

“DETECCION DE ROTAVIRUS POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE RT-PCR EN MUESTRAS DE COMPOST ELABORADO A PARTIR DE BIOSOLIDOS Y RESIDUOS VEGETALES”



**ADRIANA MILENA ESPINOSA URIBE
SANDRA MARCELA SOLANO CASTRO**

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar el título de**

MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.
NOVIEMBRE DE 2008**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

“DETECCION DE ROTAVIRUS POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE RT-PCR EN MUESTRAS DE COMPOST ELABORADO A PARTIR DE BIOSOLIDOS Y RESIDUOS VEGETALES”

**ADRIANA MILENA ESPINOSA URIBE
SANDRA MARCELA SOLANO CASTRO**

APROBADO

**Maria Fernanda Gutiérrez
Bacterióloga, Ph, D.
Directora**

**Adriana Matiz, M.S.c
Jurado**

**Janeth Arias, M.S.c
Jurado**

“DETECCION DE ROTAVIRUS POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE RT-PCR EN MUESTRAS DE COMPOST ELABORADO A PARTIR DE BIOSOLIDOS Y RESIDUOS VEGETALES”

**ADRIANA MILENA ESPINOSA URIBE
SANDRA MARCELA SOLANO CASTRO**

APROBADO

Ingrid Schuler Ph. D
Decana académica

Janneth Arias, M.S.c
Directora de carrera

DESCRIPCIÓN TRABAJO DE GRADO

AUTORES

Espinosa Uribe Adriana Milena

Solano Castro Sandra Marcela

DIRECTOR

Gutiérrez María Fernanda

TRABAJO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE: Microbióloga Industrial

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: “Detección de rotavirus mediante la técnica de RT-PCR en muestras de compost elaborado a partir de biosólidos y residuos vegetales”

FACULTAD: Ciencias

PROGRAMA: Carrera x Especialización Maestría Doctorado

NOMBRE DEL PROGRAMA: Microbiología Industrial

BOGOTÁ, 2008

NÚMERO DE PÁGINAS: 60

TIPO DE ILUSTRACIONES:

- Ilustraciones
- Tablas
- Fotos

RESUMEN

En este estudio se determinó la presencia de Rotavirus en muestras de compost y en las materias primas utilizadas en su elaboración (residuos vegetales y biosólido), identificándolo mediante la técnica de RT – PCR. Se evaluaron cuatro pilas (P1; P2; P3 y P4) con tres réplicas cada una, a las cuales se les realizó la técnica de extracción descrita por Ahmed y Sorensen (1995) y modificada para este trabajo. La suspensión resultante de este proceso fue sometida a la técnica para concentración de la partícula viral descrita por Lewis y Metcalf (1988) y modificada por Mignotte *et al* (1999), y llevadas a amplificación por RT-PCR para los genes de VP6 y VP4 de Rotavirus. Para detectar la presencia de sustancias inhibitorias que afectaran la técnica de RT-PCR, se realizó el mismo proceso de extracción, concentración y detección, a muestras de compost y a la cascarilla, a las cuales se les adicionó materia fecal positiva para Rotavirus. Se determinó la presencia de partículas de Rotavirus en la muestra de pasto y la existencia de sustancias inhibitorias contenidas en las muestras de compost y biosólido lo que impidió detectar la presencia o ausencia del virus en el producto final.

ABSTRACT

The development of molecular technologies applied to environmental studies has allowed to check that it exists a discharge there was prevailing of virus in the environment, which causes an important impact in the public health and important economic losses in the agricultural products. In this study Rotavirus's presence decided in samples of compost and in the materials raw used in his elaboration (vegetable residues and waste sludge), identifying it with RT – PCR techniques. There were evaluated four piles (P1; P2; P3 and P4) with three replies each one to which they there was realized the extraction technique described by Ahmed and Sorensen (1995) and modified for this work, the resultant suspension of this process was submitted to the technique for concentration of the viral particle described by Lewis and Metcalf (1988) and modified by Mignotte et al (1999), and taken to amplification for RT-PCR for the VP6 and VP4 Rotavirus genes. To detect the presence of inhibitory substances that going to affect the RT-PCR's technique, there was realized the same extraction, concentration and detection processes, to samples of compost and the husk. , to which was added stools positive for rotavirus. It was determined the presence of Rotavirus particles in the sample of grass and the presence of inhibitory substances in the samples of compost and biosolids which prevented detect the presence or absence of the virus in the final product

Le doy gracias a Dios por permitirme llegar hasta este punto, igualmente a mis papas, Lucila y Cayetano, porque sin ellos no hubiera sido posible culminar esta etapa de mi vida, por sus consejos, y el apoyo que siempre recibe. A mi Papito que desde el cielo siempre me protege y nunca me abandona, a él mil gracias porque siempre me dio lo mejor y sobre todo siempre confió en mí. A mi tía, mi tío y demás familiares, a Kenneth, a mis amigos Juan, Marta, Adriana, Andrea, Dorelly, Ángela, por sus palabras de aliento y ánimo para terminar esta etapa y los buenos deseos de empezar una nueva.

Marcela Solano

Principalmente le doy gracias a Dios por haberme ayudado a mantener la fuerza, la paciencia y la voluntad para sacar este proyecto adelante; A mis padres y hermanos por brindarme su amor, apoyo y buenos deseos en todo momento; A mis amigos Juan C. Marín, Jair J. Sampayo, Catherine Vargas, Martha L. Chaparro, Erika A. Alarcón, Andrea del Pilar López, Dorelly Sandoval, entre otros, por sus palabras de apoyo, fuerza y por su incondicionalidad en los momentos mas arduos de esta etapa de mi vida y por supuesto a mi amiga Marcela Solano por ser mi soporte y Colaboración para obtener este logro juntas.

Adriana Milena

AGRADECIMIENTOS

A Juan Carlos Ulloa por su contribución en el desarrollo de este trabajo.

A José Salvador Montaña por su valiosa colaboración y contribución en el desarrollo de este trabajo.

A Olga Raquel Villamizar por su oportuna asesoría.

A Mónica Alvarado por su oportuna colaboración.

A Ingrid Schuler y Janeth Árias por su valiosa intervención para culminar el desarrollo de este trabajo.

Noviembre de 2008

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEORICO	4
2.1. Rotavirus	4
2.1.1. Morfología y estructura	4
2.1.2. Clasificación	5
2.1.3. Replicación viral	8
2.1.4. Patogénesis	11
2.1.5. Dinamica viral en el medio ambiente	12
2.1.6. Epidemiología	14
2.2. Aguas residuales	17
2.3. Biosolidos	17
2.3.1. Características de los biosólidos	18
2.3.1.1. Nutrientes	18
2.3.1.2. Microorganismos	19
2.3.1.3. Metales pesados	20
2.3.1.4. Contaminantes orgánicos	20
2.3.1.5. Materia orgánica	20
2.3.2. Clasificación de los biosólidos	22
2.3.3 Tratamiento de los lodos	23
2. 4. Compostaje	24
2.4.1. Etapas del proceso de compostaje según la temperatura	24
2.4.2. Factores que condicionan el proceso de compostaje	26
2.4.2.1. Relación carbono/nitrógeno	26
2.4.2.2. Oxígeno	27
2.4.2.3. Humedad	27
2.4.2.4. Ph	28
2.4.2.5. Tamaño de las partículas del material a compostar	29
2.4.3. Patógenos en compost	29

2.4.4. Control de calidad en el producto final	31
2.5. Efecto de las condiciones del ambiente sobre agentes virales	33
2.6. Métodos de detección e identificación de virus en muestras ambientales.	35
2.6.1. PCR	36
2.6.2. ELISA (enzyme linked inmuno sorbent assay)	36
2.6.3. Microscopía electrónica	37
3. JUSTIFICACIÓN	38
4. OBJETIVOS	39
4.1. Objetivo general	39
4.2. Objetivos específicos	39
5. MATERIALES Y MÉTODOS	40
5.1. Muestras	40
5.2. Recolección de las muestras	41
5.3. Análisis de las muestras	42
5.3.1. Extracción viral	42
5.3.2. Concentración viral	42
5.3.3. Detección de sustancias inhibidoras	43
5.3.4. Almacenamiento de las muestras	43
5.3.5. Prueba de PCR para Rotavirus	43
5.3.5.1. RT	43
5.3.5.2. PCR VP6	44
5.3.5.3. PCR VP4	45
6. RESULTADOS	46
6.1. Detección de Rotavirus en las muestras por medio de la amplificación de VP6	46
6.2. Detección de Rotavirus en las muestras por medio de la amplificación de VP4	47
6.3. Detección de inhibidores de la prueba de RT- PCR	48
7. DISCUSIÓN	50

8. CONCLUSIONES	59
9. RECOMENDACIONES	60
10. BIBLIOGRAFIA	61
11. ANEXOS	70

LISTA DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PAG
1	Tipos de tratamiento de agua residual	17
2	Elementos en biosólidos	21
3	Nutrientes y otros	22
4	Normatividad y control de patógenos en biosólidos	23
5	Distribución de materiales para el montaje de pilas	41

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PAG
1	Dinámica viral en el medio ambiente	13
2	Producto de la RT-PCR de la amplificación del gen de VP6 de Rotavirus en muestras de compost.	46
3	Producto de la RT-PCR para la identificación del gen de VP4 de Rotavirus en muestras de compost que fueron positivas en la amplificación de VP6	47
4	Producto de la RT-PCR para la Identificación del gen VP6 de Rotavirus en muestras usadas para la identificación de inhibidores	49

1. INTRODUCCIÓN

El tratamiento de aguas residuales como alternativa para reducir la contaminación de las fuentes receptoras, ha generado impactos positivos para la recuperación de dichas fuentes; sin embargo, su tratamiento, genera subproductos como el biosólidos, el cual es necesario darle una adecuada utilización. La disposición de los biosólidos demanda un manejo muy cuidadoso por la cantidad que alcanzan y por los riesgos ambientales que, en algunos casos, pueden representar ante la posibilidad de contener sustancias contaminantes provenientes de las aguas tratadas.

En la actualidad, la utilización del biosólido en terrenos agrícolas es una práctica que se ha extendido alrededor del mundo, ya que el aprovechamiento de la materia orgánica, los nutrientes y los minerales que contiene pueden llegar a reducir el consumo de fertilizantes comerciales (Méndez *et al.*, 2002). Los biosólidos pueden ser utilizados en la agricultura como abono, es decir, como un producto capaz de proporcionar a los cultivos elementos nutritivos necesarios para su crecimiento y su desarrollo. También algunos biosólidos, transformados en compost, pueden jugar un papel importante como fertilizante, lo que significa mantener o mejorar la estructura del suelo, su actividad biológica o también controlar su acidez. (Lozada *et al.*, 2005). A pesar de las ventajas que poseen los biosólidos, éstos pueden generar un riesgo sanitario, debido a la concentración de microorganismos patógenos que pueden ser transmitidos a los animales y al hombre durante la disposición y utilización insalubre de estos productos.

Los microorganismos contenidos en el biosólido pueden estar presentes en formas que son directamente infecciosas para los humanos, o en sus formas más resistentes (quistes y huevos), las cuales pueden convertirse en patógenos después de su ingestión o incorporación en el sistema

gastrointestinal, por lo cual los biosólidos deben someterse a tratamientos de desinfección, que eliminen los microorganismos patógenos y permitan su utilización en tierras agrícolas (Araque, 2005).

Los virus entéricos son uno de los patógenos más críticos, debido a que la dosis mínima infecciosa es baja ($< 10^2$). Son estables a condiciones físico-químicas adversas como el pH y temperaturas en conjunto con su resistencia a los sistemas de desinfección. Adicionalmente, su detección requiere pruebas especializadas, lo que hace que sea costosa su identificación. Dentro de los virus entéricos se encuentran los rotavirus, conocidos por ser los principales agentes etiológicos de diarrea (Leon *et al.*, 2007).

En los últimos años el desarrollo de técnicas moleculares ha permitido la detección e identificación de bajas concentraciones de virus en diversas muestras, mejorando la sensibilidad y especificidad de las pruebas anteriormente usadas. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) asociada a la posibilidad de caracterizar genéticamente los virus detectados, ha permitido obtener una información más completa de muchos de los virus presentes en el ambiente. La PCR no determina el estado infeccioso de un organismo, sólo puede determinar la presencia o ausencia de secuencias de DNA o RNA específicas del patógeno. (Wilson, 1997; Ijzerman *et al.*, 1997; Monpoeho *et al.*, 2004).

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de rotavirus en muestras de compost elaborado a partir de residuos vegetales y biosólido mediante la extracción y concentración del agente y posterior detección por la técnica de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa–transcriptasa reversa). Pues como se mencionó anteriormente, el rotavirus puede estar presente principalmente en materiales como el biosólido, que debido a un

mal proceso de compostaje, podría llegar a causar infecciones en los humanos por la ingestión de alimentos abonados con este producto.

2. MARCO TEORICO

2.1. Rotavirus

Todos los miembros de la familia *Reoviridae* poseen un genoma formado por 10, 11 ó 12 segmentos de RNA de doble cadena, miden entre 60 y 65 nm, carecen de envoltura lipídica, presentan proteínas distribuidas en capas concéntricas siguiendo una simetría icosaédrica y la replicación tiene lugar en el citoplasma, formándose viroplasmos en las células infectadas (Villena, 2003). Dentro de los géneros que se agrupan en esta familia se encuentra los rotavirus, reconocidos como el principal agente etiológico de las gastroenteritis virales en las crías de un gran número de mamíferos (incluyendo al hombre), y de aves. Con base a la morfología de estos virus, cuya apariencia al microscopio electrónico es la de una rueda de carreta antigua, estos virus fueron bautizados con el nombre de rotavirus, del latín rota, que quiere decir rueda (López *et al.*, 2001).

2.1.1. Morfología y Estructura

Las partículas virales de rotavirus tienen un genoma formado por once segmentos de RNA de doble cadena rodeado por tres capas proteicas concéntricas que se denominan cápside interna o core, cápside intermedia y cápside externa (Kapikian, 2001).

Existen tres tipos de partículas virales con diferentes características estructurales; La partícula completa, que contiene las tres capas proteicas, es también llamada TLP (Triple-Layered Particle); esta es la partícula infecciosa ya que la presencia de la capa externa formada por las proteínas VP4 y VP7 le permite unirse y penetrar a su célula huésped; la partícula que contiene dos capas proteicas o DLP (Doble-Layered Particle) esta formada por la proteína no infecciosa VP6, y las partículas que contienen una sola capa de proteínas, o nucleocápsides, donde se encuentran las proteínas VP1

y VP3 que están asociadas con la VP2, que tiene la actividad de replicar el genoma viral (Greig *et al.*, 2006).

Además de tener diferentes actividades biológicas, estas partículas tienen diferentes propiedades fisicoquímicas. Entre estas vale la pena mencionar el hecho de que tienen diferentes densidades, lo que permite separarlas mediante gradientes de cloruro de cesio. Las TLPs tienen una densidad de 1.36 g/cm³, las DLPs de 1.38 g/cm³ y las nucleocápsides de 1.44 g/cm³. También, dada su diferencia en tamaño, el RNA que compone cada una de estos tres tipos de partículas puede ser separado mediante electroforesis en geles de agarosa (López *et al.*, 2001).

2.1.2. Clasificación

Los rotavirus se clasifican en serogrupos, subgrupos y serotipos según sus características serológicas. Se conocen 7 diferentes serogrupos o grupos dependiendo de los diferentes epítopes presentes en la proteína VP6, se clasifica en grupos de la A-G y subgrupos (SG) I, II, I y II, no I y no II, detectándose con mayor frecuencia los grupos de la A-C, con subgrupo SG II en las cepas humanas y el SG I en las cepas de origen animal. Los grupos A, B y C se han encontrado tanto en animales como en humanos y los rotavirus de los grupos D, E, F y G sólo se han aislado de especies animales (Taniguchi *et al.*, 1995). El serogrupo A, se asocia típicamente a diarreas en personas y animales jóvenes. El serogrupo B se ha asociado a epidemias anuales de diarrea grave en adultos en China. El serogrupo C ha sido esporádicamente descrito en muestras fecales de niños con diarrea

Entre los rotavirus del grupo A se identifican diferentes tipos antigénicos, denominados serotipos, basado en diferencias antigénicas de las dos proteínas que conforman la cápside externa, VP7 y VP4. VP7 es una glicoproteína (por lo que se le denomina proteína G) que conforma la matriz

de la cápside externa y VP4 es una proteína sensible proteasa (denominada por ello proteína P) que conforma las espículas que protruyen a través de la matriz. En la actualidad se conocen 15 serotipos G, con base en la proteína VP7 y 14 serotipos P de acuerdo con la proteína VP4 (O’Ryan, 2005; Estes, 2001; Tsunemitsu *et al.*, 1992).

La incidencia y distribución de serotipos de rotavirus humanos del grupo A varía entre zonas geográficas de una estación a otra. Como los genes de VP7 y VP4 pueden segregarse de manera independiente, es necesario un sistema de clasificación dual para caracterizar las cepas de rotavirus que circulan en las distintas estaciones del año (Estes, 2001).

La RT – PCR en cuanto a la detección y genotipificación de rotavirus proporciona datos confiables en la epidemiología de infecciones por rotavirus. Además de detectar específicamente tanto el tipo P como el tipo G, la técnica permite una vez obtenido el cDNA, secuenciarlos (Iturriza-Gomara *et al.*, 1999).

La capa más externa del virus esta formada por las proteínas VP4 y VP7, que son las proteínas responsables de los primeros contactos con la célula huésped y por lo tanto tienen funciones que determinan la infectividad del virus, tales como el rango de huéspedes del virus, la unión y la penetración del virus a la célula, y es por esto que son las principales inductoras de anticuerpos neutralizantes (Matthijnssens *et al.*, 2006).

VP7

Es una glicoproteína que forma parte de la cápside externa. Es la segunda proteína más abundante del virión ya que constituye el 30% de la proteína viral y es codificada por el segmento de RNA 7, 8, o 9 dependiendo de la cepa de rotavirus que se analice (Matthijnssens *et al.*, 2006).

Esta proteína es altamente inmunogénica y es muy buena inductora de anticuerpos neutralizantes, que son serotipo específicos. VP7, de 326 aminoácidos, se modifica post-traduccionalmente por la adición de azúcares. Es una N-glicoproteína que contiene únicamente oligosacáridos del tipo de alta manosa, lo que indica que VP7 no viaja del retículo endoplásmico al aparato de Golgi, donde normalmente los oligosacáridos del tipo de alta manosa son modificados para convertirlos en oligosacáridos complejos. Por estudios bioquímicos se sabe que VP7 es glicosilada cotraduccionalmente a medida que se inserta en el lumen del retículo endoplasmático y la señal para esta inserción se encuentra contenida en el péptido señal presente en el extremo amino de VP7 (Kapikian *et al.*, 1996).

VP4

La proteína VP4 es el producto proteico del segmento 4 no glicosilado, que se encuentra en la capa mas externa de la cápside. Constituye el 1.5% de la proteína viral.

Esta proteína de 776 aminoácidos tiene funciones esenciales en el ciclo de vida del virus, incluyendo la unión al receptor, la penetración a la célula, formación de anticuerpos neutralizantes y la hemaglutinación (Estes, 2000). Por lo tanto, las propiedades de esta proteína son determinantes importantes del rango de huésped, virulencia, tropismo e inducción de inmunidad protectora. Por ser sensible a las proteasas (tripsina), la VP4 presenta un rompimiento específico en dos polipéptidos de menor peso molecular VP5 y VP8 para activar la capacidad infecciosa (Mattion *et al.*, 1994).

Por otro lado, la capa intermedia del virus esta formada por la proteína más abundante del virión, VP6, codificada por el gen 6. Esta proteína, de 397 aminoácidos, juega un papel muy importante en la estructura del virión dado

que interacciona tanto con la proteína VP2, hacia el interior de la partícula viral, como con VP4 y VP7 en la capa externa del virión. VP6 forma espontáneamente trímeros y es muy estable; esta característica y el hecho de que contiene determinantes antigénicos (o epítopes) conservados entre diferentes cepas de rotavirus, son la razón de que VP6 sea el blanco antigénico principal en los ensayos de diagnóstico inmunológico para los rotavirus. Los epítopes de VP6 que son conservados entre todas las cepas de rotavirus del grupo A son llamados epítopes de grupo. En esta proteína también se han identificado otros epítopes, llamados epítopes de subgrupo, los cuales han sido utilizados como marcadores epidemiológicos para clasificar diferentes cepas dentro del grupo A (Lopez, 2001).

Si se remueve VP6 de las DLPs se pierde la actividad de transcriptasa de esta partícula, aunque hasta la fecha no se ha reportado que esta proteína tenga este tipo de actividad. Aparentemente el papel de VP6 en esta función es principalmente estructural, manteniendo la conformación apropiada, o la organización del complejo transcripcional en la nucleocápside viral. Esta proteína es hidrofóbica y altamente antigénica e inmunogénica (Estes, 2001).

Las proteínas que conforman la nucleocápside son VP1, VP2 y VP3, es en esta partícula donde se lleva a cabo la replicación del ARN viral. Las proteínas que constituyen los complejos varían dependiendo de si la función del complejo es la de sintetizar ARN de doble cadena utilizando como templado el ARNm (partículas replicativas), o si se trata de sintetizar ARN mensajeros a partir del ARN de doble cadena (partículas activas en transcripción) (López *et al.*, 2001).

2.1.3. Replicación Viral

Los rotavirus inician su ciclo de infección uniéndose a un receptor localizado en la superficie de la célula. Después de la unión al receptor, los rotavirus

penetran al interior de la célula y pierden la capa externa, con lo cual se activa la transcripción. Los RNAs recién sintetizados cumplen dos funciones: como RNAs mensajeros que dirigen la traducción de las proteínas del virus y como templados para la síntesis de los RNAs complementarios para la replicación del genoma. La selección, el empaquetamiento y la replicación de los segmentos del genoma, así como la morfogénesis de las partículas de doble capa (DLPs), se llevan a cabo en estructuras electrodensas denominadas viroplasmas, que están compuestos de grandes cantidades de RNA y proteínas virales. Una vez las partículas han madurado, son liberadas al exterior de la célula mediante evaginación a través de la membrana del retículo endoplasmático, donde adquieren las proteínas de la cápside más externas. Finalmente los viriones maduros son liberados de la célula por lisis. Todo el ciclo replicativo de los rotavirus se lleva a cabo en el citoplasma celular, sin necesitar el núcleo de la célula (Estes *et al.*, 2001; Jourdan *et al.*, 1997).

La proteína VP4 tiene una función esencial en el ciclo de vida del virus, incluyendo la unión al receptor y la penetración celular. El papel de VP7 durante las interacciones iniciales del virus con la célula es poco claro, aunque se ha demostrado recientemente que VP7 interactúa con las moléculas de la superficie celular como un paso subsecuente a la unión inicial del virus a través de las espículas de la proteína VP4. Después de que el virus se ha unido a la superficie celular, tiene que penetrar la membrana plasmática para infectar la célula de manera efectiva. Esta penetración se aumenta por el tratamiento con tripsina pancreática sobre el virus lo que produce la división específica de VP4 a los polipéptidos VP8 y VP5. La división de VP4 no afecta la unión celular y se asocia con la entrada del virus en la célula. Durante, o un poco después de la entrada celular, las partículas TLPs infectivas son descubiertas, perdiendo las dos proteínas de la capa

externa y produciendo partículas DLP las cuales son transcripcionalmente activas (Estes *et al.*, 2001; Arias *et al.*, 2004).

La proteína VP1 sintetiza los transcritos virales primarios, los cuales son liberados al citoplasma de la célula a través de los canales de clase I localizados en las DLPs. Los transcritos de RNA dirigen la síntesis de seis proteínas estructurales y seis proteínas virales no-estructurales (es decir, funcionan como mRNAs) y también sirve como moldes de RNA (RNA(+)) para la síntesis de cadenas de RNA negativas (ARN (-)), para formar los segmentos genómicos dsRNA. Una vez obtenida una cantidad considerable de proteínas virales acumuladas en los viroplasma, las proteínas y RNA(+) son empaquetados en el core producido durante una primera replicación (Arias *et al.*, 2004).

Además de la RNA polimerasa del virus, las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5 son esenciales para los primeros pasos de morfogénesis. Todos estos procesos llevan a la producción de dsRNA transcripcionalmente activos contenidos en las DLPs producidas durante una primera replicación. Estas partículas son responsables de reforzar una segunda transcripción la cual produce una segunda ola de partículas de doble capa (DLPs) ensambladas que entonces brotan a través de la membrana del retículo endoplasmático (RE).

Una vez las DLPs entran al retículo endoplasmático adquieren las proteínas externas, VP4 y VP7, y de esta manera producir TLPs maduros, liberados por lisis celular. Aparte de la glicoproteína NSP4, las otras cinco proteínas no estructurales (NSP1 a NSP3, NSP5, y NSP6) tiene la habilidad de ligar RNA y se piensa que están involucradas en la replicación del genoma viral, aunque su función precisa no es conocida (Arias *et al.*, 2004).

2.1.4. Patogénesis

La infección por rotavirus está restringida a las células de las puntas de las vellosidades del intestino delgado; lo que sugiere la existencia de receptores específicos del huésped (Kapikian *et al.*, 2002). El rotavirus tiene la capacidad de adherirse al revestimiento epitelial del tracto gastrointestinal y el principal sitio de replicación son los enterocitos maduros sobre las vellosidades del intestino delgado alto. Durante un periodo de uno a dos días después de la replicación viral, la infección se disemina a lo largo del tracto, desde el intestino delgado proximal hasta el ileón. La infección intestinal es suficiente para despertar la respuesta inmune local y sistémica (Pizarro *et al.*, 1991).

Se cree que la diarrea es consecuencia de la destrucción y descamación de los enterocitos; sin embargo, se ha propuesto que la diarrea es causada por la proteína no estructural NSP4 que estimula la secreción transepitelial de cloro por una vía dependiente de calcio, lo que desequilibra el balance iónico de la célula y provoca la salida de agua. Esto a su vez puede provocar el síndrome de mala absorción de carbohidratos, grasas y proteínas, debido al gran daño causado en las vellosidades del intestino delgado (Pizarro *et al.*, 1991).

Además del papel que juegan las proteínas de superficie en la primera fase de la infección viral, éstas contienen determinantes antigénicos que representan blancos importantes del sistema inmune. Anticuerpos dirigidos contra cualquiera de las dos proteínas de superficie, neutralizan al virus *in vitro* y son capaces de proteger pasivamente a ratones contra la infección por rotavirus. La infección oral con rotavirus estimula una inmunidad protectora que puede estar mediada por VP7 y/o VP4. Aunque se sabe poco de la inmunidad celular, ésta parece también tener un papel importante en la

protección o cuando menos en la resolución de la infección, aunque no es claro cuál o cuáles de las proteínas virales la inducen.

La unión de algunos rotavirus de origen animal a la célula huésped es dependiente de la presencia de ácido siálico en la superficie celular y se ha demostrado que esta interacción es necesaria para que exista una infección eficiente tanto *in vivo* como *in vitro* (Estes, 2000). Así, varios glicoconjugados que contienen ácido siálico han sido propuestos como posibles receptores para los rotavirus de origen animal. Tal es el caso de los gangliósidos GM3 en el intestino de cerdos. Por otro lado, se ha propuesto que algunas integrinas también pudiesen estar involucradas en las primeras interacciones de los rotavirus con su célula huésped (Bluff *et al.*, 2003).

Las infecciones originadas por rotavirus no están limitadas al intestino; algunos reportes de rotavirus en el líquido cefalorraquídeo y en muestras de sangre de niños infectados sugieren la posibilidad de que los rotavirus pueden escapar del intestino hacia el sistema circulatorio produciendo una antigenemia y viremia. Este descubrimiento fue importante para el entendimiento de la patogénesis, inmunología y las manifestaciones clínicas de la infección. La deshidratación debida a la inducción y vómito trae como consecuencia una alta mortalidad y carga económica en países en desarrollo (Bluff *et al.*, 2003).

2. 1.5. Dinámica viral en el medio ambiente

En las zonas cercanas a grandes núcleos de población, entre ellas lagos, ríos y demás medios acuáticos, se recibe aportes de grandes concentraciones de virus que son excretados por el hombre y otros animales a través de las heces y la orina de individuos infectados, incluso sin que presenten signos de enfermedad aparentes. La duración del periodo de excreción fecal depende del virus. Los adenovirus entéricos se encuentran

en las heces 7 - 14 días después del inicio de la sintomatología clínica, entre 3-4 días en el caso de rotavirus pudiendo llegar a excretarse hasta 10^{11} partículas de rotavirus por gramo. En el caso de poliovirus, la excreción comienza a las 24 h del inicio de la infección y se prolonga durante varios meses. La concentración de estos virus en las aguas residuales puede llegar a ser de 10^5 UFC/l (Pina, 2001).

La ingestión de agua contaminada y de vegetales que se han regado con aguas ineficientemente tratadas o que se han cultivado en terrenos abonados con biosólidos que contienen virus infecciosos, son una de las vías de transmisión (Kittigul *et al.*, 2001). La utilización de biosólidos como abono podría conducir a la contaminación de los vegetales cultivados ya sea por contacto directo o con aerosoles (Figura 1).

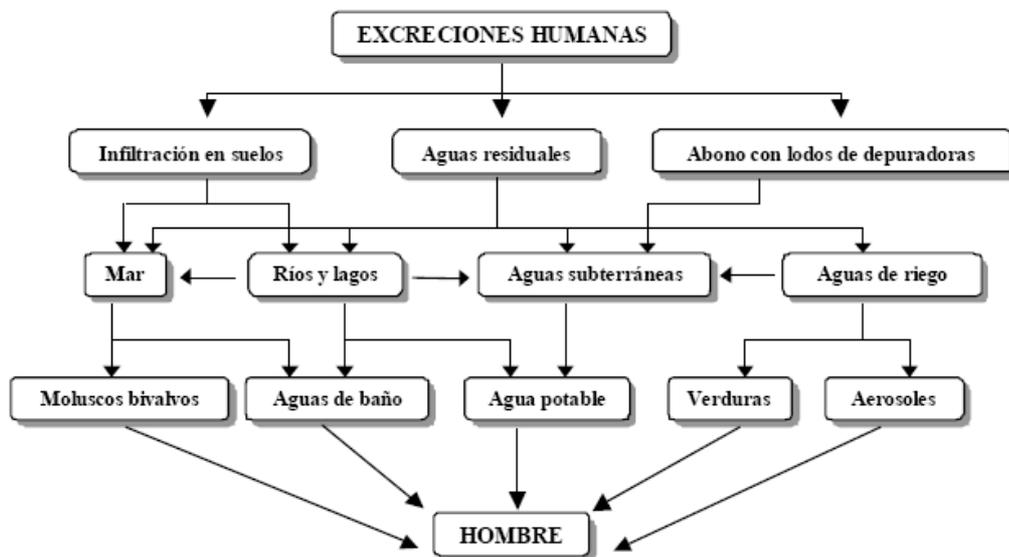


Figura 1. Dinámica viral en el medio ambiente (Pina, 2001)

Las partículas víricas presentes en heces, aguas residuales, desechos domiciliarios, no son completamente destruidas luego de ser sometidos a procesos de estabilización como la pasteurización, la digestión anaerobia

mesófila, la digestión aerobia termófila, el compostaje, estabilización con cal del lodo líquido, almacenamiento líquido, deshidratación y almacenamiento. En el caso de lodos procedentes de las plantas de tratamientos de agua residual la supervivencia viral es mayor cuando se le realiza una digestión aerobia que cuando se realiza una digestión anaerobia, debido a la formación de flóculos y puntos muertos donde se refuerza la adhesión de las partículas víricas a los sólidos (Lucena *et al.*, 2005). Debido a esto es necesario utilizar técnicas que permitan detectar la contaminación viral en el agua para consumo y de riego, o el abono de los suelos y así garantizar una calidad sanitaria antes de su aspersión o consumo, según sea el caso (Graffo *et al.*, 1993).

Los virus entéricos en agua pueden permanecer estables durante meses o incluso más tiempo si están asociados a sólidos y pueden acumularse en sedimentos donde persistirán durante más tiempo y desde donde pueden resuspenderse en la columna de agua por diversos procesos naturales como lluvias fuertes o por procesos artificiales, facilitando la diseminación viral (Rzesutka y Cock, 2004).

La contaminación del medio ambiente a partir de aguas residuales se confirma al analizar la presencia de virus en aguas superficiales y lagos en los que se detecta altos porcentajes de muestras positivas para algún tipo de virus y en los frecuentes casos de infecciones virales asociados al consumo de moluscos bivalvos que se observan cada año (Pina, 2001).

2.1.6. Epidemiología

Estudios epidemiológicos han demostrado que los rotavirus son una de las principales causas de gastroenteritis grave en niños y en animales, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo. Se ha estimado que ocasionan a nivel mundial más de 870.000 muertes por año. En la

Región de las Américas el rotavirus causa aproximadamente 75.000 hospitalizaciones y cerca de 15.000 muertes anuales (Schönning y Stenström, 2004).

El rotavirus puede provocar desde una infección asintomática en menores de 3 meses, hasta una diarrea grave con deshidratación, acompañada de vómito súbito y fiebre en 30-50% de los casos, tras un periodo de incubación de unos dos días. Durante la infección, aún la asintomática, el virus es vertido en las heces a niveles de 10^9 partículas virales o más por gramo de heces. Al ver que solo se necesita una mínima dosis de las mismas para causar enfermedad clínica, es fácil ver que el modo de transmisión principal es el fecal-oral (Schönning y Stenström, 2004).

La incidencia de la infección por rotavirus es similar en los países en desarrollo y en los desarrollados. Sin embargo, en los países más pobres la letalidad es mayor, producto de la desnutrición y de las dificultades para acceder oportunamente a los servicios de salud. En países en desarrollo, la tasa de infección más alta ocurre entre los 3 y 11 meses de vida y en los países desarrollados durante el segundo año de vida.

Aun así, se han documentado brotes producidos por rotavirus relacionados con aguas de distribución que se han vinculado al mal funcionamiento de los sistemas de depuración aplicados o a la contaminación del sistema de distribución con aguas residuales. Gerba *et al.*, en 1984, demostraron la presencia de rotavirus y enterovirus en aguas sometidas a un proceso de potabilización en los que se cumplían con los valores estándar de calidad para aguas potables (0 UFC coliformes/100 ml, concentración de cloro libre superior a 0,5 mg/l)

Los sistemas de tratamiento de aguas residuales pueden generar aerosoles que se transportan por el aire y que actúan como vehículo de transmisión de virus al ser inhalados. Esto puede tener consecuencias epidemiológicas importantes en personas expuestas a aerosoles (trabajadores de plantas de tratamiento de aguas residuales, agricultores que utilizan aguas residuales o lodos en sus campos). En el caso de la agricultura la utilización de aguas residuales depuradas o no y la utilización de lodos como abono podrían conducir a la contaminación de los vegetales cultivados ya sea por contacto directo o con aerosoles. Además, se ha descrito la incorporación de virus por parte de las plantas irrigadas con aguas residuales a través de raíces o tallos dañados. La concentración de virus de origen humano es elevada en las capas superiores de suelos irrigados con aguas residuales o abonados con lodos y la tasa de supervivencia de los virus puede llegar a ser de varios meses, como en el caso de poliovirus, (Pina, 2001).

Por otro lado el rotavirus presenta diferencias en el comportamiento estacional. En países de clima templado las infecciones predominan en invierno, mientras que en los países tropicales los casos suelen ocurrir durante todo el año, aunque pueden registrarse picos más altos en invierno, por lo tanto, un niño que nazca en un país de clima templado, después de la estación de invierno, no estará expuesto al virus hasta el siguiente año, en tanto que un niño que nazca en un país tropical estará expuesto al virus durante todo el año. Es por esto que el promedio de edad de las infecciones es más bajo en los países de clima tropical, donde los niños se enferman en su primer año de vida, en comparación con el promedio de aquellos que viven en países de clima templado, quienes suelen infectarse entre los dos y tres años de edad (Pina, 2001).

2.2. Aguas residuales

Las aguas residuales son esencialmente las aguas de abastecimiento de una población una vez han sido contaminadas por diversos usos. Resultan de una combinación de líquidos o desechos arrastrados por el agua, procedentes de casas, instituciones públicas, edificios comerciales, establecimientos industriales, agrícolas y ganaderos, a los que pueden agregarse eventualmente, aguas subterráneas, superficiales y pluviales (Metcalf *et al.*, 1995).

Los principales procesos de tratamiento de aguas residuales están dirigidos a la eliminación de la composición orgánica. En una planta de tratamiento, el agua se dirige a lo largo de una serie de procesos físicos, químicos y biológicos en los que cada uno posee una función para reducir una carga contaminante específica (**Tabla 1**).

Tabla 1. Tipos de tratamiento de agua residual

Pretratamiento	Físico y/o químico	Flotación homogenización
Tratamiento primario	Físico	Sedimentación
Tratamiento secundario	Biológico	Degradación microbiológica
Tratamiento avanzado	Físico y/o químico y/o biológico	Intercambio iónico

Fuente: Ingeniería ambiental (Kiely, 1999)

2.3. Biosólidos

Los biosólidos son lodos generados en el tratamiento de aguas residuales y sometidos a un proceso de estabilización mediante una degradación biológica de carácter anaerobio. Éstos han sido definidos por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, Environmental Protection

Agency) en su código 40 CFR 503 como sólidos provenientes del tratamiento de las aguas residuales que luego son estabilizados biológicamente, con suficiente concentración de nutrientes, bajo contenido de microorganismos, presencia permisible de metales pesados, que se puede utilizar como fertilizante, acondicionador o mejorador de suelos, de acuerdo con la composición fisicoquímica del biosólido y la vocación de uso del suelo (Quinchía *et al.*, 2004).

2.3.1. Características de los biosólidos

Dentro de las características más importantes de los biosólidos se encuentran:

2.3.1.1. Nutrientes

La concentración de los nutrientes en los biosólidos es muy variable dependiendo del tipo de efluente y tratamiento a los cuales sean sometidos. Los biosólidos poseen muchos elementos esenciales para la vida vegetal como nitrógeno, fósforo y potasio y trazas de micronutrientes considerados indispensables para el crecimiento de las plantas, algunos de estos se encuentran en concentraciones tales que pueden llegar a ser perjudiciales (Lang y Brown, 2005; Outwater, 1994)

Nitrógeno: en el biosólido este nutriente se encuentra en forma nítrica (N-NO₃), amoniacal (N-NH₄) y orgánica siendo ésta última la más abundante. Teniendo en cuenta que las plantas toman el nitrógeno de la solución del suelo en forma de iones nitrato o amonio, es necesario que este nitrógeno orgánico se transforme en estos iones, lo cual depende de las características del biosólido como del suelo.

Fósforo: Las formas en que se halla el fósforo (P) en el biosólido, dependen de la composición de éste antes de ser tratado y de los procesos a que se

halla sometido durante su estabilización, de esta forma se pueden encontrar compuestos orgánicos e inorgánicos, solubles e insolubles. En la mayoría de las condiciones del suelo, el fósforo que se adiciona es en forma soluble para que de esta manera sea aprovechado por la planta.

Potasio: El contenido de potasio (K) en los biosólidos es bajo comparado con el resto de nutrientes. Este elemento se encuentra esencialmente en forma de sales inorgánicas solubles y asimilables para las plantas.

2.3.1.2. Microorganismos

Los biosólidos son principalmente biomasa residual, la cual está constituida por una heterogénea y significativa población de microorganismos como bacterias, virus, protozoos y huevos de helmintos, los que se concentran durante el proceso de depuración de las aguas servidas. Sin embargo, el número y tipos de estos organismos varían dependiendo de factores como densidad de población, condiciones sanitarias y tratamientos a los que son sometidos. Algunos de estos tratamientos como digestión aerobia, digestión anaerobia y aireación, reducen significativamente más no eliminan completamente los patógenos. Entre las bacterias patógenas que pueden estar presentes en los biosólidos se encuentran, por ejemplo, las *Salmonellas Typhi* (que produce fiebre tifoidea), *Eschericha coli* (que produce gastroenteritis), *Shigellas* (que produce disenteria), las *Vibrio Cholerae* (que producen diarreas extremadamente fuertes o cólera), etc. Entre los protozoos se encuentran la *Crytosporidium* y la *Balantidium Coli* (que producen diarrea) y también se pueden encontrar tenias y lombrices intestinales. Entre los virus encontrados en los biosólidos frescos están además, el de la hepatitis A y el de la poliomiелitis. Los rotavirus y adenovirus pueden causar infecciones respiratorias y gastrointestinales. Éstos pueden sobrevivir en el suelo desde semanas a meses dependiendo de las condiciones ambientales (Gerba y Smith, 2005; BioVir Laboratorios Inc, 2002; Vinneras, 2006).

2.3.1.3. Metales Pesados

Están presentes en los biosólidos en cantidades importantes, su procedencia es diversa: doméstica, industrial y comercial.

Es posible encontrar metales como boro, cadmio, cromo, plomo, níquel, mercurio, plata y zinc (Khan y Scullion, 2002). Algunos de estos elementos son micronutrientes esenciales requeridos por plantas y animales lo cuales a bajas concentraciones constituyen un aporte nutritivo al suelo, sin embargo, a altas concentraciones pueden ser tóxicos.

La mayoría de los metales se acumulan en la tierra (pudiendo permanecer allí por cientos de años) y las plantas los toman de ella a través de sus raíces. El uso de ciertos productos puede terminar en el aumento de pH de los lodos lo que es deseable muchas veces ya que esta característica se asocia con la disminución de fitodisponibilidad de metales pesados (Brown *et al.*, 2003). Existe la posibilidad de que los niveles acumulados sean tan altos que constituyan un peligro para la salud de los animales y personas lo cual puede generar problemas en la cadena trófica, enfermedades y probablemente la muerte de seres vivos.

2.3.1.4. Contaminantes Orgánicos

Los biosólidos pueden contener compuestos orgánicos volátiles (VOC's) como ciclohexano, octano, cloroformo, tetracloroetileno, benceno, xilenos y toluenos. También se encuentran compuestos como hidrocarburos aromáticos (PAH's) y fenoles, además muy altas concentraciones de surfactantes debidos a los detergentes.

2.3.1.5. Materia Orgánica

Los biosólidos aumentan el contenido de materia orgánica de los suelos y mejoran sus propiedades estructurales, ya que une las partículas del mismo

en agregados estables produciendo una estructura que facilita la permeabilidad del agua y el aire, reduciendo los riesgos de erosión y la escorrentía, es decir, impidiendo que las aguas lluvias queden en movimiento sobre la superficie, y así mismo evitando que arrastre consigo los materiales orgánicos e inorgánicos que componen el suelo. En contraste si la cantidad de materia orgánica es baja, los agregados del suelo son menos estables con el agua y fácilmente dispersables. A continuación, en la tabla 2 se presenta los resultados de la caracterización química y biológica de los biosólidos obtenidos en el tratamiento de las aguas residuales de planta de tratamiento el salitre y su comparación con los límites establecidos por la EPA.

Tabla 2. Elementos en biosólidos

Elemento (MG/KG)	Planta El Salitre	límites para biosólidos que se apliquen al suelo (epa, 1996)
Cadmio (Cd)	1.53 – 7.2	85
Cromo (Cr)	40 – 70	-----
Cobre (Cu)	101 – 143	4300
Mercurio (Hg)	0.06 – 0.8	57
Níquel (Ni)	30 – 49	420
Plomo (Pb)	81 – 142	840
Selenio (Se)	0.01 – 0.45	100
Zinc (Zn)	103 – 1665	7500

Fuente: Minervini y Morales (2002)

En la tabla 3 se pueden ver los rangos de valores de nutrientes que presentan los biosólidos comparándolos con los rangos de otras Plantas de Tratamiento de agua residual.

Tabla 3. Nutrientes y otros

Parámetro	Biosólido EI Salitre	Valores típicos Literaura
Nitrógeno total (Kg N/ t bruta)	3.5 – 8.7	8 – 12
Nitrógeno orgánico (Kg N/ t bruta)	1.6 – 7.3	-----
Fósforo total (Kg P₂O₅/ t bruta)	4 – 27	6 – 9
Sólidos Totales (% proa. Bruto)	32 – 37	16 – 22
Sólidos volátiles (% MS)	40 – 55	30 – 50
Ph	7.7 – 8.5	7 – 8

Fuente: Minervini y Morales (2002)

2.3.2. Clasificación de los biosólidos

Según criterios microbiológicos, químicos y físicos, los biosólidos se clasifican en:

Lodo residual clase A: es un biosólido cuyo contenido de patógenos está por debajo de niveles detectables y puede ser aplicado al suelo sin restricciones de patógenos. Se pueden aprovechar en cultivos de consumo directo como hortalizas y aromáticas.

Lodo residual clase B: Es un material que posee microorganismos patógenos, pero permite garantizar que el contenido de patógenos se reduce a un nivel tolerable en condiciones específicas de uso que minimicen el potencial de contacto de los patógenos con humanos o animales. Se pueden utilizar en cultivos que tengan un posterior procesamiento como lo son la caña, el maíz, el cereal, el algodón y los frutales, así como también en rellenos sanitarios y recuperación de suelos (EPA 40 CFR 503, 2002).

Los parámetros de clasificación de los biosólidos a nivel microbiológico se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Normatividad y control de patógenos en biosólidos

Parámetro Microbiológico	BIOSOLIDO CLASE A, Norma EPA	BIOSÓLIDOS CLASE B, Norma EPA
Coliformes fecales	< 1000 NMP/ g	< 2 x 10 ⁶
Huevos de helminto	< 1 Huevo viables/ 4g	-----
Virus entéricos	< 1 UFC/ 4g	-----

Fuente: EPA 40 CFR 503, 2002).

2.3.3 Tratamiento de los lodos

Los métodos de tratamiento de lodos pueden estar orientados fundamentalmente a conseguir dos fines bien diferenciados. Por un lado, existen una serie de tratamientos que llevan a cabo una estabilización de los biosólidos, es decir, los someten a un tratamiento que da lugar a un producto adecuado para su utilización posterior, reduciendo su capacidad de fermentación y la presencia de organismos patógenos (Haubry, 1992). Los procesos de digestión o secado pueden ser considerados entre estos tratamientos de estabilización (Mahamud *et al.*, 1996).

Por otra parte, se utilizan también procesos conducentes a una total o casi total eliminación de la materia orgánica del lodo, obteniendo un menor volumen de un residuo más manejable y prácticamente inerte. Entre estos procesos cabe citar la incineración y la oxidación húmeda. (EPA 832-R-04-001, 2004).

2. 4. Compostaje

El compostaje se define como la descomposición biológica de los constituyentes orgánicos de los materiales de desecho que se produce en condiciones controladas en el que intervienen numerosos y variados microorganismos que requieren de una humedad adecuada y sustratos orgánicos heterogéneos en estado sólido. Pueden ser compostados los componentes orgánicos de residuos domésticos, el exceso de lodos activados, el exceso de paja y algunos residuos agrícolas, los cuales son descompuestos por una mezcla de microorganismos bajo diversas condiciones (Scragg *et al.*, 2002).

En general el proceso de compostaje se usa para transformar materiales de desecho orgánicos en un producto útil, el cual envuelve descomposición biológica aerobia de materiales orgánicos con el fin de obtener productos deseables parecidos al humus. El compost es el producto final de este proceso que también tiene como subproductos dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O) (EPA, 2003). El compost es el remanente que contiene la materia orgánica estabilizada y los minerales. Las aplicaciones más habituales del compostaje son en el tratamiento de residuos de la agricultura, residuos de jardín y cocina, residuos sólidos municipales y fangos de depuradores.

2.4.1. Etapas del proceso de compostaje según la temperatura

Las pilas de compostaje sufren variaciones de temperatura durante las diferentes fases del proceso debido a la interacción de diferentes grupos de

microorganismos. Cuando se reúne material orgánico para el compostaje, parte de la energía liberada por la descomposición del material se desprende como calor y eso origina un aumento de temperatura. Respecto al comportamiento de la temperatura se presentan cuatro fases: mesofílica, termofílica, de enfriamiento y maduración.

Al inicio del proceso, el material se encuentra a temperatura ambiente. En la primera etapa denominada mesofílica, se da un calentamiento gradual debido a la biodegradación del sustrato, en esta predominan las bacterias mesofílicas, las cuales inician la descomposición de las moléculas fácilmente degradables azúcares y almidones a temperaturas entre 35°C – 45°C, produciéndose ácidos orgánicos, esto incrementa la temperatura y genera una disminución del pH. A medida que el proceso fermentativo avanza por la descomposición de la materia orgánica, aumenta la temperatura de 45°C a 70°C (Trello, 1996).

Seguidamente, se presenta la fase termofílica, incrementando la temperatura hasta 70°C, durante la cual se acelera el rompimiento de proteínas, ácidos grasos y moléculas complejas de carbohidratos como la celulosa, hemicelulosa y algo de lignina, ya que a altas temperaturas estos polímeros son más fácilmente degradables y la actividad de las enzimas termofílicas alcanzan su actividad óptima. En esta etapa la actividad de los hongos cesa y la descomposición es llevada a cabo por los actinomicetos y las cepas de bacterias que forman esporas. Estos microorganismos transforman el nitrógeno en amoníaco y el pH del medio se hace alcalino. A esta temperatura se pueden destruir patógenos como los fitopatógenos termosensibles y patógenos humanos (Bertoldi *et al.*, 1996).

Una vez descompuestas las sustancias anteriores, la temperatura comienza a descender y los hongos y demás microorganismos mesófilos que han

sobrevivido en los puntos más fríos de la pila comienzan a multiplicarse rápidamente llegando hasta la fase de enfriamiento. Al final del periodo de enfriamiento desaparece la mayoría del suministro de alimento, comienza la competencia entre los microorganismos y se liberan antibióticos (Coyne *et al.*, 1999).

Después de unos meses el compost se ira compactando y su volumen se abra reducido a la mitad. Por ultimo, se presenta la etapa de maduración, la cual se caracteriza por el enfriamiento del producto final hasta alcanzar la temperatura ambiente, esta etapa puede durar varias semanas. Durante esta fase y finalizando la anterior, se comienza a concentrar sustancias húmicas y el pH se encuentra entre 5.5 y 8.0. Las bacterias prefieren un pH cercano al neutro. Inicialmente el pH disminuye a 5,0 – 6,0 como resultado de la liberación de ácidos orgánicos en la fermentación y adicionalmente de la presencia de bacterias acidogénicas, posteriormente el pH se eleva a 7,0 – 8,0 y finalmente se neutraliza por el poder amortiguador de las sustancias húmicas (Larney *et al.*, 2003).

2.4.2. Factores que condicionan el proceso de Compostaje

2.4.2.1. Relación Carbono/Nitrógeno

Carbono y nitrógeno son los dos componentes básicos de la materia orgánica. En el proceso de compostaje el carbono es la fuente de energía utilizada por los microorganismos para la activación de sus procesos metabólicos, mientras que el nitrógeno, es el material básico para la síntesis de material celular, por lo tanto la relación C/N es uno de los aspectos más importantes en el balance nutricional del compost. La proporción de estos dos elementos oscila entre 25:1 y 30:1 (C/N). Si hay demasiado nitrógeno en relación con la de carbono, este se perderá en forma de amoniaco. (Pare, 1998). Finalmente, como el carbono se convierte en anhídrido carbónico

esta relación decrece durante el proceso, la cual debe alcanzar un valor alrededor de 10:1, al concluir el proceso (Ballesteros, 2001).

Los residuos de origen vegetal presentan por lo general una relación C/N elevada. Las plantas contienen más nitrógeno cuando son jóvenes y menos en su madurez. A diferencia de los residuos de origen animal que comúnmente presentan una baja relación de C/N.

2.4.2.2. Oxígeno

El compostaje es un proceso aeróbico, por lo que la presencia de oxígeno es primordial. El oxígeno es necesario para el metabolismo de los microorganismos aeróbicos y para oxidar determinadas moléculas orgánicas de la mezcla en descomposición

El contenido ideal de oxígeno está entre el 10 y el 15%. Niveles inferiores del 5% de oxígeno pueden provocar condiciones anaeróbicas, mientras niveles superiores al 15% da lugar a pérdidas de calor y una pobre destrucción de organismos patógenos (Corbitt, 2003)

Para mantener el proceso es necesario airear el compost, esto se logra mediante volteos naturales del material o mediante aireación forzada. La concentración de oxígeno también dependerá del tipo de material, textura, humedad, frecuencia de volteo (Sherman, 1999; Gomez, 2000).

2.4.2.3. Humedad

El control de humedad es un factor importante en el desarrollo del proceso de compostaje ya que incide en el crecimiento bacteriano, debido a que los microorganismos requieren agua para cumplir con sus necesidades fisiológicas y no pueden sobrevivir en ausencia de esta. En el proceso de compostaje es importante que la humedad alcance unos niveles óptimos del

40-60 %. En una humedad muy baja la actividad microbiana disminuye y cesa por completo, retrasando la descomposición del material sometido a compostaje y evitando la elevación de la temperatura. Por el contrario, un alto nivel de humedad interfiere con la disponibilidad de oxígeno y reduce el proceso de compostaje debido al desplazamiento del aire entre las partículas de la materia orgánica, con lo que el medio se vuelve anaerobio, produciendo malos olores, pérdida de nutrientes y favoreciendo el metabolismo fermentativo y la respiración anaerobia (Sherman, 1999; Corbit, 2003).

2.4.2.4. pH

El pH, al igual que la temperatura, varía con el tiempo durante el proceso de compostaje debido a su acción sobre los microorganismos, por lo que se convierte en una medida de vital importancia para evaluar el ambiente microbiano y la estabilización de los residuos (Thobanoglous *et al.*, 1994).

El pH del material fermentado varía en el desarrollo del proceso así: durante los primeros días del compostaje el pH cae a 5 o menos. Durante esta etapa el material orgánico se encuentra a temperatura ambiente, comienza la reproducción de microorganismos mesófilos y sube rápidamente la temperatura. Entre los productos de esta etapa inicial están los ácidos orgánicos simples que causan la caída del pH. Después de aproximadamente tres días, el proceso llega a la temperatura termofílica y el pH debe subir de 8 a 8.5 unidades. El pH cae ligeramente durante la etapa de enfriamiento y llega a un valor entre 7 a 8 en el compost maduro (Moretti, 1986)

En general, las bacterias tienen menor capacidad de tolerancia (pH= 6 - 7.5), mientras que los hongos toleran un margen de pH entre 5 – 8. La mayor parte de virus son estables en un rango de pH de 5 a 9. Un proceso efectivo puede ser llevado a cabo en pH entre 5.5 a 9; sin embargo, lo ideal es tener

pH de 6.5 a 8. Un nivel de pH por debajo de 6 puede disminuir la velocidad de descomposición y por encima de 8 pueden causar el desarrollo de olores de origen amoniacal (Sherman, 1999).

2.4.2.5. Tamaño de las partículas del material a compostar

El tamaño de las partículas influye en la densidad, la fricción interna, las características del flujo, las fuerzas de arrastre de los materiales, en la transferencia de oxígeno y en la velocidad de las reacciones bioquímicas. La mayoría de los residuos son de forma irregular y con poca superficie específica por lo cual es importante reducir el tamaño de estos, ya que se incrementa la velocidad de las reacciones bioquímicas, lo cual favorece la actividad microbiana (Röben, 2002). Tamaños de partículas grandes promueven espacios abundantes por los cuales se dan pérdidas significativas de humedad y menor transferencia de oxígeno lo que disminuye la actividad microbiológica. Por su parte un tamaño excesivamente pequeño de partícula origina problemas de compactación impidiendo una adecuada ventilación. El exceso de partículas pequeñas puede llevar fácilmente a favorecer la putrefacción, lo que no es ideal para la producción de compost (Bongcam, 2003; Tchobanoglous *et al.*, 1994).

2.4.3. Patógenos en compost

Ciertos sustratos utilizados en el proceso de compostaje contienen organismos patógenos que pueden afectar al hombre, a las plantas y a los animales. Dentro de estos los residuos vegetales son los que contienen menor número de estos organismos. En contraste, se ha afirmado que los patógenos más numerosos y peligrosos se encuentran en los lodos generados de las plantas de tratamiento de agua residual (Silva *et al.*, 2000).

Una de las mayores ventajas del compostaje reside en la posibilidad de controlar los elementos patógenos y terminar con las semillas de malas

hierbas, que puedan existir en algunos residuos. La inactivación de los microorganismos es una función tanto de la temperatura como del tiempo de exposición a esa temperatura. Puede ser igualmente efectiva una temperatura alta durante poco tiempo, como una temperatura baja durante un tiempo más largo, siempre que la temperatura sea superior al nivel letal mínimo.

A partir de las relaciones temperatura/tiempo, se ha llegado a la conclusión de que puede conseguirse la inactivación térmica de los patógenos entéricos con las condiciones que suelen imperar en el proceso de compostaje, donde la mayoría de los patógenos son destruidos rápidamente cuando se exponen todas las partes de la pila a temperaturas promedio de 55 °C y 65°C en intervalos de tiempo que van de 24 horas a tres días.

Entre las bacterias patógenas más numerosas que representan un riesgo para los humanos y los animales se encuentran *Salmonella sp* y *E.coli*, los cuales pueden ser eliminados en las pilas de compost a una temperatura de 60°C durante tres semanas fácilmente cuando hay una aireación suficiente. Sin embargo, un factor a tener en cuenta es el hecho de que ciertas bacterias entéricas puedan volver a crecer y multiplicarse cuando descienda la temperatura.

Otras bacterias patógenas pueden estar presentes en materiales a compostar, como *Bacillus* y *Clostridium*, producen endosporas resistentes que pueden sobrevivir por periodos extensos bajo una variedad de condiciones ambientales. En un estudio, *Bacillus cereus*, fue detectado después de 7 días a temperaturas por debajo de los 70°C, pero puede no ser detectado a temperaturas por encima de los 70°C por un periodo de 2 a 3 días. Las esporas de *Clostridium botulinum* y *C. perfringens* pueden sobrevivir a

condiciones de compostaje que inactivan a otras bacterias (Jones y Martin, 2003)

Bacterias como *E. coli* O157-H7, *Helicobacter sp* y *Listeria sp*; virus como poliovirus, echovirus, hepatitis A, rotavirus y norwalk y los parásitos como *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Toxoplasma* y *Giardia* han despertado especial atención en el campo de los abonos orgánicos. Los métodos microbiológicos para la detección de *Salmonella sp*, virus entéricos y huevos de helminto todavía requieren de métodos de estandarización y validación. La presencia de los patógenos depende de los regimenes de tratamiento, incluyendo su supervivencia en el suelo y en los cultivos luego de la aplicación de los residuos tratados. Por ende, la validación de los procesos de tratamiento son necesarios. Los estudios deben incluir la presencia, movimiento y contenido microbiano de aerosoles durante la aplicación en el suelo (Gerba y Smith, 2005)

2.4.4. Control de calidad en el producto final

La calidad refleja la madurez del compost y la obtención de un producto orgánico estable. La calidad del compost está afectada por el material original (grado de digestión, contenido original de nutrientes, etc) y por el sistema de compostaje utilizado (Mazzarino *et al.*, 2005).

Para evaluar la calidad de los materiales orgánicos, durante y al final del proceso de compostaje, se proponen criterios basados en la cuantificación de los parámetros físicos, químicos y biológicos. Estos criterios definen las características benéficas del compost y permiten recomendar su aplicación para diferentes finalidades agrícolas. Tradicionalmente se han usado los parámetros anteriormente mencionados como índices o requerimientos de calidad del compost. Posteriormente se introdujeron los índices de madurez y estabilidad. Los índices bioquímicos se usan como elementos técnico-

científicos en programas de ensayos e investigación, desarrollándose en los últimos años algunos “kits” de uso comercial (Gómez *et al.*, 2005).

Aparte de los conocidos factores de humedad, oxígeno, relación C/N y estructura y porosidad de la pila de compost en proceso, existen teorías y desarrollos del proceso de compostaje que prestan una atención especial al mantenimiento de las condiciones aerobias de las pilas, mediante la reducción de su tamaño y el incremento de la frecuencia de volteo (Gómez *et al.*, 2005).

Los análisis químicos y físico-químicos más comunes incluyen pH, conductividad eléctrica, amonio, C y N total o solubles en agua, capacidad de intercambio catiónico y ácidos grasos volátiles. Con excepción de estos últimos, son análisis más sencillos y económicos, que pueden ser efectuados en laboratorios estándar de suelos, aguas o tejido vegetal. Uno de los índices más utilizados ha sido la relación C total/N total, estableciéndose, en general, que en un compost maduro esta relación debe ser < 20 .

Los Índices de madurez y estabilidad definen el grado de descomposición de la materia orgánica durante el proceso de compostaje. La estabilidad indica el nivel de actividad de la biomasa microbiana y la madurez el grado de descomposición de los compuestos fitotóxicos producidos durante la fase inicial del compostaje (Jiménez y García, 1989). La madurez es un parámetro a tener en cuenta en la producción del compost, ya que un compost inmaduro puede ser inestable y fitotóxico para el desarrollo de las plantas (Wu *et al.*, 2000).

La calidad final del compost debe cumplir con los estándares que protejan la salud y el medio ambiente. Así mismo debe basarse en aspectos que aseguren su comercialización. Los riesgos asociados a la salud humana en

las instalaciones de compostaje provienen de la exposición a patógenos humanos, aerosporas y vectores. Por ende, unas buenas prácticas agrícolas (BPA) y de higiene son necesarias para proteger los cultivos de la contaminación con los patógenos presentes en estos biofertilizantes. La contaminación microbiológica derivada de la utilización de fertilizantes naturales y las medidas necesarias para abordarla deben ser orientadas a todo el personal de la agricultura.

2.5. Efecto de las condiciones del ambiente sobre agentes virales

Aunque los virus entéricos son excretados al ambiente en grandes cantidades (de 10^8 a 10^{10} partículas por gramo de heces), una gran proporción son partículas no infecciosas. Los virus excretados al medio están sometidos a procesos de inactivación natural que afectan su supervivencia y estabilidad. Esto se debe principalmente a factores físicos (luz, temperatura, fenómenos de adsorción, agregación, presión hidrostática), químicos (pH, metales pesados, oxígeno disuelto, iones) y biológicos, entre los que encuentran la actividad de ciertas bacterias y algas, depredación y la naturaleza del propio virus.

La temperatura es uno de los factores que determinan la supervivencia del virus y su persistencia; ésta última puede ser afectada por temperaturas elevadas a través de varios mecanismos que incluyen la desnaturalización de las proteínas, daño del material genético y cambios en la actividad enzimática (Deng y Cliver, 1995). Sin embargo, las bajas temperaturas del agua durante los meses fríos, aumentan el tiempo de supervivencia de los virus.

Los virus entéricos tienen una mayor persistencia cuando están adheridos a partículas sólidas, por lo tanto se espera que se concentren en lodos,

residuos orgánicos, sedimentos y suelos donde su permanencia en el tiempo será mayor.

Los virus son fuertemente adsorbidos sobre materiales coloidales (menos sobre arenas), aumentando la adsorción al disminuir el pH. El contenido en cationes disminuye la movilidad de los virus. Los virus así retenidos lo son de modo reversible de forma que una variación del pH, una fuerte lluvia etc., pueden removerlos provocando episodios de fuerte incremento en su concentración no relacionados con un hecho contaminante concreto (Pina, 2001).

El pH tiene efectos en la supervivencia del virus, puede influir directamente en la modificación de la estructura de las proteínas de la cápside e indirectamente, en la adsorción del virus y elusión de otras partículas. La adsorción de virus generalmente aumenta cuando disminuye el pH. De igual forma, la supervivencia del virus está relacionada con la humedad en el sólido. Como regla general, los patógenos sobreviven por más tiempo bajo condiciones favorables de humedad. En algunos estudios la inactivación de poliovirus, echovirus y rotavirus en sólidos han mostrado ser dependiente de la pérdida de humedad. En períodos de sequía la inactivación de los virus es creciente (Pina, 2001).

La inactivación depende de la temperatura ambiental, humedad y radiación solar, que incrementa la temperatura, reduce la humedad y afecta a los patógenos con los rayos ultra violeta. En el suelo, los microorganismos que lo habitan naturalmente, competirán con los patógenos introducidos incrementando su decrecimiento. La reducción adicional con el tiempo, la cual constituye una “barrera en la agricultura” es de gran importancia, especialmente para los cultivos de consumo crudo. Para el manejo seguro de otros cultivos y para reducir la contaminación cruzada durante la preparación

de alimentos, el período de reposo (tiempo entre la fertilización y la cosecha) es de suma importancia.

2.6. Métodos de detección e identificación de virus en muestras ambientales

La utilización de las técnicas moleculares en estudios ambientales proporciona información muy valiosa a tiempo real sobre la incidencia de las infecciones víricas en la población, que de otra forma no podrían identificarse. La utilización de la PCR como herramienta habitual aplicada al control virológico de muestras ambientales requiere la aplicación de normas de trabajo estrictas para evitar falsos negativos y contaminaciones cruzadas, y personal especializado. Alternativamente la PCR es una herramienta que permite obtener datos epidemiológicos muy valiosos, como puede ser el estudio de la variabilidad de cepas de un virus que circulan entre la población (Pina, 2001).

En la mayoría de los casos el análisis virológico e identificación se efectúa después del proceso de extracción y concentración de partículas víricas a partir de la muestra. Los sistemas de detección e identificación desarrollados son complejos, económicamente caros y se requiere de personal y equipamiento especializados.

La caracterización estructural y genómica del virus condujo al desarrollo de métodos de diagnóstico basados en la identificación de sus antígenos o material genómico. Estas técnicas son utilizadas universalmente como métodos de diagnóstico de rotavirus, estableciéndose que este agente constituye una de las causas más frecuentes de diarrea aguda en niños en diversas regiones del mundo. Dentro de las técnicas más utilizadas en la actualidad para realizar la detección viral se encuentran la PCR, ELISA y Microscopía Electrónica. Estas técnicas requieren que el virus este presente

en una concentración de $10^4 - 10^5$ partículas en el caso de ELISA, 10^2 para PCR y de 10^6 en el caso de la Microscopía Electrónica (Riviera *et al.*, 1995).

2.6.1. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa con las que se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtiene en cuestión de horas, millones de copias de la secuencia deseada del ADN (Mackay *et al.*, 2002). Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN, una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora. y las enzimas que inicien y continúen la replicación.

La reacción en cadena de la polimerasa se desarrolla en tres pasos. El primero es la separación de las dos cadenas que forman la molécula de ADN que se quiere amplificar, para lo cual se debe calentar el ADN a altas temperaturas que pueden ser próximas a la ebullición. Cada una de estas cadenas actuará como molde para fabricar su complementaria. A continuación se baja la temperatura para conseguir que cada cebador se una a su región específica dentro de la cadena de ADN. El último paso consiste en la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa. Cada una de las moléculas de ADN hijas pueden volver a entrar en el proceso y servir como molde para fabricar más copias. Así tras 20 ciclos de reacción se puede obtener hasta 1 millón de copias de una molécula de ADN (Ijzerman *et al.*, 1997).

2.6.2. ELISA (Enzyme linked inmuno sorbent assay)

La técnica de ELISA utiliza anticuerpos que se unen covalentemente a las enzimas de este modo se conservan las propiedades catalíticas de las enzimas y la especificidad de los anticuerpos. Se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos marcados con una enzima. La reacción de antígeno – anticuerpo queda inmovilizada y por lo tanto fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar con la enzima produce un color observable simple vista y cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro (Dahling., 1991).

Esta técnica es muy utilizada tanto en países desarrollados como en países en vía de desarrollo gracias a su alta sensibilidad, especificidad, facilidad de manejo y a su relativo costo y vida útil (Riviera *et al.*, 1995).

2.6.3. Microscopía electrónica

Los agentes víricos son fácilmente detectados por microscopía electrónica (ME) cuando se encuentran en elevadas concentraciones en las heces, lo que con frecuencia ocurre en las personas infectadas que presentan sintomatología, aunque se estima que se requiere del orden de 10^6 partículas víricas por gramo de muestra para poder ser observadas. La inmunomicroscopía electrónica, utilizando antisueros o anticuerpos monoclonales, incrementa la sensibilidad de la Microscopía Electrónica y además sirve para demostrar la agregación de partículas víricas por los anticuerpos específicos, una de las observaciones consideradas como demostrativas del papel patógeno de los distintos virus. La gran ventaja de la microscopía electrónica respecto a otras técnicas diagnósticas es que permite encontrar cualquier virus, sin que el procedimiento limite la identidad del agente detectado, como sucede con las técnicas inmunológicas o moleculares (Alain, 1993).

3. JUSTIFICACIÓN

Existe en Colombia una gran cantidad y variedad de residuos orgánicos que por no ser aprovechados se tornan en contaminantes para el agua, los suelos y el aire. Adicionalmente, los desechos orgánicos contienen patógenos de origen vegetal, animal o humano. Mediante la exposición de este material a temperaturas de 55-60 °C alcanzadas normalmente dentro de un proceso de compostaje, se promueve la muerte de gran parte de los patógenos, de manera que se disminuyan los problemas de higiene, al efectuar este tipo de procesos sobre los desechos en condiciones limpias y controladas. Sin embargo algunos patógenos, entre ellos los virus, pueden sobrevivir a este proceso, convirtiéndose en un riesgo para la salud humana, animal y para el medio ambiente. Por tal razón, se hace necesario realizar análisis que busquen virus en el compost antes de su utilización y demuestren que el proceso cumplió con su objetivo.

Tales análisis se realizan con microorganismos que indican un tipo de contaminación, es así como para el presente trabajo se propuso como un indicador viral al rotavirus, que por ser de origen entérico puede estar presente en algunas de las materias primas utilizadas para el compostaje. Mediante la técnica de RT-PCR se pretendió demostrar la presencia o ausencia de este agente viral en las materias primas y su propagación o no en el producto final.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

-Determinar la presencia de rotavirus en compost elaborado con residuos vegetales y Biosólido.

4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

-Determinar la presencia de rotavirus en las materias primas utilizadas para la elaboración del compost.

-Determinar la presencia de rotavirus en las pilas de compost al inicio y al final del proceso.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Este proyecto fue realizado en los laboratorios de Microbiología ambiental y de Viroológica de la Pontificia Universidad Javeriana.

5.1. MUESTRAS

Las muestras analizadas para la detección de rotavirus fueron obtenidas de las pilas de compost elaboradas en la Vereda “La Granja” Cogua, Zipaquirá (Cundinamarca). Las materias primas utilizadas para la preparación de las pilas de compostaje fueron, pasto *kikuyo*, cascarilla de arroz y biosólidos. Los biosólidos y el corte de pasto los aportó la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “El Salitre” de Bogotá, por su parte la cascarilla provenía de una trilladora de arroz de la ciudad de Villavicencio.

Se evaluaron de manera independiente 4 pilas, de 1.2m x 1.5m x 10m, tres con las mismas proporciones de materias primas, cascarilla de arroz, pasto kikuyo y biosólido, en tanto que la pila 4 solo contenía biosólido (tabla 5). Cada pila tuvo tres replicas. Las pilas de compost 1 y 2 además de contener las materias primas estaban conformadas por dos tipos de inoculantes, inoculante PUJ e inoculante nativo, respectivamente, con el fin de acelerar la transformación de los residuos. El inoculante PUJ conformado por microorganismos amilolíticos y proteolíticos termofílicos del Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Pontificia Universidad Javeriana y el inoculante nativo conformado por bacterias termofílicas con capacidad amilolítica y proteolítica aislados a partir de las materias primas (biosólidos, cascarilla y poda).

Tabla 5. Distribución de materiales para el montaje de pilas

MATERIAS PRIMAS	PILAS DE COMPOST											
	P1			P2			P3			P4		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Biosólido	4.8Ton			4.8Ton			4.8Ton			4.8Ton		
Cascarilla de Arroz	0.8Ton			0.8Ton			0.8Ton					
Pasto kikuyo	0.3Ton			0.3Ton			0.3Ton					
Inoculante PUJ	X											
Inoculante nativo				X								

P1: Pila 1+ inoculo PUJ P2: Pila 2 +inoculo nativo P3: Pila 3 sin inoculo P4: Pila 4 sin inoculo

5.2. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las pilas de compost fueron elaboradas en el mes de Agosto de 2007, momento en el cual se recolectaron 300 g de cada una de las materias primas pasto kikuyo, cascarilla y biosólido. Una vez realizadas las mezclas para cada pila, como se describe en la tabla 5, se recolectaron, 300 g de cada una de estas pilas. Estas muestras se nombraron de la siguiente manera: P1, muestra inicial de la pila 1; P2, muestra inicial de la pila 2; P3, muestra inicial de la pila 3 y P4, muestra inicial de la pila 4. Después de realizadas las mezclas y recolectadas las muestras, se distribuyeron para montar tres réplicas de cada pila.

Las muestras finales de compost fueron tomadas pasados 60 días, periodo que duro el proceso de compostaje, en el cual se recolectaron de cada una de las pilas con sus respectivas réplicas, 500 g de muestra que se obtuvieron de 5 puntos de diferentes secciones de cada pila para evidenciar la presencia de rotavirus al final del proceso de compostaje. Estas muestras se

nombraron de la siguiente manera: P1R1, muestra de producto final de la pila 1 replica 1; P1R2, muestra de producto final de la pila 1 replica 2; P1R3, muestra de producto final de la pila 1 replica 3 y así mismo las demás muestras.

Las muestras fueron tomadas en el día cero, incluyendo cada materia prima y al final del proceso de compostaje, para un total de 18 muestras. Finalmente las muestras fueron conservadas a 4°C en una nevera del Laboratorio de Virología de la Pontificia Universidad Javeriana hasta el mes de Noviembre para su procesamiento.

5.3. ANALISIS DE LAS MUESTRAS

5.3.1. Extracción Viral

La técnica que se utilizó para la extracción del agente viral fue la descrita por Ahmed y Sorenses 1995, la cual se modificó para este trabajo. (Mignote *et al.*, 1999). Se diluyeron 5 gramos de las muestras de materia prima y compost en 30ml de extracto de carne al 10% (pH: 9) (ANEXO 1). Estas se sometieron a vortex diez veces durante 1 minuto.

Posteriormente, se efectuó un proceso de sonicación en hielo a 37 Hz durante 5 minutos en intervalos de un minuto. Seguido a lo anterior las diluciones se agitaron en Shaker por 5min a 200rpm. Luego las muestras se centrifugaron durante 1 hora a 4°C a 5000g. El sobrenadante obtenido se transfirió a otros tubos falcon en donde se ajustó el pH a 7.2 con HCl 1M y / o NaOH 1N, dependiendo del caso (ANEXO 2).

5.3.2. Concentración viral

La técnica que se utilizó para la concentración viral fue la descrita por Lewis y Metcalf 1988 y modificada por Mignotte *et al.*, 1999 (Mignote *et al.*, 1999). Al sobrenadante obtenido en el proceso anterior se le adicionó polietilenglicol

(6000) PEG 6000 en buffer fosfato 7.2 (ANEXO 1) hasta obtener una concentración final de 8% (p/v), La mezcla anterior se llevó a agitación en shaker por 2 horas a 150 rpm a temperatura ambiente y se conservó a 4° C durante toda la noche para posteriormente centrifugarla a 5000g por 90 min a 4°C. El pellet fue suspendido en 2.5 ml de buffer fosfato 7.2 (ANEXO 2).

5.3.3. Detección de sustancias inhibidoras

Se realizó un procedimiento para detectar sustancias inhibidoras en estos materiales que pudieran arrojar falsos negativos a las amplificaciones por PCR. El procedimiento a seguir fue seleccionar algunas muestras que iban a ser evaluadas por la técnica de la RT-PCR, las cuales fueron esterilizadas. Se tomaron 10 µl de materia fecal positiva para Rotavirus y se adicionó a 5 gramos de muestra estéril diluida en 30ml de extracto de carne al 10%. Igualmente se tomaron muestras estériles sin adición de materia fecal positiva para Rotavirus. Las muestras utilizadas para tal fin fueron; cascarilla, P4 (muestra inicial de la pila 4) y P4R3 (muestra del producto final de la pila 4 replica 3).

5.3.4. Almacenamiento de las muestras

Las muestras concentradas en los tubos falcon, se almacenaron a -20° C hasta que se llevó a cabo el montaje de la RT-PCR.

5.3.5. Prueba de PCR para rotavirus

Se utilizó la técnica de detección e identificación de rotavirus mediante la amplificación de la proteína VP6 y VP4 por RT-PCR, estandarizada en el laboratorio de Virología de la Pontificia Universidad Javeriana, basada en la técnica descrita por Schwarz *et al.*, 2002.

5.3.5.1. RT

A 2 µl de random primer se adicionó 10 µl de la muestra en la que se esperaba la presencia del RNA viral, se incubaron a 97°C por 5min para denaturar el dsRNA y luego a 70°C por 5 min en un termociclador para posteriormente enfriarlas en hielo por 2 min. Se agregaron 15.2 µl de la mezcla de RT que consistía en 10 µl de agua PCR, 2.5 µl de tampon 10X 200nm, 2 µl de dNTPs 2.5 mM, 0.7 µl de MgCl 50 mM, 0.5 µl de RT enzima MMLV (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase), 0.5 µl de DTT (ditiotreitól) 0.1 mM.

La RT se incubó a 42°C por 1h, se calentó a 95°C por 5 min en un termociclador, y se enfrió en hielo por 2 min, con el fin de obtener el cDNA (Schwarz *et al.*, 2002; Iturriza-Gomara *et al.*, 1999).

5.3.5.2. PCR VP6

10 µl del cDNA obtenido se mezcló con el mix de PCR que consistía en 14,2 µl de agua PCR, 2.5 µl de tampon 10X 200nm, 2 µl de dNTPs 2.5 mM, 1.25 µl de MgCl 50 mM, 2 µl de primer VP6-F (5' GACGGVGCRACTACATGGT 3') (nucleotidos 747 a 766), 2 µl de primer VP6-R (5' GTCCAATTCATNCCTGGTGG 3') (nucleotidos 1126 a 1106), 0.125 µl de Taq Pol 5 U/ µl. La denaturación se llevó a cabo a 94°C por 2 min, seguida de 40 ciclos de PCR a 94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg y 72°C por 1min, y una extensión final a 72°C por 7 min. Los primers utilizados amplificaron una región de 379 pb del gen VP6 desde el aminoácido 241 hasta el 367 (Iturriza *et al.*, 2002).

Todos los productos amplificados fueron examinados por electroforesis en gel de agarosa al 2% que contiene 4 µl/mL de bromuro de etidio (ANEXO 1) (Schwarz *et al.*, 2002).

Se utilizó un marcador de 100 bp y por cada grupo de muestras procesadas en la técnica de PCR se empleó un control positivo que consistía en tomar 10 µl de materia fecal positiva para rotavirus suministrada por el Instituto Nacional de Salud (INS) y un control negativo que contenía todos los componentes de la mezcla de reacción a excepción del material genético; en su lugar se añadió agua libre de material genético, correspondiente al volumen de la muestra, que siguió el mismo procedimiento de RT – PCR de las muestras concentradas.

5.3.5.3 PCR VP4

Las muestras que dieron resultados positivos para la amplificación de la secuencia genómica de VP6 se amplificaron para secuencia genómica de VP4, para lo cual se tomó 10 µl del cDNA de tales muestras y se mezclaron con el mix de PCR que consistía en 14,2 µl de agua PCR, 2.5 µl de tampon 10X 200nm, 2 µl de dNTPs 2.5 mM, 1.25 µl de MgCl 50 mM, 2 µl de primer CON 2 que codifica la región 5' ATTCGGACCAT'ITATAACC 3' desde el nucleotido 868 hasta el 887, 2 µl de primer CON 3 que codifica la región 5' TGGCTTCGCCATTLATAGACA 3' desde el nucleotido 11 hasta el 32, 0.125 µl de Taq Pol 5 U/ µl. La denaturación se llevó a cabo a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de PCR a 94°C por 1 min, 50°C por 2 min y 72°C por 1.30min, y una extensión final a 72°C por 5 min. Los primers utilizados amplificaron una región de 876 pb del gen VP4 (Gentsch, 1992).

Todos los productos amplificados fueron examinados por electroforesis en gel de agarosa al 2% que contiene 4 µl/mL de bromuro de etidio (ANEXO 1) (Schwarz *et al.*, 2002).

Se utilizó un marcador de 100 bp y por cada grupo de muestras procesadas en la técnica de PCR se empleó un control positivo que consistía en tomar como muestra 10 µl de materia fecal positiva para rotavirus suministrada por

Figura 2. Producto de la RT-PCR de la amplificación del gen de VP6 de rotavirus en muestras de compost. La columna de la izquierda contiene el marcador de pesos molecular, seguido del control positivo de la técnica de PCR en donde se encuentra la banda de interés (379pb) y posterior a este el control negativo. En las siguientes columnas se pueden observar a las muestras analizadas 1. Pasto 2. Cascarilla estéril sin virus, 3. Pila 3 inicial, 4. Pila 3 replica 1.

6.2 DETECCIÓN DE ROTAVIRUS EN LAS MUESTRAS POR MEDIO DE LA AMPLIFICACIÓN DE VP4

A partir del cDNA de la muestra de pasto en la que se detectó la posible presencia de rotavirus mediante la RT-PCR del segmento genómico correspondiente a VP6, se llevó a cabo el proceso de amplificación, mediante un juego de primers descritos por *Gentsch, 1992*, con los cuales se amplifica una banda de 876 pb correspondiente a la proteína VP4. A su vez, esta amplificación se realizó a la cascarilla estéril sin virus y a la cascarilla estéril con virus, muestras que fueron usadas para la detección de inhibidores. Como se muestra en la figura 2 (pozo 2) no se evidenció la banda para VP4 de la muestra de pasto.

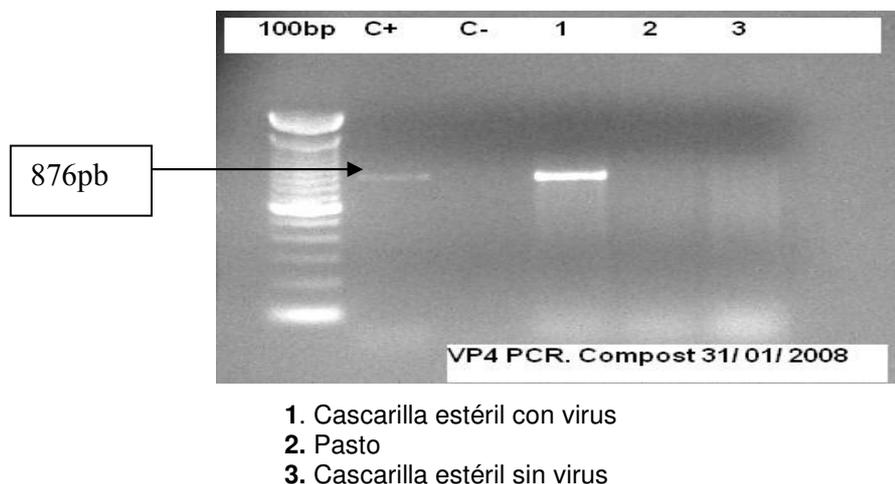


Figura 3. Producto de la RT-PCR para la identificación del gen de VP4 de rotavirus en muestras de compost que fueron positivas en la amplificación de VP6. La columna de la izquierda contiene el marcador de pesos molecular, seguido del control positivo de la técnica de PCR en donde se

encuentra la banda de interés y posterior a este el control negativo. En las siguientes columnas se observa las muestras analizadas **1.** Cascarilla estéril con virus **2.** Pasto **3.** Cascarilla estéril sin virus.

6.3 DETECCIÓN DE INHIBIDORES DE LA PRUEBA DE RT- PCR

Para la detección de inhibidores de la prueba de RT-PCR se utilizaron muestras estériles con virus y sin virus las cuales siguieron, al igual que las demás, el mismo proceso de extracción, concentración y amplificación del gen VP6 (numeral 5.3.3), en donde se obtuvo como resultado la presencia de una banda débilmente positiva en la cascarilla estéril sin virus y un resultado claramente positivo en la cascarilla con virus, las muestras de compost estéril tanto con virus como sin virus arrojaron resultados negativos.

A las muestras de cascarilla estéril tanto con virus como sin el, se les amplificó el segmento génico de VP4 obteniendo resultados negativos en la cascarilla estéril sin virus y un resultado positivo en la cascarilla estéril con virus.

Como se observa en la figura 3, la cascarilla estéril sin virus presenta una banda débil correspondiente al gen de VP6, a su vez, en el pozo 3 se evidencia la banda de 379 pb de la cascarilla estéril con virus. De igual manera se observa la ausencia de bandas de VP6 en las muestras de compost estériles sin virus en los pozos 2 y 6 y la ausencia de bandas de VP6 en las muestras de compost estériles con virus en los pozos 1 y 5. En la figura 2 se observa en el pozo 1 una banda fuertemente positiva para VP4 en la cascarilla estéril con virus, en esta misma figura se observa en el pozo 3 la ausencia de bandas para la cascarilla estéril sin virus

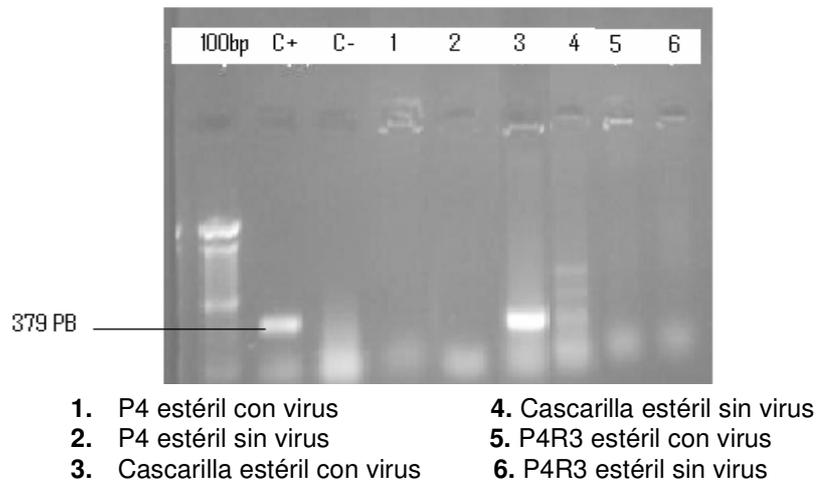


Figura 4. Producto de la RT-PCR para la Identificación del gen VP6 de rotavirus en muestras usadas para la identificación de inhibidores. La columna de la izquierda contiene el marcador de pesos molecular, seguido del control positivo de la técnica de PCR en donde se encuentra la banda de interés (379pb) y posterior a este el control negativo. En las siguientes columnas se observa las muestras analizadas para el control de inhibidores **1.**P4 estéril con virus, **2.** P4 estéril sin virus **3.** Cascarilla estéril con virus, **4.** Cascarilla estéril sin virus, **5.** P4R3 estéril con virus, **6.** P4R3 estéril sin virus.

7. DISCUSIÓN

Una gran cantidad de virus de origen humano se excretan a través de las heces y la orina de individuos infectados. Estos llegan a las aguas residuales las cuales son tratadas en plantas depuradoras, en donde se genera como subproducto el biosólido, utilizado en la agricultura como abono o como materia prima en los procesos de compostaje. No obstante, a pesar de sus ventajas, el biosólido puede ser fuente de contaminación de los alimentos si los procesos previos a su uso no son llevados a cabo eficientemente, convirtiéndose en un foco potencial de infecciones. Silvia *et al.*, 2000 afirmó que los patógenos mas numerosos y peligrosos se encuentran en los lodos generados en las plantas de tratamiento de agua residual, donde se encuentran concentraciones significativas de agentes virales como los Rotavirus. En contraste, los residuos vegetales, como el pasto y la cascarilla utilizada como sustratos para la elaboración del compost, contiene menor número de organismos patógenos.

Debido a la naturaleza de las muestras analizadas, en donde la concentración del virus varia, fue necesario encontrar un método sensible, eficiente y sencillo para la determinación de rotavirus del grupo A. En este trabajo se utilizó una metodología basada en técnicas moleculares para la detección de rotavirus que es un virus entérico de origen humano excretado al medio ambiente.

Para la extracción del virus se utilizó el método basado en la elusión con extracto de carne al 10%, con una posterior agitación, sonicación en frío y centrifugación. Inicialmente, las proteínas del extracto de carne van a ocupar el sitio de unión de los virus mediante interacciones hidrofóbicas con sustancias orgánicas, estas proteínas son moléculas de gran tamaño capaces de romper las interacciones entre partículas virales y superficies de

la muestra. De igual forma el pH alcalino aumenta la repulsión electrostática, es decir, aumenta la distancia entre las moléculas que forman los enlaces de unión entre los virus y las superficies mediante la deprotonización de los sitios ionizables de ambos (Williamson *et al.*, 2003; Wilson, 1997). Esta técnica es aplicada principalmente en la detección de virus entéricos en aguas, compost y otras muestras ambientales. El método aprovecha las propiedades de los virus como macromoléculas proteicas. Los virus se comportan en el medio como un coloide hidrófilo en el que la carga eléctrica neta varía en función del pH y de la fuerza iónica del medio. Tiene, además, la capacidad de adsorberse sobre partículas en suspensión, es simple, rápido y económico y proporciona altas tasas de recuperación (Pina, 2001). Esto se demostró en el estudio realizado por Ahmed y Sorensen, 1999 en donde se encontró que la mayor recuperación de virus entéricos se logró mediante la utilización de extracto de carne en diferentes concentraciones.

Por otro lado la agitación, sonicación y centrifugación, ayudan a la completa elusión del virus permitiendo el rompimiento de flóculos, partículas y células presentes en la muestra (Lichtenberg, 1998).

Para concentrar las partículas virales extraídas de las muestras se utilizó polietilenglicol 6000, el cual es usado en gran variedad de muestras medioambientales. Philipson *et al.*, quien aplicó este sistema para la purificación y concentración de virus, encontró que el método basado en la separación de fases usando polietilenglicol, era rápido, económico y no destructivo para los virus. Este método ha sido utilizado con éxito por varios investigadores para la concentración y detección de virus en lodos, aguas y ostras (Lewis y Metcalf, 1988).

Mediante el polietilenglicol 6000, se logra la precipitación de las proteínas presentes en la cápside externa del virus. Las proteínas más cargadas o

hidrofóbicas son mas fáciles de precipitar en comparación a las de menor carga con lo cual se puede inferir que las proteínas de mayor tamaño pueden ser precipitadas a bajas concentraciones de polietilenglicol. El polietilenglicol en concentraciones por encima del 8%, concentra la mayoría de virus infecciosos en la fase del sedimento y solo una pequeña cantidad de virus biológicamente activos quedan en el sobrenadante (Sarmiento *et al.*, 1999)

Realizada la extracción y concentración del virus se procedió a la identificación de rotavirus en las muestras de residuos vegetales, biosólido y compost mediante la técnica de RT – PCR, amplificando y detectando un fragmento de 379 pb del sexto segmento vírico que codifica para la proteína VP6. La proteína codificada por este segmento presenta epítopes muy conservados y es el principal antígeno utilizado en las pruebas de diagnóstico (Estes, 2001). La prueba de RT – PCR es una técnica molecular eficiente, sensible y sencilla y su uso es frecuente para el análisis de muestras de diferente naturaleza. Además, permite detectar desde 10^2 partículas víricas por mililitro de muestra.

Se realizó un primer análisis buscando la presencia de rotavirus en las materias primas utilizadas en la elaboración del compost y en las muestras de compost en su fase inicial, en donde se encontró que el pasto presentaba una banda débilmente positiva para rotavirus, lo cual indicaba la presencia del virus al iniciar el proceso de compostaje. Este material fue obtenido de la Planta de Tratamiento de Agua Residual “El Salitre” en donde el agua tratada es utilizada como fuente para el sistema de riego de sus prados, lo cual puede ser un vehículo importante que generó la contaminación del pasto por rotavirus. Sin embargo, estudios realizados por Sánchez *et al*, 2007 y Pina, 2001 afirman que algunos virus pueden ser transportados en forma de bioaerosoles generados en los distintos tratamientos a los que se somete el agua residual, en especial durante las operaciones de aireación o agitación

del agua que es donde mayor riesgo existe de que ocurra la transferencia de los organismos al aire y finalmente llegar a otras fuentes como lo es el pasto.

El virus presente en el pasto al estar sometido al proceso de compostaje puede ser degradado por factores físicos, químicos y/o biológicos a los que esta expuesto. La inactivación viral dentro del compost puede darse por el calor generado durante la fase termofílica del proceso, ya que se producen daños principalmente en la porción proteica del virión al elevarse la temperatura a 55-70°C. A un grado menor, los virus son también inactivados por la degradación microbiana y el amoníaco, se ha constatado que estos mecanismos interactúan de manera simultánea durante el compostaje. Así, en caso de que se presente la inactivación viral, podría ser atribuida a una interacción sinérgica entre ellos (Pourcher *et al.*, 2005; Wichuk *et al.*, 2007).

Los factores exógenos como el contenido de humedad y el pH juegan un papel secundario en la inactivación viral durante el compostaje. Las condiciones óptimas para el proceso de compostaje son los niveles de pH de 5.5 a 8.0 y el contenido de humedad del 40 a 60 %. Estas condiciones no son perjudiciales para los virus entéricos. Por lo anterior, la inactivación se induce cuando el contenido de humedad disminuye aproximadamente en un 15 % pero generalmente, la inactivación rápida y extensa de los virus probablemente no es alcanzada hasta que el contenido de humedad del material esté por debajo del 10 % (Ward y Ashley, 1977).

Las partículas de rotavirus son estables en un rango de pH de 5 a 9, en general son resistentes al ácido y por lo tanto pueden sobrevivir con valores de pH entre 3 y 5. En contraste la exposición a valores elevados de pH pueden resultar en la inactivación por pérdida de proteínas (Ciarlet, 2002).

El pH y el contenido de humedad pueden afectar la supervivencia viral solo al influir en la multiplicación y subsiguiente actividad metabólica de las bacterias y hongos nativos del compostaje que al degradar material proteico producen amonio. El amonio en altas concentraciones puede afectar la viabilidad viral incrementando el pH durante el proceso de estabilización orgánica.

La inactivación por amonio a pH mayores a 8 causa la fragmentación del RNA ya que el mecanismo de acción del amonio está limitado a la proteólisis de la cápside viral y su infiltración en el genoma, sin descartar la acción de otras sustancias capaces de degradar el RNA (Monphoeho *et al.*, 2004). De igual forma a pH ácido hay un aumento en el proceso de adsorción viral por la presencia de cationes monovalentes o divalentes (Sobsey *et al.*, 1980).

Además de la temperatura y el pH, la actividad microbiana del compostaje puede ser un factor importante en la inactivación viral. Estudios de laboratorio han indicado que algunas bacterias son depredadores microbianos de virus entéricos, estas juegan un papel importante en la destrucción de virus tanto durante el almacenaje como durante el compostaje. Las capsides virales están compuestas por proteínas y por lo tanto son susceptibles a la acción de enzimas proteolíticas liberadas por microorganismos durante el proceso de biodegradación, igualmente los ácidos nucleicos pueden quedar expuestos a procesos fisicoquímicos o biológicos que los degraden y denaturen (Deng y Cliver, 1995).

En cuanto a las muestras de cascarilla, biosólido y compost tanto al inicio como al final del proceso arrojaron resultados negativos, indicando posiblemente, la ausencia de rotavirus en estas muestras. Sin embargo, es paradójico que al encontrarse la muestra de pasto positiva para rotavirus, no se encontrara este mismo resultado en las muestras iniciales de compost de

las pilas 1, 2 y 3, las cuales tenían dentro de su composición esta materia prima.

Los anteriores resultados pueden darse posiblemente por dos factores, uno es la dilución del pasto dentro de cada una de las pilas, lo que conlleva a reducir la concentración del virus y por ende a la imposibilidad para detectarlo dentro del compost.

El segundo factor tiene que ver con la presencia de inhibidores dentro de la muestra, se ha reportado que el mayor obstáculo para la aplicación rutinaria de técnicas de amplificación molecular de ácido nucleicos es la presencia de inhibidores de la reacción (Wilson, 1997). Este hecho permite pensar que los resultados negativos obtenidos en las muestras de biosólido y de compost tanto al inicio como al final del proceso, no son reales, ya que los controles de inhibidores en donde se utilizó compost y biosólido estéril inoculados con materia fecal positiva para rotavirus, no amplificaron la banda de 379 pb, indicando de esta manera la presencia de inhibidores en este tipo de material, como compuestos húmicos, fenólicos, y metales pesados, los cuales pueden adsorber a proteínas o a enzimas que intervienen en la RT-PCR e interferir química o estereoquímicamente con el sitio activo de ellas y/o pueden crear enlaces divalentes con cationes de Ca^{2+} y Mg^{2+} evitando de esta manera que estos sean utilizados como cofactores por las enzimas transcriptasa y polimerasa. Igualmente al llevar a cabo el proceso de concentración de las partículas virales presentes en el compost, se pudo haber contribuido de esta misma forma a la concentración de sustancias inhibitorias que compiten por los sitios activos de las enzimas (Abbaszadegan *et al.*, 1993).

Sin embargo, muchos investigadores han diseñado procedimientos para eliminar o atenuar la inhibición. Estos procedimientos, pueden efectuarse

antes de la RT-PCR con el fin de optimizar la calidad del RNA, o durante la reacción de amplificación, con el fin de superar el efecto negativo del factor inhibitorio.

Así, la mayoría de los procedimientos realizados antes de la RT-PCR intentan separar el RNA del inhibidor, e incluyen entre otros, la centrifugación del extracto de un gradiente de sucrosa, la recuperación del RNA después de una electroforesis en gel de agarosa, el uso de agentes quelantes como la resina, la cromatografía de intercambio iónico o la precipitación con isopropanol. Es importante plantear que casi todos estos métodos implican la manipulación de las muestras y/o la adición de sustancias después de la extracción, pudiendo representar una fuente de contaminación. También se puede incluir dentro de los procesos antes de la RT-PCR el diseño de nuevos protocolos para incrementar la pureza de los ácidos nucleicos como el desarrollo del método basado por adsorción sobre soportes de sílice (Montiel, 2001; Pina, 2001).

En lo concerniente a los procedimientos durante la RT-PCR, algunas estrategias utilizadas son las siguientes: a) el uso de grandes cantidades de Taq DNA polimerasa, este es un método costoso que además puede conllevar la posible pérdida de especificidad; b) la dilución del extracto usado en la reacción de amplificación, lo que puede disminuir la cantidad del factor inhibitorio, pero también podría reducir la cantidad de DNA por debajo de los límites de detección; c) la adición de albúmina de suero bovino (BSA) a la mezcla de reacción, lo que ayuda a eliminar la inhibición de algunas muestras pero que sin embargo, a menudo requiere de otro procedimiento (Montiel, 2001).

Por otro lado se determinó que es posible la detección de partículas víricas en residuos vegetales mediante la metodología propuesta en este trabajo, ya

que el control de cascarilla estéril inoculado con materia fecal positiva para rotavirus, amplificó la región de 379 pb correspondiente al gen de VP6, lo cual indica que este material no contiene ningún tipo de sustancias que puedan inhibir la técnica de RT – PCR.

Además de la eficacia para detectar DNA, el PCR posee otra característica que lo convierte en una técnica especialmente delicada, consiste en su capacidad de producir una gran cantidad de copias del segmento buscado. Cuando se produce tal cantidad de copias existe el riesgo de que se puedan difundir en el laboratorio, contaminando áreas de trabajo, material y equipos, alcanzando finalmente los reactivos utilizados tanto en la extracción como en la amplificación (Montiel, 2001). Para controlar el problema de contaminación es necesario establecer un control que permita detectarlo, por lo cual se utilizaron muestras de cascarilla, biosólido y compost estériles sin virus, en donde solo se tomó como referencia el resultado de la cascarilla, ya que las otras muestras presentaban inhibidores. La cascarilla estéril amplificó débilmente la banda de 379 pb, indicando de esta manera la contaminación de la muestra con partículas de rotavirus durante los procesos de extracción, concentración o amplificación de rotavirus, debido a la realización de estos procesos en estudios anteriores.

Una vez conocida la muestra que había amplificado el gen de VP6 (pasto), junto con la cascarilla estéril con virus como sin él, se decidió amplificar la región de 876 pb correspondiente al gen de VP4. Esta región es muy conservada entre las cepas del grupo A de rotavirus, por lo que se pretendía mandar a secuenciar y de esta manera definir la cepa predominante en estas muestras.

Los resultados negativos de la amplificación del gen de VP4 en la muestra de pasto y en el control de cascarilla estéril sin virus, se debieron posiblemente

a que la alícuota tomada para el análisis tenía una concentración menor respecto a la que detecta la técnica de RT-PCR, que es de 10^2 a 10^3 partículas virales (Riviera *et al.*,1995).

Teniendo en cuenta que la sensibilidad de la prueba de PCR es de cantidades de rotavirus iguales o superiores a 10^2 la ausencia de bandas en la electroforesis implica que no se detectan cantidades inferiores a esa concentración de virus, lo cual no implica que este no esté presente. Debido a esto no se pudo establecer la presencia de rotavirus en las muestras de compost, Indicando que las mismas no necesariamente estén libres de este agente viral.

Dada la heterogeneidad de las diferentes tipos de muestras analizadas, no existe una metodología global y además, el rendimiento de cada proceso varía según los virus que se quieran concentrar. Este es evidentemente uno de los principales factores que condiciona en gran medida el éxito de la metodología aplicada para la detección, pues ocasionalmente estos procesos consiguen a la vez recuperar sustancias inhibidoras de diversa naturaleza que interfieren en los subsiguientes procesos de detección.

Es importante señalar que este producto utilizado como abono para la agricultura debe estar en óptimas condiciones, de manera que sus procesos den la garantía de un producto libre de organismos infecciosos, con el fin de no causar daños a la salud humana y al medio ambiente.

8. CONCLUSIONES

-Se determinó la presencia de rotavirus en el pasto utilizado como materia prima para la elaboración del compost, indicando la contaminación de las pilas con este agente viral al inicio del proceso de compostaje.

-No se pudo establecer la presencia de rotavirus en las muestras de biosólido y compost, indicando que las mismas no necesariamente estén libres de este agente viral.

-Existen dentro del compost sustancias inhibitorias de la reacción de RT-PCR, por lo que no se puede determinar la presencia del virus en las muestras de compost.

9. RECOMENDACIONES

- Es necesario estandarizar una metodología que permita detectar partículas virales en muestras cuya base sea el biosólido proveniente de plantas de tratamiento, pues como se mencionó, este material tiene muchos inhibidores que pueden ser controlado mediante procedimientos previos y durante la amplificación.
- No se asegura que el compost este libre de rotavirus, por lo que es necesario tomar acciones preventivas antes de la utilización del mismo como fertilizantes en suelos y de esta manera no acarrear daños a la salud humana y al ambiente.

10. BIBLIOGRAFIA

- Abad, F.X., Pinto, R.M. and Bosch, A. (1994) Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 60. pp 3704 - 3710
- Abbaszadegan, M.; Huber, M.; Gerba, C y Pepper I. 1993. Detection of Enteroviruses in Groundwater with the Polymerase Chain Reaction. *Applied and environmental microbiology*. Vol 59. pp. 1318-1324
- Abbaszadegan, M.; Stewart, P and Lechevallier, M. 1999. A strategy for Detection of Viruses in Groundwater. *Applied and environmental microbiology*. Vol 65. pp. 444–449
- Ahmed, A y Sorensen. D. 1995. Kinetics of pathogen destruction during storage of dewatered biosolids. *Wat, Environ*. Vol 63. pp 143 – 150.
- ALAIN R. and BERTHIAUME L. (1993). Electron Microscopy. In Payment and Trudel, *Methods and Techniques in Virology*. Marcel Dekker (New Cork). pp 99-109.
- Arias, C., Dector, M., Segovia, L., López, M., Cmacho, M., Isa, P., Espinosa, R y Lopéz, S. 2004. RNA silencing of Rotavirus gene expresion. *En virus Research*. Vol 102. pp. 43-51.
- Ayora-Talaver, G, Padilla, L., Arias, C., López, S., Puerto, F. 1998. Determinación de serotipos VP4 y VP7 de rotavirus de humano mediante el uso de anticuerpos monoclonales. *Rev Biomedica*. Vol. 9. No. 1.
- Bertoldi, M.; Sequi, P.; Lemmes, B. y Papi, T. 1996. The science of composting. *Blackie academia y professional*. England. pp 49 – 58.
- Bluff, S.; Kirkwood, C.; Parreno, V y Warfield, K. 2003. Rotavirus antigenaemia and viraemia: A commun event. *The lancet* 362: 1445.

- Ciartlet, M., Estes, M. y Bitton, G. 2002. Rotaviruses. In Environmental Microbiology. Wiley Ed. New York City. Pp 2753-2773.
- Corbit, R, 2003. Manual de referencia de Ingeniería Medioambiental. BrageMcGRAW-Hill interamericana de España, S.A.U., Madrid, pp 8.163 – 8.168.
- Corbit, R. A., 2003. Manual de referencia de Ingeniería Medioambiental. Ed. BrageMcGRAW-Hill interamericana de España, S.A.U., Madrid, pp. 8.163 – 8.168.
- Coyne, M., 1999. Los microorganismos del suelo y la calidad del ambiente un enfoque exploratorio. ITP – Paraninfo. España. pp 362 – 268.
- Dahling, D. 1991. Detection and enumeration of enteric viruses in cell culture. Rev. Environ. Control. 21. pp 237 – 263.
- Deng, M and Cliver, D. 1995. Persistence of Inoculated Hepatitis A Virus in Mixed Human and Animal Wastes. Applied and Environmental Microbiology. Vol 61. pp. 87–91
- England, L and Trevors, J. 2002. The Bacterial Ribonucleic Acid (RNA). University of Guelph. Department of Environmental Biology. Vol 28. pp. 15 – 18.
- Environmental Protection Agency. 2002. Chapter 5, Pathogen and vector attraction reduction requirements. Estados Unidos. Guide to the Part 503 Rule – 107 .EPA 40 CFR 503.
- Environmental Protection Agency. 2004. Primer For Municipal Wastewater Treatment Systems. Estados Unidos. EPA 832-R-04-001
- Estes, M. 2000. Rotaviruses and their replication, p. 1747-1785. En B. N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus (eds), Virology, 4 ed, vol. 2. Raven Press, New York.
- Estes, M. 2001. Rotaviruses and their replication. In D. Knipe. P. M. Howley. Fields Virology. Vol 2. pp 1747 – 1785.

- Gentsch J, Glass R, Woods P, Gouvea v, Gorziglia M, Flores J, Bimal K. y Bhan M. 1992. Identification of Group A Rotavirus Gene 4 Types by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, P. 1365-1373, Vol 30 N° 6.
- Gillian D. Lewis And Theodore G. Metcal., F 1988. Polyethylene Glycol Precipitation For Recovery Of Pathogenic Viruses, Including Hepatitis A Virus And Human Rotavirus, From Oyster, Water, And Sediment Samples. *Applied And Environmental Microbiology*, Aug. 1988, P. 1983-1988 Vol. 54, No. 8.
- Gomez, J., 2000. *Abonos Orgánicos*. Colombia. pp 1-25.
- Graffo, J., Ticehurst, J y Fleming, B. 1993. Detection of hepatitis A virus in sewage by antigen capture polymerase chain reaction. *Applied Environmental Microbiology* 59 (10):3165-3170.
- Greig, S.; Berriman, J.; O'Brien, J.; Taylor, J.; Bellamy, A.; Yeager, M y Mitra A. 2006. Structural Determinants of Rotavirus Subgroup Specificity Mapped by Cryo-electron Microscopy. *Journal Molecular Biology*. Vol 356. pp 209 – 221.
- Hansen, J.; Warden, P and Margolin, A. 2007. Inactivation of Adenovirus Type 5, Rotavirus WA and Male Specific Coliphage (MS2) in Biosolids by Lime Stabilization. *Journal of Environmental Research and Public Health*. Vol 4. pp. 61-67
- Ijzerman, M.; Dahling, D y Fout, G. 1997. A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*. Vol 63. pp. 145-153
- Iturriza M., Wong C, Blome S, Desselberger U, y Gray J. 2002. Molecular Characterization of VP6 Genes of Human Rotavirus Isolates: Correlation of Genogroups with Subgroups and Evidence of Independent Segregation. *Journal of Virology*, pp. 6596–6601 Vol. 76, No. 13.

- Iturriza-Gomara, M.; Green, J.; Brown, D.; Desselberger U y Gray, J. 1999. Comparison of specific and random priming in the reverse transcriptase polymerase chain reaction for genotyping group A rotaviruses. *Journal of Virological Methods*. Vol 78. pp 93–103
- Kapikian, A.; Hocino, Y.; Chanock, R y Perez, S. 1996. Efficacy of a quadrivalent rhenus Rotavirus – based human Rotavirus vaccine aimed at preventing severe Rotavirus diarrhea in infants and young children. *The Journal of Infectious Diseases*. Vol 174. pp 65 – 72.
- Kapikian, R.; Yasutaka, H y Chanock, R. 2002. Rotaviruses, *Journal of Virology* Vol 55. pp. 1787-1788.
- Kiely, G. 1999. *Ingeniería Ambiental*. McGraw – Hill. Madrid, España. pp 680 - 682
- Kittigula, L.; Ekchaloemkieta, S.; Utrarachkija, F.; Siripanichgona, K.; Sujiraratb, D.; Pungchittona, S and Boonthumc, 2005. A. An efficient virus concentration method and RT-nested PCR for detection of rotaviruses in environmental water samples., *Journal of Virological Methods*. Vol 124. pp. 117–122
- Larney, f.; Yankey, L.; Miller, J.; Mc Allister T.2003. Fate of Coliform Bacteria in Composted Beef Cattle Feedlot Manure. *Journal of environmental quality*. Vol 32, pp 1508-1515
- Lewis, G y Metcalf, T. 1988. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses including hepatitis A and human Rotavirus from oyster, water and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 54. pp 1983 - 1988
- Ijzerman, M.; Dahling, R y Fout, G. 1997. A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric virus by reverse – Transcription polymerase chain reaction. *J. Virol methods*. Vol 63. pp 145 – 153.

- Lopez, S y Arias, C. 2001. Los Rotavirus. Departamento de Genetica y Fisiologia Molecular. Instituto de Biotecnología/UNAM. Av. Universidad, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.
- Lozada, P.; Escobar, J.; Vidal, A.; Imery, R.; Nater, P.; Sánchez, G.; Sánchez, M. y Bermúdez, A. 2005. The influence of amendment material on biosolid composting of sludge from a waste – water treatment plant. *Revista Ingeniería e investigación*. Vol 25. pp 53 - 63
- Lucena F., Blanch, R. y Jofre, J., 2005. Critical Review On: Methods For Bacteriophages (And Virases) To Be Monitored In EU In Sludges, Soil And Treated Biowastes. *Hor-Hyg Project*. University Of Barcelona. Pp 7-20.
- Mackay, I.; Arden, K.; Nitsche, A. 2002. SURVEY AND SUMMAY Real – time PCR in Virology. *Nucleic acids Research*, Vol 30. pp 1292 – 1305.
- Mahamud, M.; Gutiérrez, A y H. Sastre. 1996. BIOSÓLIDOS GENERADOS EN LA DEPURACIÓN DE AGUAS: (II). MÉTODOS DE TRATAMIENTO. *Ingeniería del Agua*. Vol. 3 Num. 3. pp 45 – 54
- Matthijnssens, J.; Mustafizur, R.; Martella, V.; Xuelei, Y.; Leener, D y Ciarlet, M. 2006. Full Genomic Analisis of Human rotavirus Strain B4106 and Lapine rotavirus Strain 30/ 96 Provides Evidence for Interspecies Transmission, *Journal of virology*. Vol 80. pp. 3801-3810.
- Mattion, N.; Cohen, J y Estes, M. 1994. The rotavirus proteinas. In Kapikian, A. *Viral infections of the gastrointestinal tract*. New Cork. Pp 169 – 249.
- Metcalf y Eddy. 1995. *Ingeniería de aguas residuales; Tratamiento, Vertido y Reutilización*. Editorial McGraw-Hill
- Mignote, B.; Maul. A y Schwartzbrod, L. 1999. Comparative study of techniques used to recover virases from residual urban sludge. *Journal of Virological Methods*. Vol 78. pp 71 – 80.

- Minervini, N. y Morales, J. 2002. Aprovechamiento de los Biosólidos Producidos Por la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales el Salitre. Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ingeniería Civil. Departamento de Civil. Bogotá.
- Monpoeho, S., Maul, A., Bonni, C., Patria, L., Ranarijaona, S., Billaudel, S y Ferre, V. 2004. Clearance of human pathogenic viruses from sludge: study of four stabilization processes by real-time reverse transcription-PCR and cell culture. *Applied Environmental Microbiology*. Vol 70. pp. 5434-5440
- Montiel, R. 2001. Estudio diacrónico de la variabilidad del DNA mitocondrial en población catalana. Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de biología animal, biología vegetal I Ecología.
- Montiel, R., 2001. Estudio Diacrónico de la Variabilidad del Genoma. Tesis doctoral Universidad de Barcelona. Facultad de Biología. Departamento de Microbiología. Barcelona, España.
- MORETTI, C. 1986. La Biotecnología en el tratamiento ecológico de los residuos urbanos. Ministerio de Economía y obras Públicas.
- O’Ryan, M. 2005. Vacunas anti-rotavirus: Al fin una realidad. *Rev Chil Infect*. Vol 22 . pp 345-354.
- Pare, A., 2000. Aislamiento y caracterización de bacterias termófilas con actividad enzimática a partir de residuos vegetales. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá.
- Pina S. 2001 Tesis doctoral Detección y Caracterización de virus patógenos humanos en muestras ambientales y moluscos bivalvos. Universidad de Barcelona. Departamento de Microbiología Facultad de Biología.
- Pizarro, M.; Pizarro, L.; Fernandez, J.; Sandino, M y Spencer, E. 1991. Effect of nucleotide analogues on Rotavirus transcription and replication. *Virology*. Vol 184. pp 768 – 772.

- Pourcher, A.; Francois, P.; Virginie, F.; Agnieszka, G.; Vasilica, S y Gérard, M. 2007. Survival of fecal indicators and enteroviruses in soil after land-spreading of municipal sewage-sludge. *Applied Soil Ecology*. Vol 8. pp. 473-479
- Pourcher, A.; Morand, P.; Picard-Bonnaud, F.; Billaudel, S.; Monpoeho, S.; Federighi, M.; Ferre, V and Moguedet, G. 2005. Decrease of enteric micro-organisms from rural sewage sludge during their composting in straw mixture. *Journal of Applied Microbiology*. Vol 99. pp. 528–539
- Quinchía, A y Carmona D. 2004. Factibilidad de disposición de los biosólidos generados en una planta de tratamiento de aguas residuales combinada. *Revista EIA*, ISSN 1794 – 1237 Número 2. pp 89 - 108
- Riviera, M.; Pablo, A.; Vial, C.; Potin, S.; Priscilla, D y Marales, o. 1995. Evaluación de cuatro métodos para detección de Rotavirus en deposiciones en niños chilenos. *Revista Chilena Pediátrico*. Vol 65. pp 150 – 155.
- Rzezutka A y Cook N. 2004. Survival of human enteric virases in the environment and food. *FEMS Microbiology Reviews*. 28: 441-453
- Sanchez, M., Aguilar, M., Fenoll, R y Roig, A. 2007. Generación de Bioaerosoles en Estaciones Depuradores de Aguas Residuales. *Ingeniería Revista Académica*, Vol 11, pp 37-42.
- Schwarz, B.; Bange, R.; Vahlenkamp, T.; Johne, R y Muller, H. 2002. Detection and quantitation of group A rotaviruses by competitive and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*. Vol 105. pp 277–285.
- Scragg, A. 2002. *Biotecnología Medioambiental*. Acrribia. España. pp 27 - 52

- Sherman, R. 1999. Large-scale organic materials composting. Biological & Agricultural Engineering Department North Carolina State University. North Carolina Cooperative Extension Service.
- Silva, J.; Lopez, P y Valencia, P. 2000. Recuperación de nutrientes fase sólida a través del compostaje. Escuela de ingeniería recursos naturales y el ambiente (EIDENAR). Universidad del Valle. Facultad de Ingeniería. Cali. Colombia
- Sobsey. M., Dean, C., Knuckles, M y Wagner, R. 1980. Interactions and survival of enteric viruses in soil materials. *Applied Environmental Microbiology*. Vol.40.pp. 636-641.
- Taniguchi, K y Urasawa, S. 1995. Diversity in Rotavirus genomes. *Seminars in VIROLOGY*. Vol 6. pp 123–131.
- Tchobanoglous, G., Theisen, H., Vigil, S., 1994. Gestión integral de Residuos sólidos. Ed. Mc Graw Hill Interamericana de España, s. a. Madrid. Vol. 2 pp. 781-783.
- Trello, J. 1996. El proceso de compostaje y la importancia de los Factores Medioambientales. Guía N° 2.
- Tsunemitsu, H.; JIANG, B.; y SAIF, L. 1992. Detection of Group C Rotavirus Antigens and Antibodies in Animals and Humans by Enzyme-Linked Immunosorbent Assayst. *Journal of clinical microbiology*. Vol 30. pp 2129-2134.
- Villena, C., 2003. Vigilancia ambiental molecular de Rotavirus Grupo A Humanos. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona. Facultat de Biología. Departament de Microbiologia.
- Ward, R and Ashley, C. 1977. Inactivation of enteric viruses in wastewater sludge through dewatering by evaporation. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 34. pp. 564-570
- Wichk. K y McCartney. W. 2007. A review of the effectiveness of current time-tempartura regulations on pathogens inactivation during

composting. Journal Environmental Engineering. Sci. Vol 6. pp. 573 – 586

- Wilson I. 1997. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. Applied Applied and Environmental Microbiology. Vol 63. pp. 3741-3751.

RECURSOS ELECTRONICOS

Araque, M.P. 2006. Evaluación de los tratamientos térmico y alcalino en la desinfección del lodo generado en la PTAR El Salitre. Universidad de los Andes. 1-16. <http://guaica.uniandes.edu.co:5050/dspace/handle/1992/905> [Consulta: 20 Enero 2008]

Ballesteros, M.; Ballesteros, I.; Oliva, J.; Martínez, J y Carrasco, J. 2001. Hidrolysis and fermentation of organic waste and biomasa to liquid chemical and fuels. 3er informe. <http://www.ciemat.es> (Consulta: Diciembre 22 de 2007).

Biovir Laboratories inc. (Benicia, California). 2002.503 biosolids pathogens. <<http://www.biovir.com/images/pdf019.pdf>>. [Consulta: 14 enero 2008].

Charles P. Gerba and James. E., Smith, J. Sources of Pathogenic Microorganisms and Their Fate during Land Application of Wastes.

Gómez. J, Estrada, L, Belén. I. 2005. II CONGRESO SOBRE RESIDUOS BIODEGRADABLES Y COMPOST. “ÍNDICES DE CALIDAD DE SUELOS Y COMPOST DESDE LA PERSPECTIVA AGRO-ECOLÓGICA ”

11. ANEXOS

ANEXO 1. PREPARACIÓN DE MEDIOS Y SOLUCIONES

PREPARACION BUFFER FOSFATO 7.2

1. Pesar 3.1 g de Na_2HPO_4 y disolver en 100 ml de agua destilada
2. Pesar 3 g de KH_2PO_4 y disolver en 100ml de agua destilada
3. Mezclar las soluciones hasta que los dos compuestos fosforados estén completamente disueltos
4. Mezclar lentamente las dos soluciones
5. Enrazar en balón aforado hasta completar 1000ml

PREPARACIÓN EXTRACTO DE CARNE 10%

Preparación del extracto de carne, cantidad de componentes para un litro

Extracto de carne 100 g

Para prepara cantidades diferentes de caldo se utiliza una regla de tres.

Ejemplo:

Se quieren preparar 300 ml de Extracto de carne:

Extracto de carne:	100g	→	1000ml
	X		300ml

X= 30 g de Extracto de carne para 300ml de agua.

PREPARACIÓN HCl 1M

Preparación de HCl 1M, Cantidad para un litro

HCl 37% 83.3 ml

Enrazar en balón aforado hasta completar 1000 ml con agua destilada y mezclar la solución

PREPARACIÓN POLIETILENGLICOL 6000 30%

Preparación polietilenglicol 30%, cantidad para un litro

Polietilenglicol 6000 300 g

Enrazar en balón aforado hasta completar 1000 ml con buffer fosfato 7.2 agitar vigorosamente hasta mezclar la solución.

PREPARACIÓN GEL DE AGAROSA 2%

Preparación gel de agarosa 2%, cantidad para 60 ml

1. Pesar 1.2 g de agarosa
2. Diluir en 60 ml de buffer 1X
3. Calentar hasta disolver la agarosa
4. Dejar enfriar hasta una temperatura templada y adicionar 4µl/ml de bromuro de etidio.

PREPARACIÓN BUFFER 1X

Preparación de buffer 1X, cantidad para un litro

A partir del buffer 50X se prepara el buffer 1X

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$50X V_1= 1X 1000ml$$

$$V_1= 20 ml$$

Del buffer 50 X se toman 20 ml y se afora con agua destilada hasta 1000 ml

PREPARACIÓN BUFFER 50 X

Preparación buffer 50X, cantidad para un litro

Tris 242 g

Ácido acético 57.1 g

EDTA 0.5M 100ml

Enrazar en balón aforado hasta completar 1000 ml con agua destilada y mezclar. pH 8.5

ANEXO 2. PROCEDIMIENTOS Y PROTOCOLOS

PROCEDIMIENTO PARA EL MONTAJE DE LA ELECTROFORESIS

1. Adicionar la agarosa al 2% al soporte del gel sin formar burbujas.
2. Colocar la peineta para formar los pozos.
3. Dejar secar.
4. Colocar el gel en el equipo de electroforesis.
5. Cubrir completamente el gel con buffer 1X
6. Mezclar en papel de parafina 2 μ L de azul de bromotimol y 10 μ L de cada una de las muestras para la corrida electroforetica.
7. Adicionar la anterior mezcla en cada pozo.
8. Empezar la corrida a 90 voltios y 120 miliamperios.

PROTOCOLO RT-PCR ROTAVIRUS VP6

MUESTRA	RESULTADO	MUESTRA	RESULTADO

REACTIVO	VOLUMEN
Random Primer	2 μ L
RNA	10 μ L

Se incuba a: 97°C 5 min
 70°C 5 min
 2 min en hielo

Preparar el RT MIX:

RT	X MUESTRA	CANTIDAD
Agua PCR	10 μ L	
Tampon 10x 200 nM	2.5 μ L	
dNTPs 2.5 Mm	2 μ L	
MgCl 50 Mm	0.7 μ L	
RT Enzima MLVV	0.5 μ L	
DTT 0.1 mM	0.5 μ L	
TOTAL	15.2 μL	

Programa RT – PCR: 42°C 1 hora
 95°C 5 min
 2 min en hielo

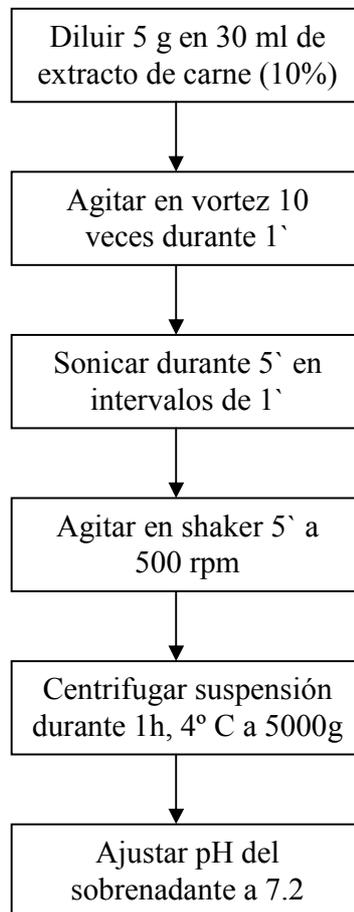
PCR:

PCR	X MUESTRA	CANTIDAD
Agua PCR	14.2 μ L	
dNTPs 2.5 mM	2 μ L	
Tampon 10X 200 mM	2.5 μ L	
MgCl 50mM	1.25 μ L	
Primer VP6-F	2 μ L	
Primer VP6-R	2 μ L	
Taq Pol 5U/ μ L	0.125 μ L	
TOTAL	24 μL	

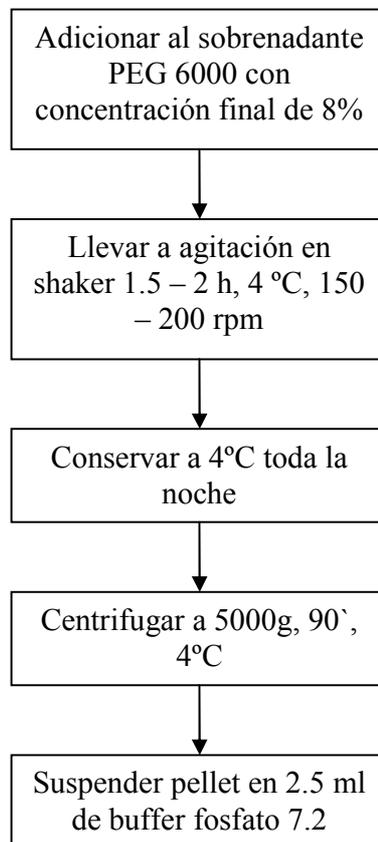
Programa PCR VP6: 94°C 2 min
 94°C 30 seg
 58°C 30 seg
 72°C 1 min
 72°C 7 min
 4 hold

Tamaño de banda: 379pb

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN VIRAL



PROTOCOLO PARA CONCENTRACIÓN DEL VIRUS



DETECCION DE ROTAVIRUS POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE RT-PCR EN MUESTRAS DE COMPOST ELABORADO A PARTIR DE BIOSOLIDOS Y RESIDUOS VEGETALES

ESPINOSA-U, ADRIANA; SOLANO-C, SANDRA; GUTIERREZ MARÍA.
Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Cra. 7ª No. 43-82. Bogotá, Colombia.

adrinita18@gmail.com, solanos@javeriana.edu.co, mfgutier@javeriana.edu.co

RESUMEN

El desarrollo de tecnologías moleculares aplicadas a estudios ambientales ha permitido verificar que existe una alta prevalencia de virus en el medio ambiente, lo que causa un importante impacto en la salud pública e importantes pérdidas económicas en los productos agrícolas. En este estudio se determinó la presencia de Rotavirus en muestras de compost y en las materias primas utilizadas en su elaboración (residuos vegetales y biosólido), identificándolo mediante la técnica de RT – PCR. Se evaluaron cuatro pilas (P1; P2; P3 y P4) con tres réplicas cada una a las cuales se les realizó la técnica de extracción descrita por Ahmed y Sorensen (1995) y modificada para este trabajo, la suspensión resultante de este proceso fue sometida a la técnica para concentración de la partícula viral descrita por Lewis y Metcalf (1988) y modificada por Mignotte *et al* (1999), y llevadas a amplificación por RT-PCR para los genes de VP6 y VP4 de Rotavirus, en donde se evidenció la presencia de este agente viral en la muestra de pasto. Se determinó la presencia de sustancias inhibitoras por lo que no fue posible detectar la presencia o ausencia de Rotavirus en el biosólido y en el compost.

Palabras claves: biosólido, residuos vegetales, compostaje, Rotavirus, técnica RT-PCR.

ABSTRACT

The development of molecular technologies applied to environmental studies has allowed to check that it exists a discharge there was prevailing of virus in the environment, which causes an important impact in the public health and important economic losses in the agricultural products. In this study Rotavirus's presence decided in samples of compost and in the materials raw used in his elaboration (vegetable residues and waste sludge), identifying it with RT – PCR techniques. There were evaluated four piles (P1; P2; P3 and P4) with three replies each one to which they there was realized the extraction technique described by Ahmed and Sorensen (1995) and modified for this work, the resultant suspension of this process was submitted to the technique for concentration of the viral particle described by Lewis and Metcalf (1988) and modified by Mignotte et to (1999), and taken to amplification for RT-PCR for the VP6 and VP4 Rotavirus genes. Where there was demonstrated the presence of this viral agent in the pasture sample. There decided the presence of inhibiting substances so that it was not possible to detect the presence or absence of Rotavirus's in the biosólido and in the compost.

Keywords: biosolids, vegetable waste, composting, Rotavirus, RT-PCR technique

INTRODUCCIÓN

El tratamiento de aguas residuales como alternativa para reducir la contaminación de las fuentes receptoras, ha generado impactos positivos para la recuperación de dichas fuentes; sin embargo, su tratamiento, genera subproductos como el biosólidos, el cual es necesario darle una adecuada utilización. La disposición de los biosólidos demanda un manejo muy cuidadoso por la cantidad que alcanzan y por los riesgos ambientales que, en algunos casos, pueden representar ante la posibilidad de contener sustancias contaminantes provenientes de las aguas tratadas.

Los biosólidos pueden ser utilizados en la agricultura como abono, es decir, como un producto capaz de proporcionar a los cultivos elementos nutritivos necesarios para su crecimiento y su desarrollo. También algunos biosólidos, transformados en compost, pueden jugar un papel importante como fertilizante, lo que significa mantener o mejorar la estructura del suelo, su actividad biológica, o también controlar su acidez. (Lozada *et al.*, 2005). A pesar de las ventajas que poseen los biosólidos, éstos pueden generar un riesgo sanitario, debido a la concentración de microorganismos patógenos que pueden ser transmitidos a los animales y al hombre durante la disposición y utilización insalubre de estos productos.

Los virus entéricos son uno de los patógenos más críticos, debido a que la dosis mínima infecciosa es baja ($< 10^2$). Son estables a condiciones físico-químicas adversas como el pH y temperaturas en conjunto con su resistencia a los sistemas de desinfección. Adicionalmente, su detección requiere pruebas especializadas, lo que hace que sea costosa su identificación. Dentro de los virus entéricos se encuentran los rotavirus, conocidos por ser los principales agentes etiológicos de diarrea (Leon *et al.*, 2007).

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de rotavirus en muestras de compost elaborado a partir de residuos vegetales y biosólido mediante la extracción y

concentración del agente y posterior detección por la técnica de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa–transcriptasa reversa).

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS

Para el análisis de detección de Rotavirus se evaluaron 4 pilas de compost elaboradas en la Vereda “La Granja” Cogua, Zipaquirá (Cundinamarca).

La distribución de las materias primas se realizó como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Distribución de materiales para el montaje de las pilas.

MATERIAS PRIMAS	PILAS DE COMPOST											
	P1			P2			P3			P4		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Biosólido	4.8Ton			4.8Ton			4.8Ton			4.8Ton		
Cascarilla de Arroz	0.8Ton			0.8Ton			0.8Ton					
Pasto kikuyo	0.3Ton			0.3Ton			0.3Ton					
Inoculante PUJ	X											
Inoculante nativo				X								

P1: Pila 1+ inoculo PUJ **P2:** Pila 2 +inoculo nativo **P3:** Pila 3 sin inoculo **P4:** Pila 4 sin inoculo

Las pilas de compost 1 y 2 además de contener las materias primas estaban conformadas por dos tipos de inoculantes, inoculante PUJ e inoculante nativo, respectivamente, con el fin de acelerar la transformación de los residuos. El inoculante PUJ conformado por microorganismos amilolíticos y proteolíticos termofílicos del Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Pontificia Universidad Javeriana, y el inoculante nativo conformado por bacterias termofílicas con capacidad amilolítica y proteolítica aislados a partir de las materias primas (biosólido, cascarilla y poda)

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Extracción Viral

La técnica que se utilizó para la extracción del agente viral fue la descrita por Ahmed y forenses, 1995, la cual se modificó para este trabajo (Mignote *et al.*, 1999). Se diluyeron 5 gramos de las muestras de materia prima y compost en 30ml de extracto de carne al 10% (pH: 9). Estas se sometieron a vortex diez veces durante 1 minuto. Posteriormente, se efectuó un proceso de sonicación en hielo a 37 Hz durante 5 minutos en intervalos de un minuto. Seguido a lo anterior las diluciones se agitaron en Shaker por 5min a 200rpm. Luego las muestras se centrifugaron durante 1 hora a 4° C a 5000g. El sobrenadante obtenido se transfirió a otros tubos falcon en donde se ajustó el pH a 7.2 con HCl 1M y / o NaOH 1N, dependiendo del caso,

Concentración viral

La técnica que se utilizó para la concentración viral fue la descrita por Lewis y Metcalf 1988 y modificada por Mignotte *et al.*, 1999. Al sobrenadante obtenido en el proceso anterior se le adicionó polietilenglicol (6000) PEG 6000 en buffer fosfato 7.2 hasta obtener una concentración final de 8% p/v, La mezcla anterior se llevó a agitación en shaker por 2 horas a 150 rpm a temperatura ambiente y se conservó a 4° C durante toda la noche para posteriormente centrifugarla a 5000g por 90 min a 4° C. El pellet fue suspendido en 2.5 ml de buffer fosfato 7.2.

Detección de sustancias inhibidoras

Se realizó un procedimiento para detectar sustancias inhibidoras en estos materiales que pudieran arrojar falsos negativos a las amplificaciones por PCR. El procedimiento a seguir fue seleccionar algunas muestras que iban a ser evaluadas por la técnica de la RT-PCR, las cuales fueron esterilizadas. Se tomaron 10 µl de materia fecal positiva para rotavirus y se adicionó a 5 gramos de muestra estéril diluida en 30ml de extracto de carne al 10%. Igualmente se tomaron muestras estériles sin adición de materia fecal positiva para rotavirus. Las muestras utilizadas para tal fin fueron; cascarilla, P4 (muestra inicial de la pila 4) y P4R3 (muestra del producto final de la pila 4 replica 3).

RT

A 2 µl de random primer se adicionó 10 µl de la muestra en la que se esperaba la presencia del RNA viral, se incubaron a 97°C por 5min para denaturar el dsRNA y luego a 70°C por 5 min en un termociclador para posteriormente enfriarlas en hielo por 2 min. Se agregaron 15.2 µl de la mezcla de RT que consistía en 10 µl de agua PCR, 2.5 µl de tampon 10X 200nm, 2 µl de dNTPs 2.5 mM, 0.7 µl de MgCl 50 mM, 0.5 µl de RT enzima MMLV (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase), 0.5 µl de DTT (ditiotretitol) 0.1 mM.

La RT se incubó a 42°C por 1h, se calentó a 95°C por 5 min en un termociclador, y se enfrió en hielo por 2 min, con el fin de obtener el cDNA. (Schwarz *et al.*, 2002 ; Iturriza-Gomara *et al.*, 1999)

PCR VP6

10 µl del cDNA obtenido se mezcló con el mix de PCR que consistía en 14,2 µl de agua PCR, 2.5 µl de tampon 10X 200nm, 2 µl de dNTPs 2.5 mM, 1.25 µl de MgCl 50 mM, 2 µl de primer VP6-F (5' GACGGVGCRACTACATGGT 3') (nucleotidos 747 a 766), 2 µl de primer VP6-R (5' GTCCAATTCATNCCTGGTGG 3') (nucleotidos 1126 a 1106), 0.125 µl de Taq Pol 5 U/ µl. La denaturacion se llevó a cabo a 94°C por 2 min, seguida de 40 ciclos de PCR a 94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg y 72°C por 1min, y una extensión final a 72°C por 7 min. Los primers utilizados amplificaron una region de 379 pb del gen VP6 desde el aminoácido 241 hasta el 367 (Iturriza *et al.*, 2002)

Se utilizó un marcador de 100 bp y por cada grupo de muestras procesadas en la técnica de PCR se empleó un control positivo que consistía en tomar como muestra 10 µl de materia fecal positiva para rotavirus suministrada por el Instituto Nacional de Salud (INS) y un control negativo que contenía todos los componentes de la mezcla de reacción a excepción del material genético; en su lugar se añadió agua libre de material genético, correspondiente al volumen de la muestra, que siguió el mismo procedimiento de RT – PCR de las muestras concentradas.

PCR VP4

Las muestras que dieron resultados positivos con la amplificación de la proteína VP6 se confirmaron amplificando la proteína VP4, para lo cual se tomó 10 µl del cDNA de tales muestras y se mezclaron con el mix de PCR que consistía en 14,2 µl de agua PCR, 2.5 µl de tampon 10X 200nm, 2 µl de dNTPs 2.5 mM, 1.25 µl de MgCl 50 mM, 2 µl de primer CON 2 que codifica la región 5' ATTTTCGGACCAT'ITATAACC 3' desde el nucleotido 868 hasta el 887, 2 µl de primer CON 3 que codifica la región 5' TGGCTTCGCCATTLATAGACA 3' desde el nucleotido 11 hasta el 32, 0.125 µl de Taq Pol 5 U/ µl. La denaturacion se llevó a cabo a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de PCR a 94°C por 1 min, 50°C por 2 min y 72°C por 1.30min, y una extensión final a 72°C por 5 min. Los primers utilizados amplificaron una region de 876 pb del gen de VP4 (Gentsch, 1992).

Se utilizó un marcador de 100 bp y por cada grupo de muestras procesadas en la técnica de PCR se empleó un control positivo que consistía en tomar como muestra 10 µl de materia fecal positiva para rotavirus suministrada por el Instituto Nacional de Salud (INS) y un control negativo que contenía todos los componentes de la mezcla de reacción a excepción del material genético; en su lugar se añadió agua libre de material genético, correspondiente al volumen de la muestra, que siguió el mismo procedimiento de RT – PCR de las muestras concentradas.

RESULTADOS

DETECCIÓN DE ROTAVIRUS EN LAS MUESTRAS POR MEDIO DE LA AMPLIFICACIÓN DE VP6

El principal objetivo de este trabajo fue detectar la presencia o ausencia de rotavirus en muestras de compost elaborado a partir de biosólidos y residuos vegetales. Para ello se necesitó poner a punto una RT–PCR para rotavirus, con la cual se amplificó

una banda de 379pb del sexto segmento vírico que codifica para la proteína VP6, para tal fin se utilizó un juego de primers descrito por Iturriza *et al.*, 2002.

Una vez realizado el proceso de extracción y concentración de RNA viral y de la amplificación por RT-PCR, las muestras de pasto, P3 (muestra inicial pila 3) y P3R1 (muestra producto final pila 3 replica 1) presentaban bandas inespecíficas cercanas a los 379 pb, por lo que se hizo pertinente repetir la prueba con estas muestras. Como se muestra en la figura 1 (pozo 4) la repetición arrojó resultados positivos para el pasto con una banda débil de tamaño aproximado a las 379 pb. El resto de las muestras probadas para VP6 fueron negativas

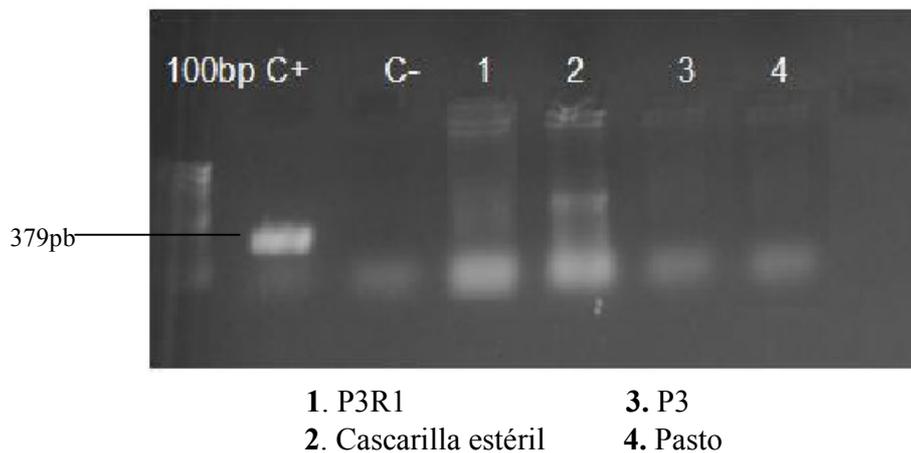
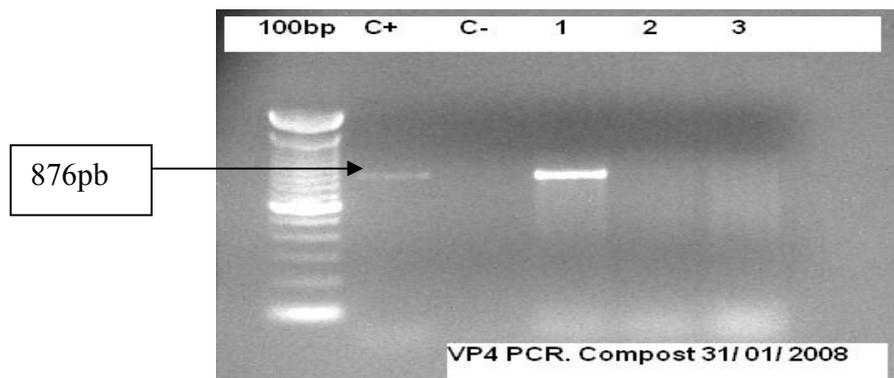


Figura 1. Producto de la RT-PCR de la amplificación del gen VP6 de rotavirus en muestras de compost. La columna de la izquierda contiene el marcador de pesos molecular, seguido del control positivo de la técnica de PCR en donde se encuentra la banda de interés (379pb) y posterior a este el control negativo. En las siguientes columnas se pueden observar a las muestras analizadas 1. Pasto 2. Cascarilla estéril sin virus, 3. Pila 3 inicial, 4. Pila 3 replica 1.

DETECCIÓN DE ROTAVIRUS EN LAS MUESTRAS POR MEDIO DE LA AMPLIFICACIÓN DE VP4

A partir del cDNA de la muestra de pasto en la que se detectó la posible presencia de rotavirus mediante la RT-PCR del segmento genómico correspondiente a VP6, se llevó a cabo el proceso de amplificación, mediante un juego de primers descritos por

Gentsch, 1992, con los cuales se amplifica una banda de 876 pb correspondiente a la proteína VP4. A su vez, esta amplificación se realizó a la cascarilla estéril sin virus y a la cascarilla estéril con virus, muestras que fueron usadas para la detección de inhibidores. Como se muestra en la figura 2 (pozo 2) no se evidenció la banda para VP4 de la muestra de pasto.



1. Cascarilla estéril con virus
2. Pasto
3. Cascarilla estéril sin virus

Figura 2. Producto de la RT-PCR para la identificación del gen VP4 de rotavirus en muestras de compost que fueron positivas en la amplificación de VP6. La columna de la izquierda contiene el marcador de pesos molecular, seguido del control positivo de la técnica de PCR en donde se encuentra la banda de interés y posterior a este el control negativo. En las siguientes columnas se observa las muestras analizadas 1. Cascarilla estéril con virus 2. Pasto 3. Cascarilla estéril sin virus.

DETECCIÓN DE INHIBIDORES DE LA PRUEBA DE RT- PCR

Para la detección de inhibidores de la prueba de RT-PCR se utilizaron muestras estériles con virus y sin virus las cuales siguieron, al igual que las demás, el mismo proceso de extracción, concentración y amplificación del gen VP6 (numeral 5.3.3), en donde se obtuvo como resultado la presencia de una banda débilmente positiva en la cascarilla estéril sin virus y un resultado claramente positivo en la cascarilla con virus, las muestras de compost estéril tanto con virus como sin virus arrojaron resultados negativos.

A las muestras de cascarilla estéril tanto con virus como sin el, se les amplificó el segmento génico de VP4 obteniendo resultados negativos en la cascarilla estéril sin virus y un resultado positivo en la cascarilla estéril con virus.

Como se observa en la figura 3, la cascarilla estéril sin virus presenta una banda débil correspondiente al gen de VP6, a su vez, en el pozo 3 se evidencia la banda de 379 pb de la cascarilla estéril con virus. De igual manera se observa la ausencia de bandas de VP6 en las muestras de compost estériles sin virus en los pozos 2 y 6 y la ausencia de bandas de VP6 en las muestras de compost estériles con virus en los pozos 1 y 5. En la figura 2 se observa en el pozo 1 una banda fuertemente positiva para VP4 en la cascarilla estéril con virus, en esta misma figura se observa en el pozo 3 la ausencia de bandas para la cascarilla estéril sin virus

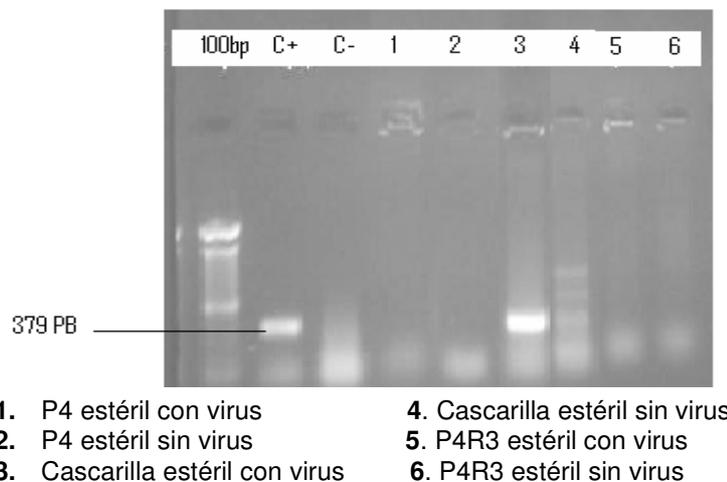


Figura 3. Producto de la RT-PCR para la Identificación del gen VP6 de rotavirus en muestras usadas para el control de inhibidores. La columna de la izquierda contiene el marcador de pesos molecular, seguido del control positivo de la técnica de PCR en donde se encuentra la banda de interés (379pb) y posterior a este el control negativo. En las siguientes columnas se observa las muestras analizadas para el control de inhibidores **1.**P4 estéril con virus, **2.** P4 estéril sin virus **3.** Cascarilla estéril con virus, **4.** Cascarilla estéril sin virus, **5.** P4R3 estéril con virus, **6.** P4R3 estéril sin virus.

DISCUSIÓN

Una gran cantidad de virus de origen humano se excretan a través de las heces y la orina de individuos infectados. Estos llegan a las aguas residuales las cuales son tratadas en plantas depuradoras, en donde se genera como subproducto el biosólido, utilizado en la agricultura como abono o como materia prima en los procesos de compostaje. No obstante, a pesar de sus ventajas, el biosólido puede ser fuente de contaminación de los alimentos si los procesos previos a su uso no son llevados a cabo eficientemente, convirtiéndose en un foco potencial de infecciones. Silvia, J., et al. 2000 afirmó que los patógenos mas numerosos y peligrosos se encuentran en los lodos generados en las plantas de tratamiento de agua residual, donde se encuentran concentraciones significativas de agentes virales como los Rotavirus. En contraste, los residuos vegetales, como el pasto y la cascarilla utilizada como sustratos para la elaboración del compost, contiene menor número de organismos patógenos.

Debido a la naturaleza de las muestras analizadas, en donde la concentración del virus varia, fue necesario encontrar un método sensible, eficiente y sencillo para la determinación de rotavirus del grupo A. En este trabajo se utilizó una técnica diseñada para la extracción y concentración de partículas virales en biosólidos y otras muestras ambientales. Para la detección se utilizó una metodología basada en técnicas moleculares como la RT-PCR.

Se realizó un primer análisis buscando la presencia de rotavirus en las materias primas utilizadas en la elaboración del compost y en las muestras de compost en su fase inicial, en donde se encontró que el pasto presentaba una banda débilmente positiva para rotavirus, lo cual indicaba la presencia del virus al iniciar el proceso de compostaje. Este material fue obtenido de la Planta de Tratamiento de Agua Residual “El Salitre” en donde el agua tratada es utilizada como fuente para el sistema de riego de sus prados, lo cual puede ser una vehiculo importante que generó la contaminación del pasto por rotavirus. Sin embargo, estudios realizados por Sanchez et al., 2007 y Pina, 2001 afirman que algunos virus pueden ser transportados en forma de

bioaerosoles generados en los distintos tratamientos a los que se somete el agua residual, en especial durante las operaciones de aireación o agitación del agua que es donde mayor riesgo existe de que ocurra la transferencia de los organismos al aire y finalmente llegar a otras fuentes como lo es el pasto.

El virus presente en el pasto al estar sometido al proceso de compostaje puede ser degradado por factores físicos, químicos y/o biológicos a los que está expuesto. La inactivación viral dentro del compost puede darse por el calor generado durante la fase termofílica del proceso, ya que se producen daños principalmente en la porción proteica del virión al elevarse la temperatura a 55-70°C. A un grado menor, los virus son también inactivados por la degradación microbiana y el amoníaco, se ha constatado que estos mecanismos interactúan de manera simultánea durante el compostaje. Así, en caso de que se presente la inactivación viral, podría ser atribuida a una interacción sinérgica entre ellos (Pourcher *et al.*, 2005; Wichuk *et al.*, 2007).

Los factores exógenos como el contenido de humedad y el pH juegan un papel secundario en la inactivación viral durante el compostaje. Las condiciones óptimas para el proceso de compostaje son los niveles de pH de 5.5 a 8.0 y el contenido de humedad del 40 a 60 %. Estas condiciones no son perjudiciales para los virus entéricos. Por lo anterior, la inactivación se induce cuando el contenido de humedad disminuye aproximadamente en un 15 % pero generalmente, la inactivación rápida y extensa de los virus probablemente no es alcanzada hasta que el contenido de humedad del material esté por debajo del 10 % (Ward y Ashley, 1977).

Las partículas de rotavirus son estables en un rango de pH de 5 a 9, en general son resistentes al ácido y por lo tanto pueden sobrevivir con valores de pH entre 3 y 5. En contraste la exposición a valores elevados de pH pueden resultar en la inactivación por pérdida de proteínas (Ciartlet, 2002).

El pH y el contenido de humedad pueden afectar la supervivencia viral solo al influir en la multiplicación y subsiguiente actividad metabólica de las bacterias y hongos nativos del compostaje que al degradar material proteico producen amonio. El amonio en altas concentraciones puede afectar la viabilidad viral incrementando el pH durante el proceso de estabilización orgánica.

La inactivación por amonio a pH mayores a 8 causa la fragmentación del RNA ya que el mecanismo de acción del amonio está limitado a la proteólisis de la cápside viral y su infiltración en el genoma, sin descartar la acción de otras sustancias capaces de degradar el RNA (Monphoeho *et al.*, 2004). De igual forma a pH ácido hay un aumento en el proceso de adsorción viral por la presencia de cationes monovalentes o divalentes (Sobsey *et al.*, 1980).

Además de la temperatura y el pH, la actividad microbiana del compostaje puede ser un factor importante en la inactivación viral. Estudios de laboratorio han indicado que algunas bacterias son depredadores microbianos de virus entéricos, estas juegan un papel importante en la destrucción de virus tanto durante el almacenaje como durante el compostaje. Las capsides virales están compuestas por proteínas y por lo tanto son susceptibles a la acción de enzimas proteolíticas liberadas por microorganismos durante el proceso de biodegradación, igualmente los ácidos nucleicos pueden quedar expuestos a procesos fisicoquímicos o biológicos que los degraden y denaturen (Deng y Cliver, 1995).

En cuanto a las muestras de cascarilla, biosólido y compost tanto al inicio como al final del proceso arrojaron resultados negativos, indicando posiblemente, la ausencia de rotavirus en estas muestras. Sin embargo, es paradójico que al encontrarse la muestra de pasto positiva para rotavirus, no se encontrara este mismo resultado en las muestras iniciales de compost de las pilas 1, 2 y 3, las cuales tenían dentro de su composición esta materia prima.

Los anteriores resultados pueden darse posiblemente por dos factores, uno es la dilución del pasto dentro de cada una de las pilas, lo que conlleva a reducir la concentración del virus y por ende a la imposibilidad para detectarlo dentro del compost.

El segundo factor tiene que ver con la presencia de inhibidores dentro de la muestra, se ha reportado que el mayor obstáculo para la aplicación rutinaria de técnicas de amplificación molecular de ácido nucleicos es la presencia de inhibidores de la reacción (Wilson, 1997). Este hecho permite pensar que los resultados negativos obtenidos en las muestras de biosólido y de compost tanto al inicio como al final del proceso, no son reales, ya que los controles de inhibidores en donde se utilizó compost y biosólido estéril inoculados con materia fecal positiva para rotavirus, no amplificaron la banda de 379 pb, indicando de esta manera la presencia de inhibidores en este tipo de material, como compuestos húmicos, fenólicos, y metales pesados, los cuales pueden adsorber a proteínas o a enzimas que intervienen en la RT-PCR e interferir química o estereoquímicamente con el sitio activo de ellas y/o pueden crear enlaces divalentes con cationes de Ca^{2+} y Mg^{2+} evitando de esta manera que estos sean utilizados como cofactores por las enzimas transcriptasa y polimerasa. Igualmente al llevar a cabo el proceso de concentración de las partículas virales presentes en el compost, se pudo haber contribuido de esta misma forma a la concentración de sustancias inhibitorias que compiten por los sitios activos de las enzimas (Abbaszadegan *et al.*, 1993).

Sin embargo, muchos investigadores han diseñado procedimientos para eliminar o atenuar la inhibición. Estos procedimientos, pueden efectuarse antes de la RT-PCR con el fin de optimizar la calidad del RNA, o durante la reacción de amplificación, con el fin de superar el efecto negativo del factor inhibitorio.

Así, la mayoría de los procedimientos realizados antes de la RT-PCR intentan separar el RNA del inhibidor, e incluyen entre otros, la centrifugación del extracto de un

gradiente de sucrosa, la recuperación del RNA después de una electroforesis en gel de agarosa, el uso de agentes quelantes como la resina, la cromatografía de intercambio iónico o la precipitación con isopropanol. Es importante plantear que casi todos estos métodos implican la manipulación de las muestras y/o la adición de sustancias después de la extracción, pudiendo representar una fuente de contaminación. También se puede incluir dentro de los procesos antes de la RT-PCR el diseño de nuevos protocolos para incrementar la pureza de los ácidos nucleicos como el desarrollo del método basado por adsorción sobre soportes de sílice (Montiel, 2001; Pina, 2001).

En lo concerniente a los procedimientos durante la RT-PCR, algunas estrategias utilizadas son los siguientes: a) el uso de grandes cantidades de Taq DNA polimerasa, este es un método costoso que además puede conllevar la posible pérdida de especificidad; b) la dilución del extracto usado en la reacción de amplificación, lo que puede disminuir la cantidad del factor inhibitorio, pero también podría reducir la cantidad de DNA por debajo de los límites de detección; c) la adición de albúmina de suero bovino (BSA) a la mezcla de reacción, lo que ayuda a eliminar la inhibición de algunas muestras pero que sin embargo, a menudo requiere de otro procedimiento (Montiel, 2001).

Por otro lado se determinó que es posible la detección de partículas víricas en residuos vegetales mediante la metodología propuesta en este trabajo, ya que el control de cascarilla estéril inoculado con materia fecal positiva para rotavirus, amplificó la región de 379 pb correspondiente al gen de VP6, lo cual indica que este material no contiene ningún tipo de sustancias que puedan inhibir la técnica de RT – PCR.

Además de la eficacia para detectar DNA, el PCR posee otra característica que lo convierte en una técnica especialmente delicada, consiste en su capacidad de producir una gran cantidad de copias del segmento buscado. Cuando se produce tal cantidad de

copias existe el riesgo de que se puedan difundir en el laboratorio, contaminando áreas de trabajo, material y equipos, alcanzando finalmente los reactivos utilizados tanto en la extracción como en la amplificación (Montiel, 2001). Para controlar el problema de contaminación es necesario establecer un control que permita detectarlo, por lo cual se utilizaron muestras de cascarilla, biosólido y compost estériles sin virus, en donde solo se tomó como referencia el resultado de la cascarilla, ya que las otras muestras presentaban inhibidores. La cascarilla estéril amplificó débilmente la banda de 379 pb, indicando de esta manera la contaminación de la muestra con partículas de rotavirus durante los procesos de extracción, concentración o amplificación de Rotavirus, debido a la realización de estos procesos en estudios anteriores.

Una vez conocida la muestra que había amplificado el gen de VP6 (pasto), junto con la cascarilla estéril con virus como sin él, se decidió amplificar la región de 876 pb correspondiente al gen de VP4. Esta región es muy conservada entre las cepas del grupo A de rotavirus, por lo que se pretendía mandar a secuenciar y de esta manera definir la cepa predominante en estas muestras.

Los resultados negativos de la amplificación del gen de VP4 en la muestra de pasto y en el control de cascarilla estéril sin virus, se debieron posiblemente a que la alícuota tomada para el análisis tenía una concentración menor respecto a la que detecta la técnica de RT-PCR, que es de 10^2 a 10^3 partículas virales (Riviera *et al.*, 1995).

Teniendo en cuenta que la sensibilidad de la prueba de PCR es de cantidades de Rotavirus iguales o superiores a 10^2 la ausencia de bandas en la electroforesis implica que no se detectan cantidades inferiores a esa concentración de virus, lo cual no implica que este esté presente. Debido a esto no se pudo establecer la presencia de rotavirus en las muestras de compost, Indicando que las mismas no necesariamente estén libres de este agente viral.

Dada la heterogeneidad de las diferentes tipos de muestras analizadas, no existe una metodología global y además, el rendimiento de cada proceso varía según los virus que se quieran concentrar. Este es evidentemente uno de los principales factores que condiciona en gran medida el éxito de la metodología aplicada para la detección, pues ocasionalmente estos procesos consiguen a la vez recuperar sustancias inhibitoras de diversa naturaleza que interfieren en los subsiguientes procesos de detección.

Es importante señalar que este producto utilizado como abono para la agricultura debe estar en óptimas condiciones, de manera que sus procesos den la garantía de un producto libre de organismos infecciosos, con el fin de no causar daños a la salud humana y al medio ambiente.

CONCLUSIONES

- Se determinó la presencia de rotavirus en el pasto utilizado como materia prima para la elaboración del compost, indicando la contaminación de las pilas con este agente viral al inicio del proceso de compostaje.
- No se pudo establecer la presencia de rotavirus en las muestras de biosólido y compost, indicando que las mismas no necesariamente estén libres de este agente viral.
- Existen dentro del compost sustancias inhibitoras de la reacción de RT-PCR, por lo que no se puede determinar la presencia del virus en las muestras de compost.

AGRADECIMIENTOS

A Juan Carlos Ulloa, José Salvador Montaña, Olga Raquel Villamizar, Mónica Alvarado, Ingrid Schuler y Janeth Árias por su valiosa intervención para culminar el desarrollo de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- Abbaszadegan, M.; Huber, M.; Gerba, C y Pepper I. 1993. Detection of Enteroviruses in Groundwater with the Polymerase Chain Reaction. *Applied and environmental microbiology*. Vol 59. pp. 1318-1324.
- Ahmed, A y Sorensen. D. 1995. Kinetics of pathogen destruction during storage of dewatered biosolids. *Wat, Environ*. Vol 63. pp 143 – 150.
- Ciartlet, M., Estes, M. y Bitton, G. 2002. Rotaviruses. In *Environmental Microbiology*. Wiley Ed. New York City. Pp 2753-2773.
- Deng, M and Cliver, D. 1995. Persistence of Inoculated Hepatitis A Virus in Mixed Human and Animal Wastes. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 61. pp. 87–91.
- Gentsch J, Glass R, Woods P, Gouvea v, Gorziglia M, Flores J, Bimal K. y Bhan M. 1992. Identification of Group A Rotavirus Gene 4 Types by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, P. 1365-1373, Vol 30 N° 6.
- Iturriza M., Wong C, Blome S, Desselberger U, y Gray J. 2002. Molecular Characterization of VP6 Genes of Human Rotavirus Isolates: Correlation of Genogroups with Subgroups and Evidence of Independent Segregation. *Journal of Virology*, pp. 6596–6601 Vol. 76, No. 13.
- Iturriza-Gomara, M.; Green, J.; Brown, D.; Desselberger U y Gray, J. 1999. Comparison of specific and random priming in the reverse transcriptase polymerase chain reaction for genotyping group A rotaviruses. *Journal of Virological Methods*. Vol 78. pp 93–103.
- Lewis, G y Metcalf, T. 1988. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses including hepatitis A and human Rotavirus from oyster, water and sediments. *Appl. Environ. Microbiol*. Vol 54. pp 1983 – 1988.
- Lozada, P.; Escobar, J.; Vidal, A.; Imery, R.; Nater, P.; Sánchez, G.; Sánchez, M. y Bermúdez, A. 2005. The influence of amendment material on biosolid composting of sludge from a waste – water treatment plant. *Revista Ingeniería e investigación*. Vol 25. pp 53 - 63

- Mignote, B.; Maul, A y Schwartzbrod, L. 1999. Comparative study of techniques used to recover viruses from residual urban sludge. *Journal of Virological Methods*. Vol 78. pp 71 – 80.
- Monpoeho, S., Maul, A., Bonni, C., Patria, L., Ranarijaona, S., Billaudel, S y Ferre, V. 2004. Clearance of human pathogenic viruses from sludge: study of four stabilization processes by real-time reverse transcription-PCR and cell culture. *Applied Environmental Microbiology*. Vol 70. pp. 5434-5440.
- Montiel, R. 2001. Estudio diacrónico de la variabilidad del DNA mitocondrial en población catalana. Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de biología animal, biología vegetal I Ecología.
- Pina, S. 2001. Detección y caracterización de virus patógenos humanos en muestras ambientales y moluscos bivalvos. Universidad de Barcelona. Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Tesis doctoral.
- Pourcher, A.; Morand, P.; Picard-Bonnaud, F.; Billaudel, S.; Monpoeho, S.; Federighi, M.; Ferre, V and Moguedet, G. 2005. Decrease of enteric micro-organisms from rural sewage sludge during their composting in straw mixture. *Journal of Applied Microbiology*. Vol 99. pp. 528–539
- Riviera, M.; Pablo, A.; Vial, C.; Potin, S.; Priscilla, D y Marales, o. 1995. Evaluación de cuatro métodos para detección de Rotavirus en deposiciones en niños chilenos. *Revista Chilena Pediatría*. Vol 65. pp 150 – 155.
- Sanchez, M., Aguilar, M., Fenoll, R y Roig, A. 2007. Generación de Bioaerosoles en Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales. *Ingeniería Revista Académica*, Vol 11, pp 37-42.
- Schwarz, B.; Bange, R.; Vahlenkamp, T.; Johne, R y Muller, H. 2002. Detection and quantitation of group A rotaviruses by competitive and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*. Vol 105. pp 277–285.
- Silva, J.; Lopez, P y Valencia, P. 2000. Recuperación de nutrientes fase sólida a través del compostaje. Escuela de ingeniería recursos naturales y el ambiente (EIDENAR). Universidad del Valle. Facultad de Ingeniería. Cali. Colombia.

- Sobsey. M., Dean, C., Knuckles, M y Wagner, R. 1980. Interactions and survival of enteric viruses in soil materials. *Applied Environmental Microbiology*. Vol.40.pp. 636-641.
- Ward, R and Ashley, C. 1977. Inactivation of enteric viruses in wastewater sludge through dewatering by evaporation. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 34. pp. 564-570.
- Wichk. K y McCartney. W. 2007. A review of the effectiveness of current time-tempartura regulations on pathogens inactivation during composting. *Journal Environmental Engineering. Sci.* Vol 6. pp. 573 –586
- Wilson I. 1997. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Applied Applied and Environmental Microbiology*. Vol 63. pp. 3741-3751.