

Eficiencia de Anaerobios sulfito-reductores como indicadores de calidad sanitaria de agua. Método de Número Más Probable (NMP)

Efficiency of Sulphite-reducing bacteria as sanitary-indicator for water.
MPN-Method

E. GESCHE¹ Dr. agr; A. VALLEJOS, M.V.; M. SAEZ¹ T.M.

¹ Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile. Casilla 567, Valdivia Chile.

SUMMARY

The possibility of pathogenic virus and protozoa persistence in water submitted to purification and disinfection for controlling bacteria, has prompted the look for new water quality indicators. Anaerobic sporulated sulphite-reducing (ASR) bacteria have been described as indicators of sanitary water quality as an alternative to the traditional coliforms in chloride treated potable water.

Thus, the aim of the present work was to test the multiple tube technique for the detection of ASR on DRCM media in water naturally contaminated with fecal residues and its resistance was compared with total coliforms (TC) and fecal coliforms (FC) at 0.1 and 1 mg/kg of chloride as water disinfectant.

Results shows that the MPN methods using DRCM media as selective broth, is efficient and that they show a greater Cl⁻ resistance as TC and FC. Therefore, the use of ASR as sanitary indicator of water is recommended in the presence of resistant biological agents hazard.

Palabras claves: agua, anaerobios sulfito-reductores, NMP.

Key words: water, sulphite-reducing bacteria, MPN.

INTRODUCCION

El agua constituye un elemento fundamental en la vida acuática y terrestre y si bien los contaminantes que a ella llegan, experimentan un gran efecto de dilución, es corriente que el agua sea vehículo de bacterias, virus y protozoos de origen fecal (Geldreich, 1996), causales de gran parte de las diarreas que afectan a la población consumidora, en especial a aquella de mayor riesgo (Atías 1999; APHA, 2001). En los países en desarrollo aproximadamente un 80% de todas las enfermedades y más de una tercera parte de

las defunciones tienen por causa el consumo de agua contaminada y, en promedio, hasta una décima parte del tiempo productivo de cada persona se pierde en las enfermedades asociadas al agua (OMS, 1998; APHA, 2001).

La búsqueda de coliformes como indicadores de contaminación de origen fecal del agua es una práctica establecida desde hace muchos años. En 1895 se propuso una prueba de *Escherichia coli* como índice para determinar la potabilidad del agua de bebida, marcando así el inicio del uso de los coliformes como indicadores de patógenos (Jay, 1992), práctica que hasta hoy aplican muchos países para la calificación sanitaria del agua potable.

Las bacterias constituyen el grupo más importante de agentes patógenos contaminantes

del agua y la principal causa de brotes epidémicos registrados que han tenido su origen en la contaminación fecal (Gray, 1996). Rheinheimer (1987) señala que las aguas servidas transportan con bastante frecuencia bacterias intestinales patógenas como *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* y también, en menor grado, *Shigella spp.*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium spp.* y *Bacillus anthracis*.

Entre los virus patógenos de mayor relevancia transmitidos por el agua se encuentran los Rotavirus y Virus de la Hepatitis A, también denominado recientemente Enterovirus 72, (APHA, 2001; Mims y col., 1999). El virus de la Hepatitis A representa el 87% de todas las enfermedades virales transmitidas por el agua en EEUU (Gray, 1996). Sus pequeños tamaños les permiten pasar, sin ser afectados, a través de las plantas de tratamiento de aguas residuales (Gray, 1996). Su baja concentración, su gran variedad de tipos, su inestabilidad como entidad biológica y las limitaciones en sus métodos de identificación y estimación en el agua, hacen que su detección sea difícil (APHA, 1981; Payment, 1991).

Los virus patógenos son excretados por las heces de humanos infectados y pueden sobrevivir en el ambiente durante largos períodos si hay materia orgánica (Gray, 1996); durante varios meses en aguas servidas, agua de grifo, suelo y mariscos, y en hortalizas maduras alrededor de 23 días luego de cesado el riego con agua contaminada (OMS, 1979). Existen estudios que demuestran que los virus pueden sobrevivir en efluentes de aguas de desecho que han sido sometidos a desinfección suficiente para destruir todos los coliformes y estreptococos fecales y, además, varios investigadores han aislado virus en aguas en las que no fueron detectables coliformes fecales (OMS, 1979). Estos virus son resistentes a los niveles normales de la cloración (OMS, 1998; Glynn y Heinke, 1999), y en un estudio realizado en Canadá se detectaron en algunas muestras pequeñas cantidades de partículas virales en aguas, después de haber sido sometidas a predesinfección, floculación, sedimentación y filtración (Payment, 1991). Por lo tanto, la ausencia de coliformes como

indicadores, no ofrece seguridad de que los virus estén ausentes (OMS, 1979).

Los parásitos son eliminados a través de las fecas humanas y de algunos animales hacia los torrentes de agua, siendo los protozoos, los de mayor importancia médica. Dentro de los protozoos patógenos se encuentra *Cryptosporidium parvum*, relacionado en un principio con individuos inmunodeprimidos. En la actualidad, también se determina en la población normal (APHA, 2001), causando gran parte de las diarreas, sobre todo aquella de tipo agudo en niños (Atías, 1999). Para iniciar una infección se requieren 1-10 ooquistes, siendo estas sus formas infectantes, que contaminan el agua de bebida y alimentos (Jay, 1992; Gray, 1996). Los ooquistes son pequeños, miden en promedio de 4-6 μm , por lo tanto, es el motivo por el cual se dificulta su filtración (Ribas y col., 2000; APHA, 2001). Estos pequeños ooquistes se podrían encontrar en el agua clorada en ausencia de bacterias indicadoras de la contaminación fecal (Gray, 1996), por cuanto son resistentes a la cloración y por ende no se puede asegurar que el agua de bebida esté libre de ellos (Hijnen y col. 2000; APHA, 2001).

Otro protozoo de importancia para la salud pública es *Giardia spp.* que provoca una infección ampliamente distribuida en todas las latitudes y continentes, encontrándose dentro de las enteroparasitosis más frecuentes en menores de 12 años (OMS, 1995; Atías, 1999). Las formas infectantes las constituyen los quistes, que miden alrededor de 8-12 μm de largo y 7-10 μm de ancho (Atías, 1999). Los quistes son eliminados por las heces y poseen la característica de ser viables por períodos de dos meses en agua fría, sobreviviendo a condiciones adversas, incluso a la cloración de las aguas (Atías, 1999; Glynn y Heinke, 1999).

Dada la imposibilidad de aislamiento de cada uno de los agentes patógenos existentes en el agua, que por efecto de dilución se encuentran en baja cantidad (OMS, 1995; Gray 1996), se ha optado por el uso de indicadores de contaminación, que se definen como grupos de microorganismos no patógenos pero frecuentemente asociados con los mismos

(Thatcher y Clark, 1973; ICMSF, 1981). Históricamente los microorganismos indicadores se han elegido de acuerdo a determinados criterios; algunos de ellos son: deben estar universalmente presente en gran número en las heces de los seres humanos y animales de sangre caliente, deben ser fáciles de detectar por métodos sencillos y no deben desarrollarse en el agua en condiciones naturales. Además, es indispensable que su persistencia en el agua y grado en que se eliminen durante el tratamiento de ésta, sean similares a los de los patógenos (OMS, 1995; Gray, 1996). Los indicadores más usados son coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli*, estreptococos fecales y esporas de anaerobios sulfito-reductores (Payment y Franco, 1993; OMS, 1995).

Los anaerobios sulfito-reductores constituyen un grupo asociado a los *Clostridium spp* y como tal se caracterizan por ser organismos Gram positivos, anaeróbicos, formadores de esporas, que están normalmente en las heces, aunque en número mucho más reducido que *E. coli*. Su representante más característico es *Clostridium perfringens* (OMS, 1995) que, de acuerdo a un estudio realizado en los sistemas hidrológicos de Estados Unidos, fue detectado en un 73% de las muestras, demostrando así su presencia en las aguas naturales al igual que los coliformes (Francy y col., 2000). Son deteriorantes, ya que producen malos olores y, con mucha frecuencia, ennegrecimiento del producto cuando éste tiene hierro, formando un precipitado oscuro de sulfuro de hierro (Merck, 2000). Estos microorganismos tienen la capacidad de reducir los sulfitos a sulfuros a partir de aminoácidos y compuestos azufrados (Mac Faddin, 1980) y para su detección se utiliza la evidente coloración negra dada por la formación del precipitado (Merck, 2000).

El origen de los anaerobios sulfito-reductores no es exclusivamente fecal, ya que pueden proceder de otras fuentes ambientales (OMS, 1995) como suelo, sedimentos marinos, vegetación en descomposición, heridas infectadas de hombre y animales (Sneath y col., 1986), aguas superficiales, como también en los alimentos, especialmente cuando las condiciones de higiene en la elaboración son deficientes.

Debido a las características que poseen los anaerobios sulfito-reductores es que se han propuesto como indicadores de contaminación de alto riesgo del agua. La ventaja más importante es que sus esporas sobreviven en el agua mucho más tiempo que los organismos del grupo coliforme y son resistentes a la desinfección, al punto que pueden ser detectados en algunas muestras de agua después de haber recibido pre-desinfección, floculación, sedimentación, filtración y la desinfección terminal (Payment, 1991). Por las razones expuestas, el aislamiento de anaerobios sulfito-reductores se propone para indicar el riesgo de sobrevivencia de agentes patógenos en ciertos ecosistemas expuestos a contaminación fecal remota, como también que, por sus características de tamaño y resistencia a la desinfección, logren escapar a los tratamientos habitualmente aplicados al agua (Payment y Franco, 1993; OMS, 1995; Cho y col., 2000).

El cloro es el desinfectante usado por excelencia, debido a que ofrece varias ventajas, entre ellas su bajo costo, su eficacia y la facilidad de cuantificación, tanto en laboratorios como en terreno. Otra ventaja importante con respecto a otros desinfectantes, es que deja un residuo desinfectante que contribuye a prevenir la nueva contaminación (OMS, 1995; Gray, 1996; OMS, 1998).

Desde el punto de vista sanitario, el valor orientativo para el cloro libre es de 5 mg/kg. Sin embargo, las concentraciones que son detectables por los consumidores y provocan un rechazo suelen ser inferiores a 0.6 mg/kg de cloro (OMS, 1998). Es por ello que la legislación sanitaria chilena, indica que las concentraciones mínimas de cloro libre residual requeridas para una desinfección de eficacia preestablecida del agua, para un período de desinfección de 10 minutos a pH 6-8 es de 1 mg/kg y se debe mantener en las redes de agua potable un residual de cloro libre de 0.2-0.3 mg/kg, no debiendo bajar en ningún caso de 0.1 mg/kg (Chile, 1979).

Actualmente se están llevando a cabo investigaciones para encontrar mejores métodos para evaluar la calidad microbiana del agua potable. Estos estudios han demostrado que las bacterias indicadoras tradicionales frecuentemente

indican que el agua está libre de contaminación fecal, aunque virus, oocistos y quistes de protozoos y aquellas bacterias capaces de desarrollar formas de resistencia (esporas) estén presentes, demostrando que no son totalmente confiables.

Entre los métodos de cuantificación de indicadores bacterianos para la determinación de calidad del agua, se describe el sistema del «filtro de membrana», método que ha sido empleado por varios autores para la determinación de anaerobios sulfitorreductores y/o *Clostridium spp* en agua (Bisson y Cabelli, 1979; Payment y Franco, 1993; Cho y col., 2000; Hijnen y col., 2000) Bisson y Cabelli (1979) hacen una reseña bibliográfica que demuestra el mayor uso y las ventajas de la técnica del filtro de membrana para la determinación de anaerobios-sulfito reductores en agua, argumentando la mayor precisión en los datos numéricos obtenidos y la posibilidad de filtrar grandes volúmenes, con lo cual se pueden detectar cantidades bajas de los indicadores.

Otro método de cuantificación de bacterias en agua es el de «tubos múltiples» identificado corrientemente como NMP (número más probable), que entrega un valor probabilístico de la cantidad de bacterias en 100 ml de agua y que para la determinación de anaerobios sulfito reductores en agua, está descrito en la norma internacional ISO 6461 (ISO, 1986). El método de NMP, si bien entrega un valor aproximado sobre la cantidad de bacterias presente en la muestra, corresponde a la técnica usualmente empleada para la detección de coliformes en agua (Chile, 1998)

En la presente investigación, se realizó un estudio comparativo de detección de coliformes totales y fecales y de bacterias anaerobias sulfito-reductoras a fin de probar la eficiencia de la técnica de detección del NMP de esporas de anaerobios sulfito-reductores y de comparar la resistencia al cloro de ambos grupos de indicadores. Para garantizar la presencia de ambos tipos de bacterias indicadoras en el agua a analizar, se trabajó con muestras extraídas de un río naturalmente contaminado con desechos urbanos e industriales (Bertoglio, 1990).

MATERIAL Y METODOS

En el transcurso de seis meses, se obtuvieron 14 muestras de 1 litro de agua de río, que en el laboratorio fueron subdivididas en tres submuestras de 200 ml, de las cuales 2 fueron sometidas a tratamiento con cloro (preparado con una presentación en polvo a una concentración de 62%⁽¹⁾) en concentraciones de 0.1 mg/kg y 1 mg/kg y la tercera fue dejada sin tratamiento. El tiempo de acción del cloro se fijó en 30 minutos para luego neutralizarlo con 0.2 ml (OMS, 1998) de una solución de tiosulfato de sodio⁽²⁾ al 10% (APHA, OMS, 1981), dejándolo actuar por aproximadamente 30 minutos previo al cultivo. Posteriormente las tres submuestras se sometieron al análisis del NMP de coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF) y de anaerobios sulfito-reductores (ASR) utilizando series de 5 tubos.

Para la determinación de CT y CF se emplearon 7 series de 5 tubos, incluyendo así hasta la dilución 10^{-5} , con el fin de poder interpretar los resultados que estuvieran sobre el límite máximo de detección de 1.600 bacterias por 100 ml dado por el procedimiento de siembra de tres series que señala la técnica (Chile, 1998). Se utilizó caldo Lauryl Triptosa Sulfato⁽³⁾ para desarrollar la prueba presuntiva de coliformes y luego de la incubación a 35 ± 1 °C durante 48 horas, se traspasó material de los tubos positivos a otros con caldo Lactosa bilis 2% verde brillante⁽²⁾ e incubados a 35 ± 1 °C por 48 h, en base a cuyos resultados positivos, se confirmó el NMP de CT. Para la confirmación de CF, la siembra (desde tubos positivos al caldo Lauryl Triptosa Sulfato) se realizó en caldo E.C.⁽³⁾ que fue incubado por 48 horas a 44.5 ± 0.2 °C en baño termostático. En los tres medios de cultivo empleados para la determinación de coliformes, se consideraron positivos aquellos tubos que demostraron producción de gas como consecuencia de la fermentación de la lactosa.

⁽¹⁾ Laboratorio SPARTAN.

⁽²⁾ Laboratorio MERCK S.A.

⁽³⁾ Laboratorio P.V.EQUIP LTDA. (OXOID).

Para la determinación del NMP de anaerobios sulfito-reductores se utilizó como base el método de cultivo indicado por la norma 6461/1-1986 (ISO, 1986), sembrando 3 series con los volúmenes de 10, 1 y 0.1 ml de muestra de agua. Como medio de cultivo se utilizó caldo Diferencial para Clostridios⁽²⁾ (DRCM), cubriendo los tubos sembrados con 0.5 cm de vaselina líquida para lograr la anaerobiosis. Luego los tubos sembrados fueron sometidos a un calentamiento por 15 minutos a 75 ± 1 °C, que tuvo la finalidad de destruir las formas bacterianas vegetativas presentes en las muestras (ISO, 1986). Los tubos posteriormente fueron incubados a 35 ± 1 °C por 48 horas y se consideraron positivos aquellos que presentaron coloración negra, dada por la precipitación de sulfuro de hierro. Para descartar la existencia de reacciones falsas positivas, se realizó la siembra de cada tubo con coloración negra, en placas con agar (Base Perfringens⁽³⁾ (TSC), e incubados en anaerobiosis por 48 horas a 35 ± 1 °C. La presentación de colonias negras en el agar TSC, confirmó la presencia de bacterias esporuladas sulfito-reductoras en el material sembrado.

El cálculo del NMP de los tres indicadores, se determinó en base a tablas de NMP (Chile, 1998), expresándose los resultados como el número de microorganismos por 100 ml de agua. En aquellos casos en que el NMP era inferior a la sensibilidad de la técnica (< 1.8 /100ml), el resultado se consideró como «valor zero». Para la evaluación de los resultados, se transformaron los datos obtenidos a logaritmos de base 10 (\log_{10}) y la descripción y análisis estadístico basada en el cálculo de promedio, desviación estándar, correlación y prueba de t de Student para determinar el grado de significancia de las diferencias, todos los cálculos se realizaron mediante el programa Microsoft[®]Excel 1997.

RESULTADOS Y DISCUSION

De los datos obtenidos en el estudio se comprobó que al aplicar la técnica de determinación del NMP de Anaerobios Sulfito-Reductores en agua, utilizando caldo DRCM, es innecesaria la comprobación de los tubos

sospechosos recomendada por Höll (1986), ya que todos los tubos inicialmente reconocidos como positivos produjeron colonias negras al confirmar la presencia de *Clostridium spp* en las placas con agar TSC incubadas en anaerobiosis. De lo anterior se deduce que con la técnica empleada para la detección de NMP de anaerobios sulfito-reductores, no se presentaron reacciones falsas positivas.

Considerando que se puede obviar la confirmación en placa de los tubos positivos a las bacterias tipo anaerobios sulfito-reductores, los resultados se obtienen en un lapso de 48 horas tal como lo señala la técnica 6461/1 (ISO, 1986). El lapso para la obtención de resultados ofrece ventajas frente a la técnica del NMP utilizada para coliformes totales y fecales, la cual ocupa 96 horas para conseguir resultados confirmatorios (APHA, 1981; Chile, 1998; OMS, 1998).

Otro aspecto importante que demostró este estudio, es la facilidad de interpretación de los resultados obtenidos con el caldo DRCM debido a que la lectura de los tubos se basa en el cambio de coloración del medio original, rosado pálido (negativo), a la coloración negra (positivo), producida por la precipitación del sulfuro dada por la capacidad de estas bacterias de reducir los sulfitos a sulfuros (ISO, 1986; Merck, 2000). Es importante agregar que en algunos tubos se observó la coloración amarilla al momento de la lectura, la cual estuvo dada por crecimiento de bacterias del género *Bacillus*, que son esporulados y aerobios facultativos, por lo tanto, también pueden crecer en las condiciones dadas en la técnica, sin embargo, no realizan la sulfito-reducción (Sneath y col., 1986).

En el cuadro 1 se presentan los resultados obtenidos para los tres indicadores en las 14 muestras analizadas. Del valor promedio detectado para cada indicador, se desprende que tanto CT como CF se encuentran en mayor cantidad que ASR en el agua analizada y que los valores mínimo y máximo detectados, igualmente fueron cerca de 10 veces menores para los ASR que para ambos tipos de coliformes. El análisis de la significancia de la diferencia, entre los promedios, denota valores

CUADRO 1. Variables y grado de asociación obtenidos de los indicadores de calidad de agua, encontradas en las muestras de agua de río sin tratamiento de cloro.Variables of number (\log_{10}) and association between indicators (ASR; TC and FC) in the river water samples without Cl₂.

Indicadores	Promedio \pm DS	Rango	Correlación (r)	Diferencia
ASR	2.13 \pm 0.45	1.5 - 3.0		
CT	3.65 \pm 0.67	2.5 - 4.7		
CF	3.15 \pm 0.41	2.7 - 4.0		
ASR/CT			0.52	p < 0.05
ASR/CF			0.49	p < 0.05
CT/CF			0.71	p < 0.05

de $p < 0.05$. Estos datos confirman que si bien las bacterias ASR son consideradas indicadoras de contaminación fecal, se encuentran en menor cantidad que coliformes totales y fecales en el agua (OMS, 1995).

La menor correlación encontrada entre ASR y ambos tipos de coliformes (0.50 ± 0.02) que la de coliformes entre sí (0.71) se puede atribuir a las diferentes características entre los grupos bacterianos y a las fuentes de contaminación. Es así como los anaerobios sulfito-reductores pueden proceder de fecas, suelo, sedimentos marinos, vegetación en descomposición, heridas infectadas de hombre y animales (Sneath y col., 1986; OMS, 1995) y no se multiplican fácilmente en presencia de oxígeno libre. Por otra parte, coliformes que se consideran propios de las fecas y los vegetales, se caracterizan por su rápida multiplicación en medios con materia orgánica (Kreig y Holt, 1984), creciendo además en medios mínimos que contienen solamente una fuente de carbono orgánico (Jay, 1992), lo cual podría permitir su multiplicación en un ambiente de alta contaminación.

Cho y col. (2000), realizaron un estudio de aguas superficiales y subterráneas contaminadas con desechos de ganadería, para lo cual utilizaron cuatro indicadores bacterianos, entre los cuales, los *Clostridium* sulfito-reductores, aunque en menor cantidad que los otros, estuvieron presentes en todas las muestras analizadas

La menor cantidad de ASR en relación a los CF en las muestras analizadas, le atribuye una ventaja de uso como indicador cuando se trata

de calificar agua altamente contaminada, dado que no requerirá la siembra de mayor número de series de tubos para la determinación de valores precisos superiores al valor máximo de la técnica con tres series de tubos (NMP 1.600/100ml con inóculos de 10, 1 y 0.1 ml), situación que corrientemente se presenta al utilizar coliformes como indicadores de calidad sanitaria en agua de alta contaminación. (APHA, 1981; OMS, 1998). Esto quedó demostrado en la presente investigación en que para la determinación de ASR se sembraron sólo tres series con una dilución máxima de 10^{-1} , mientras para la determinación de coliformes hubo que sembrar siete series con dilución del agua de hasta 10^{-5} , situación que resulta relevante en los costos de análisis de los laboratorios de servicio.

El resultado obtenido de la desinfección de las mismas muestras de agua con 0,1 y 1 mg/kg de cloro (Cl_2), se presenta en el cuadro 2, del cual se desprende que la concentración de 0,1 mg/kg de cloro que se recomienda mantener en el agua potable al momento del consumo (Chile, 1979; Le Chevalier y col., 1991), no tiene acción alguna sobre las bacterias ASR, ($p > 0,05$) mientras CT y CF disminuyen significativamente ($p < 0.05$) experimentando una reducción decimal de 1.55 y 1.80 respectivamente.

Diferente fue el efecto del cloro aplicado en concentración de 1 mg/kg, sobre los indicadores (cuadro 2), demostrándose claramente la mayor sensibilidad de coliformes que de ASR a esa concentración del desinfectante ($p < 0.05$), experimentando ASR una reducción decimal de

CUADRO 2. Número de muestras positivas, promedio, porcentaje de muestras con valor Zero y reducción decimal de los tres indicadores, por efecto del cloro.

Number of positive samples, mean, percent of samples with zero value and decimal reduction from the three indicators through chlorination effect.

Indicadores	Variables de tratamiento			
	Parámetros	Sin tratamiento	0,1 mg/l de Cl ⁻	1 mg/l de Cl ⁻
Anaerobios sulfitorreductores	Nº muestras positivas	14/14	14/14	14/14
	Promedio (Lg 10)	2.13 ± 0.45	2.15 ± 0.52	1.13 ± 0.5
	% Valor Zero	0	0	0
	Reducción decimal	-----	- 0.02	1.0
Coliformes totales	Nº muestras positivas	14/14	14/14	4/14
	Promedio (Lg 10)	3.65 ± 0.67	2.1 ± 0.83	0.52 ± 0.28
	% Valor Zero	0	0	71.4
	Reducción decimal	-----	1.55	3.13
Coliformes fecales	Nº muestras positivas	14/14	14/14	0/14
	Promedio (Lg 10)	3.15 ± 0.41	1.35 ± 0.86	0
	% Valor Zero	0	0	100
	Reducción decimal	-----	1.80	3.15

1.0 mientras CT lo hicieron en 3.13 con un 71.4% de muestras con valor zero, mientras CF presentaron un 100% de muestras con valor zero.

Diversos investigadores concuerdan en que la característica de formación de esporas, hace que los ASR sean más resistentes que otras bacterias a condiciones adversas, constituyendo mejores indicadores que los coliformes para determinar contaminación fecal remota (Bisson y Cabelli, 1979). A su vez, Hijnen y col. (2000) determinaron que los ASR son más sensibles al Cl⁻ que *Cryptosporidium*, sin embargo presentan una resistencia igual a la de *Giardia*, frente a ese desinfectante. También Ribas y col. (2000) señalan que los ASR, se asocian mejor a la posible presencia de protozoos patógenos, cuyos quistes y oocistos son capaces de sobrevivir largamente en el ambiente.

El presente trabajo confirma lo expresado por otros investigadores respecto a la conveniencia de incorporar la determinación de bacterias ASR como complemento a la determinación de coliformes en la determinación de calidad sanitaria del agua. Además se desprende que la cuantificación de ASR utilizando la técnica de tubos múltiples es una buena alternativa al

método del filtro de membrana, especialmente cuando se trata de agua con materia orgánica en suspensión, lo que puede dificultar o incluso impedir la filtración de volúmenes de agua superiores a 180 ml, nivel en el cual matemáticamente se iguala la sensibilidad de detección de ambas técnicas.

RESUMEN

La posibilidad de persistencia de virus y protozoos patógenos en agua sometida a procesos de purificación y desinfección para el control de bacterias, ha incentivado la búsqueda de nuevos indicadores de calidad sanitaria del agua. Se han descrito las bacterias del tipo anaerobios sulfito-reductores esporulados (ASR), como alternativa a los coliformes como indicadores tradicionales para la calificación de agua potable sometida a la desinfección con cloro.

Es por ello que en el presente trabajo se probó la técnica de tubos múltiples (NMP) para la detección de ASR en agua naturalmente contaminada con residuos fecales y se comparó su resistencia con la de coliformes totales (CT)

y coliformes fecales (CF), a 0.1 y 1 mg/kg de cloro como desinfectante del agua.

Los resultados obtenidos demuestran que la técnica de detección de ASR aplicando la técnica de NMP en caldo selectivo DRCM es eficiente, y que su resistencia al Cloro es superior a la de CT y CF. Los antecedentes demuestran la conveniencia de usar ASR como indicador de calidad sanitaria del agua cuando existe la sospecha de contaminación con agentes biológicos resistentes a los tratamientos de descontaminación del agua.

BIBLIOGRAFIA

- APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 1981. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 15th ed., American Public Health Association, Washington D.C. USA.
- APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 2001. Drinking Water Quality and Public Health. *Am. J. of Public Health*. 91: 499-500.
- ATIAS, A. 1999. Parasitología Médica. Mediterráneo, Santiago, Chile.
- BERTOGLIO, J. 1990. Contaminación del Río Valdivia: un problema grave que requiere solución urgente. Servicio de Salud, Valdivia, Chile.
- BISSON, J. W., V. J. CABELLI. 1979. Membrane Filter Enumeration Method for Clostridium perfringens. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 55-66.
- CHO, J. C.; H. B. CHO; S. J. KIM. 2000. Heavy contamination of a subsurface aquifer and a stream by livestock wastewater in a stock farming area, Wonju, Korea. *Environmental Pollution* 109: 137-146.
- CHILE. MINISTERIO DE SALUD. 1979. Agua potable: actualización sobre el control de cloro residual en las redes de agua potable. Servicio Nacional de Salud, Santiago, Chile (circular N° 27 del 22 de febrero).
- CHILE. MINISTERIO DE SALUD. 1998. Manual de Técnicas Microbiológicas para los Alimentos y Agua. Instituto de Salud Pública, Santiago, Chile.
- FRANCY, D., D. HELSEL, R. NALLY. 2000. Occurrence and Distribution of Microbiological Indicators in Groundwater and Stream Water. *Water Environ. Res.* 72:152-161.
- GELDREICH, E. 1996. La Amenaza Mundial de los Agentes Patógenos transmitidos por el Agua. En Gunther, C. 1996. Calidad del Agua Potable en América Latina: Ponderación de los Riesgos Microbiológicos contra los Riesgos de los Subproductos de la Desinfección Química. International Life Sciences Institute, Washington D.C. EEUU.
- GLYNN, J., G. HEINKE. 1999. Ingeniería Ambiental. 2^a ed., Prentice Hall Hispanoamericana S.A., México.
- GRAY, N. 1996. Calidad del Agua Potable, Problemas y Soluciones. Acibia S.A., Zaragoza. España.
- HIJNEN, W. A. M., J. WILLEMSSEN-ZWAAGSTRA, P. HIEMSTRA, G. J. MEDEMA, D. VAN DER KOOIJ. 2000. Removal of sulphite-reducing clostridia spores by full-scale water treatment processes as a surrogate for protozoan oocysts removal. *Water Science and Technology* 41: 165-171
- HÖLL, K. 1986. Wasser. 7th ed., Walter de Gruyter, New York-Berlin.
- ICMSF, INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. 1980. Ecología Microbiana: Factores que afectan a la Supervivencia de los Microorganismos en los Alimentos. Acibia S.A., Zaragoza, España.
- ICMSF, INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. 1981. Microorganismos de los Alimentos. 1 Métodos Recomendados. Acibia S.A., Zaragoza, España.
- ISO. INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. 1986. ISO 6461/1 Water Quality: Detection and Enumeration of the Spores of Sulphite-Reducing Anaerobes (Clostridia).
- JAY, J. 1992. Microbiología Moderna de los Alimentos. 3^a ed., Acibia S.A., Zaragoza, España.
- KREIG, N., J. HOLT. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volumen 1, Williams-Wilkins, Baltimore, USA.
- LE CHEVALLIER, M.W; W.D.NORTON; R.G. LEE. 1991. *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. In Filtered Drinking Water Supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2617-2621.
- MAC FADDIN, J. 1980. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de las Bacterias de Importancia Clínica. Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
- MERCK, S.A. 2000. Microbiology Manual. Deutscher Akreditierungs Rat, Berlin, Alemania.
- MIMS, C., J. PLAYFAIR, I. ROITT, D. WAKELIN, W. WILLIAMS. 1999. Microbiología Moderna. 2^a ed., Harcourt Brace, Madrid, España
- OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 1979. Virus Humanos en el Agua, Aguas Servidas y Suelo. Ginebra (Informe Técnico 639).
- OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA

- SALUD. 1995. Guías para la Calidad del Agua Potable: Recomendaciones, Volumen 1. Ginebra (Informe Técnico sin número).
- OMS, ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 1998. Guías para la Calidad del Agua Potable: Vigilancia y Control de los Abastecimientos de Agua a la Comunidad. Volumen 3, 2ª ed., Ginebra (Informe Técnico sin número).
- PAYMENT, P. 1991. Fate of Human Enteric Viruses, Coliphages and *Clostridium perfringens* during drinking-Water Treatment. *Can. J. Microbiol.* 37: 154-157.
- PAYMENT, P., E. FRANCO. 1993. *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 9: 2418-2424.
- RHEINHEIMER, G. 1987. Microbiología de las Aguas. 4ª ed., Acribia S.A., Zaragoza, España.
- RIBAS, F., A. BERNAL, J. PERRAMÓN. 2000. Elimination of *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts, turbidity and particles in a drinking water treatment plant with clarification and double filtration. *Water Science and Technology.* 41: 203-211.
- SNEATH, P., N. MAIR, M. E. SHARPE, J. HOLT. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volumen 2, Williams-Wilkins, Baltimore, USA.
- THATCHER, F., D, CLARK. 1973. Análisis Microbiológico de los Alimentos. Acribia S.A., Zaragoza, España.

