
TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en biología

“Microorganismos patógenos en suelos agrícolas regados con aguas depuradas”

“Pathogenic microorganisms in agricultural soils irrigated with treated wastewaters”

Rubén Ayoze Viera Santana

Tutores:

Francisco Javier Díaz Peña

Jacob Lorenzo Morales

Septiembre 2018

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS	5
3.1. Descripción del sitio de estudio.....	5
3.2. Muestreo y caracterización físico-química de las aguas	7
3.3. Muestreo y caracterización físico-química de los suelos.....	9
3.4. Muestreo y análisis microbiológico de las aguas	11
3.4.1. Bacterias patógenas	12
3.4.2. Amebas de vida libre	13
3.5. Muestreo y análisis microbiológico de los suelos	15
3.5.1. Bacterias patógenas	15
3.5.2. Amebas de vida libre	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
4.1. Resultados de los análisis microbiológicos de las aguas de riego.....	16
4.1.1. Bacterias patógenas	16
4.1.2. Amebas de vida libre	18
4.2. Resultados de los análisis microbiológicos de los suelos.....	19
4.2.1. Bacterias patógenas	19
4.2.2. Amebas de vida libre.....	21
5. CONCLUSIONES	26
6. BIBLIOGRAFÍA	29

RESUMEN

La reutilización de agua depurada (AD) constituye una opción para aliviar la presión sobre la explotación de las reservas de agua dulce y permitir la agricultura en regiones áridas y semiáridas. La principal desventaja del empleo de AD es el riesgo asociado a la presencia de microorganismos patógenos. En el presente estudio se analizó la presencia de bacterias patógenas y amebas de vida libre (AVL) en 12 muestras de dos tipos de suelos (*Typic Haplocambids* y *Typic Torrifuvents*) de diferente textura que son regados con dos clases de aguas: un recurso hídrico convencional como es el agua subterránea (AS), y AD. El objetivo fue evaluar el riesgo clínico asociado a la reutilización de AD en el sector agrícola de Fuerteventura. Los resultados muestran que el AD de entrada de los tanques de almacenamiento contienen la mayor carga bacteriana, si bien el AD y AS de salida presenta un mayor contenido de bacterias y AVL que las aguas de entrada, indicando contaminación de los mismos. Se determinó también que el contenido y la diversidad de bacterias patógenas en los suelos regados con AD es superior que aquellos regados con AS, presentando una tendencia a la disminución del número de UFC por gramo de suelo con la profundidad. Además, las AVL están presentes en todas las muestras, incluso en los suelos no regados. *Acanthamoeba* es el género más frecuente.

PALABRAS CLAVE: agua depurada, bacterias, amebas de vida libre, patógenos, suelos.

ABSTRACT

The reuse of treated wastewater (TWW) is an option to relieve pressure on the exploitation of freshwater reserves and allow agriculture in arid and semi-arid regions. The main disadvantage of the use of TWW is the risk associated with the presence of pathogenic microorganisms. In the present study, the presence of pathogenic bacteria and free-living amoebas (FLA) was analyzed in 12 samples of two types of soils (*Typic Haplocambids* and *Typic Torrifuvents*) of different texture that are irrigated with two kinds of water: a conventional water resource which is the groundwater (GW), and TWW. The objective was evaluating the clinical risk associated with the reuse of TWW in the agricultural sector of Fuerteventura. Results show that the TWW output of the

storage tanks contain the highest bacterial load, while the TWW and GW output has a higher content of bacteria and FLA than the input waters, indicating contamination. It was also determined that content and diversity of pathogenic bacteria in soils irrigated with TWW is higher than those irrigated with GW, showing a tendency to decrease the number of CFU per gram of soil with depth. In addition, FLA are present in all soil samples, even in non-irrigated soils. *Acanthamoeba* is the most frequent genus.

KEYWORDS: treated wastewater, bacteria, free-living amoebae, pathogens, soils.

1. INTRODUCCIÓN

La escasez de agua dulce constituye a nivel global un problema en alza acrecentado por el continuo incremento de la población humana y de las necesidades hídricas asociadas al desarrollo agrícola e industrial (Hess et al., 2015). Se estima que solamente las actividades agrícolas son responsables de aproximadamente el 70 % del consumo total de agua dulce en el planeta (Hess et al., 2015). La utilización de aguas de calidad marginal (p.ej. aguas depuradas, aguas subterráneas salinas, aguas de drenaje agrícola, etc.) constituye una opción para aliviar la presión sobre las reservas de agua dulce, y permitir a su vez el desarrollo agrícola en regiones áridas y semiáridas (Dolnicar & Hurlimann, 2009). El agua depurada (AD) o regenerada, procedente de la depuración de excedentes tras su uso doméstico y/o industrial representa uno de los tipos de recursos hídricos no convencionales con mayor potencial para uso en regadío (Belhaj et al., 2016).

A pesar de la necesidad de reutilización del AD, en España el volumen reutilizado alcanza únicamente el 8,8 % del total anual generado, del cual un 41 % es destinado al sector agrícola para su uso en regadío (Figura 1). Canarias por su parte, es una de las comunidades autónomas que cuenta con uno de los porcentajes más bajos de reutilización (2,6 %) a pesar de ser un territorio con una amplia distribución de zonas áridas y semiáridas con gran limitación de recursos hídricos convencionales. La isla de Fuerteventura, por ejemplo, localizada en el margen oriental de las Islas Canarias, constituye una de las regiones más áridas de la Unión Europea, presentando una marcada escasez de recursos hídricos que ha conducido, entre otros factores, a un

abandono del 92 % de las tierras arables a lo largo de las pasadas décadas (Dorta-Santos et al., 2014). En esta isla el sector hostelero, actualmente la más importante fuente de ingresos, supone una elevada producción de AD, aproximadamente unos $15 \times 10^6 \text{ m}^3$ anuales, de los cuales sólo un 9 % se emplea para el riego agrícola (Dorta-Santos et al., 2014).

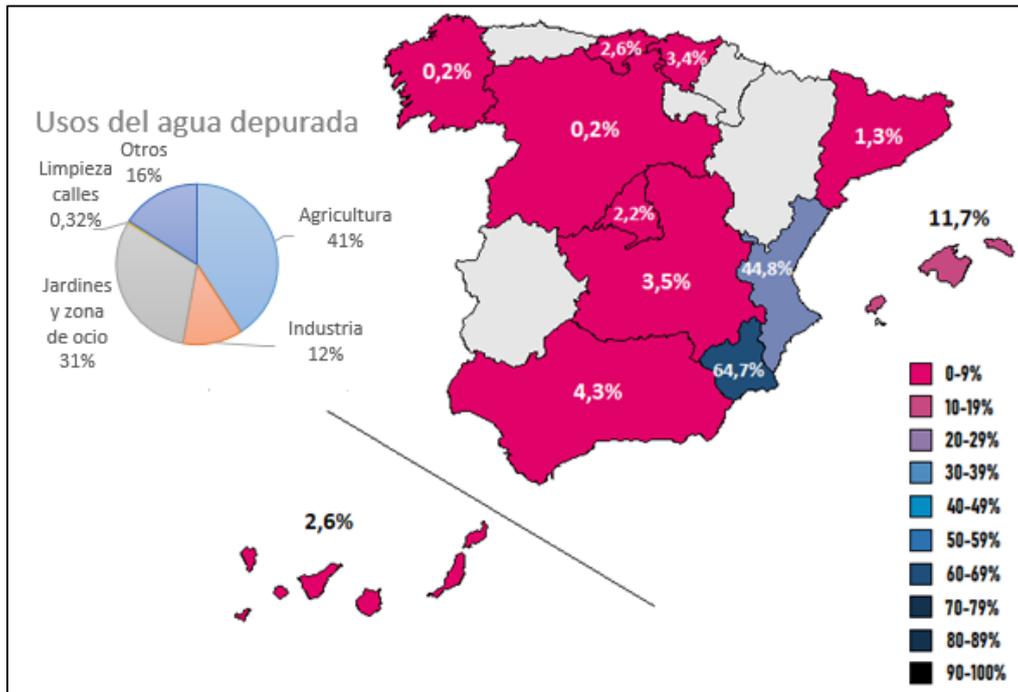


Figura 1. Porcentaje de agua depurada reutilizada del total generado por cada CCAA en el año 2016. Fuente: Asociación española de Abastecimiento de Agua y Saneamiento (AEAS).

La obligación, recogida en la legislación europea y española, de depurar los efluentes, en especial los de origen urbano, producidos como consecuencia de la actividad humana para evitar la contaminación ambiental, ha incrementado exponencialmente los volúmenes de agua residual depurada en las últimas décadas constituyendo así una fuente de agua permanente que puede satisfacer la demanda local de este recurso para el regadío (European Commission; 2013). Asimismo, el empleo de AD incrementa en los suelos la cantidad de nutrientes disponibles para las plantas y la eficiencia metabólica de los microorganismos, con el consiguiente ahorro en la aplicación de fertilizantes (Meli et al., 2002).

Sin embargo, la reutilización de AD en agricultura conlleva una serie de factores de riesgo que han de tenerse en cuenta. A medio y largo plazo la potencial salinización y sodificación de los suelos utilizados como consecuencia fundamentalmente del elevado contenido en sodio del agua, la contaminación de aguas subterráneas por compuestos orgánicos o inorgánicos (p.ej. nitratos), y la acumulación hasta niveles tóxicos para las plantas de elementos traza (p.ej. boro) son algunos de los problemas más relevantes (Toze, 2005). Además, un alto contenido en nutrientes combinado con una elevada relación C/N puede disminuir la conductividad hidráulica del suelo como resultado de un sobrecrecimiento de las poblaciones microbianas y la formación de biofilms que obstruyen la porosidad edáfica (Magesan et al., 2000). Otros componentes químicos tales como los disruptores endocrinos y compuestos de actividad farmacéutica, aunque normalmente presentes en estas aguas en concentraciones muy bajas, pueden suponer un riesgo potencial no totalmente evaluado para la salud humana y el medio ambiente (Jobling et al., 1998; Hong et al., 2018).

A corto plazo los riesgos sanitarios para humanos y animales asociados a la carga microbiológica que presentan estas aguas constituyen sin lugar a dudas el problema más relevante y al que se le ha prestado una mayor atención en la literatura científica (Muñoz et al, 2010). Debido a que una parte significativa del AD procede del tratamiento de aguas fecales, es común encontrar en ésta microorganismos de origen fecal, aunque también microorganismos oportunistas de vida libre, que constituyen una causa potencial de infección. Los patógenos más comunes presentes en AD son las bacterias, si bien también están presentes otros organismos como protozoos, helmintos y virus (Toze, 2005).

Puesto que la reutilización de AD, en un marco de cambio climático global que podría limitar aún más la disponibilidad de recursos hídricos para la agricultura, constituye un factor clave para la producción agrícola en regiones áridas como la isla de Fuerteventura, su aplicación en regadío debe ir asociada a estudios que evalúen y que permitan minimizar los riesgos asociados anteriormente mencionados. Así, el presente estudio analiza la carga microbiológica contaminante (bacterias patógenas y amebas de vida libre (AVL)) en el AD y dos tipos de suelos agrícolas regados con AD de la isla de

Fuerteventura, con el objetivo general de evaluar el riesgo clínico asociado a la reutilización de este tipo de calidad de aguas.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio es la evaluación del riesgo clínico asociado a la presencia de microorganismos patógenos en el AD utilizada para el regadío en la isla de Fuerteventura.

Se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la presencia y cantidad de bacterias patógenas y AVL en el AD utilizada para regadío, comparándola con agua subterránea (AS) utilizada como control.
- Evaluar los efectos de las condiciones de almacenamiento del AD antes de su uso en la carga microbiológica de la misma.
- Evaluar la pervivencia de bacterias patógenas y AVL en dos tipos de suelos (*Typic Haplocambids* y *Typic Torrifuvents*) regados con AD, comparándolo con suelos regados con AS y suelos sin riego utilizados como control.
- Evaluar la influencia de la profundidad del suelo (0-5 cm y 5-10 cm) en la pervivencia de bacterias patógenas y AVL en suelos regados con AD.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Descripción del sitio de estudio

El estudio fue llevado a cabo en la isla de Fuerteventura en la Granja Agrícola y Experimental de Pozo Negro, localizada en el municipio de Antigua, y gestionada por la Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca del Cabildo Insular.



Figura 2. Vista general de las parcelas experimentales (suelo *Typic Haplocambids*) con cultivo de *Medicago sativa* bajo riego con AD y AS dentro de las instalaciones de la Granja Experimental de Pozo Negro, Fuerteventura.

El sitio de estudio presenta una precipitación media anual de 98 mm, con una elevada variabilidad interanual (32 – 117 mm), temperatura media anual de 20°C, humedad relativa del 64 %, velocidad media del viento de 3.4 m s⁻¹, radiación media de 18.9 MJ m⁻² día⁻¹, e insolación media anual de 10.6 horas día⁻¹. La presencia casi constante de vientos, unida a los elevados niveles de radiación y temperatura, hace que la evapotranspiración de referencia (ET_o) calculada mediante el método FAO/Penman-Montheith se eleve a 1707 mm año⁻¹ (Dorta-Santos et al., 2014). Este trabajo se ha integrado dentro del Proyecto de Investigación "Agricultura biosalina para el aprovechamiento de recursos marginales de suelos y aguas en un medio insular (AGL2013-46054-R)" desarrollado desde 2016 en las instalaciones de la Granja Agrícola.

Las infraestructuras de este proyecto (sistemas de riego, parcelas experimentales) han sido utilizadas para la toma de muestras de aguas y suelos del presente TFG.

3.2. Muestreo y caracterización físico-química de las aguas

Se realizó la caracterización físico-química de dos calidades de agua utilizadas para riego en el proyecto anteriormente mencionado. Agua depurada (AD) procedente de la EDAR Puerto del Rosario, que recibe agua de uso urbano con origen en agua de mar desalinizada, y se genera mediante pretratamiento (eliminación de sólidos por filtración), tratamiento primario (decantación) y tratamiento secundario (digestión biológica); y agua subterránea (AS) extraída a 45 m de profundidad mediante un pozo localizado dentro de las instalaciones de la Granja Experimental (Dorta-Santos et al., 2014). Ambos tipos de aguas son almacenadas por periodos variables antes de su aplicación en el riego en tanques cubiertos con mallas situados también dentro de las instalaciones de la Granja Experimental. Se tomó una muestra de AD y otra de AS a la salida de los tanques de almacenamiento en febrero de 2018, siendo colectadas en botellas de polietileno y trasladadas al laboratorio para su análisis. Los siguientes parámetros fueron analizados en las muestras de agua: conductividad eléctrica (CE), pH, sólidos totales en suspensión (STS), cationes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , NH_4^+), aniones (Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , NO_3^-), boro (B), demanda química de oxígeno (DQO) y demanda biológica de oxígeno (DBO). Los valores de relación de absorción de sodio (SAR; Sodium Adsorption Ratio) fueron obtenidos a partir de los niveles de Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+ . Todos los análisis de agua siguieron el *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998). Los análisis fueron llevados a cabo por el personal técnico del laboratorio de Edafología del Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de La Laguna.

Los niveles de los parámetros fisicoquímicos analizados en el AD y AS se muestran en la Tabla 1. El AD presentó del orden de 2 veces más STS que el AS. El valor de pH fue más elevado en el AS que en el AD. Ambos tipos de aguas presentaron valores de CE por encima de 2.0 dSm^{-1} , siendo mucho más elevado en el AS. Atendiendo a la composición de aniones y cationes se puede establecer que se trata de aguas cloruradas sódicas. Los

valores de SAR fueron dos veces más altos en el AS que en el AD, mostrando también contenidos de boro más elevados ($\sim 2.4 \text{ mg l}^{-1}$). En general se trata de aguas ligeramente alcalinas con valores de SAR elevados que indican que su uso puede representar un alto riesgo de sodificación del suelo (Klay et al., 2010). Los niveles de amonio, nitrato y fosfato fueron del orden de 3, 3 y 15 veces mayor, respectivamente, en el AD que en el AS, pudiendo constituir potencialmente una fuente significativa de nutrientes en suelos con baja fertilidad (Heidarpour et al., 2007).

Parámetro	AS	AD
STS mg L^{-1}	5.9	12.1
pH	8.3	7.6
CE dS m^{-1}	4.9	2.6
Ca^{2+} mg L^{-1}	28.7	28.4
Mg^{2+} mg L^{-1}	41.8	32.3
K^{+} mg L^{-1}	12.1	31.5
Na^{+} mg L^{-1}	1042.2	450.8
SAR (mmol L^{-1}) ^{0.5}	25.7	11.7
Cl^{-} mg L^{-1}	981.6	644.6
CO_3^{2-} mg L^{-1}	30.7	0.0
HCO_3^{-} mg L^{-1}	550.3	170.6
SO_4^{2-} mg L^{-1}	392.9	100.2
PO_4^{2-} mg L^{-1}	0.4	15.3
NO_3^{-} mg L^{-1}	9.8	31.6
B mg L^{-1}	2.4	1.0
NH_4^{+} mg L^{-1}	0.0	2.8
DQO mg L^{-1}	10.3	53.3
DBO5 mg L^{-1}	7.2	16.6

Tabla 1. Características físico-químicas de las aguas de riego. AS, agua subterránea; AD, agua depurada; SAR, relación de absorción de sodio; DQO, demanda química de oxígeno; DBO, demanda biológica de oxígeno.

Los valores de DQO y DBO en el AD fueron 5 y 2 veces mayores respectivamente que en el AS. Los niveles de DQO ($>50 \text{ mg L}^{-1}$) y K ($>30 \text{ mg L}^{-1}$) señalan que el AD podría ser considerada una fuente de materia orgánica y nutrientes esenciales permitiendo una mejora de la fertilidad del suelo y consecuentemente del crecimiento y productividad de las plantas (Tarchouna et al., 2010).

3.3. Muestreo y caracterización físico-química de los suelos

Para el muestreo de suelos se seleccionaron aleatoriamente tres parcelas experimentales (regada con AD; regada con AS; sin riego) en dos tipos de suelos diferentes (*Typic Torrifuvents*; *Typic Haplocambids*). Las parcelas regadas están cultivadas con alfalfa y se riegan desde noviembre de 2016. Las parcelas sin riego no presentan cultivo. El muestreo de los suelos se llevó a cabo en febrero de 2018, tomándose una muestra de suelo a dos profundidades (0-5 cm y 5-10 cm). Así un total de 12 muestras de suelos fueron colectadas en recipientes de plástico y transportadas al laboratorio para su análisis.

Los análisis de suelos fueron llevados a cabo por el autor del presente trabajo en el laboratorio de Análisis Agrícola y Agrología de la Sección de Ingeniería Agraria de la Escuela Politécnica Superior de Ingeniería de la Universidad de La Laguna. Todas las muestras de suelo fueron secadas al aire y tamizadas a 2 mm previamente a su análisis (con la excepción de las muestras de suelos tomadas para el cálculo del contenido de humedad mediante el método gravimétrico). Los siguientes parámetros fueron analizados en las muestras de suelos: granulometría (arena, limo y arcilla) (densímetro de Boyoucos); pH y conductividad eléctrica en extracto de pasta saturada (pHe and CEe); carbonato cálcico equivalente (calcímetro de Bernard); carbono orgánico total (método Walkley & Black); carbono orgánico lábil (Weil et al., 2003); fósforo disponible (método Olsen); nitrógeno total (método Kjeldahl). Todos los análisis de suelos siguieron el *Standard Methods* (Soil Survey Staff, 1996).

Parámetro	Sin riego		Riego con AS		Riego con AD	
	0-5 cm	5-10 cm	0-5 cm	5-10 cm	0-5 cm	5-10 cm
<i>Typic Torrifuvents</i>						
Humedad %	8.3	5.5	17.6	16.7	19.8	19.1
CE _e dS m ⁻¹	2.0	10.1	3.1	4.3	3.5	3.3
pH _e	8.5	8.0	8.6	8.4	8.1	8.1
CaCO ₃ g kg ⁻¹	121	109	121	60	125	120
C org. total g kg ⁻¹	4.8	11.5	10.3	6.0	13.0	5.1
C org. lábil mg kg ⁻¹	481	677	657	499	694	486
Nitrógeno total g kg ⁻¹	0.5	1.0	1.1	0.8	1.5	0.9
Olsen-P mg kg ⁻¹	3.4	9.2	11.0	2.5	16.7	3.0
Arcilla g kg ⁻¹	179	176	190	191	196	184
Limo g kg ⁻¹	189	233	225	219	223	228
Arena g kg ⁻¹	632	591	585	590	581	588
<i>Typic Haplocambids</i>						
Humedad %	9.6	8.6	24.0	27.0	18.6	22.9
CE _e dS m ⁻¹	11.6	18.9	3.2	3.0	2.0	2.0
pH _e	8.1	7.9	7.8	8.0	8.1	8.2
CaCO ₃ g kg ⁻¹	186	193	125	39	176	163
C org. total g kg ⁻¹	5.1	16.8	20.3	6.4	17.6	4.3
C org. lábil mg kg ⁻¹	441	491	729	562	722	454
Nitrógeno total g kg ⁻¹	0.6	0.8	2.6	1.2	2.1	0.5
Olsen-P mg kg ⁻¹	2.0	1.9	16.2	3.5	25.2	5.6
Arcilla g kg ⁻¹	299	284	291	329	250	273
Limo g kg ⁻¹	418	505	438	440	501	426
Arena g kg ⁻¹	283	211	271	231	239	301

Tabla 2. Características físico-químicas de las capas superficiales (0-5 cm y 5-10 cm) de los suelos TT (Typic Torrifuvents) y TH (Typic Haplocambids) bajo riego con AD, AS y suelos control (no regados).

Los resultados de los análisis físico-químicos de los suelos se muestran en la Tabla 2. Puesto que no se tomaron réplicas de los diferentes tratamientos no fue posible realizar un análisis estadístico de los datos y sólo se pretende realizar una descripción de los mismos. El suelo *Typic Torrifluvents* (TT) presenta textura franco arenosa para las dos profundidades estudiadas. El suelo *Typic Haplocambids* (TH) tiene textura franco arcillosa en ambas profundidades. El contenido de agua es, como cabría esperar, mucho menor en los suelos no regados y ligeramente mayor en el suelo TH que en el TT. La reacción de ambos suelos es alcalina con valores de pH cercanos o superiores a 8.0. Los niveles de CEe fueron más altos en las parcelas sin riego (control) particularmente en el suelo TH, disminuyendo considerablemente en las parcelas regadas como consecuencia fundamentalmente de las altas fracciones de lavado aplicadas (~25 %; comunicación personal). Las parcelas regadas con AS tuvieron en general valores ligeramente superiores de CEe que las regadas con AD, reflejo de la diferencia de salinidad entre ambos tipos de agua (Tabla 1). Ambos suelos contienen CaCO_3 , con valores generalmente superiores a 100 g kg^{-1} . Los contenidos de carbono orgánico total y lábil y de nitrógeno fueron en general mayores en el suelo TH que en el suelo TT, siempre dentro de rangos muy bajos ($< 20 \text{ g kg}^{-1}$ de carbono total y $< 2 \text{ g kg}^{-1}$ de nitrógeno total), característicos de suelos de zonas áridas con baja productividad biológica. Se observa un incremento del carbono orgánico y el nitrógeno en los suelos regados, particularmente aquellos bajo riego con AD, con respecto a los suelos no regados. La aportación de nutrientes realizada con el AD y también la fijación biológica de nitrógeno realizada por el cultivo de alfalfa pueden explicar estos incrementos. Igualmente, los contenidos de P-Olsen se vieron incrementados en las parcelas bajo riego con respecto a las parcelas control (Tabla 2).

3.4. Muestreo y análisis microbiológico de las aguas

Para el análisis microbiológico de las aguas de riego se realizó un muestreo en febrero de 2018 colectando AD y AS a la entrada y salida de los tanques de almacenamiento. Las muestras se tomaron en tubos de centrífuga estériles Falcon® con un volumen de 50 ml,

y fueron mantenidas a -4°C hasta su análisis en laboratorio (iniciado a las 24 horas de la toma de las muestras).

3.4.1. Bacterias patógenas

Existen diversidad de especies bacterianas patógenas con implicaciones para la salud pública. Atendiendo a su relevancia clínica se seleccionaron para este estudio los siguientes grupos bacterianos: *Vibrio*, coliformes totales (CT), *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Shigella*.

Vibrio agrupa un conjunto de 66 especies de las cuales 12 son potencialmente patógenas para el ser humano (Garrity et al., 2004); el término “bacterias coliformes” incluye los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Aeromonas* y otros capaces de fermentar lactosa, siendo una fracción de origen fecal, por lo que su presencia se emplea como indicador de contaminación fecal en el medio (Martin et al., 2016); *Escherichia coli* es el indicador más fiable de contaminación fecal debido a que es una bacteria de origen intestinal con baja capacidad de supervivencia en el medio ambiente en comparación con otros coliformes (Odonkor & Ampofo, 2013); *Pseudomonas* es un género de distribución ubicua que no incluye especies estrictamente patógenas para el ser humano, pero que pueden actuar como patógenos oportunistas al infectar a huéspedes susceptibles (Granados & Villaverde, 2003); *Pseudomonas aeruginosa* es la que mayor repercusión tiene en la salud humana, al participar en el 10 % de las infecciones nosocomiales de los hospitales de la Unión Europea (Bentzmann & Plésiat, 2011); *Salmonella* constituye la causa más prevalente de infección alimentaria a nivel mundial (Andino & Hanning, 2015); *Shigella* es un género de bacterias responsables del desarrollo de enfermedades diarreicas que constituyen una causa frecuente de mortalidad en humanos (Schroeder & Hibi, 2008).

El análisis de bacterias se llevó a cabo mediante la técnica de filtración por membrana haciendo pasar un determinado volumen de agua a través de filtros de nitrocelulosa (0.45 μm de diámetro de poro) mediante una rampa de filtración y una bomba de vacío. Seguidamente se depositaron los filtros sobre los medios de cultivo sólidos. Se emplearon distintos tipos de medios en función del grupo bacteriano: medio Chromocult (coliformes y *E. coli*; Alonso et al., 2008), medio TCBS (*Vibrio sp.*; Huq et al.,

2013), agar cetrimida (*Pseudomonas sp.*; Colinon et al., 2013) y agar *Salmonella-Shigella* (para ambos géneros; Ruiz-Gómez et al., 1998). Debido a la elevada carga bacteriana las muestras de AD fueron diluidas en solución PAS (*Page's Amoeba Saline solution*) previamente a la filtración con el fin de obtener un número de colonias adecuado para el recuento. Tras la siembra, las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas a excepción de las placas con medio *Salmonella-Shigella*, que se incubaron 48 horas. Pasado el tiempo de incubación se procedió al recuento de las colonias. En el caso del medio agar cetrimida para detectar la presencia de colonias de *Pseudomonas* se expusieron las placas a luz ultravioleta, puesto que la mayor parte de las bacterias de este género producen pigmentos fluorescentes como la piocianina y la pioverdina (Stanier et al., 1992).

3.4.2. Amebas de vida libre

En este estudio se presta especial atención a un grupo de protozoos conocido como amebas de vida libre (AVL), que no requieren un organismo hospedador para poder sobrevivir (Cateau et al., 2014). Las AVL son consideradas como un grupo emergente de patógenos oportunistas por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta, al cual se da cada vez más atención desde el ámbito sanitario. Se trata de organismos ubicuos que han sido aislados en gran diversidad de ambientes tanto naturales como artificiales, incluyendo agua dulce, agua salobre, agua marina, plantas de tratamiento de agua, y diversos tipos de suelos (Scheikl et al., 2014). Las AVL son capaces de causar enfermedades en el ser humano de diversa índole, desde infecciones cutáneas y oculares hasta encefalitis y afecciones pulmonares, óseas y de las glándulas adrenales (Visvesvara et al., 2007). Entre las AVL patógenas más comunes en humanos se encuentran cuatro géneros/especies: *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandriallaris* y *Sappinia pedata*, si bien otros géneros como *Vahlkampfia*, *Paravahlkampfia* y *Hartmannella* (*Vermamoeba*) también parecen estar asociadas con infecciones en humanos (Khurana et al., 2015). Algunas de las infecciones asociadas a las mismas, a pesar de tener una baja morbilidad, presentan una elevada mortalidad y por lo tanto constituyen un problema potencial para la salud de la población (Król-Turminska & Olender). Otras enfermedades como la queratitis por *Acanthamoeba* presentan una incidencia cada vez mayor (Lorenzo-Morales et al., 2015).

Para el estudio de las AVL se recurrió también a la técnica de filtración por membrana. En este caso las muestras no fueron diluidas previamente a la filtración. Tras la misma los filtros fueron colocados en posición invertida, debido a la elevada movilidad que presentan estos organismos, sobre el medio de cultivo (agar no nutritivo (ANN); Reyes-Batlle et al., 2014). Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente (20-25 °C) de forma indefinida con monitorización diaria.

Tras varios días de incubación se procedió a estudiar el desarrollo de AVL en los medios mediante un microscopio óptico invertido Leica D IL. Dado que el medio ANN permite también el crecimiento simultáneo de hongos y otros microorganismos, para poder aislar las AVL se recurrió al método de replicación. En este método se localizan y monitorean diariamente con el microscopio los distintos tipos de AVL presentes en el medio. Una vez observado un tipo de ameba y localizado este organismo dentro del campo de visión se rotula sobre la placa de Petri el área en cuestión. A continuación se agujerea el medio de cultivo siguiendo la línea de la zona marcada, obteniéndose un disco que contiene el microorganismo observado previamente y que es depositado en un nuevo medio ANN. Este nuevo cultivo constituye una réplica, que es incubada y a partir de la cual se pueden realizar nuevas réplicas hasta obtener un cultivo de AVL aisladas libre de otros microorganismos.

Una vez obtenido un cultivo de AVL aisladas se procede a su identificación mediante secuenciación de ADN. Para la extracción del ADN fue necesario en primer lugar obtener una suspensión de las células de los organismos de estudio. Para ello se añadió solución PAS sobre la superficie del medio de cultivo, y se raspó ésta haciendo uso de un cayado de vidrio para liberar las células al líquido. El líquido resultante se introdujo en tubos Eppendorf®, que se centrifugaron para obtener un pellet celular tras la eliminación del sobrenadante. Posteriormente la extracción y purificación del ADN se realizó de forma automatizada en un equipo Maxwell 16, programado para optimizar la extracción de ADN a partir de quistes amebianos. Seguidamente el ADN fue cuantificado mediante un espectrofotómetro DS-11 (DeNovix), que determina los valores del grado de pureza y de concentración del ADN de cada una de las muestras.

Las muestras de ADN fueron entonces sometidas a PCR (*Polymerase Chain Reaction*; termociclador *Arktik*™) empleando para ello dos tipos de cebadores: un par de

cebadores FLA (FLAf y FLAr) para confirmar la presencia de amebas de vida libre, y un par de cebadores JDP (JDP1 y JDP2) para detectar amebas del género *Acanthamoeba* (Dendara et al., 2008). Ambos tipos de cebadores se encargan de amplificar una pequeña región del ARN_r 18s amebiano. Tras la PCR las muestras fueron sometidas a electroforesis a 70 voltios en geles de agarosa al 2 %. Una vez acabada la electroforesis se introdujeron los geles en el sistema ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) para su análisis e interpretación. Las muestras que en este análisis dieron positivo para *AVL sensu lato* (cebadores FLA) o *Acanthamoeba* (cebadores JDP) fueron enviadas a una empresa encargada de la secuenciación del ADN (Macrogen Spain). Finalmente, las secuencias de ADN de los genomas secuenciados fueron cotejadas en una base de datos para la identificación definitiva de las especies presentes en las muestras.

3.5. Muestreo y análisis microbiológico de los suelos

3.5.1. Bacterias patógenas

Para el estudio bacteriológico de los suelos se analizaron los mismos grupos que para las aguas. En este caso se tomaron de cada muestra de suelo 0.5 gramos que fueron diluidos en tampón fosfato salino (PBS) hasta la obtención de diluciones 10^{-3} y 10^{-4} . Estas dos diluciones (100 μ l) fueron las empleadas para realizar la siembra de los medios de cultivo. Tras la siembra se procedió a incubar, con los tiempos de incubación y temperatura ya comentados en el análisis de las aguas, y al posterior recuento.

3.5.2. Amebas de vida libre

Para el aislamiento de AVL a partir de los suelos se utilizó, al igual que para las muestras de agua, medio de ANN, que fue sembrado tomando una pequeña cantidad de suelo (\approx 0.5 gramos) y esparciéndolo en línea sobre la superficie del medio de cultivo. Una vez sembradas las placas se incubaron a temperatura ambiente (20-25 °C). Posteriormente se siguió el mismo proceso de aislamiento e identificación detallado previamente para las muestras de aguas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados de los análisis microbiológicos de las aguas de riego

4.1.1. Bacterias patógenas

Los resultados obtenidos en el recuento de colonias bacterianas a partir de las aguas de entrada y de salida de los tanques de almacenamiento se muestran en la Tabla 3.

Tipo de agua	UFC/100 ml					
	<i>Vibrio</i>	CT	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>
Agua subterránea						
Entrada	0	500	0	0	0	0
Salida	Φ	Φ	0	0	Φ	0
Agua depurada						
Entrada	1200	2666	533	0	Φ	0
Salida	Φ	Φ	10000	0	10	0

Tabla 3. Identificación y recuento de bacterias patógenas en aguas de riego (agua subterránea y agua depurada). UFC, unidades formadoras de colonias; CT, coliformes totales; *E. coli*, *Escherichia coli*; Φ, incontables UFC.

Cuando se compara las dos calidades de agua a la entrada de los tanques de almacenamiento se observa que el AD presenta un mayor número de bacterias y diversidad de grupos que el AS. Así en el AD se detectaron *Vibrio*, CT, *E. coli* y *Salmonella*, mientras que en el AS sólo se observan CT en un número considerablemente bajo (~ 500 UFC). Estos datos confirman que el proceso de depuración del agua empleado no asegura la completa eliminación de importantes grupos de bacterias patógenas, y que, por tanto, el uso de esta calidad de agua en regadío puede implicar potenciales problemas sanitarios. Tras el paso del agua por los tanques de almacenamiento (aguas de salida) ambos tipos de aguas presentan una elevada carga bacteriana y los mismos grupos (*Vibrio*, CT y *Salmonella*) a excepción de *E. coli*, que sólo está presente en el AD. Se observa, de forma general, un mayor contenido en bacterias en las aguas de salida que en las de entrada tanto para el AD como para el AS. Esto podría significar que los tanques de almacenamiento del agua, dado que se encuentran abiertos y expuestos, están siendo contaminados por aportes externos de microorganismos a través de

cadáveres de animales, heces, u otro tipo de fuentes. Esto unido a un mantenimiento inadecuado de estas infraestructuras (limpieza y desinfección deficitarias) puede contribuir al desarrollo de condiciones propicias (temperatura, pH, nutrientes...) para el crecimiento bacteriano.

Los géneros *Vibrio* y *Salmonella* están presentes con una elevada carga en el AS de salida, pero no de entrada, indicando que estos grupos se incorporan al AS por contaminación de los tanques.

El cultivo del AD supuso el recuento de un elevado número de UFC de *E. coli*, resultado esperado debido a que se trata de una enterobacteria y al origen fecal de parte de este tipo de agua. La supervivencia de *E. coli* en el agua depende de diversos factores ambientales incluyendo el pH, temperatura, salinidad, predación e intensidad de la luz solar (Blaustein et al., 2013). Según Bordalo et al (2002), la salinidad del agua ejerce un efecto supresor al reducir la supervivencia de esta especie. Este hecho podría explicar la ausencia de *E. coli* en el AS, más salina que el AD (Tabla 1), a pesar de la contaminación externa de los tanques de almacenamiento.

La ausencia de *Pseudomonas* en todas las muestras de agua sugiere que este grupo podría no estar presente de forma natural en el AD y el AS empleadas, ni ser incorporada al agua en el proceso de contaminación de los tanques. Las especies del género *Shigella*, que son residentes habituales del tracto digestivo del ser humano y otros animales, se transmiten a través de aguas y alimentos contaminados por heces (Zaidi & Estrada, 2014). Su tasa de supervivencia en el agua es de al menos 6 meses a temperatura ambiente, lo cual favorece su transmisión a través de este medio (Cabral, 2010). Sin embargo, en este estudio se obtuvieron resultados negativos para el crecimiento de *Shigella* en medio de cultivo para los dos tipos de aguas estudiados.

En cualquier caso, con el objetivo de minimizar la cantidad de patógenos de las aguas de salida se aconseja aplicar una serie de recomendaciones como cubrir totalmente los tanques de almacenamiento para evitar la contaminación, aplicar procesos de limpieza y desinfección, y reducir el tiempo de almacenamiento del agua desde su llegada al tanque hasta que es empleada para el riego con el fin limitar el crecimiento microbiano.

4.1.2. Amebas de vida libre

La Tabla 4 muestra los datos de los cultivos de AVL procedentes de las muestras de agua.

Tipo de agua	ANN	PCR	Especie	Genotipo
Agua subterránea				
Entrada	-	-	n/a	n/a
Salida	+	+	<i>Acanthamoeba sp.</i>	T4
Agua depurada				
Entrada	-	-	n/a	n/a
Salida	+	+	<i>Acanthamoeba sp.</i>	T4
	+	+	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	n/a

Tabla 4. Identificación de AVL en aguas de riego (agua subterránea y agua depurada) tomadas a la salida y a la entrada de los tanques de almacenamiento. ANN, detección en cultivo; PCR, detección por PCR; n/a, no aplica.

Las AVL constituyen un grupo de protozoos presentes en un amplio abanico de hábitats naturales y artificiales (Scheikl et al., 2014). A pesar de esta ubicuidad, no fue posible la identificación de AVL en las aguas de entrada tanto para el AS como para el AD, siendo la detección negativa para cultivo (no se observaron trofozoítos ni quistes) y PCR (Tabla 4). En las aguas de salida, sin embargo, se aisló *Acanthamoeba* del genotipo T4 (el más virulento) en ambos tipos de agua, y *Vermamoeba vermiformis* en el AD. Esto indica que las amebas podrían estar ligadas a los tanques y no ser aportadas a través de las aguas de entrada. Los estudios de Park (2016), reportaron la incapacidad de *V. vermiformis* de crecer en agua salina. Esta posible falta de halotolerancia podría explicar la ausencia de esta especie en el AS, que presenta una salinidad relativamente elevada, mientras que sí está presente en el AD, agua con una menor salinidad (Tabla 1).

Estos datos confirman la presencia de AVL potencialmente patógenas en los tanques de almacenamiento, que adicionalmente son capaces de incrementar la capacidad de transmisión de bacterias patógenas que se alojan intracelularmente (Lorenzo-Morales et al., 2007).

4.2. Resultados de los análisis microbiológicos de los suelos

4.2.1. Bacterias patógenas

Los datos obtenidos del crecimiento bacteriano a partir de las muestras de suelo se muestran en la Tabla 5. Los suelos sin riego no presentan crecimiento de ninguno de los grupos bacterianos estudiados a excepción de *Vibrio* en los suelos TH. La presencia de *Vibrio* en los suelos control podría deberse a que se trata de organismos naturalmente presentes en el medio o a su aporte previo por anteriores manejos (cultivo, adición de materia orgánica, riego, pastoreo...).

Riego	Profundidad	UFC/g suelo				
		Vibrio	CT	E. coli	Pseudomonas	SS
Typic Torrifluvents						
Sin riego	0-5 cm	0	0	0	0	0
	5-10 cm	0	0	0	0	0
AS	0-5 cm	20*10 ³	0	0	0	0
	5-10 cm	0	0	0	0	0
AD	0-5 cm	0	300*10 ³	0	0	0
	5-10 cm	0	10*10 ³	0	50*10 ³	0
Typic Haplocambids						
Sin riego	0-5 cm	20*10 ³	0	0	0	0
	5-10 cm	0	0	0	0	0
AS	0-5 cm	0	0	0	0	0
	5-10 cm	0	0	0	0	0
AD	0-5 cm	40*10 ³	60*10 ³	0	0	0
	5-10 cm	0	0	0	50*10 ³	0

Tabla 5. Identificación y recuento de bacterias patógenas en suelos TT y TH con tres tipos de riego: AD, AS y sin riego (control). UFC, unidades formadoras de colonias; CT, coliformes totales; E. coli, *Escherichia coli*; SS, *Salmonella* y *Shigella*; Φ, incontables UFC.

Se obtuvieron cultivos positivos para *Vibrio*, CT y *Pseudomonas* a partir de los suelos tratados con AD, mientras que en los suelos regados con AS solamente fue positivo para *Vibrio* (suelo TT). Parece por tanto, que si bien ambas calidades de agua aportan una

elevada carga bacteriana (Tabla 3), la supervivencia de estos organismos en los suelos regados con AD es mayor que en aquellos regados con AS. Muchos estudios han revelado que la salinidad del suelo y el agua reduce de forma significativa la actividad y la biomasa microbiana (Setia et al, 2011; Andronov et al., 2012). Esta reducción de biomasa es consecuencia fundamentalmente de los procesos de deshidratación y lisis que sufren las células bacterianas bajo estas condiciones de estrés por salinidad (Rietz & Haynes, 2003). Por otra parte, Wong et al. (2009) advirtieron que la respiración del suelo se ve menguada al incrementarse el valor de conductividad eléctrica (CE) del mismo. El AS y los suelos regados con esta calidad de agua presentan una salinidad elevada (Tabla 1 y Tabla 2) por lo que la menor presencia de bacterias patógenas en estos suelos puede estar evidenciando el efecto supresor que ejerce la salinidad sobre el establecimiento de estos microorganismos. Adicionalmente la concentración de materia orgánica y nutrientes es mucho mayor en el AD y en los suelos regados con este tipo de agua que en el AS y suelos regados con AS (Tabla 1 y Tabla 2). Así los primeros pueden constituir un medio más favorable para la supervivencia y reproducción de las bacterias.

Con respecto a la influencia del tipo de suelo, si comparamos los suelos TT y TH regados con AD no se observan tendencias claras. Mientras en el suelo TH hay mayor número de grupos bacterianos, en el suelo TT hay mayor número de UFC de CT (Tabla 5). Se observa en todos los suelos más carga bacteriana a 0-5 cm que a 5-10 cm de profundidad para los grupos *Vibrio* y CT, mientras que *Pseudomonas* parece distribuirse prioritariamente a 5-10 cm de profundidad. La mayor cantidad de nutrientes en la capa más superficial (0-5 cm) (Tabla 2) podría favorecer un mayor crecimiento bacteriano a esa profundidad. A pesar de no obtenerse crecimiento de *Pseudomonas* en el cultivo de las aguas de riego (Tabla 3), sí están presentes en los suelos TT y TH regados con AD, lo cual indica que se trata de especies del grupo naturalmente presente en los suelos o que fueron aportadas por prácticas de manejo previas, y cuyo crecimiento se ve favorecido por la adición de AD.

No hubo crecimiento de *Salmonella* en las placas sembradas con los suelos a pesar de encontrarse en los cultivos de AS y AD. Palacios et al. (1999) reportaron una disminución

del número de UFC de *Salmonella* en suelos agrícolas como consecuencia directa de la radiación solar, si bien otros factores como la temperatura y la depredación pueden estar involucrados en menor medida, con el resultado de la eliminación de *Salmonella* del suelo. Asimismo, no se observó crecimiento de *E. coli* a partir de ninguna de las muestras de suelo aunque es aportada con una elevada carga en el AD, evidenciando que los suelos de estudio reúnen una serie de características desfavorables para el establecimiento de esta especie. Estos resultados ponen en evidencia que la interacción de las aguas regeneradas con estos suelos puede considerarse como un tratamiento adicional que elimina y atenúa algunos componentes bióticos indeseables de las mismas.

4.2.2 Amebas de vida libre

La Tabla 6 muestra los datos del análisis microbiológico para el estudio de AVL en los diferentes tipos de suelos. Como se observa en la tabla, se logró la detección de AVL en todas las muestras de suelo. Los suelos tratados con AD muestran una mayor diversidad de AVL que los regados con AS y los suelos control. Sin embargo, no se aprecian diferencias en cuanto a la composición en AVL de los suelos con el tipo de suelo ni la profundidad.

Se detectó la presencia de *Acanthamoeba* en 9 de las 12 muestras de suelo estudiadas (75 %), género también presente en las muestras de aguas (Tabla 4). Estos datos demuestran que su presencia es independiente del tipo de riego y del tipo de suelo, ya que se encuentran en los suelos TT y TH no irrigados. Por lo tanto, debido a su ubicuidad, este género no parece ser un buen indicador de contaminación en suelos y aguas. *Acanthamoeba* es un género que es común en los suelos y en las aguas y presenta varias especies que son importantes patógenos para el ser humano y otros animales (Schuster & Visvesvara, 2004).

Riego	Profundidad	ANN	PCR	Especie	Genotipo
Typic Torrfluvents					
Sin riego	0-5 cm	+	+	<i>Acanthamoeba sp.</i>	T2
	5-10 cm	+	+	<i>Acanthamoeba sp.</i>	T4
AS	0-5 cm	+	+	<i>Acanthamoeba sp.</i>	T4
	5-10 cm	+	+	<i>Acanthamoeba sp.</i>	T4
AD		+	+	<i>Acanthamoeba sp.</i>	T4
	0-5 cm	+	+	<i>Acanthamoeba mauritaniensis</i>	n/a
		+	-	Amebas testáceas	n/a
	5-10 cm	+	+	<i>Acanthamoeba sp.</i>	T4
Typic Haplocambids					
Sin riego	0-5 cm	+	-	<i>n/a</i>	n/a
	5-10 cm	+	+	<i>Acanthamoeba sp.</i>	T4
AS	0-5 cm	+	+	<i>Acanthamoeba sp.</i>	T4
	5-10 cm	+	-	<i>n/a</i>	n/a
AD	0-5 cm	+	+	<i>Acanthamoeba sp.</i>	T4
		+	-	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	n/a
	5-10 cm	+	+	-	n/a

Tabla 6. Identificación de AVL en suelos (Typic Torrfluvents y Typic Haplocambids) regados con distintas aguas de riego (AS, agua subterránea; AD, agua depurada) y sin regar (control). ANN, detección en cultivo; PCR, detección por PCR; n/a, no aplica.

La peculiar morfología poliédrica del endoquiste (Figura 3A) es una característica que hace a este grupo fácilmente reconocible visualmente. Muchas especies del género se han reportado como agentes causantes de queratitis por *Acanthamoeba* en individuos sanos normalmente a través del uso de lentes de contacto, mientras que como infecciones oportunistas pueden causar neumonía, encefalitis granulomatosa amebiana (afección con una elevada tasa de mortalidad) e infecciones cutáneas (Marciano-Cabral et al., 2000).

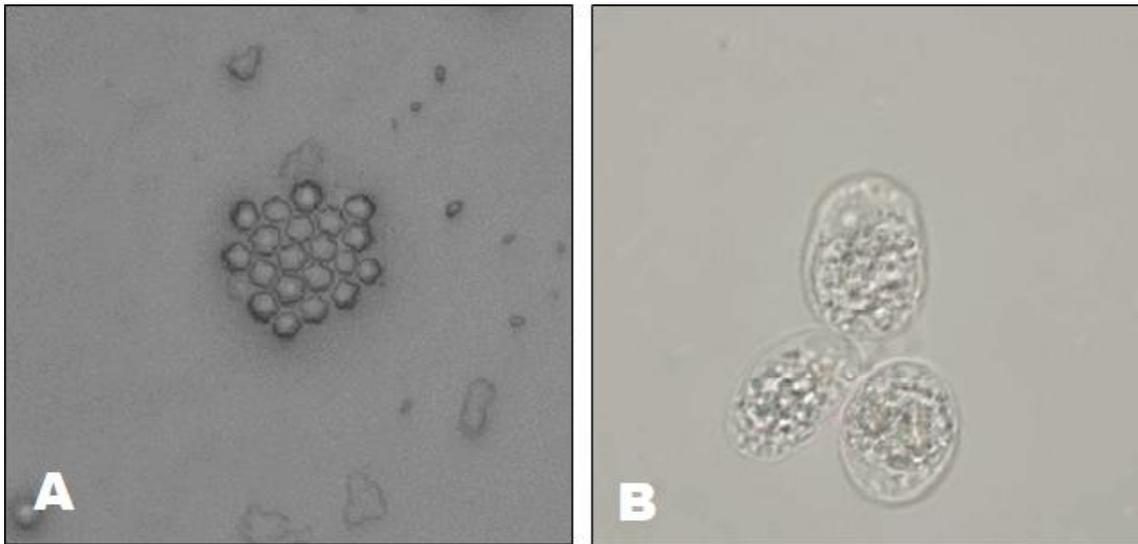


Figura 3. AVL en muestras de suelo TT (0-5 cm) regado con AD. A, quistes poliédricos de *Acanthamoeba*; B, asociación de tres amebas testáceas a través de sus pseudópodos.

En la actualidad se han identificado al menos 20 genotipos distintos (T1-T20) del género *Acanthamoeba* a través de la secuenciación del ARNr 18S (Abdul-Majid et al., 2017). Los estudios realizados muestran que el 90 % de las cepas aisladas de infecciones pertenecen al genotipo T4, si bien otros genotipos pueden estar presentes (Lorenzo-Morales et al., 2013). Estos datos corroboran que el genotipo T4 es el más virulento. Precisamente el genotipo T4 fue el más frecuente en el presente trabajo al constituir 10 de los 12 aislamientos de *Acanthamoeba* (83 %) en las muestras de aguas y suelos.

Vermamoeba vermiformis fue detectada únicamente en los suelos TH regados con AD, estando ausente en suelos más salinos como son los regados con AS y los suelos control, sustentado el argumento de su posible halosensibilidad. La ausencia de *V. vermiformis* en las muestras de AS apoyan este argumento. Esta especie no pudo ser identificada por secuenciación de ARNr, pero sí mediante identificación morfológica (Figura 4). El trofozoíto presenta una forma cilíndrica elongada característica. Los quistes muestran una morfología esférica u ovoide, con paredes lisas en los más jóvenes o de contorno ligeramente irregular en los más maduros, y citoplasma generalmente granular (Park, 2016). Esta especie es especialmente importante desde el punto de vista clínico dada su capacidad para actuar como vectores de transmisión de bacterias patógenas

intracelulares, siendo el caso más estudiado *Legionella pneumophila* (Park, 2016). Además, Aitken et al. (1996) identificaron un caso de queratitis no amebiana consecuencia de una coinfección por *Vahlkampfia* y *Vermamoeba*, demostrando la capacidad infecciosa de esta última.

Asimismo, fue posible la detección en cultivo de amebas testáceas, un grupo polifilético de amebas, a través de su particular morfología. Se caracterizan por presentar una concha o testa externa resistente (Figura 3B) (Glymph, 2005). Estas amebas se distribuyen en ambientes acuáticos y en suelos húmedos con un aporte continuo o muy frecuente de agua (Ju et al., 2014). Las amebas testáceas fueron halladas únicamente a 0-5 cm, dado que viven preferentemente en las capas más superficiales de los suelos (Glymph, 2005).

La dieta de las AVL incluye microorganismos como hongos, protozoos y bacterias, así como partículas orgánicas (Cateau et al., 2014). Se ha comprobado que las AVL pueden actuar como reservorios y vectores de transmisión de bacterias patógenas capaces de vivir dentro de los trofozoítos e incluso de los quistes (Lorenzo-Morales et al., 2007; Mella et al., 2016). Existen determinadas bacterias que han evolucionado para resistir la digestión por parte de las amebas y que reciben el nombre de bacterias resistentes a amebas o ARB (*Amoeba-Resistant Bacteria*). Esta asociación permite a las ARB estar protegidas frente a las condiciones ambientales adversas, e incrementar su potencial de transmisión y virulencia, dado que se ocultan del sistema inmunitario del hospedador en el interior de las amebas y pueden acumularse dentro de vesículas (Mella et al., 2016). Entre las ARB se encuentran patógenos importante como *Legionella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cryptococcus neoformans*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae*, *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli* serovar O157, entre otras (Greub & Raoult, 2004). Por lo tanto, la coexistencia en los suelos de bacterias patógenas y AVL, puede suponer un incremento del riesgo de infección en los sistemas agrarios.

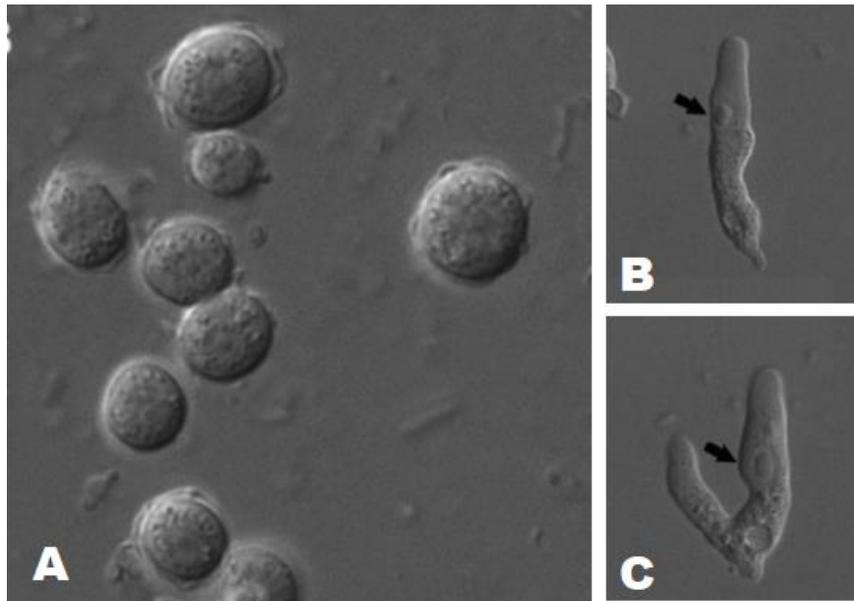


Figura 4. Características morfológicas de *Vermamoeba vermiformis*. A, quistes mostrando una forma esférica a ligeramente ovoide; B, trofozoíto mostrando morfología cilíndrica; C, cambio de dirección de desplazamiento del trofozoíto; las flechas indican el núcleo. Fuente: adaptado de Park, 2016.

Las AVL pueden suponer también una serie de efectos beneficiosos para los suelos llevando a cabo diversos procesos a pequeña escala relacionados con funciones biogeoquímicas (Urich et al, 2008). A través de la depredación influyen en la estructura de las comunidades microbianas y estimulan el reciclaje de los nutrientes (Ruqaiyyah & Naveed, 2012). Las bacterias resultan ineficientes en liberar minerales de su propia biomasa (Ruqaiyyah & Naveed, 2012). Otros descomponedores como las amebas, liberan esos nutrientes ligados a la biomasa bacteriana al digerir bacterias y desechar esos nutrientes al medio (Ruqaiyyah & Naveed, 2012). Mediante este proceso, las amebas contribuyen a que los nutrientes se encuentren en un estado de disponibilidad más rápidamente (Ruqaiyyah & Naveed, 2012). El estudio de Rosenberg et al. (2009) sugiere que la presencia de amebas en los suelos incrementa el grado de mineralización del carbono, el nitrógeno y el fósforo. Por otra parte, dicho estudio también demostró la capacidad de *Acanthamoeba* para modificar la composición bacteriana en la rizosfera de *Arabidopsis thaliana* que condujo a mejorar el crecimiento de las plantas.

De este modo, aunque las AVL suponen una amenaza directa como agentes infecciosos y como transmisores de bacterias patógenas, su presencia en los suelos, lejos de ser perjudicial para los mismos, resulta de especial importancia ecológica al mejorar la

disponibilidad de nutrientes y modificar las poblaciones bacterianas, con efectos positivos sobre el crecimiento vegetal.

5. CONCLUSIONES

- a) El AD presenta una mayor carga y diversidad de grupos bacterianos que el AS a la entrada de los tanques de almacenamiento.
- b) El mayor contenido en bacterias y AVL en los dos tipos de aguas analizados (AS y AD) en las muestras de salida respecto a las de entrada, sugiere un proceso de contaminación de los mismos y/o el desarrollo de los microorganismos que contienen las aguas de entrada al encontrarse en condiciones más favorables en los tanques de almacenamiento.
- c) Se observa que los suelos regados con AD contienen la mayor carga y diversidad de grupos bacterianos patógenos y AVL de entre los tres tratamientos de riego aplicados (AD, AS y sin riego). Por otra parte, el reducido contenido en bacterias de los suelos regados con AS podría deberse a la menor carga bacteriana del AS y estar acrecentado por el efecto supresor que ejerce la salinidad sobre el establecimiento de estos microorganismos en los suelos.
- d) No se observa una tendencia clara en cuanto a la influencia del tipo de suelo en la supervivencia de bacteria patógenas.
- e) Se observa en todos los suelos más carga bacteriana a 0-5 cm que a 5-10 cm en los grupos hallados (*Vibrio*, CT y *E. coli*) salvo en *Pseudomonas*, que parece distribuirse prioritariamente a 5-10 cm. La mayor cantidad de nutrientes a 0-5 cm que a 5-10 cm podría favorecer el crecimiento a menor profundidad.
- f) *Acanthamoeba* fue el género de AVL más frecuentemente aislado a partir de las aguas y los suelos. Esta ubicuidad hace que este grupo no pueda ser empleado como bioindicador de contaminación. De las cepas identificadas, el genotipo T4 (el más virulento) fue el más común.

Con los datos obtenidos a partir de este estudio se concluye que la calidad del AD empleada no garantiza la seguridad sanitaria en su utilización para el riego en el sistema agrícola en la isla de Fuerteventura. Para reducir el riesgo se han de aplicar una serie de medidas con el objetivo de minimizar la carga de microorganismos patógenos de este tipo de agua.

5. CONCLUSIONS

- a) TWW presents a greater load and diversity of bacterial groups than the GW at the entrance of the storage tanks.
- b) The higher content of bacteria and FLA in the two types of analyzed waters (GW and TWW) in the output samples compared to the input ones, suggests a process of contamination and/or the development of the microorganisms that contain the input waters when they reach more favorable conditions in the storage tanks.
- c) We observed that soils irrigated with TWW contain the highest load and diversity of pathogenic bacterial groups and FLA among the three irrigation treatments applied (TWW, GW and non-irrigated). On the other hand, the reduced bacterial content of soils irrigated with GW could be due to the lower bacterial load of GW and be enhanced by the suppressive effect exerted by salinity on the establishment of these microorganisms in soils.
- d) No clear tendency is observed regarding the influence of soil type on the survival of pathogenic bacteria.
- e) In all soils, more bacterial load is observed at 0-5 cm than at 5-10 cm in the groups found (*Vibrio*, CT and *E. coli*) except for *Pseudomonas*, which seems to be distributed more likely at 5-10 cm. The greater amount of nutrients at 0-5 cm than at 5-10 cm could favor growth at a lower depth.
- f) *Acanthamoeba* was the most frequently isolated AVL genus from waters and soils. This ubiquity makes this group unable to be used as a bioindicator of contamination. Of the identified amoebic strains, the T4 genotype (the most virulent) was the most common.

With the data obtained from this study we conclude that the quality of the TWW used does not guarantee sanitary safety when it is use for irrigation in the agricultural system on the island of Fuerteventura. To reduce the risk, a series of measures must be applied in order to minimize the load of pathogenic microorganisms in this type of water.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abdul-Majid et al., 2017 | Abdul-Majid, M. A., Mahboob, T., Mong, B. G. J., Richard, R. L., Tian-Chye, T., Phimpila, A., Mahaphonh, P., Aye, K. N., Aung, W. L., Chuah, J., Ziegler, A. D., Yasiri, A., Sawangjaroen, N., Lim, Y. A. L. & Nissapatorn, V. 2017. *Pathogenic waterborne free-living amoebae: an update from selected Southeast asian countries*. PLoS ONE, 12: e0177564.

Aitken et al., 1996 | Aitken, D., Hay, J., Kinnear, F. B., Kirkness, C. M., Lee, W. R. & Seal, D. V. 1996. *Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed Vahlkampfia and Hartmannella infection*. Ophthalmology, 103: 485-494.

Alonso et al., 2008 | Alonso, J. L., Soriano, A., Amoros, I. & Ferrus, M. A. 2008. *Quantitative determination of E. coli, and fecal coliforms in water using chromogenic medium*. Journal of environmental science and health, 33: 1229-1248.

Andino & Hanning, 2015 | Andino, A. & Hanning, I. 2015. *Salmonella enterica: survival, colonization and virulence differences among serovars*. The scientific world journal, 2015: 1-16.

Andronov et al., 2012 | Andronov, E. E., Petrova, S. N., Pinaev, A. G., Pershina, E. V., Rakhimgalieva, S. Z., Akhmedenov, K. M. & Sergaliev, N. K. 2012. *Analysis of the structure of microbial community in soils with different degrees of salinization using T-RFLP and real-time PCR techniques*. Eurasian soilless Science, 45: 147-156.

APHA, 1998 | APHA. 1998. *Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed.* APHA Publication office, Washington DC.

Belhaj et al., 2016 | Belhaj, D., Jerbi, B., Medhioub, M., Zhou, J., Kallel, M. & Ayadi, H. 2016. *Impact of treated urban wastewater for reuse in agriculture on crop response and soil ecotoxicity*. Environmental science and pollution research international, 16: 15877-15887.

Bentzmann & Plésiat, 2011 | Bentzmann, S. & Plésiat, P. 2011. *The Pseudomonas aeruginosa opportunistic pathogen and human infections*. Environmental microbiology, 13: 1655-1665.

Blaustein et al, 2013 | Blaustein, R. A., Pachepsky, Y., Hill, R. L., Shelton, D. R. & Whelan, G. 2013. *Escherichia coli survival waters: temperatura dependence*. Water research, 47: 569-578.

Bordalo et al., 2002 | Bordalo, A. A., Onrassami, R. & Dechsakulwatana, C. 2002. *Survival of faecal indicator bacteria in tropical estuarine waters (Bangpakong River, Thailand)*. Journal of Applied microbiology, 93: 864-871.

Cateau et al., 2014 | Cateau, E., Delafont, V., Hechard, Y. & Rodier, M. H. 2014. *Free-living amoebae: what part de they play in healthcare-associated infections?* Journal of hospital infections, 87:131-140.

Cabral, 2010 | Cabral, J. P. S. 2010. *Water microbiology. Bacterial pathogens and water*. International journal of environmental research and public health, 7: 3657-3703.

Colinon et al., 2013 | Colinon, C., Dereddjian, A., Hien, E., Brothier, E., Bouziri, E., Cournoyer, B., Hartman, A., Henry, Jolivet, C., Ranjard, L. & Nazaret, S. 2013. *Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa in soil and manure assessed by an ecfX qPCR Assay*. Journal of applied microbiology, 114: 1734-1749.

Dendara et al., 2008 | Densara, F., Sellami, H., Jarraya, F., Sellami, A., Makni, F., Cheikhrouhou, F., Hachicha, J. & Ayadi, A. 2008. *Free-living amoebae (FLA): detection, morphological and molecular identification of Acanthamoeba genus in the hydraulic system of an haemodialysis unit in Tunisia*. Parasite, 15: 137-142.

Dolnicar & Hurlimann, 2009 | Dolnicar, S. & Hurlimann, A. 2009. *Drinking water from alternative water sources: differences in beliefs, social norms and factors of perceived behavioural control across eight Australian locations*. *Water Science and technology*, 60: 1433-1444.

Dorta-Santos et al., 2014 | Dorta-Santos, M., Tejedor, M., Jiménez, C., Hernández-Moreno, J. M., Palacios-Díaz, M. P & Díaz, F. J. 2014. *Recycled urban wastewater for irrigation of *Jatropha curca* L. in abandoned agricultural arid land*. *Sustainability*, 6: 6902-6924.

European Commission, 2013 | European Commission. 2013. *Seventh Report on the Implementation of the Urban Waste Water Treatment Directive (91/2717EEC)*.

Garrity et al., 2004 | Garrity, G. M., Bell, J. A. & Lilburn, T. G. 2004. *Taxonomic outline of prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd edition. Release 5.0*. Springer-Verlag, New York: Ed. Michigan State University.

Glymph, T., 2005 | Glymph, T. 2005. *Wastewater microbiology. A handbook for operators*. USA: Ed. American Water Works Association.

Granados & Villaverde, 2003 | Granados Pérez, R. & Villaverde Peris, M. C. 2003. *Microbiología: bacteriología, características y clasificación bacteriana, virología, características y clasificación bioquímicas*. Madrid, España: Ed. Paraninfo.

Greub & Raoult, 2004 | Greub, G. & Raoult, D. 2004. *Microorganisms resistant to free-living amoebae*. *Clinical microbiology reviews*, 17: 413-433.

Heidarpour et al., 2007 | Heidarpour M., Mostafazadeh F., Koupai J. A. & Malekian R. *The effects of treated wastewater on soil chemical properties using subsurface and surface irrigation methods*. *Agricultural water management*, 90: 87-94

Hess et al., 2015 | Hess, T. M., Lennard, A. T. & Daccache, A. 2015. *Comparing local and global water scarcity information in determining the water scarcity footprint of Potato cultivation in Great Britain*. *Journal of cleaner production*, 87: 666-674.

Hong et al., 2018 | Hong, P., Julian, T. R., Pype, M., Jiang, S. C., Nelson, K. L., Graham, D., Pruden, A. & Manaia, C. M. 2018. *Reusing treated wastewater: consideration of the safety aspects associated with antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistant genes*. *Water*, 10: 244-266.

Huq et al., 2013 | Huq, A., Haley, B. J., Taviani, E., Chen, A., Hasan, N. A. & Colwell, R. R. 2013. *Detection, Isolation and identification of *Vibrio cholerae* from the environment*. *Current protocols in microbiology*, chapter 6: unit 6A.5.

Jobling et al., 1998 | Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C. R., Brighty, G. & Sumpter, J. P. 1998. *Widespread sexual disruption in wild fish*. *Environmental science and technology*, 32: 2498-2506.

Ju et al., 2014 | Ju, L., Yang, J. & Wilkinson, D. M. 2014. *Diversity and distribution of freshwater testate amoebae (protozoa) along latitudinal and Trophic gradients in China*. *Microbial ecology*, 68: 657-670.

Khurana et al., 2015 | Khurana S., Biswal, M., Kaur, H., Malhotra, P., Arona, P., Megha, K., Taneja, N. & Sehgal, R. 2015. *Free living amoebae in water sources of critical units in a tertiary care hospital in India*. *Indian journal of medical microbiology*, 33: 343-348.

Klay et al., 2010 | Klay, S., Charef, A., Ayed, L., Houman, B. & Rezgui, F. 2010. *Effect of irrigation with treated wastewater on geochemical properties (saltiness, C, N and heavy metals) of isohumic soils (Zaouit Sousse perimeter, Oriental Tunisia)*. *Desalination*, 253: 180-187.

Król-Turminska & Olender, 2017 | Król-Turminska, K. & Olender, A. 2017. *Human infections caused by free-living amoebae*. *Annals of agricultural and environmental medicine*, 24: 254-260.

- Lorenzo-Morales et al., 2007** | Lorenzo-Morales, J., Martínez-Carretero, E., Batista, N., Álvarez-Martin, J., Bahaya, Y., Walochnik, J. & Valladares, B. 2007. *Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with Acanthamoeba and Hartmannella*. Parasitology research, 102: 167-169.
- Lorenzo-Morales et al., 2013** | Lorenzo-Morales, J., Martín-Navarro, C. M., López-Arencibia, A., Arnalich-Montiel, F., Piñero, J. E. & Valladares, B. 2013. *Acanthamoeba keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide?* Trends in Parasitology, 29: 181-187.
- Lorenzo-Morales et al., 2015** | Lorenzo-Morales, J., Naveed, A. K. & Walochnik, J. 2015. *An update on Acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment*. Parasite. 2015;22:10. doi: 10.1051/parasite/2015010.
- Magesan et al., 2000** | Magesan, G. N., Williamson, J. C., Yeates, G. W. & Lloyd-Jones, A. R. 2000. *Wastewater C:N ratio effects on soil hydraulic conductivity and potential mechanisms for recovery*. Bioresource technology, 71: 21-27.
- Marciano-Cabral et al., 2000** | Marciano-Cabral, F., Puffenbarger, R. & Cabral, G. A. 2000. *The increasing importance of Acanthamoeba infections*. The journal of eukaryotic microbiology, 47: 29-36.
- Martin et al., 2016** | Martin, N. H., [Trmčić](#), A., Hsieh, T., Boor, K. J. & Wiedmann, M. 2016. *The evolving role of coliforms as indicators of unhygienic conditions in dairy foods*. Frontiers in microbiology, 7: 1549-1557.
- Meli et al., 2002** | Meli, S., Porto, M., Belligno, A., Mazzatura, A. & Scopa, A. 2002. *Influence of irrigation with lagooned urban wastewater on chemical and microbiological soil parameters in a citrus orchard under mediterranean conditions*. Science of the total environment, 285: 69-77.
- Mella et al. 2016** | Mella, C., Medina, G., Flores-Martín, S., Toledo, Z., Simaluiza, R. J., Pérez-Pérez, G. & Fernández, H. 2016. *Interaction between zoonotic bacteria and free-living amoebas. A new angle of an epidemiological polyhedron of public health importance?* Archivos de medicina veterinaria, 48: 1-10.
- Muñoz et al., 2010** | Muñoz, I., Tomás, N., Mas, J., García-Reyes, J. F., Molina-Díaz, A. & Fernández-Alba, A. R. *Potential chemical and microbiological risks on human health from urban wastewater reuse in agriculture. Case study of wastewater effluents in Spain*. Environmental science and technology, 45: 300-309.
- Odonkor & Ampofo, 2013** | Odonkor, S. T. & Ampofo, J. K. 2013. *Escherichia coli as an indicator of bacteriological quality of water: an overview*. Microbiology research, 4: 5-11.
- Palacios et al., 1999** | Palacios, M. P., Lupiola, P., Del Nero, E., Pardo, A., Rodríguez, F., Pita, M. L. & Tejero, M. T. 1999. *First results of study of Salmonella persistence in non saturated zone of agricultural soil*. The national institute for agricultural and food research and technology, 84: 127-130.
- Park, 2016** | Park, J. S. 2016. *First record of potentially Pathogenic Amoeba Vermamoeba vermiformis (Lobosea: Gymnamoebia) isolated from a freshwater of Dokdo Island in the East Sea, Korea*. Animal systematics, evolution and diversity, 32: 1-8.
- Reyes-Battle et al., 2014** | Reyes-Battle, M., Chedirad, D. T., Martín-Navarro, C. M., López-Arencibia, A., Cabello-Vilchez, A. M., González, A. C., Córdoba-Lanús, E., Lindo, J. F., Valladares, B., Piñero, J. E. & Lorenzo-Morales, J. 2013. *Isolation and characterization of Acanthamoeba strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain*. Parasitology research, 113: 1383-1388.
- Rietz & Haynes, 2003** | Rietz, D. N. & Haynes, R. J. 2003. *Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity*. Soilless Biology biochemistry, 35: 845-854.

- Rosenberg et al., 2009** | Rosenberg, K., Bertaux, J., Krome, K., Hartmann, A., Scheu, S. & Bonkowski, M. 2009. *Soil amoebae rapidly change Bacterial community in the rhizosphere of Arabidopsis thaliana*. International society for microbial ecology, 9: 675-684.
- Ruiz-Gómez et al., 1998** | Ruiz-Gómez, J., Lorente-Salinas, I., Pérez-Salmerón, J., Simarro-Córdoba, E. & Martínez-Campos, L. 1998. *Evaluation of methods for Isolation of Salmonella species using modified semisolid Rappaport-Vassiliadis medium and Salmonella-Shigella agar*. European journal of clinical microbiology and Infectious diseases, 11: 791-793.
- Ruqaiyyah & Naveed, 2012** | Ruqaiyyah S. & Naveed, K. 2012. *Biology and pathogenesis of Acanthamoeba*. Parasites and vectors, 5: 1-13.
- Scheikl et al, 2014** | Scheikl, U., Sommer, R., Kirschner, A., Rameder, A., Schrammel, B., Zweimüller, I., Wesner, W., Hinker, M. & Walochnik, J. 2014. *Free-living amoebae (FLA) co-occurring with legionellae in industrial waters*. European journal of protistology, 50: 422-429.
- Schroeder & Hibi, 2008** | Schroeder, G. N. & Hibi, H. 2008. *Molecular pathogenesis of shigella spp.: controlling host cell signaling, invasion and death by type III secretion*. Clinical microbiology reviews, 21: 134-156.
- Schuster & Visvesvara, 2004** | Schuster F.L. & Visvesvara, G.S. 2004. *Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals*. Int J Parasitol, 34: 1001–1027.
- Setia et al., 2011** | Setia, R., Marschner, P., Baldock, J., Chittleborough, D. & Verma, V. 2011. *Relationships between carbon dioxide emission and soil properties in salt-affected landscapes*. Soilless Biology biochemistry, 43: 667-674.
- Soil Survey Staff, 1996** | Soil Survey Staff. 1996. *Soil Survey Laboratory Methods Manual*. Soil Survey Invest. Rep. 42. USDA-NRCS, Natl. Soil Survey Center, Lincoln, NE.
- Stanier et al., 1992** | Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L. & Painter, P. R. 1992. *The microbial world*. Englewood Cliffs, New Jersey: Ed. Prentice-Hall.
- Tarchouna et al., 2010** | Tarchouna, L. G., Merdy, P., Raynaud, M., Pfeifer, H. & Lucas, Y. 2010. *Effects of long-term irrigation with treated wastewater. Part I: evolution of soil physico-chemical properties*. Applied geochemistry, 25: 1703-1710.
- Toze, 2005** | Toze, S. 2006. *Reuse of effluent water, benefits and risks*. Agricultural water management, 80: 147-159.
- Urich, et al, 2008** | Urich, T., Lanzén, A., Qj, J., Hudson, D. H., Schleper, C. & Schuster, S. C. 2008. *Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the meta-transcriptome*. PLoS ONE, 3: e2527.
- Visvesvara et al., 2007** | Visvesvara G. S., Moura, H. & Schuster, F. L. 2007. *Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, and Sappinia diploidea*. Immunology and microbiology, 50: 1-26.
- Weil et al., 2003** | Weil, R. R., Islam, K. R., Stine, M. A., Gruver, J. B. & Samson-Liebig, S. E. 2003. *Estimating active carbon for soil quality assessment: a simplified method for laboratory and field use*. American journal of alternative agriculture, 18: 3-17.
- Wong et al., 2009** | Wong, V. N. L., Dalal, R. C. & Greene, R. S. B. 2009. *Carbon dynamics of sodic and saline soils following gypsum and Organic material additions: a laboratory incubation*. Applied soilless ecology, 41: 29-40.
- Zaidi & Estrada, 2014** | Zaidi, M. B. & Estrada García, T. 2014. *Shigella: a highly virulent elusive pathogen*. Current tropical medicine reports, 1: 81-87.