

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE MEDICINA PREVENTIVA VETERINARIA

EVALUACION DE UNA TECNICA DE DETECCION DEL NMP DE ANAEROBIOS
SULFITO-REDUCTORES, PARA LA CALIFICACION SANITARIA DE AGUA

Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al TITULO DE
MEDICO VETERINARIO.

ANDREA EUGENIA VALLEJOS CAMPOS

VALDIVIA-CHILE

2002

PROFESOR PATROCINANTE

Erika Gesche R
Nombre

Firma

PROFESORES CALIFICADORES

Ricardo Enríquez S.
Nombre

Firma

Roberto Murúa B.
Nombre

Firma

FECHA DE APROBACION: 6 de Agosto del 2002.

INDICE

	Nº Página
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCION	3
4. MATERIAL Y METODO	11
5. RESULTADOS	14
6. DISCUSION	19
7. BIBLIOGRAFIA	24
8. ANEXOS	27
9. AGRADECIMIENTOS	34

1. RESUMEN

EVALUACION DE UNA TECNICA DE DETECCION DE NMP DE ANAEROBIOS SULFITO-REDUCTORES, PARA LA CALIFICACION SANITARIA DE AGUA.

Existe inquietud sobre la eficiencia de los Coliformes como indicadores de calidad sanitaria del agua, por cuanto serían menos resistentes a condiciones adversas, que ciertos agentes patógenos entéricos, especialmente del tipo virus y parásitos. Con el propósito de evaluar un parámetro de calidad sanitaria de aguas, se implementó la técnica de cuantificación de Anaerobios Sulfito-Reductores y se comparó el efecto del cloro como desinfectante de agua, sobre ellos y los indicadores Coliformes Totales y Fecales.

Para ello se tomaron muestras de 1 litro de agua del río Calle-Calle en su paso por la ciudad de Valdivia para posteriormente, ser analizadas a través de la técnica de los tubos múltiples para los tres indicadores. De cada muestra se obtuvieron tres submuestras de 200 ml y dos de ellas fueron sometidas a cloración en concentraciones de 0,1 y 1 ppm de cloro, dejando la tercera sin tratamiento. Las bacterias fueron cuantificadas a través del método NMP (Número Más Probable).

Los resultados de este trabajo, demuestran la resistencia que poseen Anaerobios Sulfito-Reductores a las concentraciones de 0,1 ppm de cloro, observándose cierta sensibilidad a concentraciones de 1 ppm, sin su eliminación total siendo, por lo tanto, más resistentes que Coliformes a estas concentraciones, sobre todo Coliformes Fecales, los cuales a 1 ppm de cloro tienden a ser prácticamente eliminados del agua tratada, arrojando resultados bajo el mínimo detectable con el método NMP.

Con este estudio, se demostró que la técnica utilizada para la detección de Anaerobios Sulfito-Reductores es fácil y rápida de desarrollar. Además, se observó que las bacterias tipo Anaerobios Sulfito-Reductores, se encuentran en cantidades suficientes para ser detectadas en agua incluso, en aquellas sometidas a desinfección con cloro hasta concentraciones de 1 ppm. Por lo tanto, a diferencia de Coliformes, son un indicador confiable que advierte la presencia de microorganismos patógenos presentes en agua, que serían resistentes al cloro.

Palabras claves: Indicadores bacterianos, Anaerobios Sulfito-Reductores, resistencia al cloro.

2. SUMMARY

EVALUATION OF A SULPHITE-REDUCING ANAEROBES MPN DETECTION TECHNIQUE FOR THE SANITARY QUALIFICATION OF WATER.

There is uncertainty about the efficacy of Coliforms as sanitary quality water indicators, since they would be less resistant to adverse conditions than certain enteric pathogen agents especially virus and parasites. With the purpose of evaluating a sanitary quality water parameter, it was implemented a quantification technique of Sulphite-Reducing Anaerobes and was compared to the chlorine effect as water purifier over them and the Total and Fecal Coliform indicators.

To do so, some 1 litre samples were taken from the Calle-Calle river which flows through the city of Valdivia to be analyzed through a multiple tube technique for the three indicators. Three subsamples of 200 ml were obtained from every sample and two of them were put to be chlorinated in 0,1 and 1 ppm chlorine concentrations, leaving the third one without treatment. The bacteria were quantified through the MPN method (Most Probable Number).

The results obtained from this study demonstrate that Sulphite-Reducing Anaerobes do have resistance to the 0,1 ppm chlorine concentrations, observing certain sensitivity to 1 ppm concentrations without their total output, so being more resistant than Coliforms to these concentrations, especially to those of Fecal Coliforms which in 1ppm chlorine tend to be practically eliminated of treated water, giving out results under the least noticing properties through the MPN method.

After having carried out this research, it has been demonstrated that the technique used for the identification of Sulphite-Reducing Anaerobes is easy and non-time consuming to be performed. Moreover, it was observed that Sulphite-Reducing Anaerobes bacteria are found in enough quantities to be identified in water even in those put to be purified with chlorine in concentrations up to 1 ppm. So, if compared to Coliforms, these are reliable indicators that show the presence of pathogen microorganisms in water that would be chlorine resistant.

Key Words: Bacteria indicators, Sulphite-Reducing Anaerobes, chlorine resistance.

3. INTRODUCCION

Desde un punto de vista fisiológico el agua es esencial para todas las formas de vida (Traverso, 1996). Conforman el 65% del peso corporal de los animales y el hombre, constituyendo también el 80% del cuerpo de los vegetales (Chile, 1983). El agua no es sólo fundamental para el desarrollo de la vida en la tierra, si no que también forma parte de ella. Es así como corresponde a las $\frac{3}{4}$ partes (70,8%) de su superficie (Marrero, 1981). De esta agua el 97,5% es salina, encontrándose la mayoría en los océanos, de ello se deduce que sólo el 2,5% restante, es actualmente agua dulce. El agua dulce no está toda disponible para el consumo humano ya que, alrededor del 75% de ella, está inmovilizada en glaciares y casquetes polares. El 24% restante corresponde a aguas subterráneas, por lo tanto, menos del 1% del agua está en lagos y ríos (Gray, 1996).

Con el aumento de la población en los últimos años y la activa intervención del hombre en el medio ambiente (Geldreich, 1996), destruyendo el equilibrio ecológico (Chile, 1983), los recursos hídricos tanto superficiales como subterráneos, se están volviendo cada vez más escasos, debido a que han afectado sus reservas disponibles y capacidad de autopurificación (Geldreich, 1996).

A medida que aumenta la actividad humana, incluyendo la agricultura y la industria, las fuentes de agua se van cargando de diversos desechos contaminantes, tanto domésticos como industriales (Geldreich, 1996). Es por ello, que la OMS define la contaminación del agua dulce de la siguiente manera “ el agua está contaminada cuando su composición o su estado están alterados, de tal modo que no reúne las condiciones para una u otra, para el conjunto de utilidades a las que se hubiere destinado en su estado natural ” (Chile, 1983).

Los agentes biológicos son los contaminantes del agua de mayor trascendencia (Traverso, 1996), y se clasifican en cuatro grandes grupos: bacterias, virus, protozoos y helmintos (Geldreich, 1996; Traverso, 1996).

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 más importantes se encuentra *Cryptosporidium parvum* (Traverso, 1996), relacionado en un principio con individuos inmunodeprimidos. En la actualidad, también se determina en la población sana (APHA, 2001), causando gran parte de las diarreas, sobre todo diarrea aguda en niños en América Latina y El Caribe (Traverso, 1996; 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 μ m, por lo tanto, es el motivo por el cual se hace difícil su filtración (APHA, 2001). Estos pequeños ooquistes se podrían encontrar en el agua clorada en ausencia de bacterias indicadoras de la contaminación fecal (Gray, 1996), es decir, son resistentes a la cloración. Por ambas causas mencionadas anteriormente (tamaño y

dificultad de filtración), no se puede asegurar que el agua de bebida esté libre de ellos (APHA, 2001).

Con menor frecuencia se encuentra *Entamoeba histolytica*, protozoo responsable de parte de las disenterías en adultos, que se presentan en América Latina y El Caribe (Traverso, 1996; Atías, 1999). La diseminación está dada por la expulsión asintomática de quistes (su forma infectante) que miden aproximadamente 5-20 μm , siendo capaces de resistir la cloración y de sobrevivir fuera del hospedador por días o semanas (Atías, 1999; Glynn y Heinke, 1999). La transmisión de la infección puede ocurrir por contacto directo (persona a persona) favorecido por condiciones sanitarias deficientes y por contacto indirecto, a través de la ingestión de agua de bebida y alimentos contaminados (Atías, 1999; Mims y col., 1999).

Otro protozoo de importancia para la salud pública es *Giardia spp.* (OMS, 1995), que provoca una infección ampliamente distribuida en todas las latitudes y continentes, encontrándose dentro de las enteroparasitosis más frecuente 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 que al contaminar el agua de bebida y sumando además, el grado de educación sanitaria de la población, es la principal vía de transmisión (Atías, 1999). Estos quistes 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).

Existen muchas variaciones en los períodos de sobrevivencia de los parásitos en el agua, es así como los quistes de protozoos promedian sobre los 30 días a temperaturas de 8°-10°C (OMS, 1989), incluso 18 meses dependiendo de las temperaturas, en el caso de *Cryptosporidium parvum* (Gray, 1996). Los huevos de helmintos pueden hacerlo por varios meses (OMS, 1989), no obstante, en este caso, el modo de transmisión habitual es la ingestión de huevos en alimentos o tierra contaminada por fecas, más que la ingestión de agua contaminada, pero no por ello deja de ser un peligro (OMS, 1995).

Los virus patógenos humanos sólo son expelidos por humanos infectados (Geldreich, 1996). Sólo se multiplican en células vivas (APHA, 1981), pero pueden sobrevivir en el ambiente durante largos períodos si hay materia orgánica (Gray, 1996), durante varios meses en agua de desecho, agua de grifo, suelo y mariscos, y en hortalizas maduras alrededor de 23 días luego de cesado el riego con agua contaminada (OMS, 1979). Pasan sin ser afectados a través de la planta de tratamiento de aguas residuales, llegando así a las aguas superficiales (Gray, 1996). Además, por su pequeño tamaño, 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 un problema (APHA, 1981; Payment, 1991).

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 *Streptococcus Fecales* y además, varios investigadores han aislado virus en aguas en las que no fueron detectables Coliformes Fecales (OMS, 1979). 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 recibir 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).

Entre los virus de mayor importancia en América Latina y El Caribe transmitidos por el agua se encuentran: Rotavirus (Traverso, 1996; APHA, 2001), que mide aproximadamente 75 nm (Mims y col., 1999) y Virus de la Hepatitis A (Traverso, 1996), también denominado recientemente Enterovirus 72, que mide entre 25-30 nm (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).

Las bacterias son el grupo más importante en cuanto a frecuencia de detección en agua potable y epidemias de enfermedades registradas, asociadas comúnmente con la contaminación fecal (Gray, 1996). Estas bacterias producen cuadros de gastroenteritis que cursan fundamentalmente con diarrea y deshidratación, e incluso la muerte (Traverso, 1996).

Lo anterior es de importancia, si se considera 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* (Rheinheimer, 1987).

Todas las bacterias patógenas representan un riesgo grave para la salud, sobre todo si se encuentran en el agua de bebida. En América Latina y El Caribe, las bacterias de mayor importancia son *Escherichia coli enterotoxigénica*, *Shigella* y *Campylobacter jejuni*, en otras áreas *Salmonella*, *Escherichia coli enteropatógena* y *Vibrio cholerae* (Traverso, 1996).

Especial cuidado, se debe poner en aquellas bacterias que forman esporas y que son altamente patógenas para el ser humano. Las esporas son células en reposo (Jawetz y col., 1992), que ciertas bacterias desarrollan en su interior (Sneath y col., 1986) como forma de resistencia, por lo tanto, es un mecanismo de respuesta a condiciones ambientales desfavorables, principalmente agotamiento de nutrientes (Jawetz y col., 1992). Las esporas son únicas, redondas u ovals, reconocidas por su forma, tamaño y posición en la célula (Sneath y col., 1986) y cuando encuentran condiciones nutricionales favorables se activan y germinan para producir una célula vegetativa única (Jawetz y col., 1992).

Las esporas resisten efectos letales como el calor, temperaturas de 80°C por 10 minutos (Sneath y col., 1986) e incluso 100°C por varias horas (ICMSF, 1980). También son resistentes a la sequía y muchos desinfectantes, como es el caso del etanol al 95% por 45 minutos y además, sobreviven en la naturaleza inactivadas por largos períodos (Sneath y col., 1986).

Los integrantes de diversos géneros bacterianos son capaces de formar esporas. Los dos bacilos gram positivos esporulados más comunes son el género *Bacillus* que son aerobios

y el género *Clostridium* que son anaerobios (Jawetz y col., 1992), cuyos representantes patógenos de mayor interés son *Cl. perfringens*, *Cl. botulinum* y *B. cereus*.

El hábitat de *Cl. perfringens* es el suelo, agua, alimentos, polvo y tracto gastrointestinal del hombre y animales (Jay, 1992; Mims y col., 1999). Produce enfermedades como gangrena gaseosa debida a la infección de heridas e intoxicaciones alimentarias (Mims y col., 1999). La carne contaminada es el alimento más importante implicado en brotes alimentarios de corta duración, dada fundamentalmente por la cepa tipo A (Jay, 1992).

Cl. botulinum es un microorganismo autóctono de suelos y aguas, en donde los tipos A, B y E son los principales causantes del botulismo en personas. El mayor riesgo, lo constituyen los alimentos preparados y enlatados en casa (Jay, 1992), como carne y pescados (Mims y col., 1999) que se manipulan inadecuadamente o que se someten a un tratamiento térmico insuficiente para destruir las esporas (Jay, 1992; Mims y col., 1999).

B. cereus se encuentra normalmente en el suelo, polvo y agua (Jay, 1992), asociándose a intoxicaciones alimentarias de corta duración y autolimitadas, en donde los alimentos vehiculizadores más destacados son el arroz recalentado, las legumbres y verduras (Mims y col., 1999).

Todos los agentes patógenos de origen biológico, provienen principalmente de las descargas públicas que colectan fecas y residuos. Estos residuos proceden tanto de domicilios como de hospitales, servicios públicos e industrias alimentarias de las ciudades que no cuentan con plantas de depuración o pretratamiento antes de vertirlos al sistema de alcantarillado. También derivan de las aguas lluvias que han escurrido por patios, calles y basurales y de algunos sitios de orillas de ríos, en donde se abandonan basuras sólidas, las que posteriormente son esparcidas por las corrientes (Bertoglio, 1990; OMS, 1998).

Los riesgos que implican estos contaminantes para la salud humana, derivan ante todo, de los usos que se le da al agua, en lo que respecta a su ingestión directa como agua de bebida, a su contacto directo con el deporte y recreación, en el riego de plantaciones de vegetales comestibles (Bertoglio, 1990). Esto último es un peligro, sobre todo en lo que respecta al lavado de otros productos comestibles como pescados y mariscos extraídos del curso o estuario que posteriormente van a la venta (Bertoglio, 1990).

Es por ello, que según el uso que se de al agua, se puede clasificar en agua para consumo humano, agua para bebida de animales, riego, recreación y estética, y vida acuática, basada en los requisitos establecidos por la Norma Chilena Oficial 1333. Of. 78, modificada en 1987 (Chile, 1987).

Para los consumidores es necesario poner a disposición, un abastecimiento de agua satisfactorio. Lo mencionado es importante ya que, las enfermedades transmitidas por el agua potable, en particular las bacterianas, generalmente ocurren por fallas en la infraestructura o en el sistema de tratamiento de aguas (APHA, 2001). Por lo tanto, se debe obtener la mejor calidad que permitan las circunstancias, para ello el mejor método es casi siempre la

protección de la fuente, que debe preferirse al tratamiento del agua contaminada a fin de hacerla apta para el consumo (OMS, 1995).

Hoy en día es prácticamente imposible lograr la protección de las fuentes de abastecimiento, es por ello que el agua de bebida debe reunir ciertas características. En Chile, la Norma 409. Of. 70 (Chile, 1984) establece los requisitos físicos, químicos y bacteriológicos que debe cumplir el agua potable proveniente de cualquier sistema de abastecimiento. La misma Norma define los métodos para determinar su número e indica los parámetros de evaluación.

Actualmente, es posible detectar la presencia de numerosos agentes patógenos en el agua. Dado que los métodos de aislamiento y recuento a menudo son complejos y consumen demasiado tiempo, no es factible localizar en el agua de bebida todos y cada uno de los patógenos microbianos posibles (OMS, 1995). Otra desventaja que tiene su detección, es que estos microorganismos patógenos pueden no estar presentes en el agua todo el tiempo y encontrarse solamente en número muy pequeño (Gray, 1996). Además, la selección de un patógeno específico puede ser engañosa, ya que cada especie puede tolerar diferentes condiciones ambientales (Gray, 1996).

Un método más lógico, es detectar organismos normalmente presentes en las heces de los seres humanos y otros animales de sangre caliente, que se utilicen como indicadores de la contaminación fecal y de la eficacia del tratamiento y la desinfección del agua (OMS, 1995). Los indicadores se definen como grupos de microorganismos no patógenos pero frecuentemente asociados con los mismos (ICMSF, 1981), de enumeración fácil y cuya presencia en cierto número se considera como una indicación de que los alimentos o agua, estuvieron expuestos a condiciones que permitieron la llegada o proliferación de organismos patógenos. Los indicadores bacterianos simplemente advierten el riesgo de que pudieran estar presentes agentes patógenos (Thatcher y Clark, 1973).

Para que los resultados obtenidos tengan sentido, los microorganismos indicadores han de responder a determinados criterios. Deben estar universalmente presentes 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 eliminan durante el tratamiento de ésta, sean similares a los de los patógenos (OMS, 1995; Gray, 1996).

La realización de frecuentes exámenes para determinar si el agua contiene organismos indicadores de la contaminación fecal sigue siendo el modo más sensible y específico de estimar la calidad del agua desde el punto de vista de la contaminación indeseada (OMS, 1995). Los indicadores más usados son: Coliformes Totales, Coliformes Fecales, *Escherichia coli*, Estreptococos Fecales y esporas de Anaerobios Sulfito-Reductores (Clostridios) (OMS, 1995).

El grupo Coliforme comprende todos los bacilos aeróbicos y facultativamente anaeróbicos, gram negativos, no formadores de esporas, pertenecientes a la familia

Enterobacteriaceae, que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de 48 horas a 35°C (APHA, 1981), siendo representado por los géneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella* (Thatcher y Clark, 1973; Jay, 1992). Su presencia no indica necesariamente contaminación fecal (Thatcher y Clark, 1973), ya que pueden encontrarse tanto en las heces como en el medio ambiente (OMS, 1998).

Posteriormente, se diferenciaron los Coliformes Fecales, que son un grupo de organismos pertenecientes al grupo Coliforme, presentes en el intestino y fecas de los animales de sangre caliente (APHA, 1981). Su selección se basa en la incubación, en caldo de enriquecimiento de Coliformes, en donde producen gas a partir de lactosa a temperaturas de 44,5°C (Thatcher y Clark, 1973; APHA, 1981), lo que no sucede con los Coliformes provenientes de otras fuentes (APHA, 1981). Encontrándose principalmente el género *Escherichia* (Thatcher y Clark, 1973).

Este grupo, es el indicador principal para determinar calidad del agua doméstica, de bebida y de otros usos. Se caracteriza por usar la densidad de estos microorganismos como criterio del grado de contaminación (APHA, 1981).

La utilización de los Coliformes como indicación de contaminación de origen fecal del agua y de los alimentos, 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. Esto marcó el principio del uso de los Coliformes como indicadores de patógenos en el agua, práctica que ha sido ampliada a los alimentos (Jay, 1992).

Los Anaerobios Sulfito-Reductores (Clostridios) son organismos anaeróbicos, formadores de esporas, que están normalmente en las heces, aunque en número mucho más reducido que *E. coli*. Su representante más característico es *Cl. 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 el 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). Para su detección se utiliza esta característica, 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 y encontrándose también presentes en los alimentos, especialmente cuando las condiciones de higiene en la elaboración son deficientes (*).

* Sra. Eliana Marambio. Instituto de Salud Pública. Santiago. Chile.

Debido a las ventajas que poseen los Anaerobios Sulfito-Reductores es que se han propuesto como indicadores (*). La ventaja más importante es que sus esporas sobreviven en el agua mucho más tiempo que los organismos del grupo Coliforme y resisten la desinfección (OMS, 1995), incluso puede ser detectado en algunas muestras de aguas, después de haber recibido predesinfección, floculación, sedimentación, filtración y la desinfección terminal (Payment, 1991). Su presencia en agua desinfectada puede indicar que el tratamiento, principalmente la filtración, ha sido deficiente. Por lo mencionado anteriormente, sería útil para indicar la sobrevivencia de agentes patógenos resistentes y de riesgo para la salud (OMS, 1995).

El agua de beber es tan sólo uno de los vehículos de transmisión de enfermedades (OMS, 1995). Aproximadamente un 80% de todas las enfermedades y más de una tercera parte de las defunciones en los países en desarrollo, 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 relacionadas al agua (OMS, 1998), siendo la población mayormente afectada bebés, niños, individuos inmunodeprimidos y ancianos (APHA, 2001).

Es por esto, que la desinfección de las fuentes de abastecimiento de agua potable, es una medida de salud pública necesaria, pero no suficiente para garantizar la buena salud (Reiff, 1996). La desinfección, se usa por lo general como complemento a otros procesos previos, como sedimentación, filtración, floculación, almacenamiento, ajuste de pH (OMS, 1998) y la selección de estos procesos depende de la calidad del agua bruta que entra en la planta de tratamiento (Gray, 1996).

Se estima que en Chile desde 1991, la población atendida con agua desinfectada es el 87,9% (Reiff, 1996). 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).

El principio de la cloración, consiste en agregar suficiente cloro para oxidar toda la materia orgánica e inorgánica (manganeso, hierro) y otras sustancias reductoras presentes en el agua, así como oxidar el amoníaco libre de modo que el residual de cloro quede presente como cloro libre activo (Chile, 1979; Chile, 1980). Desde el punto de vista sanitario, el valor orientativo para el cloro libre es de 5 ppm. Sin embargo, las concentraciones que son detectables por los consumidores y provocan un rechazo suelen ser inferiores a 0,6 ppm de cloro (OMS, 1998).

Es por ello, 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 0,2 ppm, y se debe mantener en las redes de agua potable un residual de cloro libre de 0,2-0,3 ppm, no debiendo bajar en ningún caso de 0,1 ppm (Chile, 1979).

* Sra. Eliana Marambio. Instituto de Salud Pública. Santiago. Chile.

Hoy en día 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, ooquistes y quistes de protozoos y aquellas bacterias capaces de desarrollar formas de resistencia (esporas) estén presentes, demostrando que no son totalmente fiables.

Es por ello, que con la presente investigación se desea implementar una técnica de cuantificación de bacterias Anaerobias Sulfito-Reductoras, con el propósito de obtener un parámetro de calidad sanitaria de aguas y determinar el efecto del cloro sobre las bacterias indicadoras de calidad sanitaria: Anaerobios Sulfito-Reductores y Coliformes.

4. MATERIAL Y METODO

Entre mayo y noviembre del año 2001 se tomaron en 15 oportunidades, muestras de un litro de agua desde el río Calle-Calle en su paso por la ciudad de Valdivia (escalinata de la feria fluvial). Las muestras fueron transportadas al laboratorio del Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria de la Universidad Austral de Chile para su análisis de inmediato, de lo contrario, fueron almacenadas en refrigeración por un máximo de 6 horas hasta su análisis. De cada litro de muestra de agua, se obtuvieron 3 submuestras de 200 ml, de las cuales 2 fueron sometidas a tratamiento con cloro en concentraciones de 0,1 ppm y 1 ppm y la tercera fue dejada sin tratamiento. Las tres submuestras se sometieron al análisis de Coliformes Totales, Coliformes Fecales y de Anaerobios Sulfito-Reductores.

4.1 DETERMINACIÓN DEL NMP DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES

Según el manual de técnicas microbiológicas para alimentos y agua (Chile, 1998), se deben sembrar tres series de cinco tubos cada uno, con volúmenes de 10, 1 y 0,1 ml de muestra de agua. El manual también estipula la necesidad de realizar diluciones, en el caso de aguas contaminadas, con el fin de poder interpretar los resultados con mayor exactitud. De acuerdo a ello, se sembraron siete series de cinco tubos en caldo Lauryl Triptosa Sulfato ⁽¹⁾ para desarrollar la prueba presuntiva de Coliformes. Los tubos se incubaron por 48 horas a 35°C. Los tubos positivos fueron destinados a desarrollar la prueba confirmatoria, sembrados con asa en caldo Lactosa bilis 2% verde brillante ⁽²⁾ e incubados a 35°C por 48 horas para posteriormente determinar el NMP de Coliformes Totales. En ambos casos, los tubos positivos fueron aquellos que presentaron gas como producto de la fermentación de la lactosa, presente en el caldo de cultivo.

Para la determinación de Coliformes Fecales, se sembraron paralelamente a la prueba confirmatoria de Coliformes Totales, tubos con caldo E.C ⁽³⁾ (Caldo *Escherichia coli*) a partir de los tubos positivos a la prueba presuntiva de Coliformes, siendo incubados por 48 horas a 44,5°C en baño termostático.

El cálculo del NMP de Coliformes Totales y Fecales se determinó en base a una tabla para el cálculo del NMP de microorganismos por 100 ml de muestra, formando la clave con los tubos que fueron positivos en los caldos de bilis verde brillante y E.C.

(1) Laboratorio P.V. EQUIP Ltda. Los capitanes 1388, Providencia. Santiago.

(2) Laboratorio Merck S.A. Francisco de Paula Taforó 1981. Santiago.

(3) Laboratorio P.V. EQUIP Ltda. Los capitanes 1388, Providencia. Santiago.

4.2 DETERMINACIÓN DEL NMP DE ANAEROBIOS SULFITO-REDUCTORES.

Se utilizó como base el método de cultivo indicado por la norma ISO 6461/1-1986 (E), empleando los volúmenes de 10, 1 y 0,1 ml.

El procedimiento a seguir, fue la siembra de tres series de cinco tubos con caldo DRCM (Caldo Diferencial para Clostridios) ⁽⁴⁾, cubiertos con 0,5 cm de vaselina líquida para lograr la anaerobiosis. Luego, 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), posteriormente fueron incubados a 35 +/- 1°C por 48 horas.

La detección de tubos con coloración negra, dada por la precipitación de sulfuro de hierro, indicó la sospecha de Anaerobios Sulfito-Reductores en ellos. Posteriormente, se comprobó la positividad, mediante la siembra de cada tubo sospechoso en placas con agar TSC (Agar Base Perfringens) ⁽⁵⁾ y puesto en jarras de anaerobiosis (Höll, 1986), incubándose por 28 horas a 35 +/- 1°C. Aquellas que presentaron crecimiento de colonias con coloración negra, se dieron por positivas y a partir de ellas (placas positivas) se obtuvieron los números de la clave que determinaron el NMP de Anaerobios Sulfito-Reductores. Para la cuantificación se empleó la misma tabla de cálculo de NMP de bacterias por 100 ml, indicada para Coliformes.

4.3 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL CLORO

Para determinar el efecto de la adición de cloro en el tratamiento de agua, sobre los microorganismos indicadores Coliformes y Anaerobios Sulfito-Reductores, se preparó una solución madre, en la que se utilizó cloro en polvo a una concentración de 62% ⁽⁶⁾. A partir de ella, se hicieron diluciones de 1:10, hasta lograr concentraciones de 10 ppm y 1 ppm de cloro, de las cuales se tomaron 20 ml para agregarlas a 2 submuestras de 180 ml de agua, llevándolas a una concentración de 1 ppm y 0,1 ppm respectivamente. El tiempo de acción del cloro en la muestra se fijó en 30 minutos (anexo 8.1).

Con la finalidad de neutralizar el cloro de las submuestras, previo a la siembra en los tubos, se agregó a las submuestras cloradas 0,2 ml (OMS, 1998) de una solución de tiosulfato de sodio ⁽⁷⁾ al 10% (APHA, 1981) dejándolo actuar por 30 minutos aproximadamente. Posteriormente, se determinó el NMP de Coliformes Totales y Fecales y NMP de Anaerobios Sulfito-Reductores en el agua clorada con 1 y 0,1 ppm.

(1) Laboratorio Merck S.A. Francisco de Paula Taforó 1981. Santiago.

(2) Laboratorio Merck S.A. Francisco de Paula Taforó 1981. Santiago.

(3) Clorospar 62. Laboratorio Spartan. Av. Marathon 3011, Macul. Santiago.

(4) Laboratorio Merck S.A. Francisco de Paula Taforó 1981. Santiago.

4.4 EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

De cada una de las muestras de agua que fueron extraídas, se obtuvieron resultados de NMP de Coliformes Totales y Fecales y NMP de Anaerobios Sulfito-Reductores de agua sin tratamiento y de las aguas tratadas con 1 y 0,1 ppm de cloro, comparándolas entre sí.

Debido a los altos valores absolutos y a la amplia variedad numérica encontrada en los datos obtenidos que entorpecen el análisis, es que los valores fueron transformados a logaritmos de base 10 (\log_{10}) para su normalización, facilitando su manejo y análisis. Además, para efectos de gráficos y análisis estadístico, aquellos datos cuantificados mayores a 1.600 (> 1.600) y menores a 1,8 ($< 1,8$) fueron utilizados como tales valores absolutos. Para la evaluación estadística se utilizó el Análisis de Varianza (ANDEVA) (Chao, 1993; Hopkins y col., 1997; Taucher, 1997), método paramétrico utilizado para la comparación de más de dos medias. Posteriormente se realizó la prueba de contraste con el método de Tukey (Taucher, 1997) y en ambas pruebas se utilizó un nivel de significación del 5% ($\alpha: 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 EVALUACION DE LA TECNICA DE NMP DE ANAEROBIOS SULFITO-REDUCTORES.

Los datos presentados en el anexo 8.2, demuestran que todos los tubos de caldo DRCM considerados sospechosos, fueron confirmados como positivos al comprobar, por cultivo en placa con agar TSC, la presencia de colonias características de bacterias Anaerobias Sulfito-Reductoras. Esto se aprecia, ya que, tanto en tubos como en placas se obtuvieron iguales claves, por lo tanto, idéntico NMP.

5.2 COMPARACION DEL NMP DE ANAEROBIOS SULFITO-REDUCTORES Y DE COLIFORMES.

En el gráfico N° 1, se visualiza la comparación de los datos obtenidos del NMP de Anaerobios Sulfito-Reductores, Coliformes Totales y Coliformes Fecales en muestras de agua sin tratamiento. La tabulación de estos datos se encuentra en el anexo 8.3.

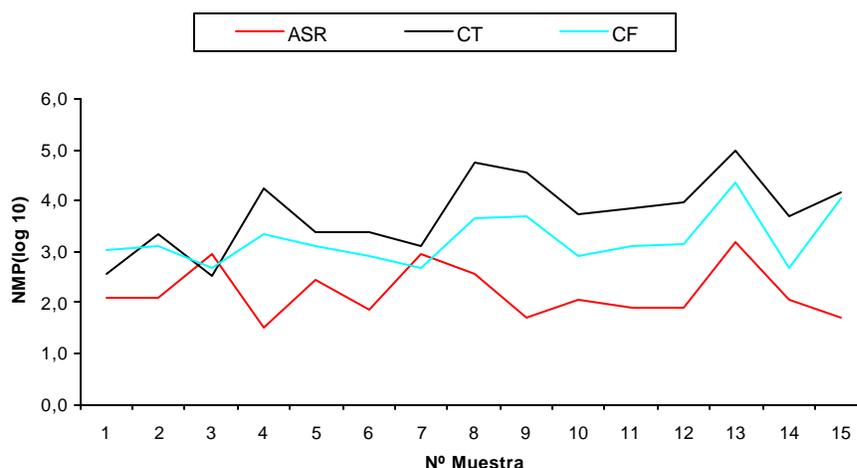


Gráfico N° 1: NMP(log₁₀) Anaerobios Sulfito-Reductores (ASR), Coliformes Totales (CT) y Coliformes Fecales (CF), obtenidos en las muestras de agua sin tratamiento.

En el gráfico expuesto, se puede observar claramente que en la mayoría de las muestras analizadas, el NMP de Coliformes tanto Totales como Fecales fue superior al NMP de Anaerobios Sulfito-Reductores.

5.3 EFECTO DEL CLORO SOBRE LOS INDICADORES BACTERIANOS.

A continuación en los gráficos N° 2 y N° 3, se visualiza la comparación del NMP (\log_{10}) de Anaerobios Sulfito-Reductores, Coliformes Totales y Coliformes Fecales en muestras de agua que fueron cloradas con 0,1 ppm y 1 ppm. Los datos graficados se presentan tabulados en los anexos 8.4 y 8.5 respectivamente.

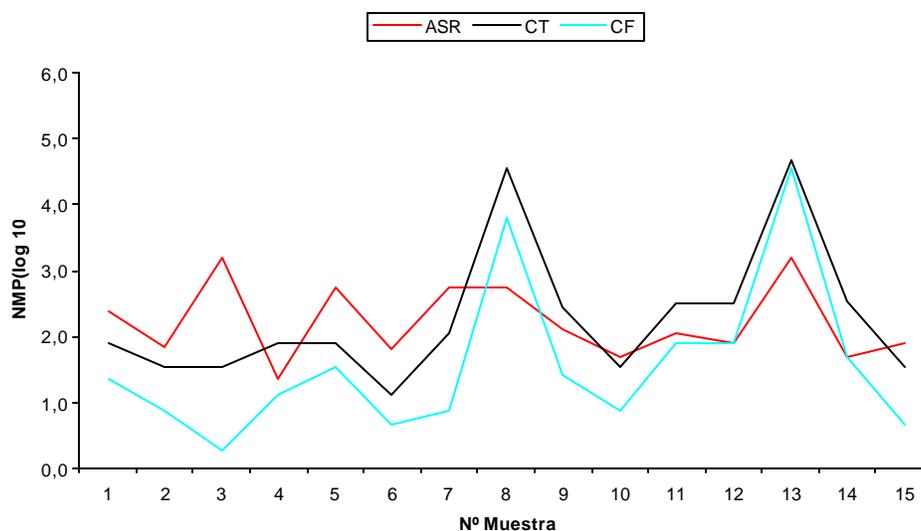


Gráfico N° 2: Efecto de la Cloración del agua con 0,1 ppm, sobre el NMP(\log_{10}) de Anaerobios Sulfito-Reductores (ASR), Coliformes Totales (CT) y Coliformes Fecales (CF).

En el gráfico N° 2, se visualiza claramente el efecto del desinfectante cloro sobre ambos indicadores Coliformes, sobre todo a nivel de Coliformes Fecales, demostrando su efecto higienizante al compararlos con los Anaerobios Sulfito-Reductores, quienes tienden a tener un NMP superior en varias ocasiones del muestreo, demostrando una cierta resistencia al nivel de cloración de 0,1 ppm, con excepción de las muestras N° 8 y N° 13.

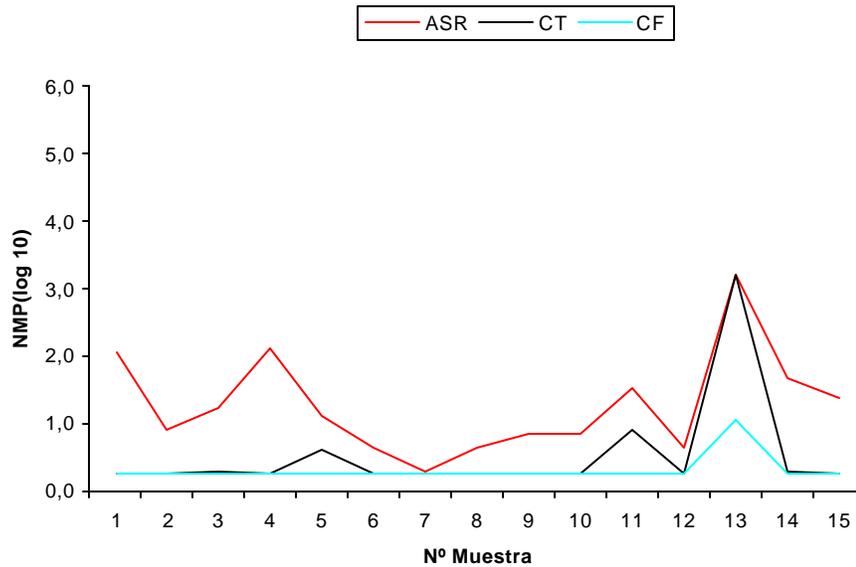


Gráfico N° 3: Efecto de la cloración del agua con 1ppm, sobre el NMP(log₁₀) de Anaerobios Sulfito-Reductores (ASR), Coliformes Totales (CT) y Coliformes Fecales (CF).

En el gráfico N° 3 se puede observar la drástica acción del cloro en concentraciones de 1ppm, provocando la disminución del NMP de Coliformes, llegando a niveles inferiores al mínimo detectable en varias oportunidades notándose, por lo tanto, la eficacia del tratamiento, sobre todo a nivel de Coliformes Fecales. En el caso de las bacterias Anaerobias Sulfito-Reductoras, se encuentran presentes con un NMP en un nivel detectable en todas las muestras cloradas con 1 ppm.

En el siguiente gráfico, se visualiza el efecto del cloro como desinfectante sobre Anaerobios Sulfito-Reductores, ya que son ellas las bacterias indicadoras en estudio. Se observa la comparación de muestras sin tratamiento y las cloradas con 0,1 y 1 ppm, tabulándose los datos en el anexo 8.6.

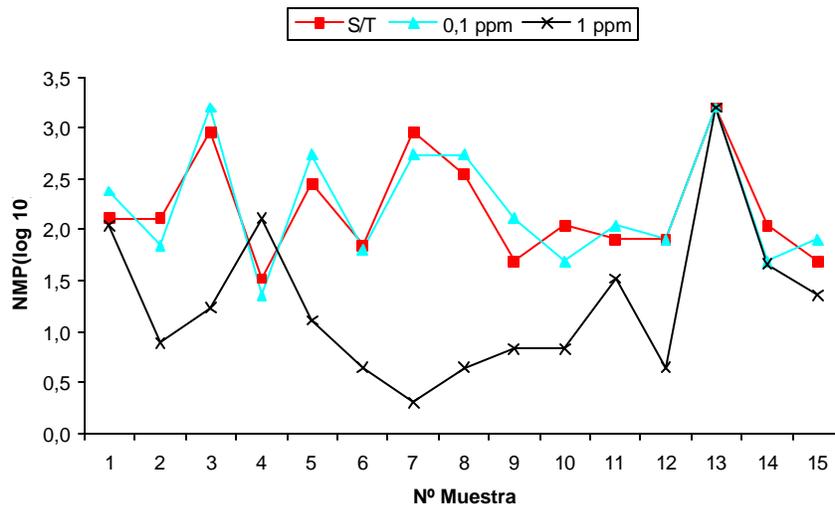


Gráfico N° 4: Efecto del tratamiento con cloro sobre bacterias Anaerobias Sulfito-Reductoras en muestras de agua sin tratamiento (S/T) y con 0,1 y 1 ppm de cloro.

En este gráfico, se aprecia claramente el efecto del cloro sobre los Anaerobios Sulfito-Reductores al compararlos con aquellas muestras sin tratamiento. Se observa la resistencia a concentraciones de 0,1 ppm, ya que se hace similar a aquellas muestras sin tratamiento. Se evidencia a simple vista, la sensibilidad a concentraciones de 1 ppm de cloro, si bien es cierto no los elimina totalmente, los disminuye en gran medida, siendo aún detectables.

6. DISCUSION

Para la detección de Anaerobios Sulfito-Reductores, Höll (1986) propuso una técnica para la comprobación de los tubos sembrados en caldo DRCM sospechosos de poseerlos. Esta técnica consiste en sembrar en agar nutritivo todos los tubos sospechosos para confirmar colonias halladas posterior a la incubación de las placas. De los datos obtenidos en el presente trabajo, se deduce que al aplicar la técnica de determinación del NMP de Anaerobios Sulfito-Reductores en agua, usando tubos con caldo DRCM con cubierta de vaselina líquida y el calentamiento en baño termorregulado a 75°C por 15 minutos de los tubos sembrados, previo a la incubación a 35°C por 48 horas, es innecesaria la comprobación de los tubos sospechosos ya que, arrojaron igual NMP que la confirmación en las placas con agar TSC incubadas en anaerobiosis, es decir, no se presentaron tubos falsos positivos.

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 (ISO, 1986). Con ello se denota la mayor rapidez de obtención de resultados, lo que es una ventaja al compararla con la técnica del NMP utilizada para Coliformes Totales y Fecales, la cual ocupa 96 horas para conseguir resultados concretos (APHA, 1981; Chile, 1998; OMS, 1998). Con respecto a lo anterior, la rapidez de la técnica se debe a que para la detección de las bacterias tipo Anaerobios Sulfito-Reductores, se requiere solo una prueba. En cambio para Coliformes Totales se debe realizar la prueba presuntiva seguida de la prueba confirmatoria (APHA, 1981; OMS, 1998).

Otro punto importante que demostró este estudio, es la facilidad de interpretación de los resultados para Anaerobios Sulfito-Reductores, debido a que esta técnica 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 la lectura de los Coliformes, son tubos positivos aquellos que presentan enturbiamiento del medio y gas (burbuja) en la campana de Durham (APHA, 1981; Chile, 1998; OMS, 1998). Al respecto, es importante recalcar, que cuando el enturbiamiento se encuentra en demasía, entorpece la lectura por enmascaramiento de la burbuja de gas que se forma por la fermentación de la lactosa. El tamaño de la burbuja de gas es otro factor de dificultad de lectura, debido a que causas ajenas a la fermentación pueden dejar burbujas de aire en la campana de Durham, que no siempre desaparecen totalmente en el proceso de esterilización de los tubos (APHA, 1981).

Por otra parte, de acuerdo a lo observado en el desarrollo de la investigación, se debe mencionar que la vaselina líquida agregada a los tubos con caldo DRCM para la detección de Anaerobios Sulfito-Reductores, entorpece la limpieza de los tubos utilizados ya que tiende a adherirse a ellos. Sin embargo, un acontecimiento similar ocurre para la limpieza de las campanas de Durham agregadas para la detección de Coliformes, dado que su pequeño tamaño dificulta la limpieza minuciosa que requieren, obstaculizando posteriormente la lectura de los tubos positivos.

De los datos obtenidos de Anaerobios Sulfito-Reductores y Coliformes en aquellas muestras sin tratamiento, se demuestra claramente, tanto en el gráfico N° 1 como en el anexo 8.3, que Coliformes como grupo son numéricamente superiores a las bacterias del tipo Anaerobios Sulfito-Reductores y además, las diferencias existentes entre las tres medias fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$). Ello se debe, a que Coliformes son un grupo más amplio compuesto por varios géneros (Thatcher y Clark, 1973; APHA, 1981; Jay, 1992; OMS, 1998) y a pesar de que ambos grupos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, principalmente en el suelo y en el intestino de animales y el hombre, los Coliformes están presentes en las heces en mayor número que Anaerobios Sulfito-Reductores (OMS, 1995). También es importante recalcar, que Coliformes 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). Además, se debe agregar su facilidad de crecimiento en medios de laboratorio facilitando su detección (Kreig y Holt, 1984).

Como se aprecia en este trabajo, los Anaerobios Sulfito-Reductores no se encuentran en cantidades tan altas como Coliformes, estando en cantidades suficientes para ser detectados mediante la siembra de sólo tres series en volúmenes de 10, 1 y 0,1 ml. Si bien, el método de cuantificación por tubos múltiples (NMP) está indicado para la detección de bajas cantidades de bacterias (APHA, 1981), también está contemplada la siembra de más de tres series con diluciones 1:10 (APHA, 1981; OMS, 1998). Es por ello, que los Coliformes al encontrarse en mayores cantidades en las muestras, necesitaron ser diluidos (hasta 10^{-5} ml) para cuantificarse con mayor exactitud. Al realizar mayor cantidad de diluciones se requiere material adicional, necesitándose recipientes, agua destilada y pipetas para realizar tal operación. Todo esto significa trabajo, tiempo y material extra para el personal y el laboratorio que deba desarrollar los exámenes. Además, si hay falta de pericia pueden desarrollarse confusiones de cálculo de resultado, al tener que considerar diluciones superiores a las indicadas en la tabla utilizada para la determinación del NMP.

Con respecto al efecto del cloro como desinfectante sobre los indicadores, se desprende de los resultados obtenidos, que las esporas de Anaerobios Sulfito-Reductores poseen resistencia a ambas concentraciones de cloro aplicadas, lo que se demuestra claramente en el gráfico N° 4. Si bien es cierto, a concentraciones de 1 ppm, los Anaerobios Sulfito-Reductores disminuyen substancialmente, no son eliminados en su totalidad. Lo mencionado se respalda con el análisis estadístico, del cual se concluye que no existe una diferencia significativa entre las medias obtenidas de las muestras sin tratamiento y aquellas cloradas con

0,1 ppm ($p \geq 0,05$) confirmando su resistencia a esas concentraciones de cloro. A diferencia de la comparación de las medias de aquellas muestras sin tratamiento y cloradas con 1 ppm, en donde existió diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$), obteniéndose diferencia también, en la comparación entre las medias de las muestras cloradas con 0,1 ppm y 1 ppm ($p \leq 0,05$), confirmando nuevamente lo mencionado, que concentraciones de 1 ppm de cloro tendrían cierta acción higienizante, provocando la disminución de Anaerobios Sulfito-Reductores.

También se evidenció, la sensibilidad de ambos indicadores Coliformes a las concentraciones de cloro aplicadas, afectando sobre manera a Coliformes Fecales que son los indicadores por excelencia de la contaminación fecal (APHA, 1981), lo cual se observa en los gráficos N° 2 y N° 3. Del análisis estadístico realizado para los tres indicadores, las muestras cloradas a concentraciones de 0,1 ppm concluyeron, que las tres medias obtenidas no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) lo que explicaría la similitud de los datos obtenidos y graficados para los tres indicadores, deduciéndose además, que esta falta de diferencia se debería a la disminución sufrida por Coliformes como respuesta al desinfectante y a la mantención de Anaerobios Sulfito-Reductores dada por su resistencia a esas concentraciones de cloro (gráfico N° 2). A concentraciones de 1 ppm de cloro, el análisis estadístico demuestra una diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre las medias de Anaerobios Sulfito-Reductores y de Coliformes tanto Totales como Fecales, observándose claramente la resistencia a estas concentraciones por parte de Anaerobios. En cambio esta diferencia no existe entre Coliformes ($p \geq 0,05$) dado principalmente por su sensibilidad al efecto desinfectante del cloro, encontrándose bajo el límite detectable por la técnica del NMP (gráfico N° 3).

La variabilidad de la concentración de indicadores bacterianos entre muestras, se explicaría, debido a la gran cantidad de materia orgánica que contienen las aguas naturales contaminadas. Esta materia orgánica varía de acuerdo a las precipitaciones, capacidad de autopurificación, contaminación proveniente de las industrias y a la gran contaminación fecal, que viene cargada con microorganismos (Bertoglio, 1990). A su vez, es sabido que el cloro se inactiva en presencia de materia orgánica (Chile, 1979; Chile 1980), la cual explicaría el comportamiento de la concentración de bacterias indicadoras en las tres muestras N° 8 y N° 13 de los gráficos N°2 y N° 3.

La potabilización del agua normalmente contempla varios procesos, dentro de los cuales la filtración debería retener microorganismos del tamaño de la mayoría de los protozoos y bacterias (Payment, 1991; Gray, 1996; OMS, 1998). Sin embargo, frente a la posibilidad de recontaminación del agua por deficiencias en el servicio (rupturas, obstrucciones y falta de capacidad) (Bertoglio, 1990), es que la desinfección final con cloro es fundamental, debido a que su acción residual le permite seguir actuando en las redes de distribución hasta llegar al consumidor (OMS, 1998). La concentración de cloro que debe existir en la red es de 0,2 ppm/Cl (Chile, 1979; Chile1980) y debería eliminar todo tipo de bacterias, incluso los indicadores de contaminación fecal, dada su sensibilidad al cloro (Gray, 1996; OMS, 1998). Pero no se debe olvidar, que estas concentraciones no afectarían en igual medida a protozoos y

virus, por lo tanto, existiría la probabilidad de que estos agentes patógenos sobrevivan a la desinfección con cloro (OMS; 1979; Jay, 1992; Atías, 1999; Glynn y Heinke, 1999), en concentraciones capaces de eliminar las bacterias utilizadas como indicadores de calidad sanitaria.

La posibilidad de contaminación también afecta a aguas de pozo (aguas subterráneas), aunque estas aguas por lo general son de buena calidad, siempre existe tal riesgo. La fuente de contaminación más grave la derivada de infiltraciones de desechos humanos procedentes de letrinas y fosas sépticas mal ubicadas, falta de protección de la entrada de pozos e inadecuado mantenimiento de ellos (OMS, 1998). Además de aplicaciones en el terreno de aguas residuales con un tratamiento mínimo, en zonas donde hay infiltración rápida de suelos (Geldreich, 1996). También se debe agregar como fuente de contaminación, los desechos industriales enterrados en el suelo, productos agroquímicos como plaguicidas y la ganadería concentrada (OMS, 1998). En lo que respecta a las aguas superficiales destinadas para uso doméstico o agrícola y para la recreación, las fuentes de contaminación son diversas. Cuentan entre ellas, los servicios de alcantarillado que colectan las fecas y residuos de hospitales, domicilios e industrias que van cargados de bacterias, virus y parásitos que contaminan directamente los cursos de aguas, además de basuras y aguas lluvias que llegan a ellos (Bertoglio, 1990).

Lo mencionado es importante, si se piensa que en algunas partes aún se usa el cloro como único proceso de purificación del agua de beber (Reiff, 1996), sobre todo en zonas rurales, donde esta agua se usa con fines domésticos (Geldreich, 1996; OMS, 1998). Por lo tanto, de acuerdo a este trabajo, los Coliformes no serían un indicador fidedigno de la presencia de contaminación biológica, ya que son sensibles a la concentración de cloro agregada para desinfectar agua, constituyendo por ende, un riesgo para la salud ya que podrían existir patógenos resistentes a la cloración en ausencia de ellos. Es por ello que Anaerobios Sulfito-Reductores serían un indicador confiable de este tipo de contaminación, dada su resistencia al cloro en concentraciones superiores a las indicadas para la desinfección del agua potable. Además, los Anaerobios Sulfito-Reductores son más resistentes que Coliformes en condiciones adversas del ambiente (Sneath y col., 1986).

La presencia de agentes patógenos en agua, no sólo involucra la salud humana por ingesta directa del agua contaminada sino que también, a través de alimentos como productos agrícolas destinados al consumo humano, contaminados por aguas sin saneamiento o solamente desinfectadas, sobre todo en aquellos alimentos que se consumen crudos, transmitiendo enfermedades parasitarias y virales (OMS, 1979; OMS, 1989; Geldreich, 1996; Traverso, 1996; Atías, 1999). Lo mencionado es importante dado que, estos agentes patógenos son capaces de resistir a condiciones adversas como la desinfección, permaneciendo en estos alimentos el tiempo suficiente para llegar a algún huésped (OMS, 1989; Atías, 1999).

Respecto del agua utilizada para recreación (buceo, natación, esquí acuático), también se corre riesgo potencial de contagio de parásitos y virus por consumo accidental o el simple contacto de las mucosas expuestas a ella (OMS, 1979; Traverso, 1996). Este problema afecta principalmente a los centros de recreación masivos mantenidos inadecuadamente, es decir, en

donde no existe una desinfección residual o un control periódico de la desinfección, sobre todo en períodos de alta concurrencia, permitiendo la acumulación y sobrevivencia de los patógenos resistentes a la cloración (APHA, 1981). Además se debe agregar, la falta de educación sanitaria y las deficientes costumbres higiénicas en la población, principalmente la población infantil, que hacen posible la alta probabilidad de contagiarse tales enfermedades (Atías, 1999; Mims y col., 1999). Es por ello que Anaerobios Sulfito-Reductores serían un buen indicador de la presencia de organismos resistentes a la cloración como lo son virus y protozoos, sobreviviendo mucho más tiempo que Coliformes (OMS, 1995).

Conclusiones:

Los Anaerobios Sulfito-Reductores se encuentran en aguas contaminadas en concentraciones suficientes para ser detectados como indicadores de calidad sanitaria.

La determinación del NMP de Anaerobios Sulfito-Reductores como indicador de contaminación de agua resulta un método confiable y amigable debido a su facilidad de lectura e interpretación, rápida obtención de resultados y menor cantidad de material utilizado.

Los Anaerobios Sulfito-Reductores son más resistentes que Coliformes a las concentraciones de cloro habitualmente aplicadas al agua, por lo que pueden considerarse mejores indicadores de riesgo de presencia de agentes patógenos resistentes a la cloración del agua.

7. BIBLIOGRAFIA

- APHA, AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 1981. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 15^a 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, 3:499-500.
- 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.
- CHAO, L. 1993. Estadística para las Ciencias Administrativas. 3^a ed., Mc Graw-Hill, Santa Fé-Bogota-Buenos Aires-Caracas-Lisboa-New York.
- 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. 1980. Programa de Vigilancia Epidemiológica y Control de la Calidad del Agua Potable. Servicio Nacional de Salud, Santiago .Chile.
- CHILE, MINISTERIO DE EDUCACION. 1983. Apuntes, Educación Básica. Volumen 8, Publicaciones Lo Castillo, Santiago. Chile.
- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION. 1984. Norma Chilena Oficial 409. of. 70: Agua Potable, Requisitos. Santiago. Chile.
- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION. 1987. Norma Chilena Oficial 1333. of. 78 mod. 1987: Requisitos de Calidad del Agua para Diferentes Usos. Santiago. Chile.
- 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, 2:152-161.
- 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. 2ª ed., Prentice Hall Hispanoamericana S.A. México.

GRAY, N. 1996. Calidad del Agua Potable, Problemas y Soluciones. Acribia S.A., Zaragoza. España.

HÖLL, K. 1986. Wasser. 7ª ed., Walter de Gruyter, New York-Berlín.

HOPKINS, K., B.R.HOPKINS, G. GLASS. 1997. Estadística para las Ciencias Sociales y del Comportamiento. 3º ed., Prentice-Hall Hispanoamericana S.A., México- New York.

ICMSF, INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. 1980. Ecología Microbiana: Factores que afectan a la Supervivencia de los Microorganismos en los Alimentos. Acribia S.A., Zaragoza. España.

ICMSF, INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. 1981. Microorganismos de los Alimentos 2, Métodos de Muestreo para Análisis Microbiológicos: Principios y Aplicaciones Específicas. Acribia 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. 3ª ed., Acribia S.A., Zaragoza. España.

JAWETZ, E., E. MELNICK, J. ADELBERG. 1992. Microbiología Moderna. 15ª ed., El Manual Moderno S.A., México D.F. México.

KREIG, N., J. HOLT. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volumen 1, Williams-Wilkins, Baltimore. USA.

MAC FADDIN, J. 1980. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de las Bacterias de Importancia Clínica. Panamericana, Buenos Aires. Argentina.

MARRERO, L. 1981. La Tierra y Sus Recursos. Cultural Venezolana S.A., Caracas. Venezuela.

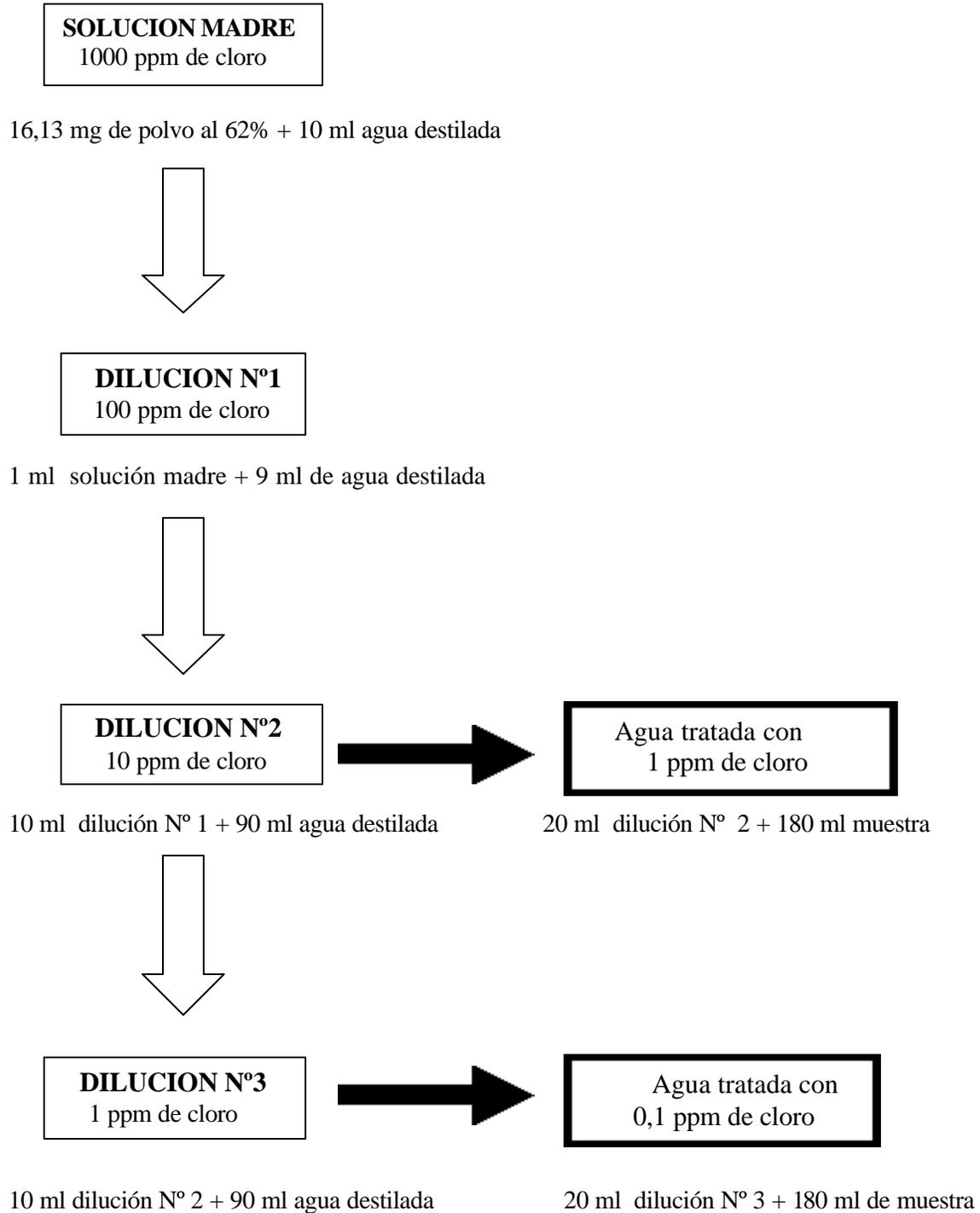
MERCK S:A. 2000. Microbiology Manual. Deutscher Akreditierungs Rat, Berlin. Alemania.

MIMS, C., J. PLAYFAIR, I. ROITT, D. WAKELIN, W. WILLIAMS. 1999. Microbiología Moderna. 2ª 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. 1989. Directrices Sanitarias sobre el Uso de Aguas Residuales en Agricultura y Acuicultura. Ginebra (Informe Técnico 778).
- 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, 2:154-157.
- RHEINHEIMER, G. 1987. Microbiología de las Aguas. 4ª ed., Acribia S.A., Zaragoza. España.
- REIFF, F. 1996. El Estado de la Desinfección del Agua Potable en América Latina y El Caribe. 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.
- SNEATH, P., N. MAIR, M. E. SHARPE, J. HOLT. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volumen 2, Williams-Wilkins, Baltimore. USA.
- TAUCHER, E. 1997. Bioestadística. Universitaria, Santiago. Chile.
- THATCHER, F., D. CLARK. 1973. Análisis Microbiológico de los Alimentos. Acribia S.A., Zaragoza. España.
- TRAVERSO, H. 1996. Agua y Salud en América Latina y El Caribe: Enfermedades Infecciosas transmitidas 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.

8. ANEXOS

Anexo 8.1. Esquema de desinfección del agua con 0,1 y 1 ppm de cloro.



Anexo 8.2. Clave y NMP de Anaerobios Sulfito-Reductores, en caldo DRCM y agar TSC, expresados en 100 ml de muestra de agua sin tratamiento y tratada con 0,1 ppm y 1 ppm de cloro.

	Nº Muestra	Clave Tubo	Clave Placa	NMP/100ml
S/Tratam.	1	540	540	130
	2	540	540	130
	3	553	553	920
	4	510	510	33
	5	543	543	280
	6	521	521	70
	7	553	553	920
	8	551	551	350
	9	520	520	49
	10	531	531	110
	11	530	530	79
	12	530	530	79
	13	555	555	> 1.600
	14	531	531	110
	15	520	520	49
0,1 ppm	1	550	550	240
	2	521	521	70
	3	555	555	> 1.600
	4	500	500	23
	5	552	552	540
	6	512	512	64
	7	552	552	540
	8	552	552	540
	9	540	540	130
	10	520	520	49
	11	531	531	110
	12	530	530	79
	13	555	555	> 1.600
	14	520	520	49
	15	530	530	79

Continuación anexo 8.2.

	N° Muestra	Clave Tubo	Clave Placa	NMP/100ml
1 ppm	1	531	531	110
	2	300	300	7,8
	3	410	410	17
	4	540	540	130
	5	400	400	13
	6	200	200	4,5
	7	100	100	2,0
	8	200	200	4,5
	9	210	210	6,8
	10	201	201	6,8
	11	510	510	33
	12	200	200	4,5
	13	555	555	> 1.600
	14	511	511	46
	15	500	500	23

Anexo 8.3. Clave y NMP expresado en valores absolutos y en log₁₀ para Anaerobios Sulfito-Reductores, Coliformes Totales y Coliformes Fecales en 100 ml de muestras de agua sin tratamiento.

N° de Muestra	Anaerobios Sulfito-Reductores			Coliformes Totales			Coliformes Fecales		
	Clave	NMP		Clave	NMP		Clave	NMP	
		Absoluto	log 10		Absoluto	log 10		Absoluto	log 10
1°	540	130	2,11	544	350	2,54	531(10)*	1.100	3,04
2°	540	130	2,11	542(10)*	2.200	3,34	540(10)*	1.300	3,11
3°	553	920	2,96	510(10)*	330	2,52	520(10)*	490	2,69
4°	510	33	1,52	541(100)*	17.000	4,23	542(10)*	2.200	3,34
5°	543	280	2,45	500(100)*	2.300	3,36	540(10)*	1.300	3,11
6°	521	70	1,85	500(100)*	2.300	3,36	530(10)*	790	2,90
7°	553	920	2,96	540(10)*	1.300	3,11	520(10)*	490	2,69
8°	551	350	2,54	552(100)*	54.000	4,73	511(100)*	4.600	3,66
9°	520	49	1,69	551(100)*	35.000	4,54	520(100)*	4.900	3,69
10°	531	110	2,04	552(10)*	5.400	3,73	530(10)*	790	2,90
11°	530	79	1,90	521(100)*	7.000	3,85	540(10)*	1.300	3,11
12°	530	79	1,90	553(10)*	9.200	3,96	532(10)*	1.400	3,15
13°	555	> 1.600	3,20	553(100)*	92.000	4,96	542(100)*	22.000	4,34
14°	531	110	2,04	520(100)*	4.900	3,69	511(10)*	460	2,66
15°	520	49	1,69	532(100)*	14.000	4,15	531(100)*	11.000	4,04
Promedio		327,27	2,20		16485,33	3,74		3.608	3,23

(*): factor de dilución.

Anexo 8.4. Clave y NMP expresado en valores absolutos y en log₁₀ para Anaerobios Sulfito-Reductores, Coliformes Totales y Coliformes Fecales en 100 ml de muestras de agua tratada con 0,1 ppm de cloro.

N° de Muestra	Anaerobios Sulfito-Reductores			Coliformes Totales			Coliformes Fecales		
	Clave	NMP		Clave	NMP		Clave	NMP	
		Absoluto	log 10		Absoluto	log 10		Absoluto	log 10
1°	550	240	2,38	530	79	1,90	500	23	1,36
2°	521	70	1,85	510	33	1,52	300	7,8	0,89
3°	555	>1.600	3,20	510	33	1,52	0	< 1,8	0,26
4°	500	23	1,36	530	79	1,90	400	13	1,11
5°	552	540	2,73	530	79	1,90	510	33	1,52
6°	512	64	1,81	400	13	1,11	200	4,5	0,65
7°	552	540	2,73	531	110	2,04	300	7,8	0,89
8°	552	540	2,73	544(100)*	35.000	4,54	512(100)*	6.400	3,81
9°	540	130	2,11	543	280	2,45	412	26	1,41
10°	520	49	1,69	510	33	1,52	300	7,8	0,89
11°	531	110	2,04	501(10)*	310	2,49	530	79	1,90
12°	530	79	1,90	501(10)*	310	2,49	530	79	1,90
13°	555	> 1.600	3,20	545(100)*	43.000	4,63	551(100)*	35.000	4,54
14°	520	49	1,69	551	350	2,54	520	49	1,69
15°	530	79	1,90	510	33	1,52	200	4,5	0,65
Promedio		380,87	2,22		5316,13	2,27		2782,41	1,56

(*): Factor de dilución.

Anexo 8.5. Clave y NMP expresado en valores absolutos y en \log_{10} para Anaerobios Sulfito-Reductores, Coliformes Totales y Coliformes Fecales en 100 ml de muestras tratadas con 1 ppm de cloro.

N° de Muestra	Anaerobios Sulfito-Reductores			Coliformes Totales			Coliformes Fecales		
	Clave	NMP		Clave	NMP		Clave	NMP	
		Absoluto	log 10		Absoluto	log 10		Absoluto	log 10
1°	531	110	2,04	0	< 1,8	0,26	0	< 1,8	0,26
2°	300	7,8	0,89	0	< 1,8	0,26	0	< 1,8	0,26
3°	410	17	1,23	100	2,0	0,30	0	< 1,8	0,26
4°	540	130	2,11	0	< 1,8	0,26	0	< 1,8	0,26
5°	400	13	1,11	110	4,0	0,60	0	1,8	0,26
6°	200	4,5	0,65	0	< 1,8	0,26	0	< 1,8	0,26
7°	100	2,0	0,30	0	< 1,8	0,26	0	< 1,8	0,26
8°	200	4,5	0,65	0	< 1,8	0,26	0	< 1,8	0,26
9°	210	6,8	0,83	0	< 1,8	0,26	0	< 1,8	0,26
10°	201	6,8	0,83	0	< 1,8	0,26	0	< 1,8	0,26
11°	510	33	1,52	300	7,8	0,89	0	< 1,8	0,26
12°	200	4,5	0,65	0	< 1,8	0,26	0	< 1,8	0,26
13°	555	> 1.600	3,20	554	1.600	3,20	310	11	1,04
14°	511	46	1,66	100	2,0	0,30	0	< 1,8	0,26
15°	500	23	1,36	0	< 1,8	0,26	0	< 1,8	0,26
Promedio		133,93	1,27		108,92	0,53		2,41	0,31

Anexo 8.6. Clave y NMP expresado en valores absolutos y en \log_{10} , para Anaerobios Sulfito-Reductores de acuerdo al tratamiento aplicado en 100 ml de muestras de agua.

Número de muestra	sin tratam			0,1 ppm			1 ppm		
	Clave	NMP		clave	NMP		Clave	NMP	
		Absoluto	log 10		Absoluto	log 10		Absoluto	log 10
1°	540	130	2,11	550	240	2,38	531	110	2,04
2°	540	130	2,11	521	70	1,85	300	7,8	0,89
3°	553	920	2,96	555	> 1.600	3,20	410	17	1,23
4°	510	33	1,52	500	23	1,36	540	130	2,11
5°	543	280	2,45	552	540	2,73	400	13	1,11
6°	521	70	1,85	512	64	1,81	200	4,5	0,65
7°	553	920	2,96	552	540	2,73	100	2,0	0,30
8°	551	350	2,54	552	540	2,73	200	4,5	0,65
9°	520	49	1,69	540	130	2,11	210	6,8	0,83
10°	531	110	2,04	520	49	1,69	201	6,8	0,83
11°	530	79	1,90	531	110	2,04	510	33	1,52
12°	530	79	1,90	530	79	1,90	200	4,5	0,65
13°	555	> 1.600	3,20	555	> 1.600	3,20	555	> 1.600	3,20
14°	531	110	2,04	520	49	1,69	511	46	1,66
15°	520	49	1,69	530	79	1,90	500	23	1,36
promedio		327,27	2,20		380,87	2,22		133,93	1,27

9. AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque me enseñó a tener paciencia, cada cosa a su tiempo, aunque a veces la espera parecía tediosa y frustrante, sus frutos fueron dulces.

A mi familia, por la fortuna de tenerlos unidos y conmigo, por enseñarme a luchar y a no perder nunca de vista mis objetivos, por apoyarme siempre y entregarme la herencia más valiosa que puedo recibir: los estudios y la persona que hoy soy.

A mis amigos, porque se tomaron el tiempo de conocerme, quererme y aceptarme, por estar siempre cuando los necesité.

A Dra. Erika Gesche, por el apoyo y disposición que siempre me manifestó.

A la Srta. Mónica Sáez por el apoyo, preocupación, paciencia y disposición que siempre me manifestó.

Al personal del Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria, por la buena disposición, compañía y apoyo prestado.