosa*, *Scirpus olneyi*, *Typha domingensis*, *Anemopsis californica*, y *Arundo donax*.

Adición de los trazadores y muestreo

En marzo 26 del 2000, 20 litros de suspensión fueron preparados mezclando 838 g de NaBr y 100 ml de PRD1, a una concentración de 1.2×10^{11} unidades formadoras de placa (ufp) ml⁻¹, en agua residual. La suspensión fue añadida en el influente durante un periodo de 1.5 h. El gasto de entrada du-

Secciones verticales

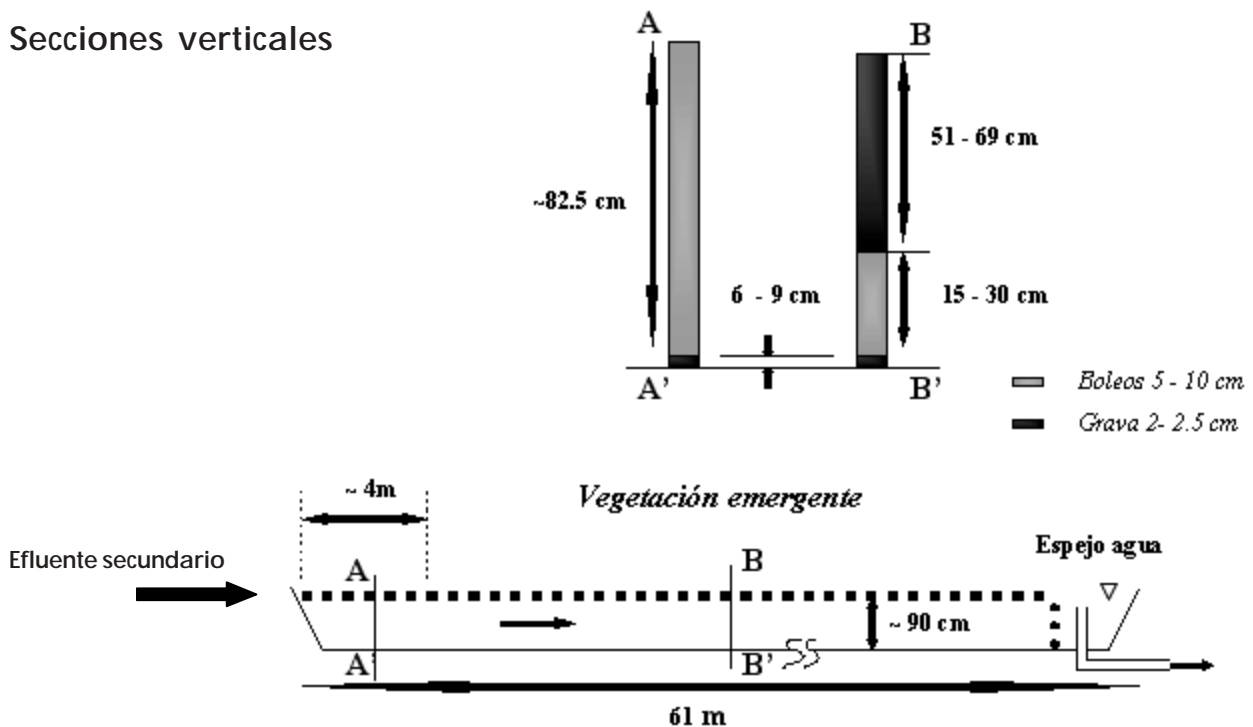


Fig. 1.- Representación esquemática del pantano construido donde fue realizada la prueba de trazadores mostrando su estratificación vertical, en los primeros 4 (A-A') y los siguientes 52 m (B-B') a partir del influente, y su sección transversal longitudinal.

rante la inyección fue $0.9 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ por lo que la concentración del pulso añadido (C_0) fue 468 mg L^{-1} de Br⁻ y $9.3 \times 10^6 \text{ ufp ml}^{-1}$ de PRD1. Las muestras fueron colectadas cada 3 h y el gasto medido tres veces al día en la descarga y continuamente en el influente. El agua colectada fue mantenida en hielo y transportada al laboratorio en la Universidad de Arizona. Un cromatógrafo de iones (Dionex 2020i; Sunnyvale, CA) fue usado para analizar Br⁻ en las muestras colectadas.

Simulación

La Ecuación de convección-dispersión (ECD) ha sido tradicionalmente aplicada en la predicción del desplazamiento de solutos en diversos sistemas acuáticos.^{10, 11} La ecuación parcial diferencial en forma unidimensional para un contaminante con absorción irreversible o biodegradable es la siguiente:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - v \frac{\partial C}{\partial x} - \kappa C \quad (1)$$

Donde C es concentración, D el coeficiente de dispersión, x distancia desde el origen, v velocidad de convección, y κ coeficiente de decaimiento. Para un trazador conservativo κ es igual a cero. Una solución analítica asumiendo una inyección instantánea homogéneamente distribuida en $x = 0$ y $t = 0$ bajo las siguientes condiciones iniciales y de frontera:

$$\begin{aligned} C(x, 0) &= 0 \\ C(0, t) &= \frac{m}{Ac v} \delta(t) \\ C(\infty, t) &= 0 \end{aligned}$$

se expresa como: (2)

Donde: m es la masa introducida en el sistema (kg para Br⁻ y ufp para PRD1), Ac es el área efectiva transversal al flujo de agua (m^2), y α es un coeficiente de conversión.

Análisis de momentos

El balance de masa fue calculado con el momento cero de la Función de Tiempo-Concentración (FTC) observada en la descarga del pantano:

(3)

donde: M_0 es la cantidad de trazador recobrado en la descarga (Kg o ufp), b es un factor de conversión, Q es el gasto promedio al final del sistema durante el experimento ($\text{m}^3 \text{ min}^{-1}$), t es tiempo en días y C la concentración en mg L^{-1} o ufp ml^{-1} . El primer momento normalizado de FTC observada es:

(4)

$$t_d = \frac{\int_0^\infty t C(t) dt}{\int_0^\infty C(t) dt}$$

donde: t_d es el primer momento normalizado o el tiempo de detención del sistema en días. Introduciendo la Ec. 2 en la Ec. 4 pueden obtenerse las siguientes ecuaciones:

(5)

$$t_d = \frac{x}{v} \left(1 + \frac{2D}{vx} \right)$$

la cual estima el tiempo de detención del sistema si D y v son conocidos. Mientras que la siguiente expresión proporciona el primer momento para PRD1:¹⁰

(6)

$$t_d = \frac{1 + 2 \left(\frac{v^2}{4D} + k \right)^{1/2} \left(\frac{x^2}{4D} \right)^{1/2}}{2 \left(\frac{v^2}{4D} + k \right)}$$

Resultados

Tasas de flujo y evaporación

Los gastos promedio de entrada ($0.9 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$) y salida ($0.66 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$) mostraron una pequeña variación estándar, 0.11 en el influente y 0.17 en el efluente. Las pérdidas por evaporación fueron estimadas en 26 % del gasto promedio de entrada.

Trazador conservativo

La masa recobrada de Br⁻ fue calculada mediante

la Ec. 3 después de extrapolar la FTC, observada en la descarga, a la concentración de Br en el efluente antes de la inyección de los trazadores (0.55 mg L^{-1}). La masa recobrada fue estimada en 488 g representando el 75 % de la cantidad añadida inicialmente al sistema.

Reducción de PRD1

La concentración promedio de bacteriófagos que infectan el huésped de PRD1 en el influente, antes del inicio de la prueba de trazadores, fue 119 ufp ml^{-1} , fluctuando en un rango de 104 a 150 ufp ml^{-1} . El virus fue principalmente observado durante las etapas iniciales de la FTC para Br en la descarga del sistema (figura 2). La línea vertical discontinua indica el área correspondiente al 10 % de masa recobrada para Br después de 3.2 d^{-1} de la inyección de los

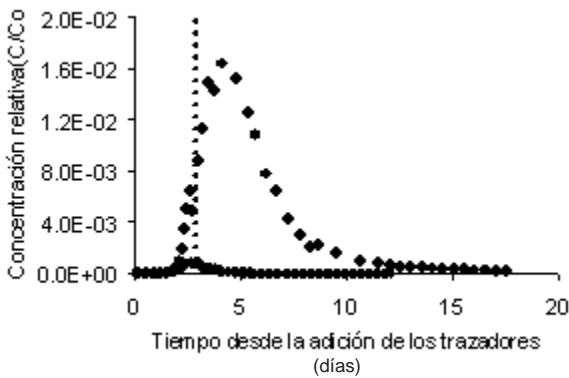


Fig. 2.- Función de tiempo concentración para Br (●●●) y PRD1 (■) observada en la descarga del pantano construido bajo estudio. C_0 es la concentración del pulso añadido (468 mg L^{-1}).

trazadores. A este tiempo, 65 % de PRD1, observado en la descarga, ya había sido recobrado. Presumiblemente, esta fracción del virus tuvo una baja tendencia a ser absorbida. La estratificación del filtro de grava del pantano sugiere que la capa de boleos es la región del sistema con un tiempo de retención más corto, donde PRD1 fue removido ineficientemente.

Modelación

La simulación fue realizada en Mathcad profesional 2000 (Mathsoft, Cambridge MA), mediante el método de mínimos cuadrados, calibrando la ECD a

las concentraciones de Br y PRD1 observadas. Los 488 g de Br recobrados al final del sistema fueron incorporados en la Ec. 2 para calcular A_c , D_i y v . Estos valores y la cantidad de PRD1 añadida al pantano ($1.2 \times 10^{13} \text{ ufp}$) fueron entonces usados para modelar la FTC para PRD1 y obtener k . La bondad de ajuste puede ser observada en las figuras 3 y 4.

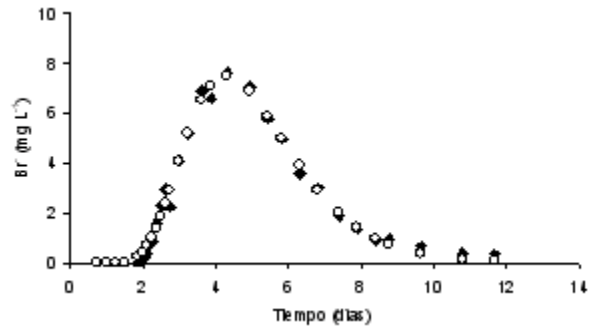


Fig. 3.- Bondad de ajuste de la ECD (o) a los datos observados de Br (◆) en la descarga del pantano construido.

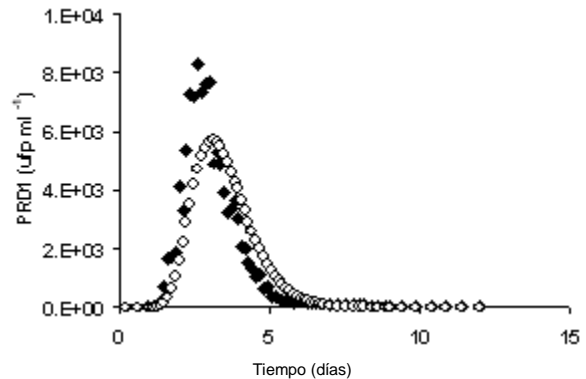


Fig. 4.- Bondad de ajuste de la ECD (o) a los datos observados de PRD1(◆) en la descarga del pantano construido.

La tabla I reporta los parámetros de transporte estimados por medio de la simulación realizada y la tabla II el primer momento para la curva de concentración observada y la simulada.

Discusión

El único estudio reportado sobre la estimación de parámetros de transporte y tasas de decaimiento, mediante la modelación del transporte de un virus modelo fue realizada por Chendorain y cols.⁴ en PCFS, usando MS2 como trazador viral. Este estudio fue conducido en un pantano de $70 \times 15.5 \times 0.46$

Tabla I. Parámetros de transporte estimados durante la simulación.

Trazador	Ac (m ²)	D (m ² d ⁻¹)	V (m ² d ⁻¹)	k (d ⁻¹)
Br	1.41	38.36	12.21	
PRD1				0.96

Tabla II. Estimación del primer momento (t_{gr} , días) para los datos observados y la curva obtenida por simulación.

Trazador	Distribución	
	Observada	Simulada
Br	5.56	5.07
PRD1	3.22	3.51

m. Los parámetros promedio estimados para D y v fueron $130 \pm 47 \text{ m}^2 \text{ d}^{-1}$ y $8.1 \pm 2.5 \text{ m d}^{-1}$, respectivamente, k fue dependiente de la posición en el pantano alcanzando valores de más de 2.24 d^{-1} en los primeros 3 m. La k promedio fue de $0.35 \pm 0.19 \text{ d}^{-1}$. Es importante señalar que el tiempo de detención para MS2 fue $3.9 \pm 0.3 \text{ d}$ el cual es muy similar a los 3.22 d (tabla II) para PRD1 estimados con la Ec. 4 en el presente estudio; sin embargo, k fue hasta seis veces mayor que la calculada por Chendorain y cols.⁴ y 15 % menor que la tasa de remoción calculada por Gersberg y cols. para bacteriófagos nativos. La remoción total fue 98.26% siendo comparable al 99% reportado por Gersberg y cols.² en un PCFSS. En el mismo tipo de sistema Thurston¹³ reportó 83% de remoción para virus entéricos humanos.

La Ec. 2 usada en esta simulación fue capaz de predecir adecuadamente las concentraciones observadas de PRD1, a pesar de que la construcción del pantano sugiere un modelo de dos regiones el cual no fue usado por el mayor número de variables a ser calibradas. La Ec. 6 planteada por Warrick¹² para la estimación del primer momento de PRD1 fue 0.29 d mayor que la estimación realizada con la Ec. 4 para PRD1.

Conclusiones

Los resultados del presente estudio muestran que la ecuación de convección-dispersión puede ser usada en el diseño de pantanos construidos de flujo subsu-

perficial, y que la remoción de PRD1 puede ser mayor que las remociones reportadas para enterovirus humanos en estos ecosistemas. Es importante señalar que la FTC para PRD1 no mostró retardación, lo cual sugiere que su absorción es irreversible. Los pantanos construidos ofrecen una alternativa en el tratamiento de aguas residuales capaz de reducir la carga viral hasta en un 99 %.

Agradecimiento

El autor desea agradecer el apoyo financiero proporcionado por: Tucson Water, United States Environmental Protection Agency, CONACYT y al Programa de Apoyo para la Investigación Científica y Tecnológica, PAICYT CA531-01.

Resumen

La ecuación de convección-dispersión fue usada para modelar el movimiento de PRD1 y Br- en un pantano construido de flujo subsuperficial localizado en el Desierto de Sonora. La tasa de decaimiento de PRD1 estimada mediante modelación fue de 0.96 d^{-1} para una remoción total de la carga viral de un 98.26 %. El coeficiente de dispersión, la velocidad convectiva, y el área efectiva de flujo obtenidas mediante la modelación del trazador conservativo describieron adecuadamente el desplazamiento del virus en el pantano. Los pantanos construidos representan una tecnología para tratar aguas residuales municipales con capacidad de reducir la carga viral hasta en un 98 %.

Palabras clave: Pantanos construidos, Modelación, Agua residual, Bacteriófagos, PRD1.

Abstract

The convection-dispersion equation was used for modeling transport of PRD1 and Br- in a constructed subsurface flow wetland located in the Sonoran Desert. PRD1 decay rate was estimated to be 0.96 d^{-1} for a total removal of 98.26 %. Convective velocity, dispersion coefficient, and effective cross-sectional area estimated by modeling of observed Br- concentrations were capable of simulating PRD1 movement in the wetland. Constructed wetlands represent a wastewater treatment technology capable of reducing influent viral concentrations up to 98 %.

Keywords: Constructed wetlands, Modeling, Wastewater, Bacteriophage, PRD1.

Referencias

1. Rusin P., C.E. Enríquez, D. Johnson y C.P. Gerba. 2000. Environmentally Transmitted Pathogens. In *Environmental Microbiology* (Edited by Maier R. M., Pepper I.L. y Gerba C. P.) pp 447-489. Academic Press, San Diego, CA.
2. Gersberg R. M., S. R. Lyon, R. Brenner y B. V. Elkins. 1987. Fate of viruses in artificial wetlands. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 731-736.
3. Vinluan E. A. 1996. Survival of microbial indicators in constructed wetlands. Thesis Department of *Soil, Water, and Environmental Science*. University of Arizona, Tucson, AZ., p. 65.
4. Chendorain M., M. Yates y F. Villegas. 1998. The fate and transport of viruses through surface water constructed wetlands. *J. Environ. Qual.*, 27, 1451-1458.
5. Vidales-Contreras J.A. 2001. Removal of viruses and pollution indicators in constructed wetlands. Dissertation, Department of *Soil, Water and Environmental Science*. University of Arizona, Tucson AZ.
6. Olsen R.H., J. Siak y R. Gray. 1974. Characteristics of PRD1, a plasmid-dependent broad host range DNA bacteriophage. *J. Virol.*, 14, 689-699.
7. Caldentey J., J.K.H. Bamford y D. H. Bamford. 1990. Structure and Assembly of bacteriophage PRD1, an *Escherichia coli* virus with a membrane. *J. Struc. Biol.*, 104, 44-51.
8. Powelson D.K. y C.P. Gerba. 1994. Virus removal from sewage effluent during saturated and unsaturated flow through soil columns. *Wat. Res.*, 28, 2175-2181.
9. Adams, M.H. 1959. Bacteriophage. Interscience Publishers, Inc., New York.
10. Warrick A.W. 2001. Comunicación personal, University of Arizona, USA.
11. Jury, W.A., W. R. Gradner, y W. H. Gardner 1991. *Soil Physics*. John Wiley and Sons, N.Y.
12. Schwarzenbach, R.P., P. M. Gschwend y D. M. Imboden 1993. *Environmental Organic Chemistry*. John Wiley and Sons, N.Y.
13. Thurston J.A. 1997. Fate of pathogenic and indicator microorganisms in two subsurface multi-species constructed wetlands. Thesis, Department of *Soil, Water, and Environmental Science*. University of Arizona, Tucson AZ.