

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y PRUEBAS DE  
CLORO RESISTENCIA *in vitro* A CEPAS NATIVAS DE COLIFORMES  
TOTALES Y *E. coli* OBTENIDAS EN LA RED DE DISTRIBUCIÓN DEL  
ACUEDUCTO DE BOGOTÁ**

**CLAUDIA ROCIO COTE COY**

**TRABAJO DE GRADO**  
Presentado como requisito parcial para optar al título de

**Microbióloga Industrial**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL  
Bogotá, D.C.  
Marzo del 2006**

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y PRUEBAS DE  
CLORO RESISTENCIA *in vitro* A CEPAS NATIVAS DE COLIFORMES  
TOTALES Y *E. coli* OBTENIDAS EN LA RED DE DISTRIBUCIÓN DEL  
ACUEDUCTO DE BOGOTÁ**

**CLAUDIA ROCIO COTE COY**

**APROBADO**

\_\_\_\_\_  
**Adriana Castillo, Bacterióloga**  
**Director**

\_\_\_\_\_  
**Asesor**

\_\_\_\_\_  
**Carlos Rincón, Ing. Químico**  
**Jurado**

\_\_\_\_\_  
**Yenia M Salazar, Bacterióloga**  
**Jurado**

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y PRUEBAS DE  
CLORO RESISTENCIA *in vitro* A CEPAS NATIVAS DE COLIFORMES  
TOTALES Y *E. coli* OBTENIDAS EN LA RED DE DISTRIBUCIÓN DEL  
ACUEDUCTO DE BOGOTÁ**

**CLAUDIA ROCIO COTE COY**

**APROBADO**

---

**Angela Umana Muñoz M. Phil**  
Decano Académico

---

**David Gómez**  
Director de carrera

*A mi familia, que siempre ha estado ahí*

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

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

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de julio de 1946.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer muy amablemente a la Dra. Adriana Castillo, Bacterióloga del Acueducto de Bogotá quien cumple una labor excepcional en el Laboratorio de Aguas y quien me prestó ayuda incondicional para la realización de este proyecto.

Igualmente, gracias a todas las personas que colaboraron para la realización del mismo, como lo fueron Maria Teresa Rivera y Jairo Ramírez, quienes en calidad de Auxiliares del laboratorio me prestaron gran ayuda con el alistamiento del material de vidrio y demás elementos. Igualmente, mil gracias a los Analistas químicos: Fredy Gómez, Nancy Aldana y Fanny Villamarín quienes me colaboraron con las mediciones químicas del cloro y siempre estuvieron dispuestos a resolver mis inquietudes.

Agradecimientos al Ingeniero Ceferino Rodriguez, Director de Servicios Técnicos por permitir la realización de este proyecto y finalmente gracias al personal de la Planta Francisco Wiesner por su ayuda invaluable en la explicación del proceso y por permitirme hacer uso del laboratorio de la planta para la realización de algunos ensayos.

En conclusión, gracias al Acueducto de Bogota por permitirme el aprendizaje y realización de este proyecto.

Bogotá, Abril del 2006

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Introducción</b>	xiv
<b>1. Antecedentes Bibliográficos</b>	
Generalidades.....	xvii
Definición de coliformes.....	xix
Técnicas de detección.....	xx
Prevalencia de microorganismos contaminantes.....	xxii
Eficiencia de la desinfección.....	xxiii
1.5.1 El cloro.....	xxiv
Problemas en la desinfección.....	xxvi
1.6.1 Microorganismos cloro resistentes.....	xxvi
Legislación del agua potable en Colombia.....	xxvii
<b>2. Materiales y Métodos</b>	
2.1 Recolección y Recepción de muestras.....	xxix
2.2 Análisis Microbiológico (FM).....	xxx
2.3 Identificación bioquímica.....	xxxii
2.4 Conservación: Creación del banco de cepas.....	xxxiii
2.5 Pruebas de cloro resistencia.....	xxxiii
<b>3. Resultados</b>	
3.1 Identificación Bioquímica.....	xxxv
3.2 Pruebas de Viabilidad.....	xxxvii
3.3 Pruebas de Cloro Resistencia.....	xliv
<b>4. Discusión de Resultados</b> .....	lxxi
<b>5. Conclusiones</b> .....	lxxxiii
<b>6. Recomendaciones</b> .....	lxxxv
<b>7. Referencias</b> .....	lxxxvi

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Disminución del porcentaje de viabilidad de <i>Yersinia enterocolitica</i> Group (cepa No. 2191) mediante el método de conservación con glicerol 50% v/v	xxxix
Figura 1A	Disminución del porcentaje de viabilidad de <i>Klebsiella oxytoca</i> (cepa No.2579) mediante el método de conservación con glicerol 50% v/v	xxxix
Figura 2	Disminución del porcentaje de viabilidad de <i>Aeromonas Hydrophila</i> (cepa No. 2873) mediante el método de conservación con glicerol 50% v/v	xi
Figura 2A	Disminución del porcentaje de viabilidad de <i>Enterobacter cloacae</i> (cepa No. 2936) mediante el método de conservación con glicerol 50% v/v	xi
Figura 3	Disminución del porcentaje de viabilidad de <i>Enterobacter cloacae</i> (cepa No. 3492) mediante el método de conservación con glicerol 50% v/v	xli
Figura 3A	Disminución del porcentaje de viabilidad de <i>Sphingobacterium multivorum</i> (cepa No. 3862B) mediante el método de conservación con glicerol 50% v/v	xlii
Figura 4	Disminución del porcentaje de viabilidad de <i>Cryseobacterium meningosepticum</i> (cepa No. 4618) mediante el método de conservación con glicerol 50% v/v	xlii



Figura 4A Disminución del porcentaje de viabilidad de <i>Acinetobacter Baumannii</i> (cepa No. 4803 A) mediante el método de conservación con glicerol 50% v/v	xlii
Figura 5 Disminución del porcentaje de viabilidad de <i>Escherichia coli</i> (cepa 4803 B) mediante el método de conservación con glicerol 50% v/v	xliii
Figura 5A Disminución del porcentaje de viabilidad de <i>Escherichia coli</i> (cepa No. 8457) mediante el método de conservación con glicerol 50% v/v	xliii
Figura 6 Acción del cloro libre sobre la concentración celular de <i>E. coli</i> con 10 minutos de contacto	xliv
Figura 7 % colonias de <i>E.coli</i> resistentes al desinfectante (%R) en todas las concentraciones de cloro libre con 10 minutos de contacto	xlvi
Figura 8 Acción del cloro libre sobre la concentración celular de <i>Yersinia enterocolitica</i> Group con 10 minutos de contacto	xlviii
Figura 9 % Colonias de <i>Yersinia enterocolitica</i> Group resistentes al desinfectante (%R) en todas las concentraciones de cloro libre con 10 minutos de contacto	xliv
Figura 10 Acción del cloro libre sobre la concentración celular de <i>Klebsiella oxytoca</i> con 10 minutos de contacto	I
Figura 11 % Colonias de <i>Klebsiella oxytoca</i> resistentes al desinfectante (%R) en todas las concentraciones de cloro libre con 10 minutos de contacto	li
Figura 12 Acción del cloro libre sobre la concentración celular de <i>Acinetobacter baumannii</i> con 10 minutos de contacto	lii

Figura 13 % Colonias de <i>Acinetobacter baumannii</i> resistentes al desinfectante (%R) en todas las concentraciones de cloro libre con 10 minutos de contacto	liii
Figura 14 Acción del cloro libre sobre la concentración celular de <i>E. coli</i> con 10 minutos de contacto	liv
Figura 15 % Colonias de <i>E. coli</i> resistentes al desinfectante (%R) en todas las concentraciones de cloro libre con 10 minutos de contacto	lv
Figura 16 Acción del cloro libre sobre la concentración celular de <i>Aeromonas hydrophila</i> con 10 minutos de contacto	lvi
Figura 17 % Colonias de <i>Aeromonas hydrophila</i> resistentes al desinfectante (%R) en todas las concentraciones de cloro libre con 10 minutos de contacto	lvii
Figura 18 Acción del cloro libre sobre la concentración celular de <i>Sphingobacterium multivorum</i> con 10 minutos de contacto	lviii
Figura 19 % Colonias de <i>Sphingobacterium multivorum</i> resistentes al desinfectante (%R) en todas las concentraciones de cloro con 10 minutos de contacto	lix
Figura 20 Acción del cloro libre sobre la concentración celular de <i>E. coli</i> con 15 minutos de contacto	lx
Figura 21 % Colonias de <i>E. coli</i> resistentes al desinfectante (%R) en todas las concentraciones de cloro con 15 minutos de contacto	lxi
Figura 22 Acción del cloro libre sobre la concentración celular de <i>Yersinia enterocolitica</i> Group con 15 minutos de contacto	lxii

Figura 23	% Colonias de <i>Yersinia enterocolitica</i> Group resistentes al desinfectante (%R) en todas las concentraciones de cloro 15 minutos de contacto	Ixiii
Figura 24	Acción del cloro libre sobre la concentración celular de <i>Klebsiella oxytoca</i> con 15 minutos de contacto	Ixiv
Figura 25	% Colonias de <i>Klebsiella oxytoca</i> resistentes al desinfectante (%R) en todas las concentraciones de cloro con 15 minutos de contacto	Ixv
Figura 26	Acción del cloro libre sobre la concentración celular de <i>E. coli</i> con 15 minutos de contacto	Ixvi
Figura 27	% Colonias de <i>E. coli</i> resistentes al desinfectante (%R) en todas las concentraciones de cloro libre con 15 minutos de contacto	Ixvii

## RESUMEN

A pesar de los múltiples tratamientos a los que es sometida el agua para su potabilización, entre los que se encuentran la desinfección con cloro, se ha detectado presencia de Coliformes en el agua proveniente de la red de distribución de agua potable del Acueducto de Bogotá.

Con este trabajo, se pretendió aislar e identificar las cepas nativas de coliformes totales y *E. coli* en el análisis de agua potable de la red de distribución del Acueducto de Bogotá durante los días de muestreo programados por el laboratorio de aguas, durante los meses de Febrero a Mayo del 2004 y realizarles pruebas de cloro-resistencia, con el fin de determinar si los coliformes totales y *E. coli* aislados son Cloro – Resistentes bajo las variables manejadas, es decir, que pueden soportar concentraciones de Cloro Libre entre 0.2 y 1.0 mg/L, que son las concentraciones mínimas y máximas permitidas por el Decreto 475 de 1998 para agua potable. Todo esto con el fin de poder abrir diferentes alternativas de desinfección, descartar contaminación en la toma de muestras, verificar la incidencia de la biopelícula de las tuberías de la red de distribución en la calidad del agua potable.

Se aislaron e identificaron 5 cepas nativas de coliformes totales y *E. coli* y 7 cepas nativas de Enterobacterias durante el análisis del agua de la red de distribución del Acueducto de Bogotá. El 60% de estas bacterias resistieron la acción oxidativa del cloro en todas las concentraciones probadas con 10 minutos de contacto; bajo condiciones controladas en el laboratorio. Asimismo, de las bacterias que fueron resistentes a las pruebas de 10 minutos de contacto, el 66% de éstas presentaron resistencia a todas las concentraciones probadas, con 15 minutos de contacto; bajo condiciones controladas en el laboratorio.

## ABSTRACT

Despite the multiple treatments which the water is treated with, whether physics or chemists -one of which is water disinfection by chlorine-; it has been detected presence of coliforms in the net of distribution of drinkable water in the Acueducto de Bogotá.

In this thesis, we have tried –by performing tests of chlorine resistance- to identify and isolate the natives strains of total coliforms and *E. coli* in the analysis of drinkable water in the distribution system of the Acueducto de Bogotá. It have been based on the Acueducto's taking samples itinerary, within February and May of 2004; in order to find out whether or not Total Coliforms and some *E. coli* isolated there, are chlorine resistant. This means that they could resist free chlorine concentrations within 0.2 mg/L and 1.0 mg/L; which are the minimum and maximum concentrations allowed by the 475 governmental act of 1998 for the drinkable water.

All this with the aim of let the way open to different disinfections alternatives, to rule out contamination caused during the collection of the samples and to verify the incidence of the biofilm located on the distribution system pipes, on the quality of Bogotá's drinkable water.

It has been isolated 5 total coliforms native strains and *E. coli* and 7 Enterobacteria's strains during the water analysis of the distribution system of the Acueducto de Bogotá. The 60% of these bacteria have showed resistance to the chlorine's oxidative strength with all the chlorine concentrations tested within the 10 minutes of the contact time. Likewise, the 66% of the remaining resistant strains have showed resistance with 15 minutes of contact time.

## INTRODUCCIÓN

El agua, es una de las principales fuentes de vida de nuestra tierra y al mismo tiempo puede tratarse de una fuente de enfermedades y epidemias si se llegara a realizar su consumo en mal estado de potabilización, ya que este primordial recurso natural puede ser un caldo de cultivo para la multiplicación de organismos patógenos causantes de epidemias a nivel mundial.

Entre los organismos patógenos indicadores de contaminación del agua potable, se encuentran los coliformes. Los coliformes son una familia de bacterias, entre los que se encuentran los géneros *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Citrobacter sp.*, y *Escherichia sp.*, que se encuentran comúnmente en las plantas, el suelo y los animales, incluyendo a los humanos. Generalmente, las bacterias coliformes se encuentran en mayor abundancia en la capa superficial del agua o en los sedimentos del fondo. La presencia de coliformes totales en el suministro de agua es un indicio de la ineficacia en el tratamiento (OMS, 1995 y Urbaneja, 2004).

Los coliformes fecales, que se encuentran en los intestinos de los humanos y otros animales de sangre caliente, son un tipo de bacterias coliformes. La presencia de coliformes fecales en un suministro de agua es un buen indicador de que las aguas residuales han contaminado el agua. (Urbaneja, 2004)

La contaminación fecal del agua potable puede incorporar una variedad de diversos organismos patógenos intestinales bacterianos, virales y parasitarios cuya presencia está relacionada con enfermedades y portadores de tipo microbiano que puedan existir en ese momento en la comunidad. Las bacterias patógenas intestinales se hallan diseminadas a lo largo y ancho del planeta. Aquéllas cuya presencia ha sido detectada en agua potable contaminada incluyen: *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* enterotoxígena, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* y

*Campylobacter fetus*. Estos organismos pueden ser causantes de enfermedades cuyo índice de gravedad va desde una ligera gastroenteritis hasta casos graves y a veces fatales de disentería, cólera o tifoidea. (Organización Panamericana de la salud,1987).

Otros organismos, cuya presencia en el ambiente es natural y a los que no se considera patógenos, también pueden producir, en ocasiones, enfermedades de tipo "oportunistas". La presencia de esos organismos en el agua potable puede causar infecciones, sobre todo en aquellas personas cuyos mecanismos de defensa naturales, locales o generales, se hallan disminuidos. Esto es más probable que suceda en casos de gente de edad muy avanzada, de muy corta edad, y de pacientes hospitalizados, por ejemplo, por quemaduras, o sometidos a terapia inmunosupresiva. El agua potable que usan los pacientes para beber y bañarse, si contiene gran cantidad de organismos como *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Klebsiella* y *Serratia*, puede producir una serie de infecciones que afectan a la piel y las membranas mucosas de los ojos, oídos, nariz y garganta. (Organización Panamericana de la salud, 1987).

Asimismo, los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Escherichia* suelen representar la mayor parte de microorganismos aislados en aguas naturales y suministros de aguas municipales tratadas, siendo *Enterobacter cloacae* el que se aísla con mayor frecuencia, si bien no todos los coliformes tienen necesariamente su origen en las aguas de alcantarilla; *E. coli* es el coliforme más afectado por los tratamientos habituales de agua (APHA-AWWA-WPCF,2000).

Es por esto, que las aguas destinadas al consumo humano deben ser tratadas, para lograr su potabilización y de esta forma eliminar la mayor cantidad posible de organismos contaminantes que puedan llegar a afectar la salud de los consumidores.

De esta manera, la potabilización del agua evita un 20% de mortalidad infantil en los países subdesarrollados y reduce la mayoría de los contagios en las epidemias clásicas. (Germán y Marcén, 1998). En el proceso de potabilización intervienen una serie de procesos tanto físicos como químicos, y en algunos casos microbiológicos, cuyo fin es proporcionar al consumidor las características organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas deseadas y exigidas por la ley.

Asimismo, para lograr las especificaciones microbiológicas exigidas en la legislación, la mayoría de las entidades encargadas de la salubridad del agua, tanto a nivel mundial como en nuestro país, en este caso en su capital, Bogotá con la Empresa de Acueducto y alcantarillado de Bogotá, se aplica el proceso de desinfección por medio del uso del cloro y sus derivados. La desinfección en las plantas de tratamiento del Acueducto de Bogotá se realiza por medio del uso del cloro en su forma gaseosa.

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

Sin embargo, a pesar del tratamiento de cloración aplicado al agua en las plantas de tratamiento con el fin de eliminar al máximo los microorganismos patógenos presentes en el agua destinada para consumo humano, el Laboratorio de Aguas del Acueducto, entidad encargada de la evaluación de la calidad del agua de la red de distribución, ha encontrado cepas de coliformes en presencia de cloro; estas muestras son inferiores al 5% de aceptación que permite el Decreto 475 de 1998.



Lo que se pretende con este proyecto es determinar in vitro si los Coliformes Totales y algunos *E. coli* aislados en el laboratorio, son Cloro – Resistentes bajo condiciones controladas, es decir, que pueden soportar concentraciones de Cloro Libre entre 0.2 y 1.0 mg/L, que son las concentraciones mínimas y máximas permitidas por el decreto 475 de 1998 para la red de distribución; con el fin de poder abrir diferentes alternativas de desinfección, descartar contaminación en la toma de muestras, relacionar las cepas aisladas con otros microorganismos aislados de la biopelícula encontrada en estudio anteriores en la red de distribución del Acueducto de Bogotá.

El proyecto aplica para las muestras positivas con Coliformes totales y *E. coli* reportadas diariamente en la red de distribución del Acueducto de Bogotá durante el periodo de Febrero a Mayo del 2004.

A pesar de todo, el agua, siendo una necesidad absoluta para la vida, debe tener una calidad apropiada al utilizarse para el consumo humano, por lo que tiene que estar libre de cualquier organismo capaz de causar enfermedades. Para lograr esto, históricamente se ha reconocido el uso casi absoluto del cloro como agente químico capaz de eliminar a la mayoría de estos microorganismos. Sin embargo, se ha encontrado evidencia de resistencia microbiana a este agente desinfectante, a pesar de ser uno de los mas potentes, y por ende, mas utilizados en el mercado. Es por esto, que es de vital importancia, reconocer e identificar los microorganismos que están presentando resistencia a la desinfección e igualmente conocer las concentraciones mínimas en las cuales las bacterias están presentando esta resistencia, para así, poder llevar a cabo acciones correctivas en un futuro.

Se puede pensar que las muestras que resultaron positivas en la detección de microorganismos indicadores de contaminación del agua potable en la red de distribución, analizadas en el laboratorio de aguas del Acueducto de Bogotá, se deben a que están presentando resistencia al proceso de desinfección con cloro. Para demostrar o refutar esta hipótesis

se simularon las condiciones de desinfección de las plantas de tratamiento, con el enfrentamiento *in vitro* de las cepas nativas aisladas a una solución de cloro gaseoso.

El principal objetivo de este trabajo es aislar e identificar las cepas nativas de coliformes totales y *E. coli* en muestras de la red de distribución del agua del Acueducto de Bogotá durante los meses de Febrero a Mayo del 2004 y realizarles pruebas de cloro resistencia.

Para ello se montó el banco de cepas nativas de Coliformes Totales y *E. coli* halladas en las muestras de agua potable de la red de distribución; todos estos análisis fueron llevados a cabo en el laboratorio de aguas del Acueducto. Se calculó el porcentaje de aceptabilidad establecido por el Decreto 475 de 1998 durante los meses de Enero a Junio del 2004, para evaluar la calidad microbiológica del agua que ofrece el Acueducto a los ciudadanos.

Se expusieron las diferentes cepas nativas a diferentes concentraciones de cloro, superiores e inferiores a la concentración máxima indicada por el decreto 475 de 1998 (0.2 – 1.0 mg/L), para verificar cloro resistencia. También, en análisis *in vitro* se expusieron las cepas a diferentes tiempos de contacto con concentraciones de cloro establecidas, para evaluar su incidencia y la efectividad del mismo en el proceso de desinfección. Finalmente, se planteó un modelo de desinfección, basados en las concentraciones bacterianas y en los diferentes tipos de microorganismos presentes en el agua.

El proyecto evaluó si hay correspondencia entre las muestras analizadas que resultaron positivas, con la hipótesis planteada, la cual afirma que existen cepas nativas de coliformes totales y *E. coli* cloro resistentes, o si por el contrario, la presencia de estos microorganismos, se debe a otros factores entre los que se encuentran, la toma de muestras, la biopelícula

de las tuberías de la red de distribución; para así poder tomar medidas correctivas que ayuden a minimizar estos problemas en el Acueducto de Bogotá.

## 1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### 1.1 GENERALIDADES

El peligro más común y más difundido relativo al agua potable es el de su contaminación, sea esta directa o indirecta, debido al efecto de aguas servidas, de otros desechos o de las excretas del hombre o de los animales. Si dicha contaminación es reciente y entre los factores que contribuyeron a ella se hallan agentes portadores de enfermedades entéricas transmisibles, es posible que estén presentes algunos de los organismos vivos causales de las mismas. Beber agua así contaminada, o emplearla en la preparación de determinados alimentos, puede producir mayor número de casos de infección (Organización Panamericana de la salud, 1987).

Con el fin de asegurar que el agua de la llave es segura para beber, la EPA (Environmental Protection Agency) y la Comisión de Calidad Ambiental de Texas (TCEQ) dictan normas que limitan la cantidad de ciertos contaminantes en el agua, provista por los sistemas públicos de agua de acuerdo con la Interim Primary Drinking Water Regulations, emitidas en 1975 por la EPA. Estas disposiciones fijan un número mínimo de muestras que deben estudiarse cada mes y establecen el número máximo de coliformes (Nivel Máximo de Contaminación, NMC) permisible en 100 ml de agua Terminal (APHA-AWWA-WPCF, 2000). Debido a esto, el parámetro de calidad más importante de detectar en las aguas de consumo humano, es la presencia de coliformes.

Estas, si bien no son generalmente patógenas de por sí, son indicadoras de presencia de microbios potencialmente patógenos, y por lo tanto son un índice de definiciones sanitarias en las fuente de agua. La ingestión de agua contaminada por coliformes incrementa el riesgo de contraer enfermedades en humanos (Perdomo C. *et al.*,2001). Cabe señalar, sin embargo, que aunque se reconoce que la determinación de la

concentración de estas bacterias en el agua es un elemento crítico para determinar el riesgo de enfermedades relacionadas al consumo de la misma, no existe una relación simple entre el nivel de coliformes en el agua, la presencia de microorganismos en el agua, la presencia de patógenos en la misma y el riesgo de enfermedades (Perdomo C.H. *et al.*,2001).

## **1.2 DEFINICIÓN DE COLIFORMES**

El grupo Coliforme se define como todas las bacterias gram-negativas en forma bacilar que fermenta la lactosa a temperatura de 35 a 37 °C, produciendo ácido y gas (CO<sub>2</sub>) en un plazo de 24 a 48 horas, aerobias o anaerobias facultativas, son oxidasa negativa, no forman esporas y presentan actividad enzimática de la β galactosidasa (Ministerio de Salud, 1998).

El grupo de bacterias coliformes, es el principal indicador de la adecuación del agua para usos domésticos, industriales o de otro tipo. La experiencia ha demostrado que la densidad del grupo de los coliformes es un indicador del grado de contaminación y, por tanto, de la calidad sanitaria (AWWA-WPC, 2000)

Desde hace tiempo se reconoce que los organismos del grupo coliforme son un buen indicador microbiano de la calidad del agua potable, debido principalmente a que son fáciles de detectar y enumerar en el agua. La presencia de *E. coli* en muestras de agua potable, indica la existencia de fallas en la eficacia de tratamiento de aguas, en la integridad en el sistema de distribución y por lo tanto evidencia de contaminación de diferentes orígenes: suelo, superficies de agua dulce, y tracto digestivo (Organización Panamericana de la salud, 1987).

Dentro de los coliformes totales, se pueden distinguir dos tipos, por un lado están los coliformes fecales, que provienen del tracto intestinal de animales de sangre caliente y que serían los mejores indicadores de

riesgo de afecciones humanas (Perdomo C. *et al.*,2001). Estos son los organismos coliformes que son capaces de fermentar la lactosa a temperaturas de 44,0°C ó 44,5°C; entre ellos se encuentran los del género *Escherichia* y, en menor grado, algunas cepas de *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella*. De todos estos microorganismos, sólo los *E. coli* tienen un origen específicamente fecal, pues están siempre presentes en grandes cantidades en las heces humanas, de los animales y de los pájaros, y rara vez se encuentran en el agua o el suelo que no hayan sufrido algún tipo de contaminación fecal (Organización Panamericana de la salud, 1987).

También, existe otro grupo de coliformes que son residentes naturales en el suelo y agua (Perdomo C.H. *et al.*,2001). En general, se caracterizan por su capacidad para fermentar la lactosa en cultivos a 35° ó 37°C, y entre ellos se encuentran las especies *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella* (Organización Panamericana de la salud, 1987).

### **1.3 TECNICAS DE DETECCION**

Entre las técnicas reconocidas mundialmente para la detección de coliformes en aguas, se encuentra la técnica de filtración por membrana, que implica una siembra directa para la detección y calculo de la densidad de coliformes; esta técnica es tan eficaz como la fermentación en tubos múltiples para la detección de bacterias de este mismo grupo (APHA-AWWA-WPCF, 2000).

- Filtración por Membrana

La Filtración por membrana (FM) es el mecanismo mediante el cual se atrapan en la superficie de una membrana de nitrocelulosa, microorganismos cuyo tamaño es mayor que el tamaño del poro (0.45 m); esto gracias a una bomba eléctrica que ejerce una presión diferencial sobre la muestra de agua haciendo que se filtre. Los contaminantes de tamaño menor que el específico del poro atraviesan la

membrana o quedan retenidos en su interior, las bacterias quedan en la superficie de la membrana y luego esta es llevada a un medio de enriquecimiento selectivo o diferencial, quien a través de un intercambio metabólico y una incubación, evidencian el crecimiento de microorganismos y las Unidades Formadoras de Colonia (UFC). (APHA-AWWA-WPCF, 2000) .

La técnica de filtración por membrana (FM) es altamente reproducible, puede utilizarse para estudiar volúmenes relativamente grandes de muestra y proporciona resultados numéricos más rápidos que el método de los tubos múltiples. La técnica de filtración por membrana es extraordinariamente útil para controlar las posibles situaciones de urgencia en relación con el agua potable y para estudiar distintas aguas naturales. Sin embargo, esta técnica tiene limitaciones, sobre todo para estudiar aguas con elevada turbidez o que contengan bacterias no coliformes (APHA-AWWA-WPCF, 2000).

En lo que se refiere a la técnica de filtración por membrana, el grupo coliforme puede definirse como el formado por las bacterias aerobias y anaerobias facultativas, gramnegativas, no esporuladas y de forma alargada, que desarrollan una colonia roja con un brillo metálico en un medio tipo Endo que contenga lactosa tras una incubación de 24 horas a 35 °C. Al estudiar cultivos purificados de bacterias coliformes, se observa una reacción de citocromo oxidasa (CO) negativa y una de  $\beta$ -galactosidasa (ONPG) positiva. La presencia de un elevado número de no coliformes o de sustancias tóxicas puede dar lugar a un cálculo de coliformes inferiores al real. (APHA-AWWA-WPCF, 2000).

La citocromo oxidasa es una enzima del grupo de la porfirina férrica muy difundida en la naturaleza. Ella oxida el citocromo c reducido y entonces se transforma ella misma en la forma reducida e inactiva. Por transferencia de los electrones a oxígeno molecular la citocromo oxidasa

se transforma de nuevo en la forma activa. En presencia de oxígeno molecular el sistema citocromo oxidasa/citocromo c puede reducir toda una serie de sustancias orgánicas, entre ellas el llamado reactivo NaDi (1-naftol + dimetilparafenilendiamina) con formación de la molécula de condensación, azul de indofenol (Inserto Citocromo oxidasa Merck, 2003).

El volumen estándar que se va a filtrar en las muestras de agua potable es de 100 ml, que, si es necesario, puede distribuirse a lo largo de varias membranas. El agua potable tratada no debe contener coliformes por 100 ml, por lo que las plantas de tratamiento de agua deben tomar en consideración el estudio de muestras de 1 L de agua terminal, siempre que no existan partículas que interfieran con la filtración o el desarrollo de colonias aisladas. (APHA-AWWA-WPCF, 2000).

#### **1.4 PREVALENCIA DE MICROORGANISMOS CONTAMINATES**

Los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Escherichia* suelen representar la mayor parte de microorganismos aislados en aguas naturales y suministros de aguas municipales tratadas, siendo *Enterobacter cloacae* el que se aísla con mayor frecuencia. Si bien no todos los coliformes tienen necesariamente su origen en las aguas de alcantarilla, *E. coli* es el coliforme más afectado por los tratamientos habituales de agua (APHA-AWWA-WPCF, 2000).

Según investigaciones realizadas por Jhon T. Lisle y sus colaboradores (1998), demostraron que *E. coli* O:157H7 puede presentar una resistencia progresiva al tratamiento con cloro al exponerse a periodos de inanición, cuando se simuló un microcosmos de condiciones naturales; este estudio demostró que *E. coli* O:157H7 se adaptó a las condiciones de inanición a las que fue sometida, por medio del desarrollo de un fenotipo de cloro resistencia.



Por otra parte, los microorganismos coliformes, algunos de los cuales son saprofitos de vida libre, pueden multiplicarse en lavaderos de cuero, madera, cuerdas de piscina, y empaquetadoras de yute, y producir a veces cienos en el interior de las tuberías (APHA-AWWA-WPCF. 2000); esto podría conllevar a la formación de un microcosmos de protección al cloro como se mencionaba anteriormente en el artículo de Lisle.

Se puede hacer una lista de manera similar en orden decreciente de la resistencia relativa de diversos tipos de microorganismos y su supervivencia probable, es decir, quistes de protozoarios, enterovirus, enterobacterias. Aunque existen claras diferencias respecto al tiempo necesario para inactivar los enterovirus en comparación con las enterobacterias, es posible alcanzar fácilmente las condiciones mínimas de desinfectante-residual y de contacto tiempo-requeridos para garantizar la inocuidad microbiológica del abastecimiento de agua (Organización Panamericana de la salud, 1987).

A pesar de esto, las bacterias coliformes no deberían ser detectadas en sistemas de tratamiento de abastecimiento de agua y, si así ocurriese, ello es indicio de que el tratamiento fue inadecuado o de que se produjo la contaminación posteriormente. En este sentido, la prueba de coliformes se usa como indicador de la eficiencia del tratamiento (Organización Panamericana de la salud, 1987).

### **1.5 EFICIENCIA EN LA DESINFECCION**

La eficiencia comparativa de los desinfectantes puede expresarse en términos ya sea de las concentraciones relativas necesarias para alcanzar el mismo nivel de desinfección o la de los niveles relativos de desinfección producidos con una misma concentración del agente desinfectante. Sin embargo, debido a la naturaleza diferente de los microorganismos y a la dificultad de estandarizar las condiciones para realizar las pruebas, como control de pH, temperatura y características químicas del agua, sólo es

posible formular apreciaciones generales sobre las eficiencias comparativas de los distintos desinfectantes. Dentro de estas limitaciones, se puede agrupar a los diversos agentes desinfectantes de acuerdo con su eficacia. Así, es preferible usar cloro, bióxido de cloro u ozono, aunque en el caso del cloro el pH deberá ser menor de 8,0. Como las cloraminas tienen una acción biocida lenta, no se recomienda su empleo como agentes desinfectantes primarios para propósitos de tratamiento de agua, aunque pueden utilizarse para el mantenimiento de desinfección residual en sistemas de distribución donde el tiempo de contacto es más prolongado (Organización Panamericana de la Salud, 1987).

El uso de organismos intestinales normales como indicadores de contaminación fecal, en lugar de los organismos patógenos mismos, es un principio de aceptación universal en la vigilancia y evaluación de la seguridad microbiana en los sistemas de abastecimiento de agua . Lo ideal será que el hallazgo de dichas bacterias indicadoras denotara la presencia posible de todos los organismos patógenos pertinentes. Los organismos indicadores abundarán en los excrementos, pero estarán ausentes, o existir solo en números reducidos, en otras fuentes, serán fáciles de aislar, identificar y enumerar y deberán ser incapaces de desarrollarse en el agua. Igualmente deberán sobrevivir más tiempo en el agua que los gérmenes patógenos y serán más resistentes a los desinfectantes, como podría ser el cloro (Organización Panamericana de la salud, 1987)

### **1.5.1 EL CLORO**

El cloro se descubre en el 1774 por el químico sueco Karl Wilhelm Scheele como producto de la reacción entre ácido hidrocloreídrico y dióxido de manganeso.

El cloro es una sustancia tan energética y activa que solo existe en la naturaleza en combinación con otros elementos. El carácter tóxico de cloro y algunos de sus compuestos se atribuye en gran parte a su capacidad oxidante (Ocasio y Lopez, 2004)

El cloro y los compuestos que contienen cloro son oxidantes muy potentes y se pueden disipar en reacciones con una variedad de materiales orgánicos e inorgánicos en el agua antes de que se obtenga suficiente desinfección (Ocasio y Lopez, 2004). Las aguas que llegan a una planta de tratamiento de agua contienen agentes reductores (compuestos orgánicos e inorgánicos como nitritos, iones de hierro, plomo y sulfuros), así como microorganismos y bacterias.

El cloro se aplica en exceso (aprox. 2mg/L) de manera que pueda satisfacer la demanda para oxidar estos compuestos y eliminar esta bacterias, y que así, reste una cantidad de cloro residual en los conductos de agua. Este cloro residual es el cloro libre que queda en el agua después que ha sido desinfectada en la planta. Su utilidad es de continuar desinfectando el agua desde que sale de la planta de tratamiento hasta que llegue al consumidor (Ocasio y Lopez, 2004).

El cloro debe ser aplicado al agua a tratar en forma gaseosa ( $\text{Cl}_2$ ) o como un sólido ionizado [ $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ,  $\text{NaOCl}$ ]. Como el cloro es adicionado al agua, este reacciona con el amoniaco y materia orgánica formando cloraminas y compuestos órgano clorados. Como se adiciona mas cloro, las cloraminas residuales y los compuestos órgano clorados son reducidos a un valor mínimo y queda como resultado el cloro residual libre.

El punto donde ocurre la formación de compuestos de cloro residual es conocido como punto de quiebre, el cual describe el proceso donde suficiente cloro es adicionado para obtener cloro residual libre. Si suficiente cloro no puede ser adicionado para llevar a cabo el punto de quiebre y así garantizar la desinfección del agua a través de la saturación con cloro, se debe tener cuidado para garantizar la desinfección a través de la extensión de los tiempos de contacto. (EPA, 1999).

Teorías del efecto germicida del cloro:

- Oxidación de las células
- Alteración de la permeabilidad celular
- Alteración del protoplasma celular
- Inhibición de la actividad enzimática
- Daño del DNA y el RNA celular

Asimismo, el cloro reacciona fuertemente con los lípidos en la membrana celular, por lo tanto, membranas con mayor concentración lipídica, son mas susceptibles a la destrucción. Por esta razón, virus, quistes y huevos son mas resistentes a la destrucción que las bacterias (EPA, 1999).

## **1.6 PROBLEMAS EN LA DESINFECCIÓN**

### **1.6.1 MICROORGANISMOS CLORO RESISTENTES**

Históricamente se ha asociado la cloración con el bajo costo, la comodidad de uso y la eficacia del cloro contra algunas bacterias patógenas. Sin embargo, en los últimos cien años, el prestigio de la desinfección ha llegado a sustituir la vieja creencia en la salubridad de las aguas claras, por la nueva creencia que se resume en la consigna institucional "Agua Clorada, garantía de Salud". La clarificación de las aguas de consumo no se contempla con el rigor necesario; ciertas autoridades sanitarias centran su atención en asegurar un mínimo de Cloro, permitiendo excesos de cloración y defectos de clarificación. La falsa seguridad que aporta la cloración llegó a su fin el año 1993, en la mayor epidemia transmitida por un abastecimiento de aguas; en Milwaukee, EEUU, un fallo en la clarificación provocó 400.000 casos de *Criptosporidiosis*, un parásito intestinal que resiste elevadas concentraciones de Cloro (80 mg/L). Un año más tarde, en Las Vegas, ocurría la primera epidemia de *Cryptosporidium* documentada en un abastecimiento urbano sin ningún fallo aparente. Crece la preocupación sobre la presencia en aguas de grifo de bacterias con moderada

resistencia al cloro: *Mycobacterium avium* y *Legionella pneumophila*. La primera tiene parentesco con el bacilo de la tuberculosis, aunque es mucho menos patógena; se estudió su presencia en aguas municipales de Boston, encontrándose en el 42% de las muestras (Germán y Marcén, 1998).

Sin embargo, otros procedimientos de desinfección no son aplicables en la mayoría de los abastecimientos. La *ozonización* no resulta tan eficiente como la cloración, además de su difícil manejo y ausencia de efecto residual. La esterilización por rayos ultravioleta sólo es aplicable en abastecimientos urbanos. La simple cloración de las aguas es suficiente para limitar la extensión de muchas epidemias clásicas (Cólera, Disentería bacilar, Fiebres Tifoideas), lo que ha significado importantes reducciones de mortalidad y morbilidad; pero las limitaciones de la cloración se evidencian en las recientes epidemias producidas por grupos de microbios resistentes. La persistencia de Cloro residual en la red de aguas ha supuesto uno de los paradigmas más apreciados en Ingeniería Sanitaria. Se ha supuesto que la presencia de desinfectante circulante garantiza la higienización de la red de distribución, infravalorando los riesgos que el cloro y sus derivados suponen para la salud. Numerosos estudios toxicológicos coinciden en señalar efectos tóxicos secundarios a la cloración de las aguas (Germán y Marcén, 1998).

Al mismo tiempo, Lisle *et al.* (1998) en sus estudios, demostró la resistencia de *E. coli* O157 :H7 en la desinfección con ácido hipocloroso debido a efectos de la exposición de la cepa a inanición. Las condiciones de inanición en este estudio promovieron el desarrollo de un fenotipo que le dio resistencia a una injuria sub-letal, inducida por medio de detergente membrana – activa (Ej. El desoxicolato). Este efecto fue demostrado por el significativo decrecimiento en porcentaje de las células injuriadas desde el tiempo de inoculación, hasta el día 14. Concomitantemente, los investigadores observaron un incremento de la resistencia al cloro.

La resistencia a la desinfección se define como la existencia inversamente proporcional a la sensibilidad de la desinfección. Tradicionalmente, la

resistencia a la desinfección a sido expresada como la diferencia en el crecimiento en un medio no selectivo antes y después de la exposición al desinfectante (Lisle *et al*; 1998).

### 1.7 LEGISLACION DEL AGUA POTABLE EN COLOMBIA

Según el decreto 475 del 10 de Marzo de 1998, los métodos aceptados para análisis microbiológico de del agua son los siguientes:

Para *Escherichia coli*: Filtración por membrana y sustrato definido

Para Coliformes totales: Filtración por membrana y sustrato definido

En cuanto a los valores admisibles desde el punto de vista microbiológico que deben evaluar las empresas de acueducto municipales, según el Artículo 25 del presente decreto, se describen en la tabla No. 1.

**Tabla No. 1 Valores admisibles de microorganismos indicadores**

Microorganismos indicadores/ Técnica Utilizada	Filtración por Membrana	Sustrato Definido	Tubos Múltiples de Fermentación (aceptable hasta el año 2000)
Coliformes Totales	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 microorganismos/100 cm <sup>3</sup>	< 2 microorganismos/100 cm <sup>3</sup>
<i>Escherichia coli</i>	0 UFC/100 cm <sup>3</sup>	0 microorganismos/100 cm <sup>3</sup>	Negativo

Por otro lado, el decreto establece que el numero de muestras para el control de calidad del agua en análisis microbiológico que deben tomarse en la red de distribución de todo sistema de suministro de agua, deberá corresponder a la población servida, que para el caso de Bogotá con mas de 3.960.001 habitantes, se deberán tener un numero mínimo de muestras por mes de 480 muestras.

Por ultimo, el decreto establece que para los efectos de control de calidad microbiológica del agua potable en lo que se refiere a coliformes totales, las personas encargadas de la prestación del servicio publico de acueducto, obtendrán los porcentajes del total de los resultados de las muestras consignadas en el libro o registro de control de calidad; para este efecto los porcentajes se calcularan de la siguiente manera:

$$\% \text{ Aceptabilidad} = \text{NA} \times 100 / \text{NT}$$

NA = Numero de muestras aceptables: Son todas aquellas muestras que cumplen con lo señalado en el articulo 25 del presente decreto.

NT = Numero total de muestras por mes. Es el total de muestras analizadas y registradas en el libro de control por mes.

Cuando el porcentaje de aceptabilidad se encuentre entre el 95% y 100%, se considera que el agua es apta para consumo humano; pero si dicho porcentaje es menor del 95% se considera que el agua es no apta para el consumo humano.

## **2. MATERIALES Y METODOS**

### **2.1 RECOLECCION Y RECEPCIÓN DE MUESTRA**

Con el fin de cumplir con lo establecido por el Artículo 27 del decreto 475 de 1998, en lo que respecta al numero de muestras para el control de calidad del agua, el laboratorio de aguas del Acueducto de Bogotá, ubicado en la Calle 22 C N° 40-99 de Bogotá, ha establecido un cronograma de recolección de muestras diariamente, la cual es realizada por los respectivos clientes.

Para tal fin, Bogota se encuentra dividida en cinco zonas, de cada zona se obtienen un mínimo de 6 muestras y un máximo de 12; cada zona tiene asignado sus respectivos puntos de toma de muestra y de reemplazos para evitar la falta de alguna muestra diaria.

El Laboratorio de Aguas del Acueducto de Bogotá, ha establecido un cronograma de recolección de muestras donde los 150 puntos de muestreo

son tomados por los menos 4 veces al mes. Este proceso de toma de muestra es realizado por el laboratorio y por los propios clientes.

El tamaño de la muestra es un promedio de 51 muestras diarias, fundamentado en un muestreo simple aleatorio.

Para cumplir con el objetivo de este estudio, se utilizaron las 51 muestras diarias tomadas de lunes a viernes, analizadas durante los meses de febrero a mayo del 2004, obteniendo una población total de 6120 muestras.

El método estadístico utilizado es de tipo descriptivo. Al mismo tiempo, se analizó el porcentaje de células resistentes al desinfectante (%R) y el porcentaje de resistencia al desinfectante, donde %R = (100-%I), siendo %I la razón del recuento de las colonias, antes y después de la desinfección. Es decir:

$$\%I = \frac{\text{UFC/100 mL antes de desinfect.} - \text{UFC/100 mL después de desinfect} \times 100}{\text{UFC/100 mL antes de desinfección}}$$

El objetivo del muestreo es obtener una parte representativa del material bajo estudio, para la cual se analizaron concentraciones de cloro residual libre y total, y en cuanto a las variables microbiológicas se tuvieron en cuenta la presencia de coliformes en las muestras de agua tratada.

En los 51 puntos de muestreo diarios se recolectan 2 muestras: una muestra recolectada en frascos ámbar para los análisis fisicoquímicos y la otra muestra, recolectada en frascos Schott® con tiosulfato de sodio como agente decolorante para los análisis microbiológicos (100 ml). Toda la metodología de toma de muestra y conservación y almacenamiento del laboratorio, se realiza aplicando el método normalizado 9060 A y 9060 B del Standard Methods for the examination of water and Wastewater 20 ed.

En caso de que las muestras no puedan ser analizadas de forma inmediata, estas se conserva en la nevera a una temperatura alrededor de los 2 a 4 °C.

## **2.2 ANALISIS MICROBIOLÓGICO. FILTRACIÓN POR MEMBRANA**

Después de la recepción de la muestra, se procedió al análisis de estas por la técnica de filtración por membrana. Este procedimiento aplica a la



metodología empleada en el laboratorio de agua del Acueducto, para el análisis de las muestras de agua tratada en la que se requiere establecer si es apta o no para el consumo humano.

La determinación de coliformes totales y *E.coli* con la técnica de FM se realizó aplicando el método normalizado EPA. 40 CRF Part 141S.EMS SCIENCE. Membrane filter Technique using Cromocult® Coliform Agar., empleando filtros marca PALL GELMAN, y en las cabinas de seguridad biológica tipo II LABCONCO, disponibles en el laboratorio.

La siembra de las muestras, filtradas en membranas de 0.45 µm, se realizó en agar Chromocult® de Merck, (composición en g/L: Peptona 3.0; Cloruro de Sodio 5.0; Fosfato dihidrogeno de sodio 22; Fosfato hidrógeno disodio 27; Piruvato de Sodio 1.0; Triptona 1.0; agar-agar 10.0; Sorbitol 1.0; Tergitol 70.15; Mezcla cromogénica 0.4) el cual es un medio cromogénico selectivo que detecta simultáneamente Coliformes Totales y *E. coli*. La identificación simultánea se hace posible por la nueva combinación de sustratos cromogénicos. El sustrato Salmon-GAL es escindido por la enzima β-galactosidasa, característico de coliformes y provoca una coloración roja a salmón de las colonias de Coliformes. La identificación de la β-glucoronidasa característica para *E. coli*, tiene lugar mediante el sustrato X-glucoronido, cuyo producto de escisión produce una coloración azul de las colonias positivas. (Merck, 2000).

Después de realizar el proceso de filtración, los medios con la membrana se incubaron a 35 °C +/-0.5 °C, durante 24 horas. Posterior a este tiempo, se procedió a realizar el recuento, el aislamiento y la detección de las colonias positivas de acuerdo con las indicaciones del medio.

Se calculó la densidad como recuento total de coliformes totales en 100 ml utilizando los filtros de membrana que tengan entre 20 y 80 colonias y no más de 200 utilizando la siguiente ecuación (EAAB, 2003) :

Colonias de coliformes total (totales) 100 ml = colonias de coliformes total contadas x 100 / ml de muestra filtrado.

Para agua potable se cuentan todas las colonias sin tener en cuenta el límite inferior. En el caso de ser mayor a 200, se reporta >200 UFC/100 ml.

## 2.3 IDENTIFICACION BIOQUÍMICA

Después de obtener las colonias características aisladas, se procedió a sembrarlas en un medio de enriquecimiento no selectivo, como TGE, de la casa comercial Merck; la siembra se realizó por medio de la técnica de agotamiento o estría. Posteriormente, se incubaron las muestra durante 24 horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  y se procedió a realizar una identificación bioquímica de la cepa.

Primero se realizó la detección de la enzima triptofanasa con el reactivo de Kovacs de la casa comercial Merck y la detección de la enzima citocromo oxidasa con bactident® oxidasa de Merck. La identificación bioquímica se realizó en los sistemas BBL CRYSTAL de identificación el cual es un kit para la identificación de patógenos entericos fermentadores y no fermentantes (E/NF), al cual pertenece el grupo de los coliformes. La base de datos del kit, basa su identificación en una base estadística, la cual es específica para los grupos taxonómicos superiores para la base de datos de BBL CRISTAL que mas se aproximan al perfil y a los resultados especificados en las pruebas de fuera del panel.

El protocolo de identificación se realiza siguiendo el instructivo otorgado por el kit. Después de la incubación de los paneles de 18 a 20 horas a  $35^{\circ}\text{C}$ , se realiza una prueba de pureza con coloración de Gram. a las cepas cuya identificación haya otorgado una confianza superior al 95% y una validez del biotipo inferior a 10.

La estadística de validez del Biotipo es la medida del grado de correspondencia entre el perfil BBL CRISTAL observado y el patrón de reacción que representa, en relación con un modelo “promedio” o “típico” del candidato seleccionado.

Cuando la Validez del Biotipo es uno, el organismo es muy parecido al promedio de todas las cepas usadas en la construcción de la base de datos de BBL CRISTAL. Esta estadística es calculada tomando la probabilidad

acumulativa multiplicativa del resultado mas probable para cada reacción de BBL CRISTAL y dividiéndolo por la probabilidad acumulativa multiplicativa experimental del patrón de reacción observado.

Asimismo, el porcentaje de Confianza es una medida estadística de la comparación de la probabilidad de una determinada especie que tiene el patrón de reacción, observado en relación con las probabilidades relativas para todos los demás organismos que hay en la base de datos de BBL CRISTAL. (BBL CRISTAL, 2001)

Durante todo el proceso se realizaron pruebas de control de calidad de cada lote de Crystal con una cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33495.

#### **2.4 CONSERVACION: CREACIÓN DEL BANCO DE CEPAS**

Las cepas que cumplían con estos requisitos se conservaron con glicerol al 50% v/v en el congelador (-18°C) para formar el banco de cepas cloro resistentes del Acueducto. El método de conservación utilizado es el descrito por Meza *et al.*, 2002 y Pedroza 2001; en donde a partir de las cepas identificadas, se inoculan en caldo BHI de Oxoid y se llevan a incubación por 24 horas a 35 °C. Se realizaron diluciones seriadas para hacer el recuento del porcentaje de viabilidad. Para esto se tomaron 0.5 ml del cultivo crecido y se realizaron diluciones seriadas en 4.5 ml de agua peptonada estéril al 0.1 % P/V, obteniendo diluciones de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , ... $10^{-8}$ . Se sembró en superficie 0.1 ml de las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$ . Se incubaron las cajas por 24 horas a 35°C y se realizó el recuento, seleccionando solamente aquellas diluciones en las que se presente entre 30-300 colonias siguiendo las normas de recuento establecidas para siembra en superficie (Pedroza, 2001). Posteriormente, se mezclaron los 2 ml sobrantes del cultivo con 2 ml de caldo BHI mas glicerol al 50% v/v, para obtener un volumen final de 4 ml, los cuales se congelaron a -18°C.

Para evaluar la viabilidad del cultivo se realizó un recuento mensual de las mismas diluciones descritas anteriormente. El 100% de viabilidad corresponde al recuento inicial del banco, el cual debe mantenerse igual o en el mismo exponente.

## 2.5 PRUEBAS DE CLORO RESISTENCIA

Las pruebas de cloro resistencia se efectuaron después de conocer los porcentajes de viabilidad de las cepas aisladas en el banco y al finalizar las identificaciones. Para la realización de estas pruebas se llevó a cabo el ensayo modificado de desinfección descrito por Lesle *et al.*, 1998.

A partir de las cepas congeladas, se realizaron diluciones seriadas en 100 ml de agua destilada estéril, partiendo de la concentración inicial teórica obtenida en los recuentos de los porcentajes de viabilidad, con el fin de simular concentraciones bacterianas similares, encontradas en el agua filtrada de la planta Francisco Wiesner, es decir, concentraciones por debajo de 30 UFC/100 ml.

Se preparó una solución estandarizada de cloro gaseoso, siguiendo la metodología propuesta en el Estándar Methods for the examiantion of water and wastewater, a partir de la cual se tomaron volúmenes hallados para llegar a concentraciones inferiores y superiores de lo establecido en el Decreto 475/98. Las concentraciones de cloro residual libre (mg/L) con las que se trabajaron fueron: 0.5, 0.7, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L. Para llegar a estas concentraciones se utilizo la formula  $V1 \times C1 = V2 \times C2$ , en donde:

V1: ?

V2: 100 mL

C1: 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L

C2: Concentración de solución de cloro

Cada vez que se iba a realizar un enfrentamiento de las cepas a la solución de cloro, se leía la concentración de cloro Residual libre mediante el método calorimétrico por espectrofotometría utilizado en el laboratorio, puesto que esta concentración cambiaba diariamente. El método calorimétrico emplea como indicador el N,N-dietil-p-fenilendiamina (DPD), el cual reacciona con el cloro libre instantáneamente, produciendo un color rojo fucsia (EAAB, 2004). Para la preparación del control de no cloración, se transfirieron 100 mL de la muestra a un frasco estéril con tiosulfato de sodio.

Posteriormente, se adicionó una solución estandarizada de cloro (como se describió anteriormente) al resto de la suspensión celular para obtener una

concentración final de 0.5 ppm, 1.0 ppm, 1.5 ppm y 2.0 ppm (como cloro libre).

A las cepas reconstituidas en 100 mL de agua destilada estéril se le adicionó el volumen establecido de las diferentes concentraciones de cloro gaseoso. Se ensayaron diferentes tiempos de contacto entre los cuales está el tiempo de contacto establecido utilizado en la desinfección en las plantas de tratamiento (10 minutos) y otros tiempos (15, 30 y 60 minutos). Se adicionó 2 mL de tiosulfato de sodio al finalizar el tiempo de contacto para inhibir la acción del cloro. Después de la adición tanto del cloro como de la solución de tiosulfato, se agitaron las muestras suavemente durante unos minutos. Todas las muestras se corrieron por duplicado.

Posteriormente, se realizó directamente la metodología de FM, descrita anteriormente. Se llevaron las placas a incubar durante 24 horas a  $35 \pm 0.5$  °C.

Como controles, se llevaron a cabo los mismos procedimientos, utilizando cepas certificadas de *E.coli* ATCC 25922 , *Klebsiella oxytoca* ATCC 57822, las cuales se encuentran en las mismas condiciones de conservación que las cepas nativas, en el laboratorio de aguas del Acueducto. Al mismo tiempo, se corrieron controles positivos de cada una de las cepas, los cuales fueron preparados de la misma forma que la concentración bacteriana a estudiar, con la diferencia de que a estos no se les adicionaba la concentración de cloro. Igualmente, por cada cepa se corrieron dos blancos, los cuales se preparaban con 100 mL de agua destilada estéril, la misma con la que se prepararon las diluciones de las cepas.

Finalmente, se calculó el porcentaje de células con resistencia al desinfectante y el porcentaje de resistencia al desinfectante.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA**

A todas las muestras de agua potable que resultaron positivas en el análisis de Coliformes Totales y *E. coli* por medio de la técnica de FM en el medio Chromocult, durante los meses Febrero a Mayo del 2004, se les realizó un

aislamiento en medio TGE y posteriormente las pruebas bioquímicas, explicadas anteriormente. Todas las cepas que presentaron un porcentaje de confianza mayor al 95% y una Validez del Biotipo menor de 10, se encuentran relacionadas en la tabla No. 2.

**Tabla No. 2 Identificación bioquímica de presuntas cepas cloro – Resistentes.**

Fecha de aislamiento	Identificación	Numero de Radicación	% de Confianza	Validez del Biotipo
2004-02-10	<i>Yersinia enterocolitica</i> Group	2191	99.79	7
2004-02-17	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2579	95.55	8
2004-02-23	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2873	99.71	3
2004-02-27	<i>Cryseobacterium meningosepticum</i>	3137	99.96	3
2004-02-24	<i>Enterobacter cloacae</i>	2936	99.9	3
2004-03-05	<i>Enterobacter cloacae</i>	3492	99.97	4
2004-03-12	<i>Aeromonas hydrophila</i>	3862 A	99.88	2
2004-03-12	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	3862 B	99.30	1
2004-03-26	<i>Cryseobacterium meningosepticum</i>	4618	99.9	7
2004-03-29	<i>Acinetobacter baumannii</i>	4803 A	99.80	8
2004-03-29	<i>Escherichia coli</i>	4803 B	98.99	1
2004-05-04	<i>Escherichia coli</i>	8457	98.99	1

A cada una de las cepas aisladas e identificadas por medio del kit BBL CRISTAL, y que cumplieron con las especificaciones requeridas se les realizó una prueba de pureza por medio de tinción de Gram para crear, posteriormente, el banco de cepas del Laboratorio de Aguas. Las

características macro y microscópicas de cada una de las cepas aisladas, se encuentran relacionadas en la tabla No. 3.

**Tabla No. 3 Características morfológicas de las cepas aisladas**

<b>Nombre de la Cepa</b>	<b>Características Macroscópicas en Agar Chromocult</b>	<b>Características Microscópicas</b>
<i>Yersinia enterocolitica</i> Group	Colonias grandes moradas claras (salmon)	Bacilos Gram Negativos
<i>Klebsiella okytoca</i>	Colonias pequeñas moradas	Bacilos Gram Negativos
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Colonias grandes moradas	Bacilos Gram Negativos
<i>Cryseobacterium meningosepticum</i>	Colonias moradas claras	Bacilos Gram Negativos
<i>Enterobacter cloacae</i>	Colonias moradas	Bacilos Gram Negativos
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	Colonias rojas	Bacilos Gram Negativos
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Colonias rojas	Coco bacilos Gram Negativos
<i>Escherichia coli</i>	Colonia pequeña Azul oscuro	Coco bacilos Gram Negativos

### 3.2 Pruebas de Viabilidad

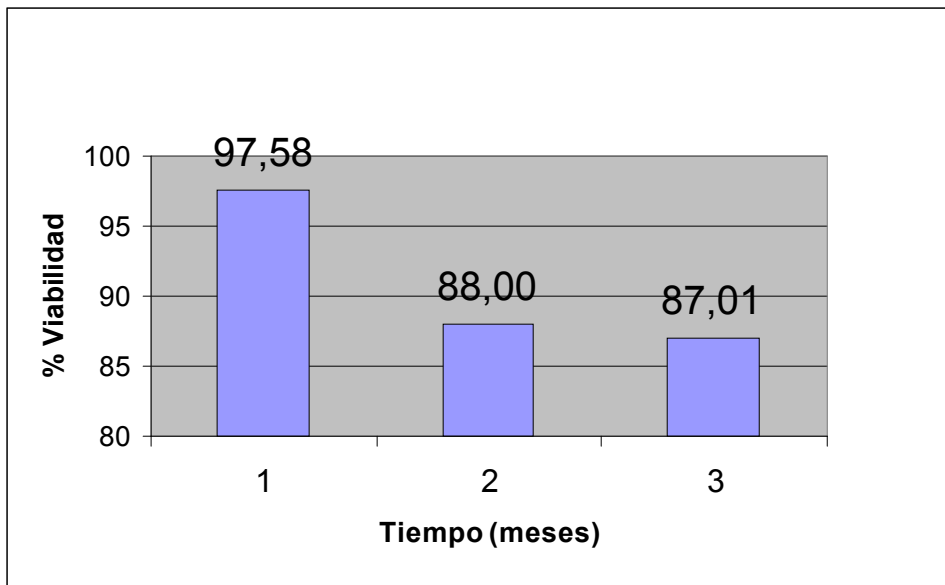
Después de garantizar la pureza de cada una de las cepas identificadas se procedió a realizar el montaje del banco de cepas. Para esto se realizó una determinación de la población inicial bacteriana de cada una de las cepas, haciendo recuentos por duplicado para determinar la concentración de células viables. Esta determinación se realizó tres veces, mensualmente, para cada cultivo. Los recuentos de población y el porcentaje de viabilidad se encuentran descritos en la tabla No. 4 y en la figura No. 1, respectivamente

**Tabla No. 4 Recuento inicial de las poblaciones bacterianas**

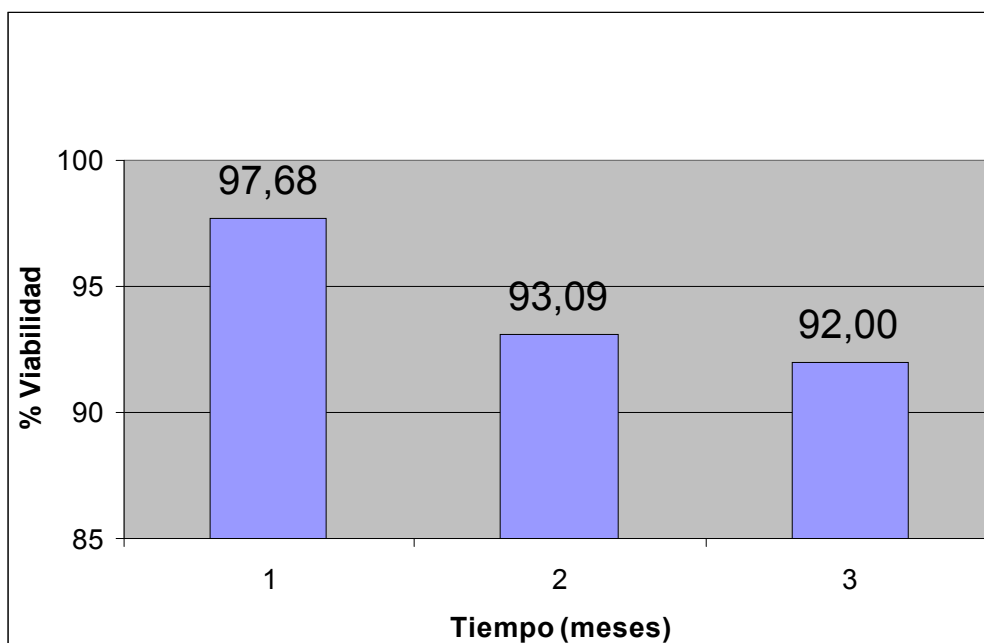
<b>Cepa No.</b>	<b>Recuento 1</b>	<b>Recuento 2</b>	<b>UFC/ml</b>	<b>Log 10 UFC/ml (100% Viabilidad)</b>
2191	$1.4 \times 10^6$	$8,3 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	7,14
2579	$2.9 \times 10^7$	$9,5 \times 10^8$	$2,9 \times 10^7$	7,46
2873	$2.8 \times 10^7$	$9,6 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	7,45
3137	$2.8 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	8,46
2936	$1,8 \times 10^7$	$6,4 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	7,26
3492	$3,0 \times 10^8$	$1,4 \times 10^9$	$3,0 \times 10^8$	8,48
3862 B	$1,8 \times 10^9$	$4,7 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$	9,29
4618	$2,2 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$	$2,6 \times 10^7$	8,42
4803 A	$2,9 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$	$2,9 \times 10^7$	7,46
4803 B	$2,7 \times 10^8$	$9,5 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	8,43
8457	$2,8 \times 10^7$	$9,8 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	7,45

El 100% de viabilidad corresponde al recuento inicial del banco, el cual es transformado en Log 10 de las UFC/ml para poder graficar la disminución de la misma en el transcurso del tiempo. Los recuentos del porcentaje de Viabilidad de las cepas analizadas se pueden observar en las figura No. 1 hasta la figura No 5A.

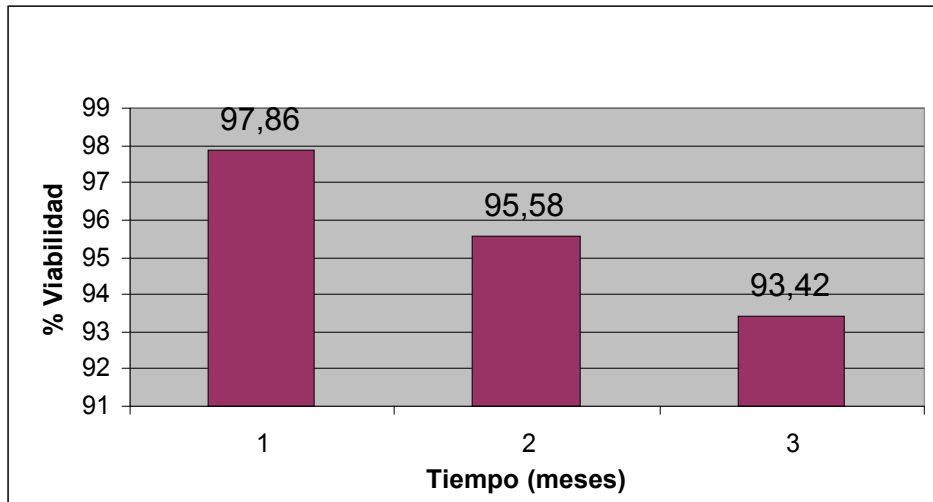




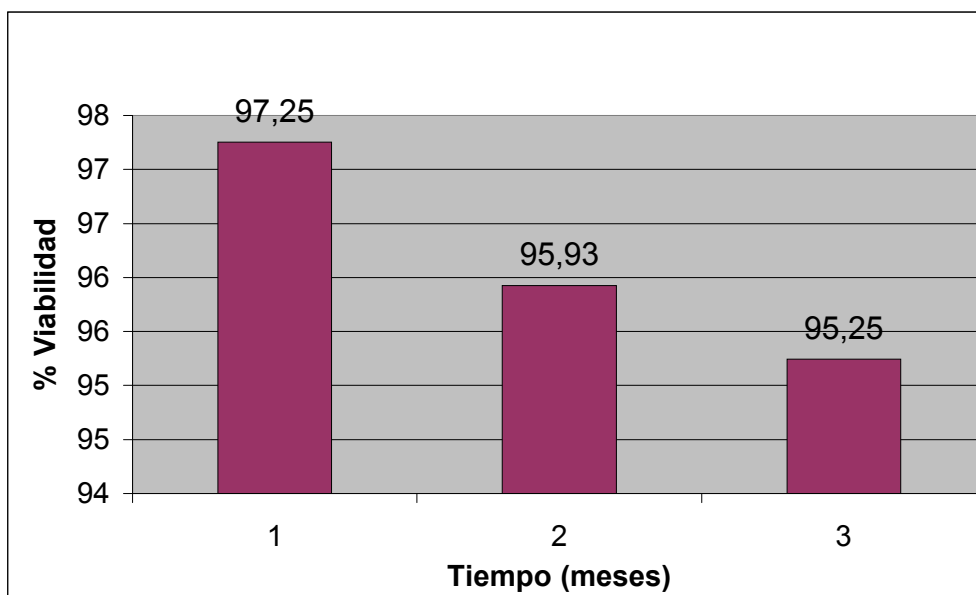
**Figura No. 1** Disminución del porcentaje de Viabilidad de *Yersinia enterocolitica* Group (cepa No. 2191) mediante el método de conservación con Glicerol 50 % v/v



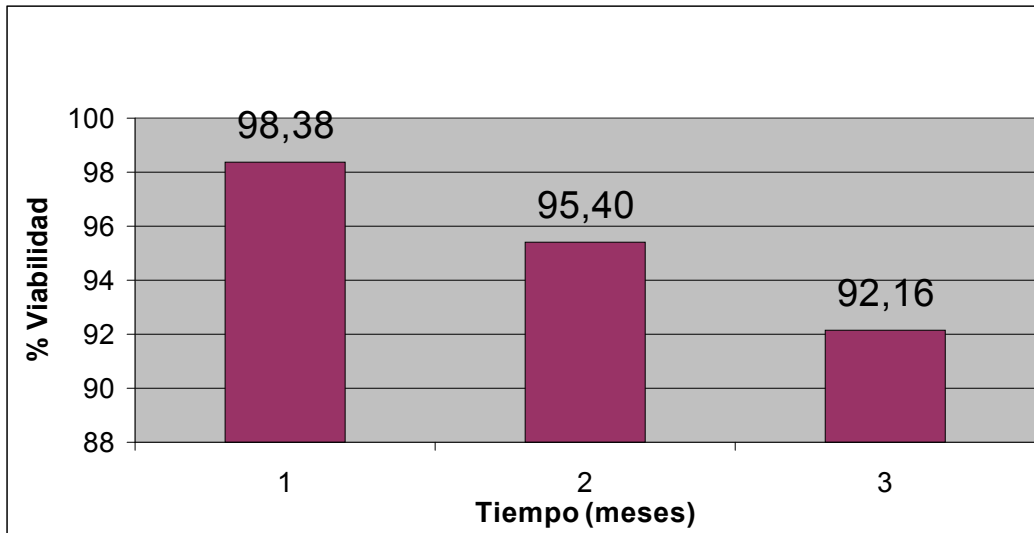
**Figura No. 1A** Disminución del porcentaje de Viabilidad de *Klebsiella oxytoca* (cepa No. 2579) mediante el método de conservación con Glicerol 50 % v/v



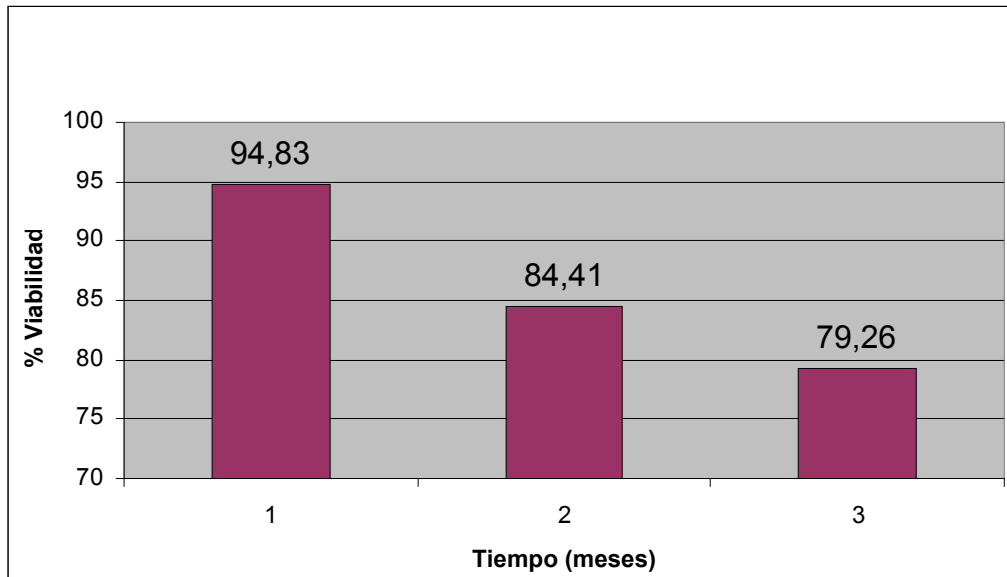
**Figura No. 2** Disminución del porcentaje de Viabilidad de *Aeromonas hydrophila* (cepa No. 2873) mediante el método de conservación con Glicerol 50 % v/v



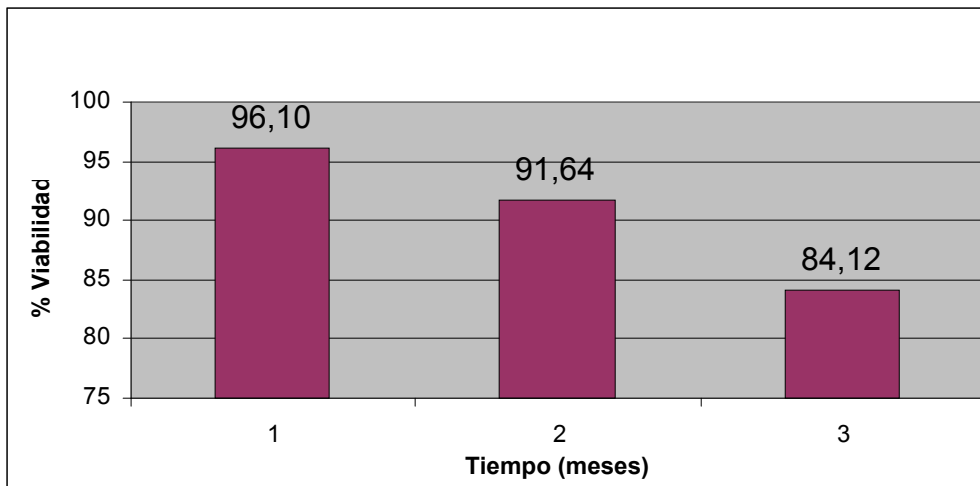
**Figura No. 2A** Disminución del porcentaje de Viabilidad de *Enterobacter cloacae* (cepa No. 2936) mediante el método de conservación con Glicerol 50 % v/v



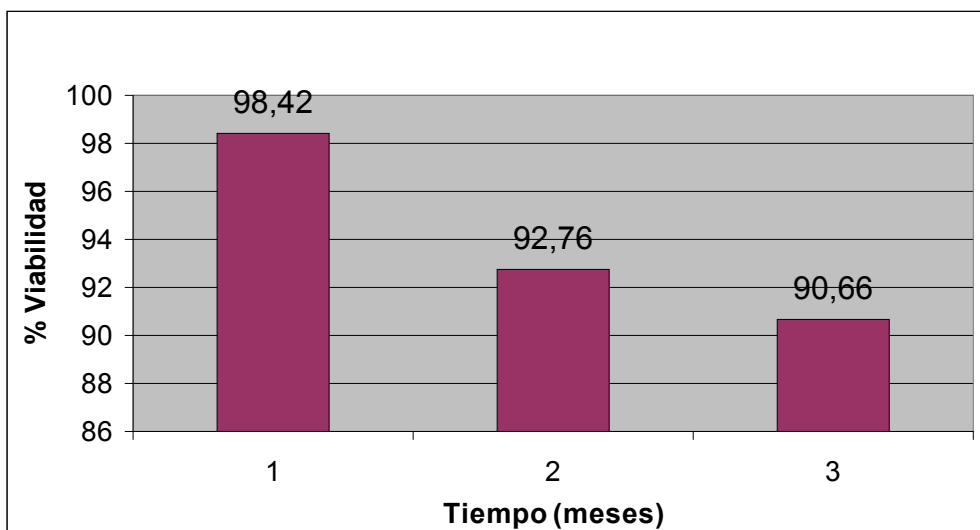
**Figura No. 3** Disminución del porcentaje de Viabilidad de *Enterobacter cloacae* (cepa No. 3492) mediante el método de conservación con Glicerol 50 % v/v



**Figura No. 3A** Disminución del porcentaje de Viabilidad de *Sphingobacterium multivorum* (cepa No. 3862B) mediante el método de conservación con Glicerol 50 % v/v



**Figura No. 4** Disminución del porcentaje de Viabilidad de *Cryseobacterium meningosepticum* (cepa No. 4618) mediante el método de conservación con Glicerol 50 % v/v



**Figura No. 4A** Disminución del porcentaje de Viabilidad de *Acinetobacterbaumanii* (cepa No. 4803 A) mediante el método de conservación con Glicerol 50 % v/v

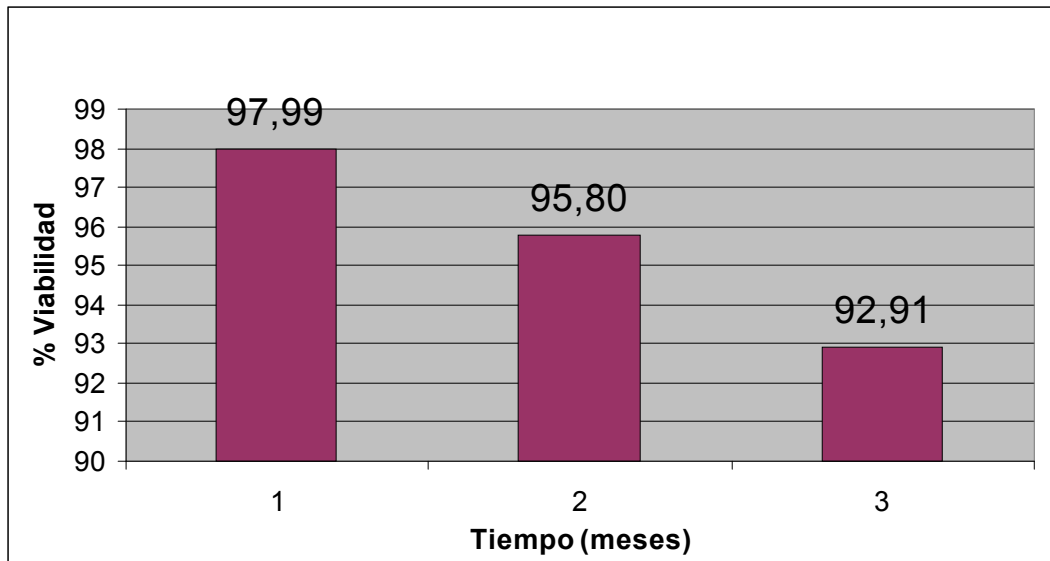


Figura No. 5 Disminución del porcentaje de Viabilidad de *Escherichia coli* (cepa No. 4803B) mediante el método de conservación con Glicerol 50 % v/v

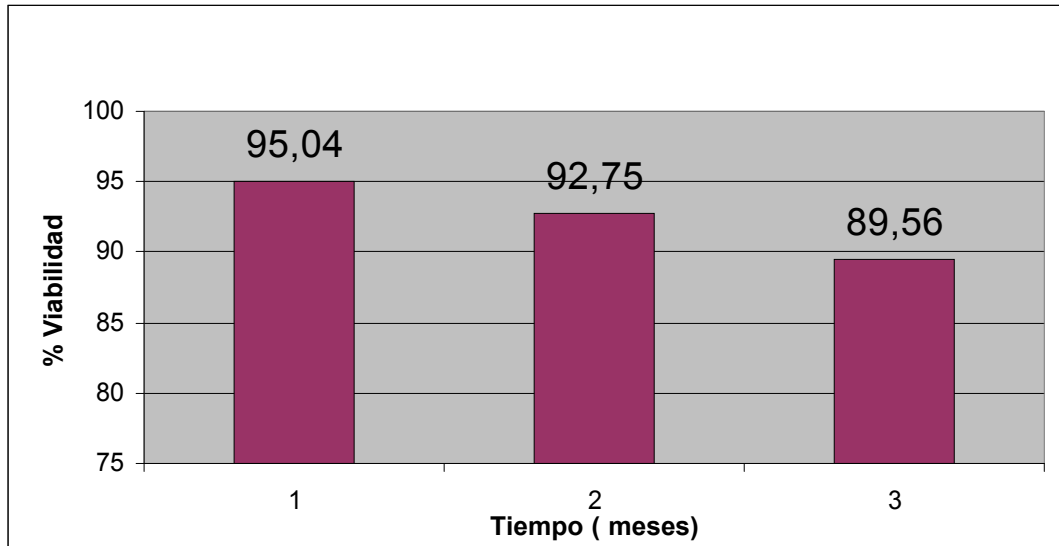


Figura No. 5A Disminución del porcentaje de Viabilidad de *Escherichia coli* (cepa No. 8457) mediante el método de conservación con Glicerol 50 % v/v

En cuanto a las cepas No. 3137 y 3862 A que corresponden a *Cryseobacterium meningosepticum* y *Aeromonas hydrophila*, respectivamente, en el primer mes de recuento se evidenció que estas cepas no habían tolerado el método de criopreservación.

### **3.3 Pruebas de Cloro – Resistencia**

#### **❖ 10 Minutos de Tiempo de Contacto**

Después de preparada la solución de cloro, se realizaron los cálculos para la dosificación del mismo, con el fin de obtener concentraciones finales de cloro libre entre 0.5 y 2.0 mg/L.

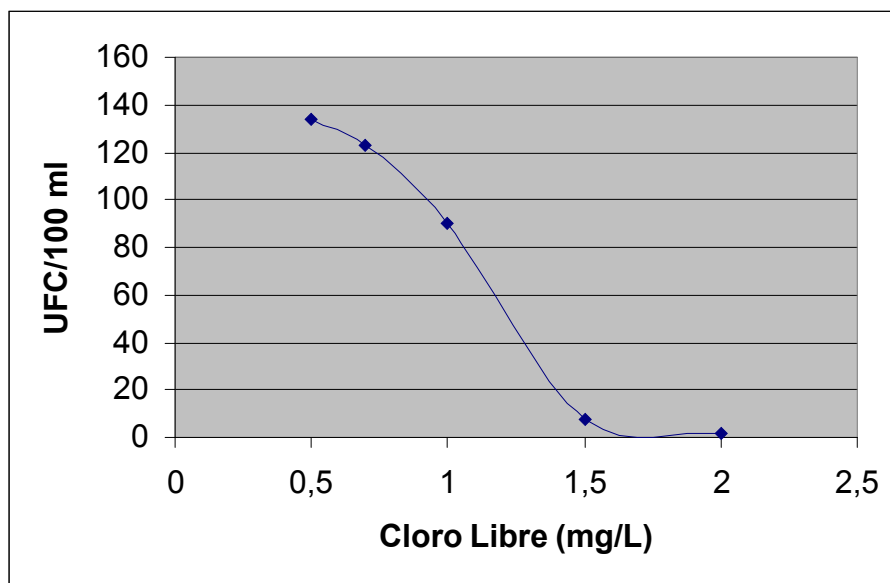
Al mismo tiempo, se hicieron diluciones de las muestras partiendo del último recuento realizado en las pruebas de viabilidad, con el fin de obtener concentraciones bacterianas cercanas a las encontradas en el agua filtrada de la planta Francisco Wiesner, según el histórico de recuentos.

Las pruebas de cloro resistencia se realizaron inicialmente con un tiempo de contacto de 10 minutos para todas las cepas. Las cepas que soportaron todas las concentraciones a las que fueron expuestas, se les realizó la misma prueba, aumentándoles el tiempo de contacto a 15, 20 y 30 minutos. Las pruebas realizadas con un tiempo de contacto de 10 minutos a todas las cepas, se encuentran descritas en las tablas 5 a la 18. Por otra parte, las pruebas de cloro resistencia realizadas a las cepas ATCC de *K. oxytoca* y *E. coli* resultaron negativas para todas las concentraciones probadas.

**Tabla No. 5 Prueba de Cloro – Resistencia a la cepa No. 4803 B *Escherichia coli* con 10 minutos de tiempo de contacto**

Cloro Libre mg/L	Volumen Dosificado ( $\mu$ L)	UFC/100 ml
0,5	24	134
0,7	33	123
1	48	90
1,5	72	8
2	97	2

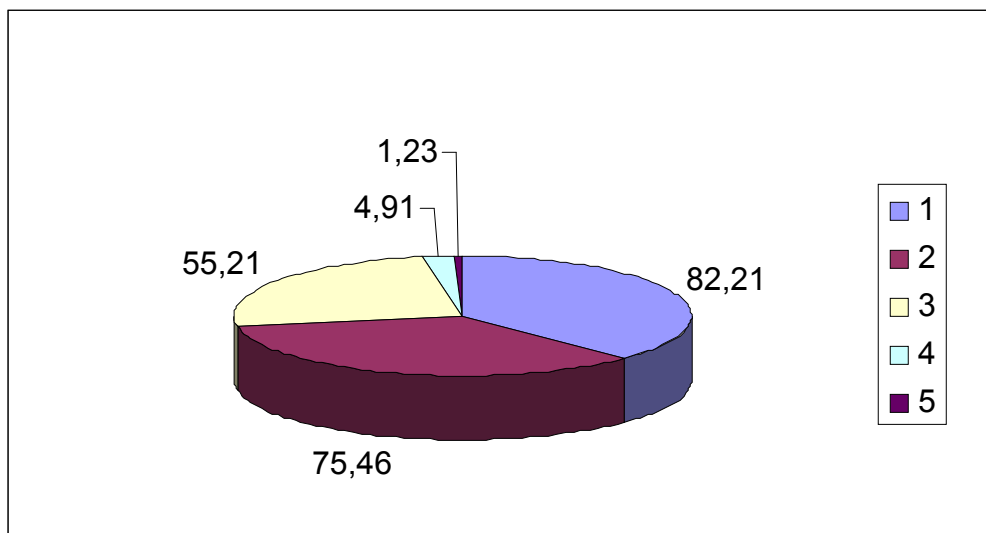
En la figura No. 6 se puede observar el decrecimiento considerable de las células de *Escherichia coli*, en todas las concentraciones, tras 10 minutos de contacto con la solución de cloro. Asimismo, se calculó el porcentaje de células resistentes a la acción del desinfectante (%R) con este tiempo de contacto. Ver tabla No. 6 y figura No. 7.



**Figura No. 6 Acción del cloro libre sobre la concentración celular de *E.coli* con 10 minutos de contacto**

**Tabla No. 6 %R y %I de *Escherichia coli* tras 10 minutos de contacto con cloro**

% Colonias resistentes al desinfectante Cepa No. 4803 B				
Cloro mg/L	Rto inicial UFC/100ml	Rto Final UFC/100ml	%I	%R
0,5	163	134	17,79	82,21
0,7	163	123	24,54	75,46
1	163	90	44,79	55,21
1,5	163	8	95,09	4,91
2	163	2	98,77	1,23



1: 0.5 mg/L de Cloro Libre    3: 1.0 mg/L de Cloro Libre    5: 2.0 mg/L de Cloro Libre  
 2: 0.7 mg/L de Cloro Libre    4: 1.5 mg/L de Cloro Libre

**Figura No. 7 % Colonias de *E. coli* resistentes al desinfectante (%R) en todas las concentraciones de cloro libre, con 10 minutos de contacto.**

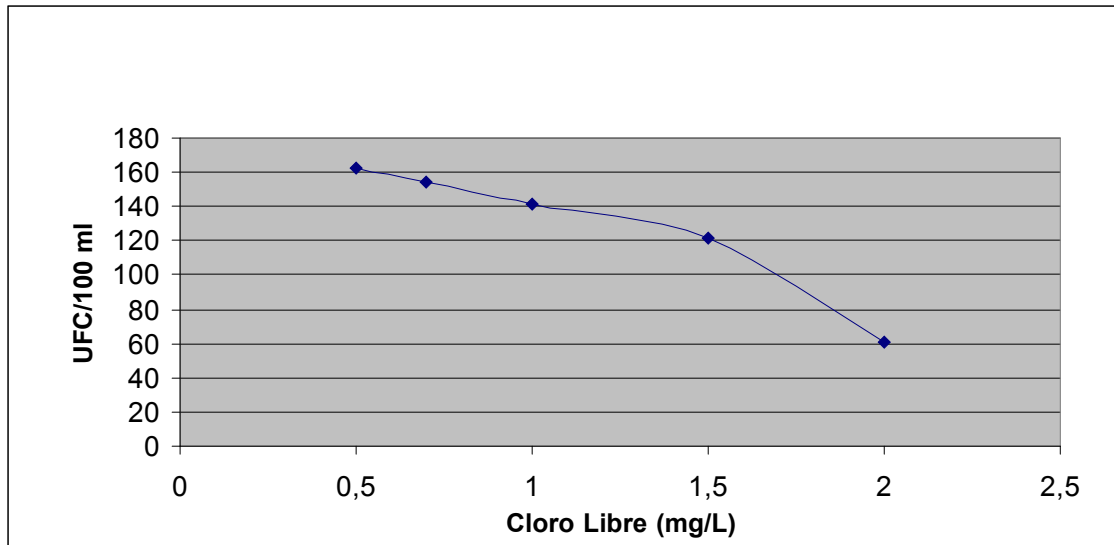


**Tabla No.7 Prueba de Cloro – Resistencia a la cepa No. 2936 *Enterobacter cloacae* con 10 minutos de tiempo de contacto**

<b>Cepa No. 2936 <i>Enterobacter cloacae</i></b>		
<b>Cloro Libre mg/L</b>	<b>Volumen Dosificado (<math>\mu</math>L)</b>	<b>UFC/100 ml</b>
0,5	24	3
0,7	33	0
1	48	0
1,5	72	0
2	97	0

**Tabla No.8 Prueba de Cloro – Resistencia a la cepa No. 2191 *Yersinia enterocolitica* Group con 10 minutos de tiempo de contacto**

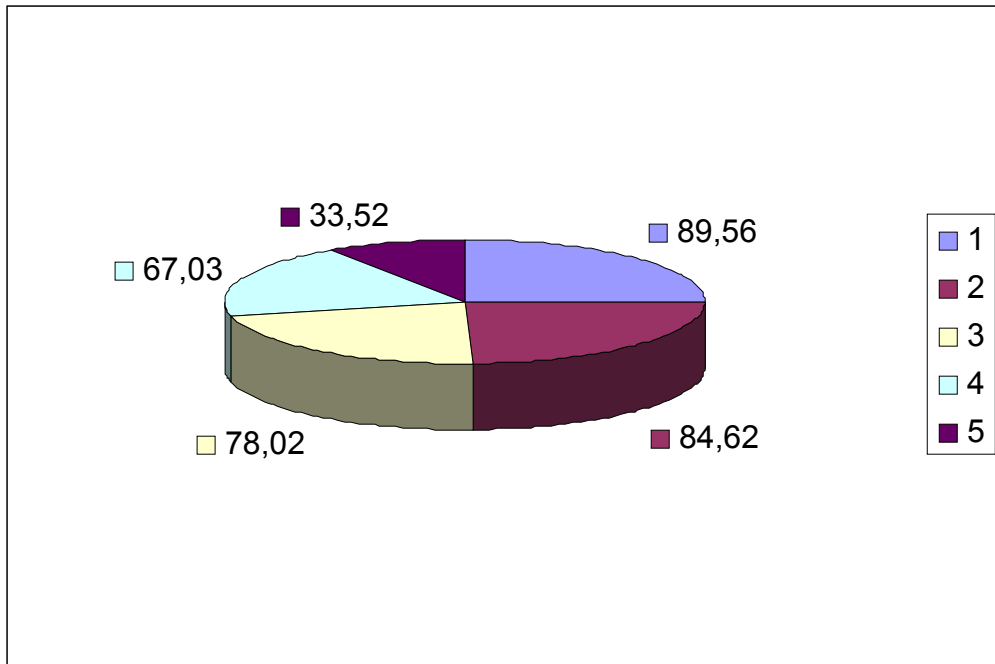
<b>Cepa No. 2191 <i>Yersinia enterocolitica</i> Group</b>		
<b>Cloro Libre mg/L</b>	<b>Volumen Dosificado (<math>\mu</math>L)</b>	<b>UFC/100 ml</b>
0,5	24	163
0,7	33	154
1	48	142
1,5	72	122
2	97	61



**Figura No. 8 Acción del cloro libre sobre la concentración celular de *Yersinia enterocolitica* Group con 10 minutos de contacto**

**Tabla No. 9 %R y %I de *Yersinia enterocolitica* Group tras 10 minutos de contacto con cloro**

% Colonias resistentes al desinfectante Cepa 2191				
Cloro mg/L	Rto inicial UFC/100ml	Rto Final UFC/100ml	%I	%R
0,5	182	163	10,44	89,56
0,7	182	154	15,38	84,62
1	182	142	21,98	78,02
1,5	182	122	32,97	67,03
2	182	61	66,48	33,52

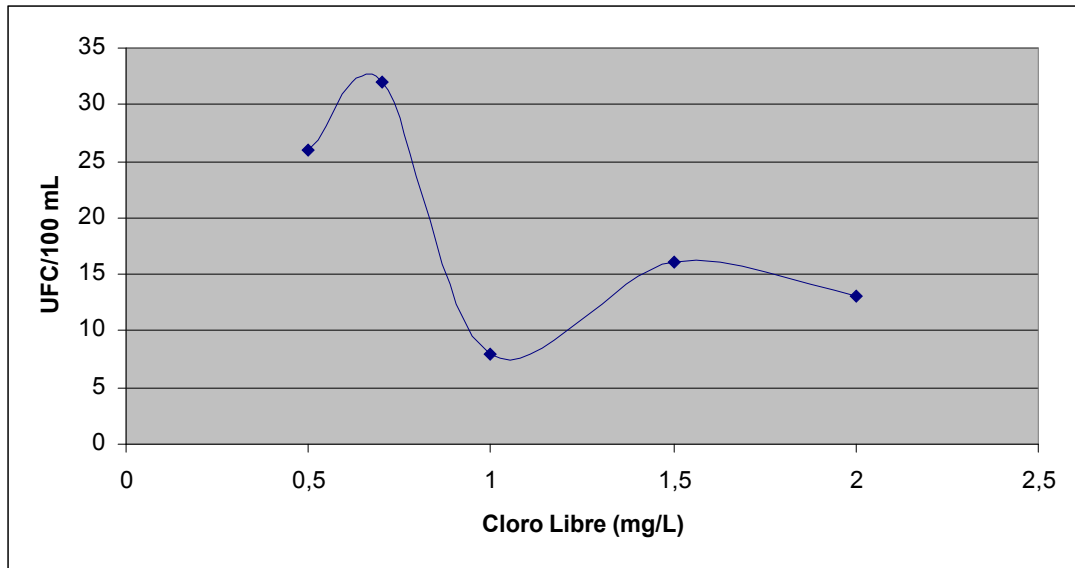


1: 0.5 mg/L de Cloro Libre    3: 1.0 mg/L de Cloro Libre    5: 2.0 mg/L de Cloro Libre  
 2: 0.7 mg/L de Cloro Libre    4: 1.5 mg/L de Cloro Libre

**Figura No. 9 % Colonias de *Y. enterocolitica* Group resistentes al desinfectante (%R) en todas las concentraciones de cloro libre, con 10 minutos de contacto.**

**Tabla No.10 Prueba de Cloro – Resistencia a la cepa No. 2579 *Klebsiella oxytoca* con 10 minutos de tiempo de contacto**

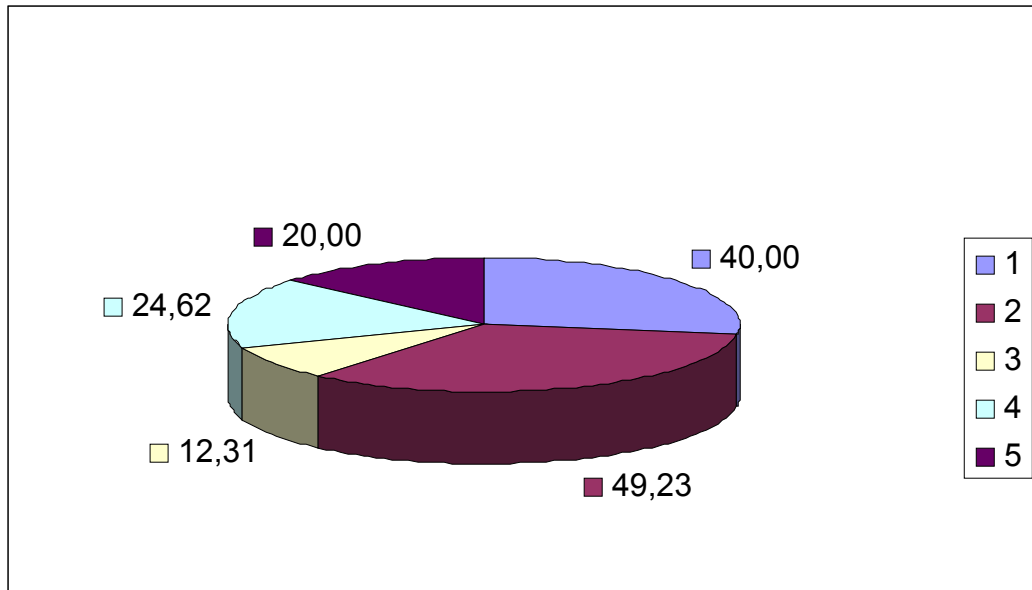
Cepa No. 2579 <i>Klebsiella oxytoca</i>		
Cloro Libre mg/L	Volumen Dosificado ( $\mu$ L)	UFC/100 ml
0,5	23,7	26
0,7	33,18	32
1	47,4	8
1,5	71,1	16
2	94,8	13



**Figura No. 10 Acción del cloro libre sobre la concentración celular de *Klebsiella oxytoca* con 10 minutos de contacto**

**Tabla No. 11. %R y %I de *Klebsiella oxytoca* tras 10 minutos de contacto con cloro**

% Colonias resistentes al desinfectante Cepa 2579				
Cloro mg/L	Rto inicial UFC/100ml	Rto Final UFC/100ml	%I	%R
0,5	65	26	60,00	40,00
0,7	65	32	50,77	49,23
1	65	8	87,69	12,31
1,5	65	16	75,38	24,62
2	65	13	80,00	20,00

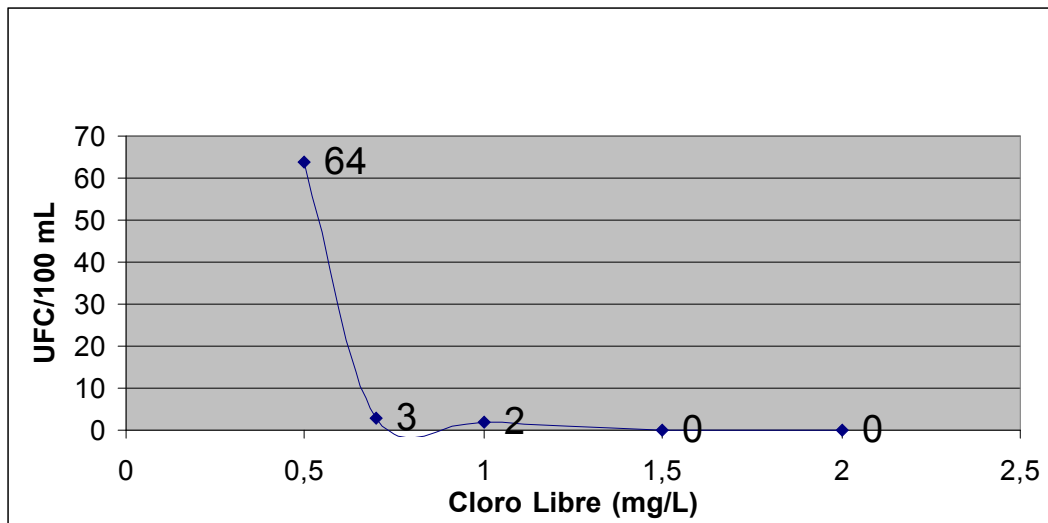


1: 0.5 mg/L de Cloro Libre    3: 1.0 mg/L de Cloro Libre    5: 2.0 mg/L de Cloro Libre  
 2: 0.7 mg/L de Cloro Libre    4: 1.5 mg/L de Cloro Libre

**Figura No. 11 % Colonias de *K. oxytoca* resistentes al desinfectante (%R) en todas las concentraciones de cloro libre con 10 minutos de contacto.**

**Tabla No. 12 Prueba de Cloro – Resistencia a la cepa No. 4803 A *Acinetobacter baumannii* con 10 minutos de tiempo de contacto**

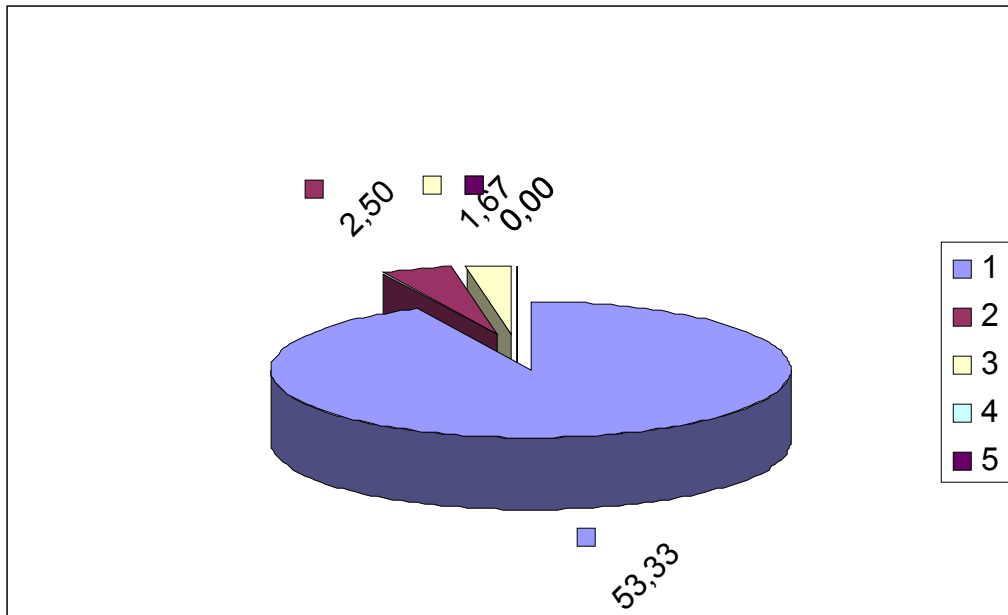
Cepa No. 4803 A <i>Acinetobacter baumannii</i>		
Cloro Libre mg/L	Volumen Dosificado ( $\mu$ L)	UFC/100 ml
0,5	19,84	64
0,7	27,74	3
1	39,69	2
1,5	59,54	0
2	79,39	0



**Figura No. 12 Acción del cloro libre sobre la concentración celular de *Acinetobacter baumannii* con 10 minutos de contacto**

**Tabla No. 13 %R y %I de *Acinetobacter baumannii* tras 10 minutos de contacto con cloro**

% Colonias resistentes al desinfectante Cepa 4803 A				
Cloro mg/L	Rto inicial UFC/100ml	Rto Final UFC/100ml	%I	%R
0,5	120	64	46,67	53,33
0,7	120	3	97,50	2,50
1	120	2	98,33	1,67
1,5	120	0	100,00	0,00
2	120	0	100,00	0,00



1: 0.5 mg/L de Cloro Libre    3: 1.0 mg/L de Cloro Libre    5: 2.0 mg/L de Cloro Libre  
 2: 0.7 mg/L de Cloro Libre    4: 1.5 mg/L de Cloro Libre

**Figura No. 13 % Colonias de *A. baumannii* resistentes al desinfectante (%R) en todas las concentraciones de cloro libre con 10 minutos de contacto.**

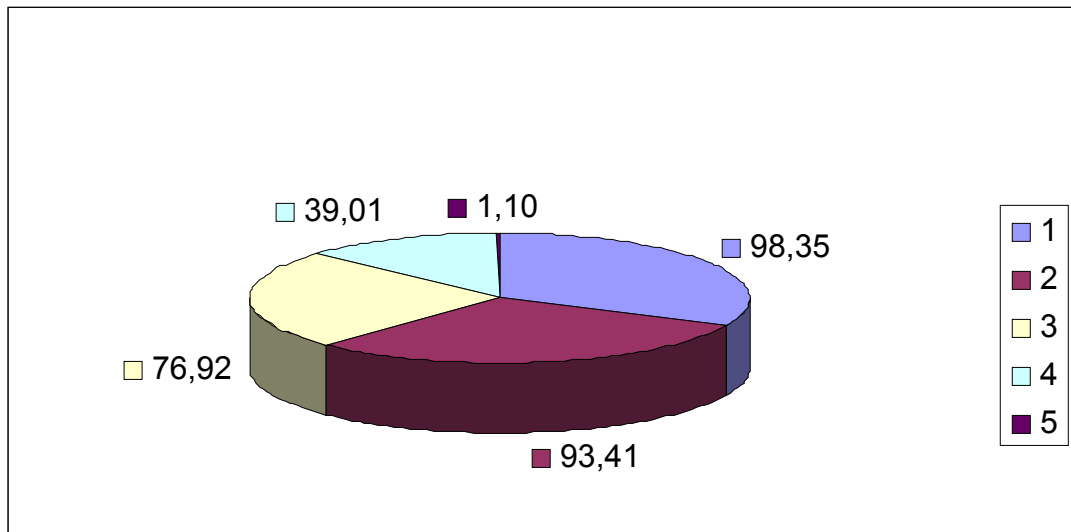
**Tabla No. 14 Prueba de Cloro – Resistencia a la cepa No. 8457 *Escherichia coli* con 10 minutos de tiempo de contacto**

Cepa No. 8457 <i>Escherichia coli</i>		
Cloro Libre mg/L	Volumen Dosificado ( $\mu$ L)	UFC/100 ml
0,5	19,84	179
0,7	27,74	170
1	39,69	140
1,5	59,54	71
2	79,39	2

**Figura No. 14 Acción del cloro libre sobre la concentración celular de *Escherichia coli* con 10 minutos de contacto**

**Tabla No. 15 %R y %I de *Escherichia coli* tras 10 minutos de contacto con cloro**

% Colonias resistentes al desinfectante Cepa 4803 A				
Cloro mg/L	Rto inicial UFC/100ml	Rto Final UFC/100ml	%I	%R
0,5	182	179	1,65	98,35
0,7	182	170	6,59	93,41
1	182	140	23,08	76,92
1,5	182	71	60,99	39,01
2	182	2	98,90	1,10



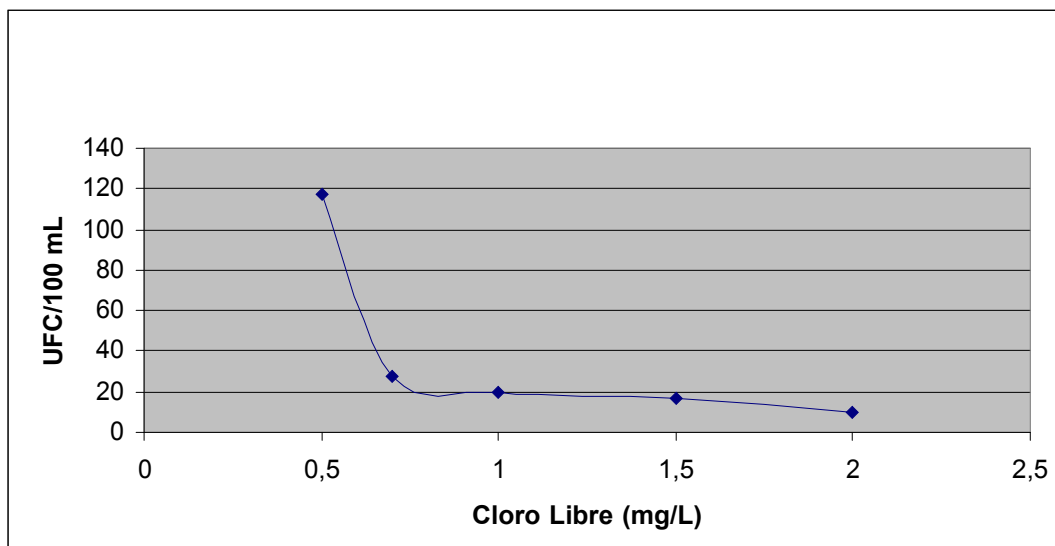
1: 0.5 mg/L de Cloro Libre    3: 1.0 mg/L de Cloro Libre    5: 2.0 mg/L de Cloro Libre  
 2: 0.7 mg/L de Cloro Libre    4: 1.5 mg/L de Cloro Libre

**Figura No. 15 % Colonias resistentes de *E. coli* al desinfectante (%R) en todas las concentraciones de cloro libre con 10 minutos de contacto**



**Tabla No. 16 Prueba de Cloro – Resistencia a la cepa No. 2873 *Aeromonas hydrophila* con 10 minutos de tiempo de contacto**

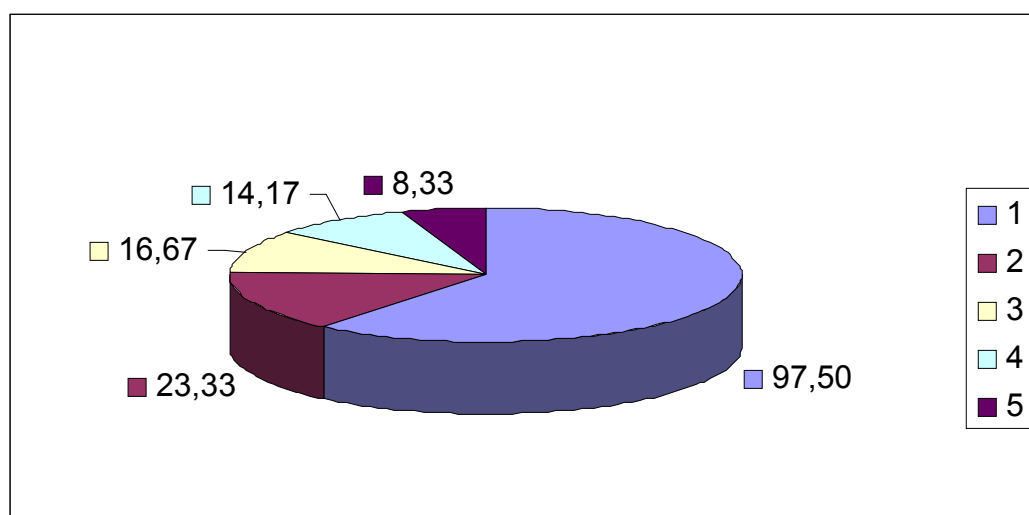
<b>Cepa No. 2873 <i>Aeromonas hydrophila</i></b>		
<b>Cloro Libre mg/L</b>	<b>Volumen Dosificado (<math>\mu</math>L)</b>	<b>UFC/100 ml</b>
0,5	21,61	117
0,7	30,26	28
1	43,23	20
1,5	64,84	17
2	86,45	10



**Figura No. 16 Acción del cloro libre sobre la concentración celular de *Aeromonas hydrophila* con 10 minutos de contacto**

**Tabla No. 17 %R y %I de *Aeromonas hydrophila* tras 10 minutos de contacto con cloro**

% Colonias resistentes al desinfectante Cepa 2873				
Cloro mg/L	Rto inicial UFC/100ml	Rto Final UFC/100ml	%I	%R
0,5	120	117	2,50	97,50
0,7	120	28	76,67	23,33
1	120	20	83,33	16,67
1,5	120	17	85,83	14,17
2	120	10	91,67	8,33

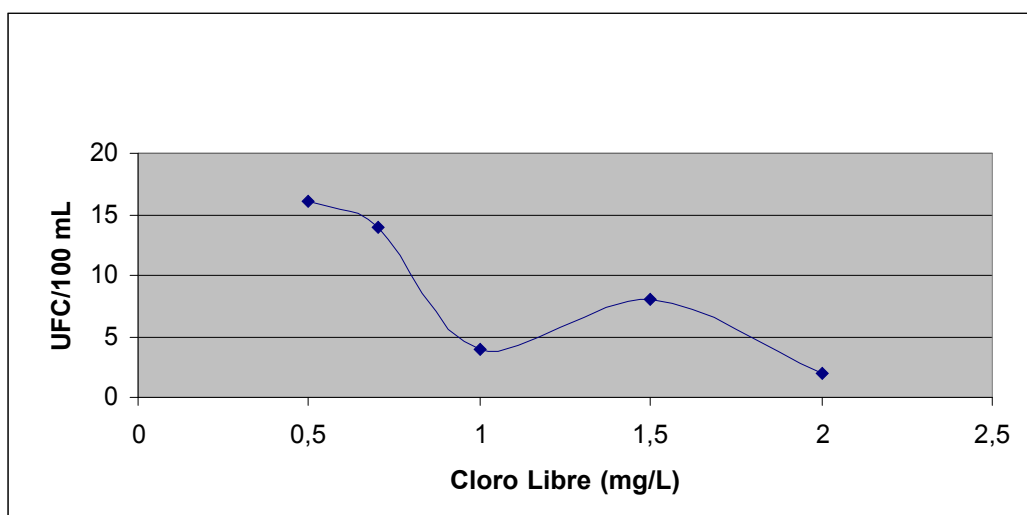


1: 0.5 mg/L de Cloro Libre    3: 1.0 mg/L de Cloro Libre    5: 2.0 mg/L de Cloro Libre  
 2: 0.7 mg/L de Cloro Libre    4: 1.5 mg/L de Cloro Libre

**Figura No. 17 % Colonias de *A. hydrophila* resistentes al desinfectante (%R) en todas las concentraciones de cloro libre con 10 minutos de contacto.**

**Tabla No. 18 Prueba de Cloro – Resistencia a la cepa No. 3862 B *Sphingobacterium multivorum* con 10 minutos de tiempo de contacto**

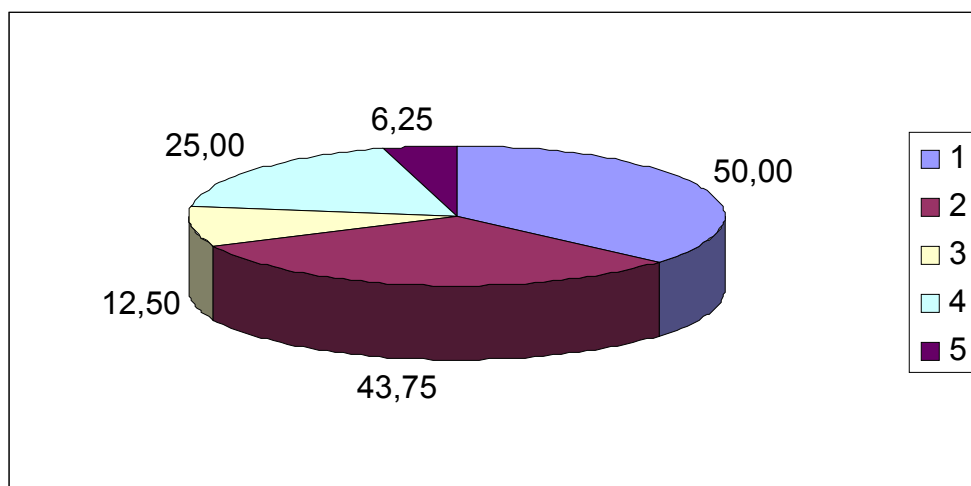
<b>Cepa No. 3862 B <i>Sphingobacterium multivorum</i></b>		
<b>Cloro Libre mg/L</b>	<b>Volumen Dosificado (<math>\mu</math>L)</b>	<b>UFC/100 ml</b>
0,5	23,7	16
0,7	33,18	14
1	47,4	4
1,5	71,1	8
2	94,8	2



**Figura No. 18 Acción del cloro libre sobre la concentración celular de *Sphingobacterium multivorum* con 10 minutos de contacto**

**Tabla No. 19 %R y %I de *Sphingobacterium multivorum* tras 10 minutos de contacto con cloro**

% Colonias resistentes al desinfectante Cepa 2873				
Cloro mg/L	Rto inicial UFC/100ml	Rto Final UFC/100ml	%I	%R
0,5	32	16	50,00	50,00
0,7	32	14	56,25	43,75
1	32	4	87,50	12,50
1,5	32	8	75,00	25,00
2	32	2	93,75	6,25



1: 0.5 mg/L de Cloro Libre    3: 1.0 mg/L de Cloro Libre    5: 2.0 mg/L de Cloro Libre  
 2: 0.7 mg/L de Cloro Libre    4: 1.5 mg/L de Cloro Libre

**Figura No. 19 % Colonias de *S. multivorum* resistentes al desinfectante (%R) en todas las concentraciones de cloro libre con 10 minutos de contacto.**

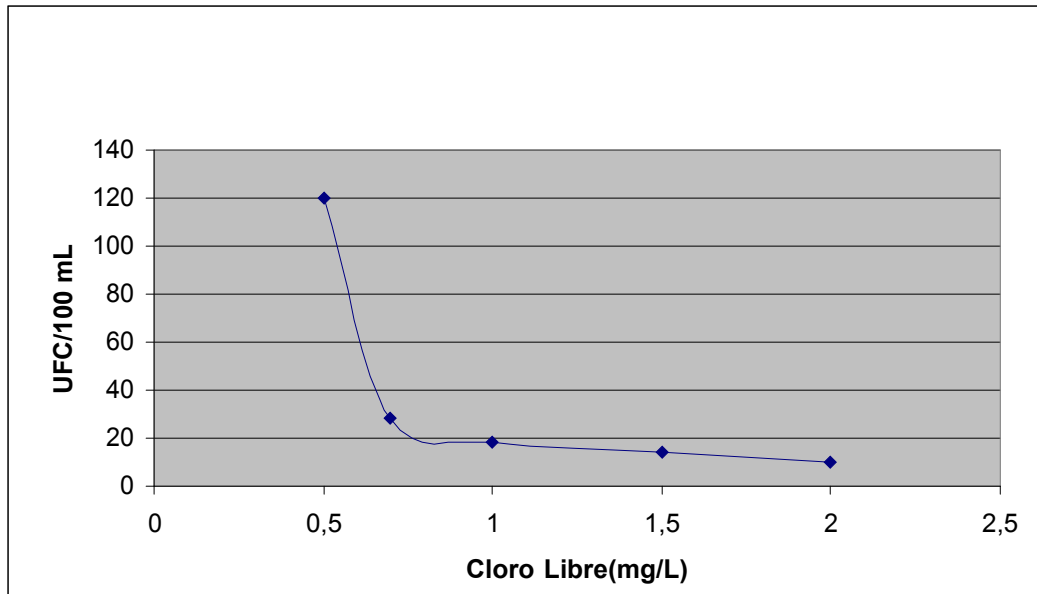
Las cepas radicadas con los numeros 3492 *Enterobacater cloacae* y la 4618 *Cryseobacterium meningosepticum* no crecieron en ninguna de las diferentes concentraciones de cloro con 10 minutos de contacto a las que fueron expuestas.

❖ **15 Minutos de Tiempo de Contacto**

Las pruebas de Cloro – Resistencia con un tiempo de contacto de 15 minutos se realizaron a las cepas que habían presentado crecimiento después de haber sido sometidas al contacto con el cloro durante 10 minutos. Las cepas que no se enfrentaron al cloro con 15 minutos de contacto fueron las 2936 y 3492 (*Enterobacter cloacae*), la 4803 A (*Acinetobacter baumannii*) y la 4618 *Cryseobacterium meningosepticum* debido a que el crecimiento de estas cepas fue muy bajo o nulo con tan solo 10 minutos de tiempo de contacto con el desinfectante. Los resultados de las pruebas de Cloro – Resistencia con un tiempo de contacto de 15 minutos para el resto de las cepas, se encuentran descritos en las tablas y figuras que se presentan a continuación:

**Tabla No. 20 Prueba de Cloro – Resistencia a la cepa No. 4803 B *Escherichia coli* con 15 minutos de tiempo de contacto**

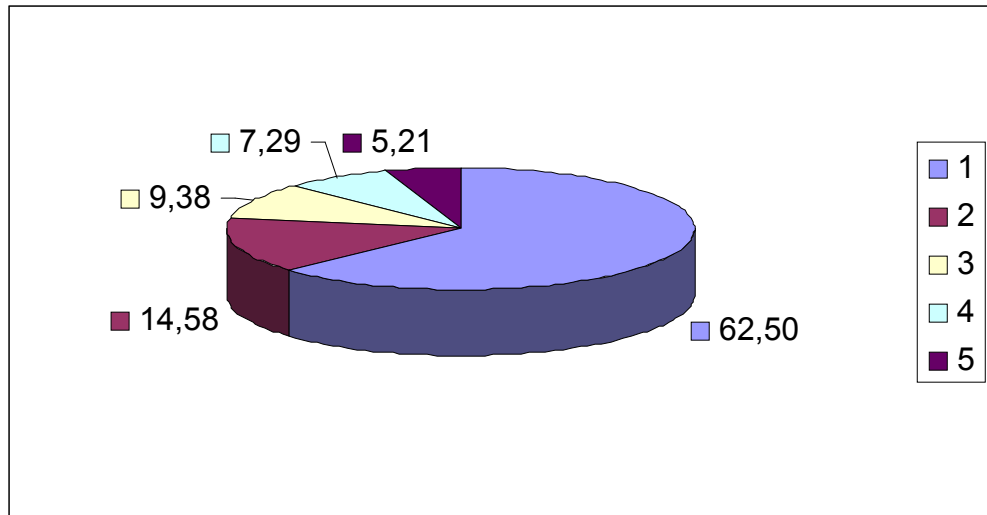
<b>CepaNo. 4803 B <i>Escherichia coli</i></b>		
<b>Cloro Libre mg/L</b>	<b>Volumen Dosificado (μL)</b>	<b>UFC/100 ml</b>
0,5	21,61	120
0,7	30,26	28
1	43,23	18
1,5	64,84	14
2	86,45	10



**Figura No. 20 Acción del cloro libre sobre la concentración celular de *Escherichia coli* con 15 minutos de contacto**

**Tabla No. 21 %R y %I de *Escherichia coli* tras 15 minutos de contacto con cloro**

% Células resistentes al desinfectante Cepa 4803B				
Cloro mg/L	Rto inicial UFC/100ml	Rto Final UFC/100ml	%I	%R
0,5	192	120	37,50	62,50
0,7	192	28	85,42	14,58
1	192	18	90,63	9,38
1,5	192	14	92,71	7,29
2	192	10	94,79	5,21

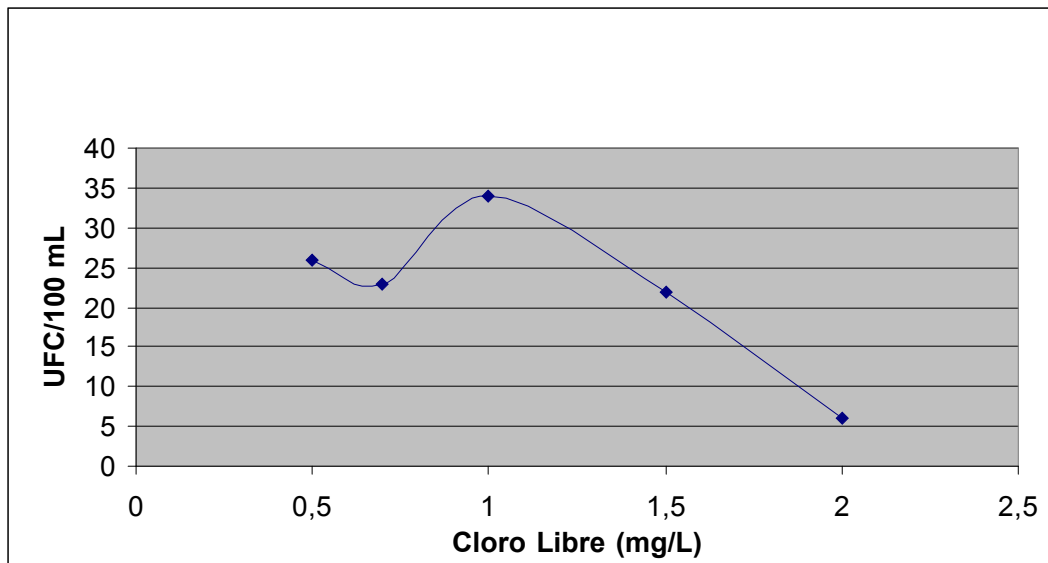


1: 0.5 mg/L de Cloro Libre    3: 1.0 mg/L de Cloro Libre    5: 2.0 mg/L de Cloro Libre  
 2: 0.7 mg/L de Cloro Libre    4: 1.5 mg/L de Cloro Libre

**Figura No. 21 % Células de *E. coli* resistentes al desinfectante (%R) en todas las concentraciones de cloro libre con 15 minutos de contacto.**

**Tabla No. 22 Prueba de Cloro – Resistencia a la cepa No. 2191 *Yersinia enterocolitica* Group con 15 minutos de tiempo de contacto**

Cepa No. 2191 <i>Yersinia enterocolitica</i> Group		
Cloro Libre mg/L	Volumen Dosificado ( $\mu$ L)	UFC/100 ml
0,5	23,7	26
0,7	33,18	23
1	47,4	34
1,5	71,1	22
2	94,8	6

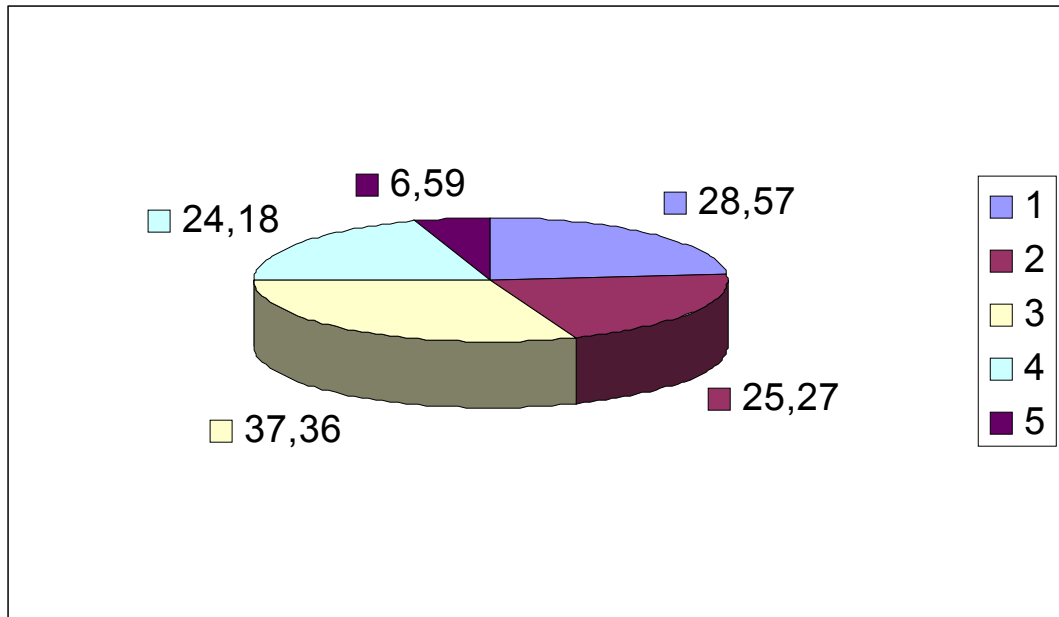


**Figura No. 22 Acción del cloro libre sobre la concentración celular de *Yersinia enterocolitica* Group con 15 minutos de contacto**

**Tabla No. 23 %R y %I de *Yersinia enterocolitica* Group tras 15 minutos de contacto con cloro**

% Células resistentes al desinfectante Cepa 2191				
Cloro mg/L	Rto inicial UFC/100ml	Rto Final UFC/100ml	%I	%R
0,5	91	26	71,43	28,57
0,7	91	23	74,73	25,27
1	91	34	62,64	37,36
1,5	91	22	75,82	24,18
2	91	6	93,41	6,59



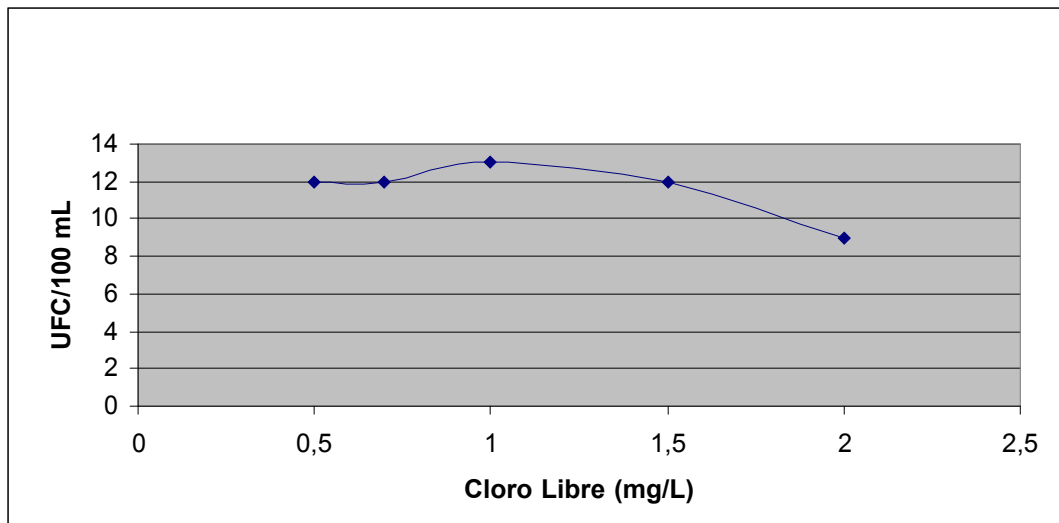


1: 0.5 mg/L de Cloro Libre    3: 1.0 mg/L de Cloro Libre    5: 2.0 mg/L de Cloro Libre  
 2: 0.7 mg/L de Cloro Libre    4: 1.5 mg/L de Cloro Libre

**Figura No. 23 % Colonias de *Y. enterocolitica* Group resistentes al desinfectante (%R) en todas las concentraciones de cloro libre con 15 minutos de contacto.**

**Tabla No. 24 Prueba de Cloro – Resistencia a la cepa No. 2579 *Klebsiella oxytoca* con 15 minutos de tiempo de contacto**

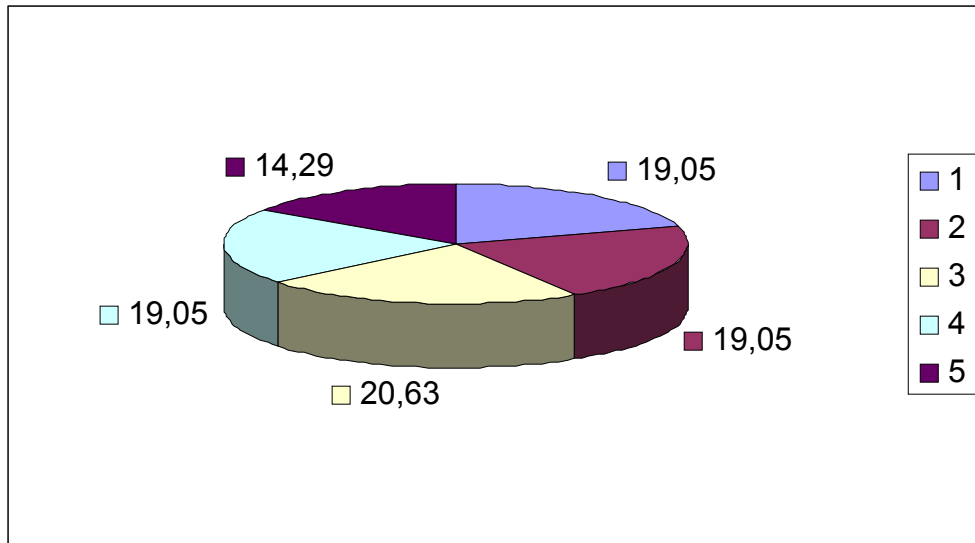
Cepa No. 2579 <i>Klebsiella oxytoca</i>		
Cloro Libre mg/L	Volumen Dosificado ( $\mu$ L)	UFC/100 ml
0,5	23,7	12
0,7	33,18	12
1	47,4	13
1,5	71,1	12
2	94,8	9



**Figura No. 24 Acción del cloro libre sobre la concentración celular de *Klebsiella oxytoca* con 15 minutos de contacto**

**Tabla No. 25 %R y %I de *Klebsiella oxytoca* tras 15 minutos de contacto con cloro**

% Células resistentes al desinfectante Cepa 2579				
Cloro mg/L	Rto inicial UFC/100ml	Rto Final UFC/100ml	%I	%R
0,5	63	12	80,95	19,05
0,7	63	12	80,95	19,05
1	63	13	79,37	20,63
1,5	63	12	80,95	19,05
2	63	9	85,71	14,29

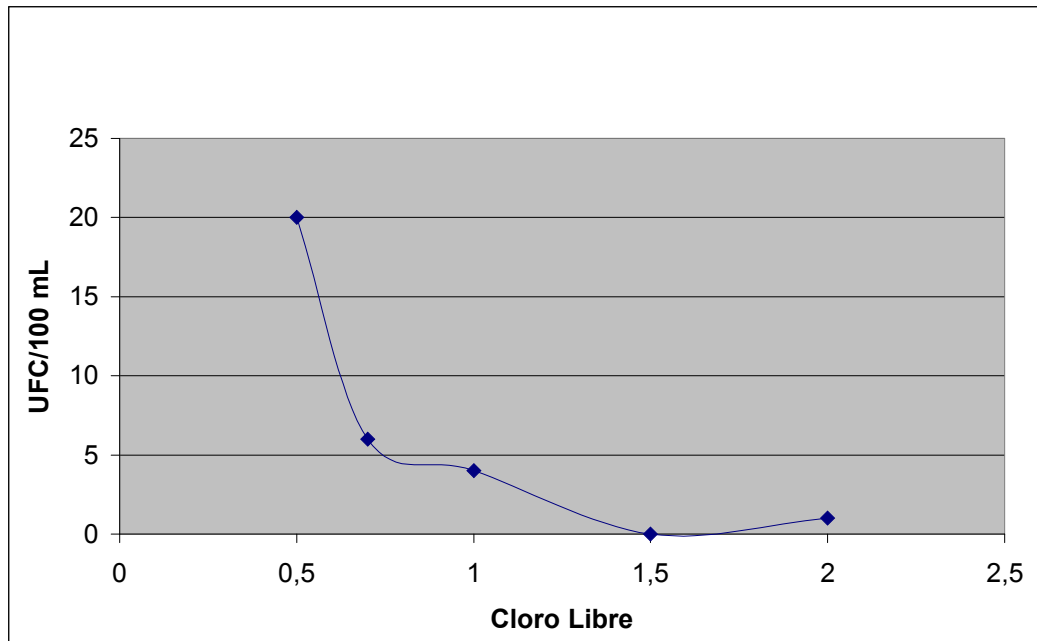


1: 0.5 mg/L de Cloro Libre    3: 1.0 mg/L de Cloro Libre    5: 2.0 mg/L de Cloro Libre  
 2: 0.7 mg/L de Cloro Libre    4: 1.5 mg/L de Cloro Libre

**Figura No. 25 % Células de *K oxytoca* resistentes al desinfectante (%R) en todas las concentraciones de cloro libre con 15 minutos de contacto.**

**Tabla No. 26 Prueba de Cloro – Resistencia a la cepa No. 8457 *Escherichia coli* con 15 minutos de tiempo de contacto**

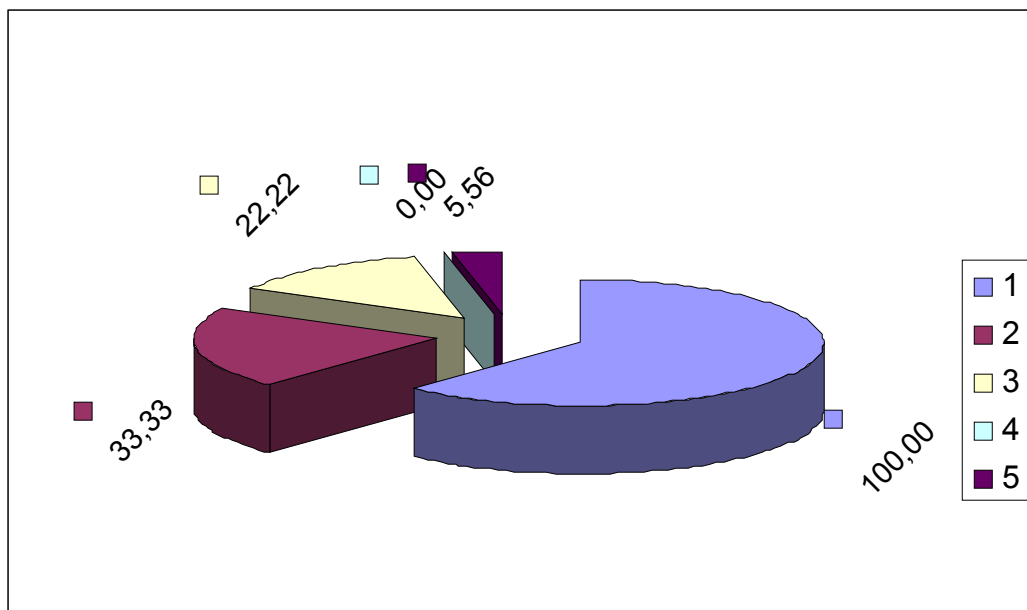
Cepa No. 8457 <i>Escherichia coli</i>		
Cloro Libre mg/L	Volumen Dosificado ( L )	UFC/100 ml
0,5	23,4	20
0,7	32,76	6
1	46,81	4
1,5	70,21	0
2	93,61	1



**Figura No. 26 Acción del cloro libre sobre la concentración celular de *Escherichia coli* con 15 minutos de contacto**

**Tabla No. 27 %R y %I de *Escherichia coli* tras 15 minutos de contacto con cloro**

% Células resistentes al desinfectante Cepa 8457				
Cloro mg/L	Rto inicial UFC/100ml	Rto Final UFC/100ml	%I	%R
0,5	18	20	0,00	100,00
0,7	18	6	66,67	33,33
1	18	4	77,78	22,22
1,5	18	0	100,00	0,00
2	18	1	94,44	5,56



1: 0.5 mg/L de Cloro Libre    3: 1.0 mg/L de Cloro Libre    5: 2.0 mg/L de Cloro Libre  
 2: 0.7 mg/L de Cloro Libre    4: 1.5 mg/L de Cloro Libre

**Figura No. 27 % Colonias de *E. coli* resistentes al desinfectante (%R) en todas las concentraciones de cloro libre con 15 minutos de contacto.**

Las cepas radicadas con los numeros 2873 *Aeromonas hydrophila* y la 3862B *Shingobacterium multivorum* no crecieron en ninguna de las diferentes concentraciones de cloro con 15 minutos de contacto a las que fueron expuestas.

❖ **30 Minutos de Tiempo de Contacto**

**Tabla No. 28 Prueba de Cloro – Resistencia a la cepa No. 4803 B *Escherichia coli* con 30 minutos de tiempo de contacto**

CepaNo. 4803 B <i>Escherichia coli</i>		
Cloro Libre mg/L	Volumen Dosificado (uL)	UFC/100 ml
0,5	23,4	0
0,7	32,76	0
1	46,81	0
1,5	70,21	0
2	93,61	0

**Tabla No. 29 %R y %I de *Escherichia coli* tras 30 minutos de contacto con cloro**

<b>% Células resistentes al desinfectante Cepa 4803B</b>				
<b>Cloro mg/L</b>	<b>Rto inicial UFC/100ml</b>	<b>Rto Final UFC/100ml</b>	<b>%I</b>	<b>%R</b>
0,5	18	0	100,00	0,00
0,7	18	0	100,00	0,00
1	18	0	100,00	0,00
1,5	18	0	100,00	0,00
2	18	0	100,00	0,00

**Tabla No. 30 Prueba de Cloro – Resistencia a la cepa No. 2579 *Klebsiella oxytoca* con 30 minutos de tiempo de contacto**

<b>Cepa No. 2579 <i>Klebsiella oxytoca</i></b>		
<b>Cloro Libre mg/L</b>	<b>Volumen Dosificado (uL)</b>	<b>UFC/100 ml</b>
0,5	23,4	0
0,7	32,76	0
1	46,81	0
1,5	70,21	0
2	93,61	0

**Tabla No. 31 %R y %I de *Klebsiella oxytoca* tras 30 minutos de contacto con cloro**

<b>% Células resistentes al desinfectante Cepa 2579</b>				
<b>Cloro mg/L</b>	<b>Rto inicial UFC/100ml</b>	<b>Rto Final UFC/100ml</b>	<b>%I</b>	<b>%R</b>
0,5	14	0	100,00	0,00
0,7	14	0	100,00	0,00
1	14	0	100,00	0,00
1,5	14	0	100,00	0,00
2	14	0	100,00	0,00

**Tabla No. 32 Prueba de Cloro – Resistencia a la cepa No. 2191 *Yersinia enterocolitica* Group con 30 minutos de tiempo de contacto**

<b>Cepa No. 2191 <i>Yersinia enterocolitica</i> Group</b>		
<b>Cloro Libre mg/L</b>	<b>Volumen Dosificado (uL)</b>	<b>UFC/100 ml</b>
0,5	23,4	0
0,7	32,76	0
1	46,81	0
1,5	70,21	0
2	93,61	0

**Tabla No. 33 %R y %I de *Yersinia enterocolitica* Group tras 30 minutos de contacto con cloro**

<b>% Células resistentes al desinfectante Cepa 2191</b>				
<b>Cloro mg/L</b>	<b>Rto inicial UFC/100ml</b>	<b>Rto Final UFC/100ml</b>	<b>%I</b>	<b>%R</b>
0,5	38	0	100,00	0,00
0,7	38	0	100,00	0,00
1	38	0	100,00	0,00
1,5	38	0	100,00	0,00
2	38	0	100,00	0,00

**Tabla No. 34 Prueba de Cloro – Resistencia a la cepa No. 8457 *Escherichia coli* con 30 minutos de tiempo de contacto**

<b>CepaNo. 8457 <i>Escherichia coli</i></b>		
<b>Cloro Libre mg/L</b>	<b>Volumen Dosificado (uL)</b>	<b>UFC/100 ml</b>
0,5	23,4	0
0,7	32,76	0
1	46,81	0
1,5	70,21	0
2	93,61	0

**Tabla No. 35 %R y %I de *Escherichia coli* tras 30 minutos de contacto con cloro**

<b>% Células resistentes al desinfectante Cepa 8457</b>				
<b>Cloro mg/L</b>	<b>Rto inicial UFC/100ml</b>	<b>Rto Final UFC/100ml</b>	<b>%I</b>	<b>%R</b>
0,5	18	0	100,00	0,00
0,7	18	0	100,00	0,00
1	18	0	100,00	0,00
1,5	18	0	100,00	0,00
2	18	0	100,00	0,00

#### **4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

Los Coliformes son conocidos mundialmente como las bacterias indicadoras de contaminación en el agua potable. En la mayoría de las entidades encargadas de la salubridad del agua para consumo humano, se realizan pruebas para detectar este grupo de bacterias como única medida de control sobre microorganismos altamente patógenos, causantes de graves epidemias como cólera, gastroenteritis, diarrea, disentería, entre otras.

Para que los resultados obtenidos tengan sentido, las bacterias indicadoras han de responder a determinados criterios. Deben estar universalmente presentes en gran número en las heces de los seres humanos y los 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 el grado que se eliminan durante el tratamiento de esta sean similares a los de los patógenos. (OMS, 1995).

Sin embargo, en las aguas tratadas no deberían detectarse bacterias coliformes y cuando las hay, existe la posibilidad de que ciertas bacterias



patógenas, pertenecientes a la familia de las Enterobacterias, se encuentren igualmente presentes en el sistema de distribución.

A pesar de los múltiples tratamientos a los que es sometida el agua cruda para potabilizarla, entre los que se encuentra la desinfección con cloro, se han presentado casos positivos de Coliformes y *Escherichia coli* en el agua de distribución del Acueducto de Bogotá, como también en muchos otros acueductos a nivel mundial. Como respuesta a estas inconformidades, se ha tratado de investigar cuales son las causas de la presencia de estos microorganismos en las muestras de agua potable analizadas por el laboratorio de Aguas del Acueducto de Bogotá.

Debido a que no se ha encontrado una falla aparente en el tratamiento realizado en las plantas, puesto que normalmente se están manejando aguas con turbiedades cercanas a 1 UNT, (en comparación con lo máximo permitido por el decreto 475 de 1998, que indica que no debe ser mayor a 5 UNT); y al mismo tiempo, se están manejando promedios de cloro libre dentro del rango indicado por el decreto, 0.2 – 1.0 mg/L, se formuló la hipótesis que explica este hecho debido a la existencia de cepas de coliformes nativas cloro-resistentes.

Soportando este supuesto, un limitado número de estudios ha evaluado la resistencia de bacterias al proceso de desinfección, manejando diferentes variables. Lisle *et al*,(1998), encontró cierta resistencia de *Escherichia coli* O157:H7 a la desinfección con cloro, después de haber sometido a las cepas a un periodo de estrés, causado por inanición. Concluyó en su estudio que la Cloro –Resistencia se incrementó progresivamente a medida que aumentaba el periodo de inanición, demostrando, a la vez, que *E. coli* se adapta a las condiciones de estrés, desarrollando un fenotipo de Cloro- Resistencia.

Al mismo tiempo, Palmateer and Dake (2001), al examinar las posibles causas de contaminación de las fuentes de agua municipales y del

sistema de distribución del acueducto de Walkerton, Ontario (Canada), ya que se estaban presentando casos positivos de Coliformes, encontraron que probablemente la prevalencia de estos microorganismos, se debía a la presencia de Biofilm en sus tuberías y que al mismo tiempo, gracias a la formación de la biopelícula, se estaban presentando casos de Cloro – Resistencia. Los resultados mostraron que después del lavado y la cloración del sistema de distribución, la ocurrencia de resultados adversos en la red, incluyendo detección de Coliformes y altos recuentos de bacterias heterotróficas, decreció todo el tiempo; pero que a pesar de estos resultados, aun se encontraban muestras positivas en el análisis de Coliformes. Por esta causa, se aislaron bacterias coliformes del sistema de distribución de Walkerton, y se encontró que estas bacterias, identificadas como *Klebsiella sp.* y *Enterobacter sp.* fueron resistentes a elevadas concentraciones de cloro, (mayores a 1.5 mg/L de Cloro Libre). En un estudio comparativo, *Klebsiella sp.* y *Enterobacter sp.* aisladas de este mismo sistema de distribución, mostraron un incremento en la Cloro-Resistencia, cuando fueron comparadas con *Escherichia coli*.

Por otro lado, Abu-shkara *et al.*,(1998), al intentar demostrar el efecto de la alteración de los ácidos grasos de las bacterias coliformes en la desinfección, puesto que se estaba generando presencia de estas bacterias en agua desinfectada con Cloro Libre Residual (cerca a 1 mg/L) en un acueducto en Israel, encontró que los efectos de la nutrición en la composición de los ácidos grasos de las bacterias estudiadas, (*Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter taylorae*), mostraron un patrón variable con cada cepa bacteriana. Sin embargo, observó que el crecimiento bacteriano en un medio líquido generó una mayor resistencia al cloro. Mientras que los resultados por los efectos de la temperatura, mostraron que el crecimiento bacteriano a bajas temperaturas las hace más resistentes a la desinfección. Por último concluyó que los análisis de los ácidos grasos fallaron al revelar un patrón constante y variabilidad entre las cepas.

En el presente estudio, se abordó el problema de Cloro – Resistencia in vitro bajo condiciones controladas de laboratorio sin tener en cuenta todas las variables de proceso de tratamiento que pueden afectar la desinfección. Para tal fin, se enfrentaron las muestras con una solución de cloro gaseoso, similar al utilizado en la planta de tratamiento Francisco Wiesner. Igualmente, los recuentos de las colonias que resultaron positivas, se sembraron en medio Chromocult el cual es utilizado en el laboratorio para la detección de los Coliformes y *Escherichia coli*, mediante la técnica de Filtración por Membrana.

Al realizar la identificación bioquímica de las cepas aisladas, se detectó presencia de falsos positivos generados por el medio Chromocult, puesto que se estaban reportando colonias positivas de Enterobacterias, las cuales presentaban las mismas características macroscópicas de los Coliformes (Tabla 3). Es decir, colonias rojas-salmón, indicativo de la presencia de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa, característica de los Coliformes, la cual escinde el sustrato Salmon-Gal después de 24 horas de incubación. El falso positivo se debió a problemas de selectividad del medio; la casa comercial Merck sugiere el uso del nuevo suplemento selectivo para E.coli y coliformes, cuando se analizan muestras muy contaminadas. Este suplemento contiene cefsulodina y vancomicina que inhiben la flora acompañante.

Se realizó el enfrentamiento de estas 5 cepas al cloro, (*Yersinia enterocolitica* Group, *Aeromonas hydrophila*, *Cryseobacterium meningosepticum*, *Sphingobacterium multivorum* y *Acinetobacter baumannii*), puesto que fueron aisladas también de las muestras de agua potable y su incidencia sanitaria es de consideración. No obstante, es necesario tener en cuenta que al usar Chromocult, el factor de recuperación de las bacterias enteropatógenicas no puede ser del 100%, puesto que el medio contiene componentes selectivos y adicionalmente

las bacterias se pueden encontrar injuriadas debido al estrés de la exposición acuática lo cual ha sido demostrado previamente en otros estudios (Lisle *et al.*, 1998).

A pesar de esto, se ha encontrado crecimiento de la mayoría de las cepas aisladas de las muestras de agua potable, indicando Cloro- Resistencia a concentraciones de cloro libre. La cepa No. 4803 B *Escherichia coli*, después de haber sido sometida a la solución de cloro durante 10 minutos (Tabla No. 4 y Figura No. 6), presentó una caída exponencial en su concentración celular en las concentraciones de Cloro Residual Libre de 0.5 a 1.0 mg/L y una disminución menos considerable en las concentraciones 1.5 a 2.0 mg/L de cloro Libre. Cabe anotar, que a pesar de la considerable disminución de la concentración bacteriana, se observó que los 10 minutos de tiempo de contacto, no fueron suficientes para acabar con la totalidad de la población bacteriana.

Por otro lado, a pesar de que se propuso trabajar con una concentración bacteriana inicial menor a 30 UFC/100 ml, para asemejar en lo mayor posible las concentraciones de agua cruda manejadas en la planta, no fue posible debido a la dificultad de preparar concentraciones mayores de  $10^8$  UFC/100 ml a tan solo 30 o menos UFC/100 ml . No obstante, se decidió reportar estos datos, puesto que el numero de organismos presentes en el agua no afecta el proceso de desinfección. La misma concentración y tiempo de contacto del desinfectante se necesitan para matar una gran cantidad de microorganismos que una pequeña, siempre y cuando la temperatura y el pH sean los mismos (Arboleda, 1992). En este estudio, se trabajó siempre con agua destilada estéril a temperatura ambiente, la cual oscilaba en el laboratorio, durante los meses de estudio, entre 17°C a 20°C; asimismo, el pH de todas las muestras, nunca supero las 7.5 unidades, favoreciendo la estabilidad de las cepas, puesto que las bacterias son altamente susceptibles a potenciales de hidrógeno muy

altos o muy bajos. Teóricamente, *Escherichia coli* sobrevive menos de 8 horas a pH de 12. (Arboleda, 1992).

El tipo de microorganismos en cambio si influye notablemente en los resultados, pues la sensibilidad de cada especie varia según el desinfectante (Arboleda, 1992). La supervivencia de bacterias entéricas a la desinfección, depende de muchos factores mencionados anteriormente, como la capacidad de formar conglomerados o agregados bacterianos, los cuales les puede conferir mayor resistencia a la desinfección al impedir un contacto total oxidante del cloro sobre las bacterias; la temperatura, ya que el crecimiento bacteriano a bajas temperaturas las hace mas resistente a la cloración (Abu-Shkara *et al.*, 1998).

Contrariamente, con una baja concentración de sólidos suspendidos, los patógenos son inhibidos con una pequeña dosis de desinfectante. No obstante, cuando la concentración de sólidos suspendidos es mayor, el proceso de desinfección es controlado por dos mecanismos diferentes. La fase de desinfección inicial mata pequeñas colonias individuales. La mayor parte de muerte bacteriana, ocurre en este paso, sin embargo, las bacterias restantes atrapadas en sólidos no son usualmente afectadas (EPA, 1999).

Igualmente, la rata de destrucción de bacterias entéricas aumenta o disminuye con el tiempo debido a (Arboleda, 1992): Errores experimentales, distinta susceptibilidad de los organismos, mezcla inapropiada de los desinfectantes con el agua, existencia de colonias de bacterias de tamaños variados que establecen una concentración no uniforme de los organismos en el liquido y la presencia de sustancias interferentes que impiden mantener un residual adecuado con ciertos desinfectantes.

Esta interferencia se podría dar *in vivo* en la red de distribución debido a la formación de biofilm, el cual fue analizado por el Acueducto de Bogotá en el año 2000 y en el cual se encontró presencia de enterobacterias entre las que se encuentran las analizadas en este estudio (Riano *et al.*, 2000); residuos metálicos de las tuberías, etc., o en la planta por fallas en el control de la turbiedad, lo cual podría conllevar a otorgar cloro resistencia a ciertas bacterias o simplemente, impedir que el cloro tenga un efecto residual adecuado.

Para impedir que cualquier interferencia se involucrara en las pruebas *in vitro*, las diluciones con las que se trabajaron, se realizaron en agua destilada estéril sin adicionar ningún otro compuesto que pueda sustituir la materia orgánica presente en el agua cruda, la cual puede llegar a producir reducción adicional del Cloro utilizado en la desinfección. Sin embargo, se trató de trabajar con concentraciones bacterianas menores a 100 UFC/100 ml para poder contar con un recuento inicial, con el objetivo de poder calcular los porcentajes de colonias Cloro-Resistentes.

Por otro lado, al realizar la revisión del histórico de los análisis de ésta muestra (4803B *E. coli*), se evidenció que esta cepa se aisló, teniendo la muestra una concentración de Cloro Libre residual de 0.36 mg/L. Aunque no es una concentración muy alta, se encuentra dentro del rango de aceptación establecido por el decreto 475 de 1998 para los Acueductos del país. Al mismo tiempo, se observó un porcentaje de colonias resistentes al desinfectante en todas las concentraciones probadas (Figura 7), que aunque éste disminuyó considerablemente, hubo un porcentaje de Cloro-Resistencia (%R) de 55.21% con 1.0 mg/L de Cloro Residual Libre, el cual es la concentración máxima permitida por la legislación para agua de consumo humano en Colombia. Por tanto, se podría decir que esta cepa de *Escherichia coli* es resistente a estas concentraciones de cloro en las pruebas *in vitro* realizadas.

Igualmente, se observó Cloro-Resistencia al enfrentar esta cepa a las mismas concentraciones de cloro, pero con un tiempo de contacto de 15

minutos (Tabla 20). No obstante, se observó una disminución notable del porcentaje de colonias cloro resistentes (%R) con respecto a las pruebas realizadas con 10 y 15 minutos de contacto (Figuras 7 y 21). Al mismo tiempo, se evidenció que hubo una caída abrupta de la concentración celular al enfrentar la muestra a 0.7 mg/L de cloro libre con 15 minutos de contacto y que con las siguientes concentraciones de cloro hubo una disminución mas estable (Figura 20).

Sin embargo, cabe anotar que en las diferentes oportunidades en las que se les realizo a las personas encargadas de tomar las muestras, la prueba de manos para verificar las condiciones idóneas de limpieza y desinfección en el momento de la toma de la muestra y descartar falsos positivos por contaminación cruzada en la muestra, se encontraron casos positivos tanto de coliformes como de *E. coli*. Por lo tanto, no se puede afirmar que las cepas de *E. coli* aisladas son provenientes de la red de distribución del acueducto.

Por otro lado, la cepa 2936 *Enterobacter cloacae*, la cual en el momento de ser aislada, presentó en la muestra una alta concentración de cloro residual (1.15 mg/L), resultó no ser resistente al proceso de desinfección en los 10 minutos, puesto que solo hubo un leve crecimiento al enfrentarse con 0.5 mg/L de Cloro Libre (Tabla 6). Este hecho, hace suponer que esta cepa se aisló en la muestra debido, probablemente, a contaminación en la toma de muestra, puesto que al observar la concentración de cloro total, se puede observar que esta concentración no varió, lo que indicaría que no hubo oxidación alguna de materia orgánica en este punto, puesto que no la había; y si juntamos el hecho de que esta cepa no resistió mas de 0.5 g/L de cloro libre durante 10 minutos, nos lleva a afirmar que la muestra dio positiva por causa de contaminación durante la toma de muestra y no por que el microorganismo sea cloro resistente.

En cuanto a la cepa No. 2191 *Yersinia enterocolitica* Group se observó una cinética similar a la de la cepa 4803 B *E. coli*, la cual muestra una disminución de la concentración bacteriana directamente proporcional al aumento de la concentración de cloro libre (Figura 8 y Tabla 7). Sin embargo, esta cepa mostró un mayor porcentaje de resistencia a la desinfección, inclusive en las concentraciones mas altas de cloro libre, (33.52% de cloro resistencia con 2.0 g/L de cloro libre) mostrando un mayor poder de cloro resistencia (Figura 9). La diferencia del recuento de colonias que resistieron entre cada concentración de cloro fue insignificante, excepto, hasta que se enfrento la muestra a 2.0 g/L de cloro libre, donde hubo una disminución de la concentración bacteriana mas significativa (Tabla 7); esto es de suma consideración puesto que a pesar de que *Yersinia enterocolitica* Group, no es considerado un Coliforme sino una Enterobacteria, es una bacteria de alto riesgo sanitario por su alta patogenicidad. Por ejemplo, *Y. enterocolitica* puede causar en el tracto gastrointestinal una enteritis aguda (especialmente en niños), enterocolitis, limfadenitis mesenterica e ileitis terminal (Bottone, 1997)

Por otra parte, la cepa No. 2579 *Klebsiella oxytoca* fue uno de los coliformes que resistió la desinfección con cloro con 10 y 15 minutos de tiempo de contacto (Tabla 9 y 23). Al hacer el enfrentamiento con 10 minutos de contacto (Figura 10), se observó una cinética irregular al enfrentar la cepa a las concentraciones de cloro libre de 0.7 y 1.0 mg/L, puesto que se presentaron recuentos muy altos, para el caso de la concentración de 0.7 mg/L de cloro libre, y muy bajos para la concentración de 1.0 mg/L de cloro. Es decir, estos puntos se salieron de la cinética normal de disminución exponencial de la concentración bacteriana, que se ha venido observando en las demás pruebas. Esto pudo ser debido a tres causas: error en el manejo del tiempo de contacto al adicionar el tiosulfato que inactivaba el cloro, errores en la medición del volumen del tiosulfato o finalmente, errores en la medición del volumen del cloro. A pesar de estas irregularidades, se puede observa una cloro



resistencia evidente de esta cepa, con 10 minutos de tiempo de contacto, inclusive cuando se enfrentó a 2.0 mg/L de cloro libre, ya que presentó un porcentaje de colonias resistentes (%R) del 20%, (Figura 11).

De la misma forma, en las pruebas de 15 minutos de contacto, se observan porcentajes de colonias cloro resistentes muy similares a las observadas en las pruebas de 10 minutos. No obstante, hubo alguna reducción del porcentaje de colonias resistentes en comparación con las pruebas de 10 minutos (Figura 11), pero hay que anotar que con las pruebas de cloro resistencia con 15 minutos de contacto (Figura 25), los porcentajes de cloro resistencia se mantuvieron casi estables, a medida que se iba aumentando la concentración de cloro libre. En cuanto a la cinética de desinfección para esta cepa, con 15 minutos de contacto (Figura 24), se puede observar una disminución de la concentración bacteriana directamente proporcional al aumento de la concentración de cloro.

Por el contrario, al realizar la prueba de cloro resistencia a la cepa No. 4803 *Acinetobacter baumannii*, se evidenció una baja resistencia al desinfectante, puesto que no resistió todas las concentraciones de cloro libre a las que fue enfrentada. Al observar la cinética de desinfección (Figura 12), se puede observar una caída exponencial en la concentración bacteriana desde las más bajas concentraciones, lo que significó una ausencia total del crecimiento al enfrentarse con 2.0 mg/L de cloro libre, es decir un %R = 0% en esta concentración (Figura 13). Por tal razón, esta cepa no se enfrentó a la prueba de cloro resistencia con un tiempo de contacto de 15 minutos.

En conclusión, esta cepa puede considerarse con una baja resistencia al cloro en el proceso de desinfección del agua con un tiempo de contacto de 10 minutos. A pesar de esto, se considera Cloro Resistente, puesto que en la muestra donde se aisló, se encontró una concentración de cloro residual libre de 0.36 mg/L y de cloro total de 0.47mg/L, resultados

coherentes con los obtenidos en la prueba de cloro resistencia. A pesar de que estas concentraciones de cloro no son muy altas, se encuentran dentro del rango de lo admitido por el decreto 475 de 1998; por ende, se dictamina bajo grado de cloro resistencia para el tiempo de contacto evaluado.

Las pruebas de Cloro Resistencia hechas a la cepa No 8457 *Escherichia coli*, demostraron que esta cepa resultó ser también cloro resistente. La desinfección hecha con un tiempo de contacto de 10 minutos (Tabla 10), arrojaron resultados de crecimiento de la cepa en todas las concentraciones probadas. La cinética de desinfección (Figura 14), mostró una disminución de la concentración bacteriana directamente proporcional al aumento de la concentración de cloro residual libre. Los porcentajes de colonias cloro resistentes (%R), se pueden observar en la figura 15. Aunque estos porcentajes disminuyeron considerablemente a medida que aumentaba la concentración de cloro libre, se puede observar que aún con 2.0 mg/L del desinfectante, hubo un porcentaje de cloro resistencia de 1.10%; lo cual indica que los 10 minutos de tiempo de contacto, no fueron suficientes para la oxidación de la totalidad de las células bacterianas.

De la misma forma, se obtuvieron resultados similares al enfrentar la cepa al cloro con un tiempo de contacto de 15 minutos. La cinética de desinfección se comportó de manera muy similar a la prueba anterior (Figura 26). Los resultados de %R, a pesar de que disminuyeron un poco, fueron muy similares a los porcentajes obtenidos con el tiempo de contacto de 10 minutos. Aunque los recuentos con el tiempo de contacto de 15 minutos, fueron más bajos en comparación a los recuentos obtenidos con 10 minutos de contacto, debido a que la concentración bacteriana inicial fue mucho menor (Tabla 26), los resultados de cloro resistencia con esta cepa, no variaron mucho a pesar del aumento del tiempo de contacto con el desinfectante.

En resumen, las dos cepas de *Escherichia coli* analizadas en este estudio, han resultado ser altamente Cloro-Resistentes y han arrojado

resultados de resistencia al desinfectante muy similares. Al revisar estudios similares de otros investigadores, se verificó que la resistencia a la desinfección con cloro y cloraminas ha sido demostrado usando cepas bacterianas aisladas de fuentes naturales (Lisle *et al*; 1998).

Lisle *et al.*, (1998) al tratar de encontrar posibles causas de cloro resistencia en *Escherichia coli* O157:H7, demostró que la sola inanición promovió el desarrollo de una injuria – resistencia en la estructura de la membrana. Al mismo tiempo, mecanismos intracelulares también contribuyen a la resistencia a la desinfección. Seguimiento de fagocitosis, un estallido oxidativo es inducido en un macrófago donde el cloro y las cloraminas están formadas. Por consiguiente, *E. coli* cuenta con un sistema de envoltura que le provee resistencia y reparo para los daños causados por las concentraciones subletales de estos compuestos oxidativos. Al mismo tiempo, otros investigadores citados por Lisle *et al*, han demostrado que unos genes *heat shock* específicos y un regulon redox (Ej., *soxRS*), son inducidos por la consecuente exposición al cloro. Estos autores propusieron que la resistencia a la desinfección con cloro es mediado celularmente, producido a través de mecanismos diferentes al mecanismo usado por el peróxido de hidrógeno, y es primariamente el resultado de la injuria inducida por la síntesis de proteínas (Lisle *et al*; 1998).

Lisle *et al*, (1998), propone que la resistencia bacteriana al cloro es un proceso bifásico, en donde el desinfectante primero reacciona con componentes extrínsecos (Ej., cápsula y membranas externas) y estas inducen a componentes intrínsecos (Ej., las proteínas *heat shock* y el regulon redox). Por ejemplo, clorinas extracelulares, reaccionan inespecíficamente con componentes de la cápsula bacteriana, membranas externas, y el periplasma, reduciendo la concentración del desinfectante disponible para reaccionar con las membranas internas de la célula.

Por otra parte, *Aeromonas hydrophila* (Cepa No. 2873), obtuvo resultados positivos en las pruebas de cloro resistencia con una tiempo de contacto de 10 minutos. En la figura 16, se puede apreciar la acción del cloro sobre esta bacteria, y aunque hubo una disminución de la concentración celular directamente proporcional al aumento de la concentración del desinfectante, estas concentraciones de cloro con 10 minutos de tiempo de contacto, no fueron suficientes para acabar con la totalidad de la población bacteriana. Un alto porcentaje de colonias resultaron ser cloro resistentes al ser expuestas a 0.5 mg/L de cloro Libre (Figura 17), la cual es una concentración aceptada por el decreto que rige los parámetros de la calidad del agua potable. Al mismo tiempo, en esta misma figura se puede observar que esta cepa se puede considerar como Cloro-Resistente, puesto que al ser enfrentada con 2.0 mg/L de cloro libre, se presentó un porcentaje de colonias cloro resistentes de 8.33%, el cual es un porcentaje de consideración.

Por ultimo, la cepa No. 3862 B *Sphingobacterium multivorum* arrojó resultados positivos en la prueba de cloro Resistencia con 10 minutos de tiempo de contacto. En la cinética de desinfección (Figura 18), se observó un recuento mayor de colonias al ser enfrentado a 1.5 mg/L de cloro libre en comparación con la concentración menor inmediatamente anterior. Se puede presumir que esta cepa presentó características de cloro resistencia, puesto que se observó crecimiento empero de los 2.0 mg/L de cloro libre adicionados. Es decir, se observó un porcentaje de colonias cloro resistentes de 6.25% con la mas alta concentración de cloro probada, lo cual india cloro resistencia a este desinfectante, con 10 minutos de contacto (Figura 19).

Recopilando, se lograron identificar un total de 12 cepas de las cuales dos de ellas se descartaron por resultar no viables, estas cepas eran la 3137 *Cryseobacterium meningosepticum* y la 3862 A *Aeromonas hydrophila*. De las diez cepas restantes que se enfrentaron a las diferentes concentraciones de cloro con 10 y 15 minutos de tiempo de contacto para

evaluar su posible Cloro-Resistencia, 6 de ellas resistieron la acción oxidativa del cloro en todas las concentraciones probadas a los 10 minutos de contacto y 4 cepas resistieron a los 15 minutos de contacto; es decir, el 60% de las cepas aisladas resultaron ser Cloro-Resistentes con 10 minutos de tiempo de contacto y el 66% con 15 minutos.

De las diez cepas aisladas, tres cepas se clasifican dentro del grupo de los coliformes y dos fueron *Escherichia coli*, las otras cepas aisladas e identificadas pertenecen a la familia de las Enterobacterias, que fueron incluidas también dentro del estudio debido a su alta relevancia epidemiológica.

En conclusión, el tratamiento del agua potable se facilita por el uso rutinario de la coagulación, floculación, sedimentación, filtración y desinfección para remover e inactivar patógenos. Sin embargo, se han visto bacterias que logran sobrevivir a estos procesos y penetrar en algunos filtros rápidos de arena en plantas operadas adecuadamente (Lisle *et al*; 1998). Adicionalmente, los resultados arrojados por este estudio, revelaron que algunos de los resultados positivos realizados en el laboratorio de agua potable del acueducto de Bogotá al sistema de distribución, se debe a la existencia de cepas nativas que han logrado desarrollar una Cloro-Resistencia a concentraciones superiores a 1.0 mg/L de cloro libre, la cual es la concentración máxima permitida por la legislación colombiana para agua apta para consumo humano.

## 5. CONCLUSIONES

- ❖ Se logró aislar e identificar 5 cepas nativas de Coliformes Totales y *E. coli* en las muestras analizadas. Al mismo tiempo, al realizar las pruebas de identificación bioquímica se encontraron 7 cepas nativas de otros grupos de bacterias presentes en la red de distribución, las cuales pertenecen a la familia de las Enterobacterias. A estas cepas bacterianas se les realizó también pruebas de cloro resistencia *in vitro*, debido a que estas bacterias representan un alto riesgo en la salud pública del país.
- ❖ Se consiguió montar el banco de cepas nativas con todas las cepas bacterianas halladas en el agua potable de la red de distribución del Acueducto de Bogotá, las cuales fueron un total de 3 cepas de Coliformes Totales, 2 Cepas de *Escherichia coli*, y 5 cepas de diferentes Enterobacterias. Las otras 2 cepas restantes de Enterobacterias no resistieron el proceso de criopreservación, lo cual se evidenció al realizar las pruebas de viabilidad.
- ❖ Se expusieron al cloro las 10 cepas aisladas con 10 y 15 minutos de tiempo de contacto para evaluar su posible Cloro-Resistencia. Seis de ellas resistieron la acción oxidativa del cloro en todas las concentraciones probadas con 10 minutos de contacto, es decir el 60% de las cepas aisladas. Mientras que, cuatro de las 6 cepas que resistieron a todas las concentraciones de cloro libre a las que fueron expuesta con 10 minutos de contacto, resistieron a todas las concentraciones expuestas con 15 minutos de contacto; es decir el %66.6.
- ❖ Se evaluó un tiempo de contacto de 30 minutos solo con cuatro cepas (*Klebsiella oxytoca*, *Yersinia enterocolitica* y dos cepas de *Escherichia coli*), las cuales no resistieron a ninguna de las concentraciones expuestas con este tiempo de contacto.
- ❖ Las cepas aisladas de *E. coli* no provenían exclusivamente del sistema de distribución del acueducto de Bogotá, puesto que al

realizar pruebas de control de higiene en las manos de los mostradores, se presentaron pruebas positivas para algunos de ellos revelando la presencia de esta bacteria.

- ❖ Se planteó como recomendación un modelo de desinfección el cual predice la reducción de la concentración bacteriana como una función de concentración de cloro residual y sistemas de tiempo de contacto, de acuerdo con el modelo de desinfección de Collins.

## 6. RECOMENDACIONES

Para evitar posibles problemas de salud pública en los que se encuentre implicado el Acueducto de Bogotá por presencia de microorganismos patógenos que han soportado el proceso de potabilización realizado en la planta de tratamiento, se recomienda hacer estudios sobre la acción de la desinfección dependiente de tiempos de contacto y de la posible presencia de coliformes que resistieron las pruebas de enfrentamiento al cloro.

La acción de la desinfección debe ser evaluada todo el tiempo a través de cambios en las concentraciones de organismos indicadores (Coliformes). Estas evaluaciones se realizan utilizando ecuaciones matemáticas que predicen futuras concentraciones de organismos indicadores en variables de sistemas específicos. Por ejemplo el modelo de Collins predice la reducción de la concentración bacteriana como una función de concentración de cloro residual y sistemas de tiempos de contacto de acuerdo con la siguiente ecuación (EPA, 1999):

$$Y_T = Y_O (1 + 0.23 CT)^{-3}$$

$Y_T$ : Concentración bacteriana después de un tiempo T (NMP/100 ml)

$Y_O$ : Concentración bacteriana original (NMP/100 ml)

C: Concentración del cloro residual después del tiempo T (mg/L)

T: Tiempo de contacto (minutos)

De igual manera se recomienda:

- Aumentar los tiempos de contacto con el cloro, en las plantas de tratamiento con el fin de maximizar el poder germicida del cloro.
- Realizar pruebas experimentales con otros desinfectantes y verificar su acción con las cepas aisladas como cloro resistentes.
- Continuar con los estudios de cloro resistencia incluyendo otras variables como turbiedad, temperatura y pH.



## BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Shkara, F., Neeman, I., Sheinman, R. and Armon, R. 1998. The effect of fatty acid alteration in Coliform bacteria on disinfection. *Water Science and Technology*. 38 (12): 133-139
- APHA-AWWA-WPCF. Eaton, A. Clesceri, L y Greenberg, A. 2000. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastwater*. 20 th Edition. P. 9-1 – 9-117.
- Arboleda, J. 1992. *Teoría y Practica de la purificación del agua*. Asociación Colombiana de Ingeniería Sanitaria ACODAL.
- BBL CRYSTAL, 2001. *Identification Systems Enteric/Nonfermenter ID Kit*. Folleto de Información. U.S. Pat. 5, 182, 082
- Bottone, E. 1997. *Yersinia enterocolitica: The carisma continues*. *Clinical Microbiology Reviews (CMR)*. Vol. 10, No. 2, p. 257-276
- EAAB. 2003. *Procedimiento Estándar de Filtro de Membrana para Coliformes Totales (Chromocult)*, Laboratorio de aguas, Bogotá, Colombia.
- EAAB. 2003. *Procedimiento para toma y recepción de muestras*, Laboratorio de aguas, Bogotá, Colombia.
- EPA. 1999. *Combined Sewer Overflow Technology Fact Sheet Chlorine Disinfection*. EPA 832-F-99-034.
- Germán, C y Marcén, J. 1998. *Agua de bebida saludable por tubería: una misión casi imposible*. *Ciudades para un futuro mas sostenible*, Boletín CF+S, Numero 11. Octubre 1999. Zaragoza, España.
- GRAY, N. 1996. *Calidad del Agua Potable, Problemas y Soluciones*. Acribia S.A., Zaragoza. España.
- Lisle, J. Broa daway, S. Presscott, A. Pyle, B. Fricker, C. and McFeters, C. 1998. *Effects of starvation on physiological activiy and Chlorine disinfection Resistance in E. coli O157:H7*, *Applied and Environmental Microbiology (AEM)*, Vol. 64, No. 12, p. 4658-4652
- Merck. 2000. *Manual de Microbiología*
- Meza, R., Monroy, A., Mercado, M., Poutou, R., Pedroza, A., Rodríguez, P. 2002. *Estudio de estabilidad a tiempo real de bancos de cepas criopreservados*. V Feria Congreso Latinoamericano de Biotecnología. Montevideo, Uruguay.

- Ministerio de Salud. Normas técnicas de calidad del agua potable. Decreto 475 del 10 de Marzo de 1998.
- Merck , 2003. Instructivo de prueba diagnostica Bactiden® Oxidasa, Merck KgaA, 64271 Darmstad, Alemania.
- 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).
- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. 1987 "Guías para la Calidad del Agua Potable. Volumen 2, Criterios relativos a la salud y otra información de base". Organización Mundial de la Salud, Publicación Científica nº 506. Washington D.C.
- Perdomo, C., Casanova, O. y Ciganda, V. 2001. Contaminación de aguas subterráneas con nitratos y coliformes en el litoral sudoeste de Uruguay. Agrociencia Vol. V. No.1. Pág. 10-22
- Pedroza, A. 2001. Conservación de cepas. Manual de laboratorio de Biotecnología, Practica No. 9, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Riano, A., Rodríguez, A., Rodríguez, P. 2000. Aislamiento y identificación microbiológica de las bacterias presentes en la biopelícula formada en las paredes de la tubería de 78 pulgadas, proveniente de la planta de tratamiento de tibatoc, utilizada por la E.A.A.B. para la distribución de agua potable a bogota. Tesis de pregrado. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Facultad de Ciencias de la salud.

#### Recursos electrónicos

- Garcia, M. y Ururburu, F. (2001: Valencia, España) La conservación de cepas microbianas. **[on line]**. Coleccion Española de cultivos tipo (CECT). Universidad de valencia. <<http://www.uv.es/cect.html>>. Consultado en Febrero del 2004.
- Ocasio, N y Lopez, M. 2004. El uso del cloro en la desinfección del agua **[on line]**. <<http://www.edustatspr.com/proyectos/Inv97-98-II-3.pdf>>. Consultado en Febrero del 2004

- Urbaneja, S. 2004. Determinación del índice de Bacterias coliformes totales y fecales en muestras de alimentos y determinación del índice de Estreptococo del grupo "D" en muestras de alimentos. **[on line]**. < <http://www.monografias.com/trabajos11/bacte/bacte.html>>. Consultado en Marzo del 2004.
- Palmateer, G and Van Dake, M. (2001: Ontario) Rehabilitating the Walkerton drinking water distribution system. **[on line]**. GAP Enviromicrobial Service. <<http://www.esemag.com/0901/rehab.html>>. Consultado en Junio del 2004.

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y PRUEBAS DE CLORO RESISTENCIA *in vitro* A CEPAS NATIVAS DE COLIFORMES TOTALES Y *E. coli* OBTENIDAS EN LA RED DE DISTRIBUCIÓN DEL ACUEDUCTO DE BOGOTÁ**

**Adriana P. Castillo, Claudia R. Cote.**

Laboratorio de Aguas, Acueducto de Bogotá. Calle 22C No. 40-94  
claudia.cote@javeriana.edu.co

**RESUMEN**

Con este trabajo, se pretendió aislar e identificar las cepas nativas de coliformes totales y *E. coli* en el análisis de agua potable de la red de distribución del agua del Acueducto de Bogotá durante los meses de Febrero a Mayo del 2004 y se les realizaron pruebas de cloro-resistencia, Todo esto con el fin de poder abrir diferentes alternativas de desinfección, descartar contaminación en la toma de muestras, verificar la incidencia de la biopelícula de las tuberías de la red de distribución en la calidad del agua potable.

El 75% de las cepas aisladas, resultaron ser Cloro-Resistentes con 10 y 15 minutos de tiempo de contacto. Se evaluó un tiempo de contacto de 30 minutos solo con cuatro cepas (*Klebsiella oxytoca*, *Yersinia enterocolitica* y dos cepas de *Escherichia coli*, ), las cuales nos resistieron a ninguna de las concentraciones expuestas con este tiempo de contacto.

Palabras claves: Enterobacterias, cloro-resistencia, coliformes, tiempo de contacto,

## ABSTRACT

In this thesis, we have tried –by performing tests of chlorine resistance- to identify and isolate the natives strains of Total Coliforms and *E. coli* in the analysis of drinkable water in the distribution system of the Acueducto of Bogotá, within February and May of 2004; in order to find out whether or not Total Coliforms and some *E. coli* isolated there, are chlorine resistant.

All this with the aim of let the way open to different disinfections alternatives, to rule out contamination caused during the collection of the samples and to verify the incidence of the biofilm located on the distribution system pipes, on the quality of Bogotá's drinkable water.

The 75% of the isolated strains were chlorine resistant with 10 and 15 minutes of contact time tested. Four strains (*Klebsiella oxytoca*, *Yersinia enterocolitica* and two *Escherichia coli* strains, ) were tested with 30 minutes of contact time and the result was the non resistant of any of this strains.

## INTRODUCCIÓN

Entre los organismos patógenos indicadores de contaminación del agua potable, se encuentran los coliformes. Los coliformes son una familia de bacterias, entre los que se encuentran los géneros *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Citrobacter sp.*, y *Escherichia sp.*, que se encuentran comúnmente en las plantas, el suelo y los animales, incluyendo a los humanos. Generalmente, las bacterias coliformes se encuentran en mayor abundancia en la capa superficial del agua o en los

sedimentos del fondo. La presencia de coliformes totales en el suministro de agua es un indicio de la ineficacia en el tratamiento (OMS, 1995 y Urbaneja, 2004).

La contaminación fecal del agua potable puede incorporar una variedad de diversos organismos patógenos intestinales bacterianos, virales y parasitarios cuya presencia está relacionada con enfermedades y portadores de tipo microbiano que puedan existir en ese momento en la comunidad. Aquéllas cuya presencia ha sido detectada en agua potable contaminada incluyen: *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* enterotoxígena, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* y *Campylobacter fetus*. (Organización Panamericana de la salud, 1987)

Asimismo, los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Escherichia* suelen representar la mayor parte de microorganismos aislados en aguas naturales y suministros de aguas municipales tratadas, siendo *Enterobacter cloacae*. el que se aísla con mayor frecuencia, si bien no todos los coliformes tienen necesariamente su origen en las aguas de alcantarilla. *E. coli* es el coliforme mas afectado por los tratamientos habituales de agua (APHA-AWWA-WPCF,2000).

De esta manera, la potabilización del agua evita un 20% de mortalidad infantil en los países subdesarrollados y reduce la mayoría de los contagios en las epidemias clásicas. (Germán y Marcén, 1998).

Asimismo, para lograr las exigencias microbiológicas exigidas en la legislación, la mayoría de las entidades encargadas de la salubridad del agua, tanto a nivel mundial como en nuestro país, en este caso en su capital, Bogotá con la Empresa de Acueducto de Bogotá, se aplica el proceso de desinfección por medio del uso

del cloro y sus derivados. La desinfección en las plantas de tratamiento del Acueducto de Bogotá se realiza por medio del uso del cloro en su forma gaseosa.

Sin embargo, a pesar del tratamiento de cloración aplicado al agua en las plantas de tratamiento con el fin de eliminar al máximo los microorganismos patógenos presentes en el agua destinada para consumo humano, el Laboratorio de Aguas del Acueducto, entidad encargada de la evaluación del agua de la red de distribución, ha encontrado cepas de coliformes con presencia de cloro inferior al 5% de aceptación que permite el Decreto 475 de 1998.

Lo que se pretende con este proyecto es determinar si los Coliformes Totales y algunos *E. coli* aislados en el laboratorio, son Cloro-Resistentes bajo condiciones controladas, es decir, que pueden soportar concentraciones de Cloro Libre entre 0.2 y 1.0 mg/L, que son las concentraciones mínimas y máximas permitidas por el decreto 475 de 1998 para la red de distribución; con el fin de poder abrir diferentes alternativas de desinfección, descartar contaminación en la toma de muestras, relacionar las cepas aisladas con otros microorganismos aislados de la biopelícula encontrada en estudio anteriores en la red de distribución del Acueducto de Bogotá.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Recolección y recepción de muestra**

El tamaño de la muestra es de un promedio de 51 muestras diarias (tomadas de lunes a viernes, analizadas durante los meses de Febrero a Mayo del 2004), fundamentado en un muestreo simple aleatorio.

El método estadístico utilizado es de tipo descriptivo. Al mismo tiempo, se analizó el porcentaje de células resistentes al desinfectante (%R) y el porcentaje de resistencia al desinfectante, donde  $\%R = (100 - \%I)$ , siendo %I la razón del recuento de las colonias, antes y después de la desinfección. Es decir:

$$\%I = \frac{\text{UFC/100 mL antes de desinfect.} - \text{UFC/100 mL después de desinfect} \times 100}{\text{UFC/100 mL antes de desinfección}}$$

Toda la metodología de toma de muestra y conservación y almacenamiento del laboratorio, se realiza aplicando el método normalizado 9060 A y 9060 B del Standard Methods for the examination of water and Wastwater 20 ed.

#### **Análisis microbiológico. (FM)**

La determinación de coliformes totales y *E.coli* se realizó mediante la técnica de filtración por membrana (FM), la cual se realizó aplicando el método normalizado EPA. 40 CRF Part 141S. EMS SCIENCE. Membrane filter Technique using Cromocult Coliform Agar (composición en g/L: Peptona 3.0; Cloruro de Sodio 5.0; Fosfato dihidrogeno de sodio 22; Fosfato hidrógeno disodio 27; Piruvato de Sodio 1.0; Triptona 1.0; agar-agar 10.0; Sorbitol 1.0; Tergitol 70.15; Mezcla cromogénica 0.4).

Después de filtradas la totalidad de las muestras, se incuban a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 24 horas. Se calculó la densidad como recuento total de coliformes totales en 100 ml utilizando los filtros de membrana que tengan entre 20 y 80 colonias y no mas de 200 utilizando la siguiente ecuación (EAAB, 2003) :



Colonias de coliformes total (totales) 100 ml = colonias de coliformes total contadas x 100 / ml de muestra filtrado.

### **Identificación bioquímica**

Se realiza la detección de la enzima triptofanasa con el reactivo de Kovacs de la casa comercial Merck® y la detección de la enzima citocromo oxidasa con bactident® oxidasa de Merck®. La identificación bioquímica se realizó en los sistemas BBL CRYSTAL de identificación de patógenos entericos/no fermentantes (E/NF).

Después de la incubación de los paneles de 18 a 20 horas a 35 °C, se realiza una prueba de pureza con coloración de Gram a las cepas cuya identificación haya otorgado una confianza superior al 95% y una valides del biotipo inferior a 10 (BBL CRYSTAL, 2000).

### **Conservación: creación del banco de cepas**

Las cepas que cumplían con estos requisitos se conservaron con glicerol al 50% v/v en el congelador (-18°C) para formar el banco de cepas cloro resistentes del Acueducto. El método de conservación utilizado es el descrito por Meza *et al.*, 2002 y Pedroza 2001.

### **Pruebas de cloro resistencia**

Para la realización de estas pruebas se llevó a cabo el ensayo modificado de desinfección descrito por Lisle *et al.*, 1998.

Las concentraciones de cloro residual libre (mg/L) con las que se trabajaron fueron: 0.5, 0.7, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L. La concentración de cloro residual fue medida mediante el método colorimétrico por espectrofotometría, DPD (N,N-dietil-p-fenilendiamina) (EAAB, 2004).

Para la preparación del control de no cloración, se transfirieron 100 mL de la muestra a un frasco estéril con tiosulfato de sodio .

A las cepas reconstituidas en 100 mL de agua destilada estéril se le adicionó el volumen establecido de las diferentes concentraciones de cloro gaseoso. Se ensayaron diferentes tiempos de contacto entre los cuales está el tiempo de contacto establecido utilizado en la desinfección en las plantas de tratamiento (10 minutos) y otros tiempos (15, 30 y 60 minutos). Se adicionó 2 mL de tiosulfato de sodio al finalizar el tiempo de contacto para inhibir la acción del cloro. Todas las muestras se corrieron por duplicado.

Posteriormente, se realizó directamente la metodología de FM.

Como controles, se llevaran a cabo los mismos procedimientos, utilizando cepas certificadas de *E.coli* ATCC 25922 , *Klebsiella oxytoca* ATCC 57822, las cuales se encuentran en las mismas condiciones de conservación que las cepas nativas, en el laboratorio de agua potable del Acueducto. Al mismo tiempo, se corrieron controles positivos de cada una de las cepas, los cuales fueron preparados de la misma forma que la concentración bacteriana a estudiar, con la diferencia de que a estos no se les adicionaba la concentración de cloro. Igualmente, por cada cepa se corrieron dos blancos, los cuales se preparaban con 100 mL de agua destilada estéril, la misma con la que se prepararon las diluciones de las cepas, mas los 2 mL de tiosulfato de sodio.

Finalmente, se calculó el porcentaje de células con resistencia al desinfectante y el porcentaje de resistencia al desinfectante.

## RESULTADOS

### Identificación bioquímica

Todas las cepas que presentaron un porcentaje de confianza mayor al 95% y una Validez del Biotipo menor de 10, se encuentran relacionadas en la tabla No. 1.

Tabla No. 1 Identificación bioquímica de presuntas cepas cloro-Resistentes.

Fecha de aislamiento	Identificación	Numero de Radicación	% de Confianza	Validez del Biotipo
2004-02-10	<i>Yersinia enterocolitica</i> Group	2191	99.79	7
2004-02-17	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2579	95.55	8
2004-02-23	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2873	99.71	3
2004-02-27	<i>Cryseobacterium meningosepticum</i>	3137	99.96	3
2004-02-24	<i>Enterobacter cloacae</i>	2936	99.9	3
2004-03-05	<i>Enterobacter cloacae</i>	3492	99.97	4
2004-03-12	<i>Aeromonas hydrophila</i>	3862 A	99.88	2
2004-03-12	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	3862 B	99.30	1

2004-03-26	<i>Cryseobacterium meningosepticum</i>	4618	99.9	7
2004-03-29	<i>Acinetobacter baumannii</i>	4803 A	99.80	8
2004-03-29	<i>Escherichia coli</i>	4803 B	98.99	1
2004-05-04	<i>Escherichia coli</i>	8457	98.99	1

### **Pruebas de Cloro-resistencia**

Se lograron identificar un total de 12 cepas de las cuales dos de ellas se descartaron por resultar no viables, estas cepas eran la 3137 *Cryseobacterium meningosepticum* y la 3862 A *Aeromonas hydrophila*.

De las diez cepas restantes que se enfrentaron a las diferentes concentraciones de cloro con 10 y 15 minutos de tiempo de contacto para evaluar su posible Cloro-Resistencia bajo las condiciones controladas en el laboratorio; 6 de ellas resistieron la acción oxidativa del cloro en todas las concentraciones probadas a los 10 minutos de contacto y 4 cepas resistieron a los 15 minutos de contacto; es decir, el 60% de las cepas aisladas resultaron ser Cloro-Resistentes con 10 minutos de tiempo de contacto y el 66% con 15 minutos bajo estas condiciones *in vitro*.

De las diez cepas aisladas, tres cepas se clasifican dentro del grupo de los coliformes y dos fueron *Escherichia coli*, las otras cepas aisladas e identificadas pertenecen a la familia de las Enterobacterias, que fueron incluidas también dentro del estudio debido a su alta relevancia epidemiológica.

## DISCUSIÓN

A pesar de los múltiples tratamientos a los que es sometida el agua cruda para potabilizarla, entre los que se encuentra la desinfección con cloro, se han presentado casos positivos de Coliformes y *Escherichia coli* en el agua de distribución del Acueducto de Bogotá, como también en otros Acueductos a nivel mundial.

Debido a que no se ha encontrado una falla aparente en el tratamiento realizado en las plantas, se formuló la hipótesis que explica este hecho debido a la existencia de cepas de coliformes nativas Cloro – Resistentes.

Soportando este supuesto, un limitado numero de estudios ha evaluado la resistencia de bacterias al proceso de desinfección, manejando diferentes variables. Lisle *et al.*,(1998), encontró resistencia de *Escherichia coli* O157:H7 a la desinfección con cloro, después de haber sometido a las cepas a un periodo de estrés, causado por inanición. Al mismo tiempo, Palmateer and Dake (2001), al examinar las posibles causas de contaminación de las fuentes de agua municipales y del sistema de distribución del acueducto de Walkerton, Ontario (Canada), ya que se estaban presentando casos positivos de Coliformes, encontraron que probablemente la prevalencia de estos microorganismos, se debía a la presencia de Biofilm en sus tuberías y que al mismo tiempo, gracias a la formación de la biopelícula, se estaban presentando casos de Cloro – Resistencia.

En este estudio, se abordó el problema de Cloro – Resistencia bajo condiciones controladas de laboratorio sin tener en cuenta todas las variables de proceso de tratamiento que pueden afectar la desinfección. Al realizar la identificación bioquímica de las cepas aisladas, se detectó presencia de falsos positivos

generados por el medio Chromocult, puesto que se estaban reportando colonias positivas de Enterobacterias, las cuales presentaban las mismas características macroscópicas de los Coliformes. El falso positivo se debió a problemas de selectividad del medio.

Se realizó el enfrentamiento de estas 5 cepas al cloro, (*Yersinia enterocolitica* Group, *Aeromonas hydrophila*, *Cryseobacterium meningosepticum*, *Sphingobacterium multivorum* y *Acinetobacter baumannii*), puesto que fueron aisladas también de las muestras de agua potable y su incidencia sanitaria es de consideración.

Se ha encontrado crecimiento bacteriano en las muestras de agua potable del Acueducto de Bogotá, indicando Cloro- Resistencia bajo condiciones *in vitro* a concentraciones de cloro libre. Por ejemplo, la cepa No. 4803 B *Escherichia coli*, después de haber sido sometida a la solución de cloro durante 10 minutos, presentó una caída exponencial en su concentración celular en las concentraciones de Cloro Residual Libre de 0.5 a 1.0 mg/L y una disminución menos considerable en las concentraciones 1.5 a 2.0 mg/L de cloro Libre. Cabe anotar, que a pesar de la considerable disminución de la concentración bacteriana, se observó que los 10 minutos de tiempo de contacto, no fueron suficientes para acabar con la totalidad de la población bacteriana.

Por otro lado, al realizar la revisión del histórico de los análisis de ésta muestra (4803B *E. coli*), se evidenció que esta cepa se aisló, teniendo la muestra una concentración de Cloro Libre residual de 0.36 mg/L. Aunque no es una concentración muy alta, se

encuentra dentro del rango establecido por el decreto 475 de 1998 para los Acueductos del país. Al mismo tiempo, se observó un porcentaje de colonias resistentes al desinfectante en todas las concentraciones probadas, que aunque éste disminuyó considerablemente, hubo un porcentaje de Cloro-Resistencia (%R) de 55.21% con 1.0 mg/L de Cloro Residual Libre, el cual es la concentración máxima permitida por la legislación para agua de consumo humano en Colombia. Por tanto, se podría decir que esta cepa de *Escherichia coli* es resistente al proceso de desinfección realizado *in vitro*, bajo las condiciones controladas de laboratorio. Igualmente, se observó Cloro-Resistencia al enfrentar esta cepa a las mismas concentraciones de cloro, pero con un tiempo de contacto de 15 minutos . No obstante, se observó una disminución notable del porcentaje de colonias cloro resistentes (%R) con respecto a las pruebas realizadas con 10 y 15 minutos de contacto.

Por otro lado, a pesar de que se propuso trabajar con una concentración bacteriana inicial menor a 30 UFC/100 ml, para asemejar en lo mayor posible las concentraciones de agua cruda manejadas en la planta, no fue posible debido a la dificultad de preparar concentraciones mayores de  $10^8$  UFC/100 ml a tan solo 30 o menos UFC/100 ml . No obstante, se decidió reportar estos datos, puesto que el numero de organismos presentes en el agua no afecta el proceso de desinfección. La misma concentración y tiempo de contacto del desinfectante se necesitan para matar una gran cantidad de microorganismos que una pequeña, siempre y cuando la temperatura y el pH sean los mismos(Arboleda, 1992). En este estudio, se trabajó siempre con agua destilada estéril a temperatura ambiente, la cual oscilaba

en el laboratorio, durante los meses de estudio, entre 17 a 20 oC; asimismo, el pH de todas las muestras, nunca supero las 7.5 unidades, favoreciendo la estabilidad de las cepas, puesto que las bacterias son altamente susceptibles a potenciales de hidrógeno muy altos o muy bajos (Arboleda, 1992).

El tipo de microorganismos en cambio si influye notablemente en los resultados, pues la sensibilidad de cada especie varia según el desinfectante (Arboleda, 1992).

La supervivencia de bacterias entéricas a la desinfección, depende de muchos factores mencionados anteriormente, como la capacidad de formar conglomerados o agregados bacterianos, los cuales les puede conferir mayor resistencia a la desinfección al impedir un contacto total oxidante del cloro sobre las bacterias; la temperatura, ya que el crecimiento bacteriano a bajas temperaturas las hace mas resistente a la cloración (Abu-Shkara *et al.*, 1998).

Contrariamente, con una baja concentración de sólidos suspendidos, los patógenos son inhibidos con una pequeña dosis de desinfectante. No obstante, cuando la concentración de sólidos suspendidos es mayor, el proceso de desinfección es controlado por dos mecanismos diferentes. La fase de desinfección inicial mata pequeñas colonias individuales. La mayor parte de muerte bacteriana, ocurre en este paso, sin embargo, las bacterias restantes atrapadas en sólidos no son usualmente afectadas (EPA, 1999).

Igualmente, la rata de destrucción de bacterias entéricas aumenta o disminuye con el tiempo debido a (Arboleda, 1992): Errores experimentales, distinta susceptibilidad de los organismos, mezcla inapropiada de los desinfectantes con el agua, existencia de colonias de bacterias de tamaños variados que establecen una



concentración desuniforme de los organismos en el líquido y la presencia de sustancias interferentes que impiden mantener un residual adecuado con ciertos desinfectantes.

Esta interferencia se podría dar *in vivo* en la red de distribución debido a la formación de biofilm el cual fue analizado en el Acueducto de Bogotá en el año 2000 y en el cual se encontró presencia de enterobacterias entre las que se encuentran las analizadas en este estudio (Riano *et al.*, 2000); residuos metálicos de las tuberías, etc., o en la planta por fallas en el control de la turbiedad, lo cual podría conllevar a otorgar cloro resistencia a ciertas bacterias o simplemente, impedir que el cloro tenga un efecto residual adecuado.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Shkara, F., Neeman, I., Sheinman, R. and Armon, R. 1998. The effect of fatty acid alteration in Coliform bacteria on disinfection. *Water Science and Technology*. 38 (12): 133-139
- APHA-AWWA-WPCF. Eaton, A. Clesceri, L y Greenberg, A. 2000. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20 th Edition. P. 9-1 – 9-117.
- Arboleda, J. 1992. *Teoría y Practica de la purificación del agua*. Asociación Colombiana de Ingeniería Sanitaria ACODAL.
- BBL CRYSTAL, 2001. *Identification Systems Enteric/Nonfermenter ID Kit*. Folleto de Información. U.S. Pat. 5, 182, 082
- EAAB. 2003. *Procedimiento Estándar de Filtro de Membrana para Coliformes Totales (Chromocult)*, Laboratorio de aguas, Bogotá, Colombia.
- EAAB. 2003. *Procedimiento para toma y recepción de muestras*, Laboratorio de aguas, Bogotá, Colombia.
- EPA. 1999. *Combined Sewer Overflow Technology Fact Sheet Chlorine Disinfection*. EPA 832-F-99-034.

- Germán, C y Marcén, J. 1998. Agua de bebida saludable por tubería: una misión casi imposible. Ciudades para un futuro mas sostenible, Boletín CF+S, Numero 11. Octubre 1999. Zaragoza, España.
- Lisle, J. Broa daway, S. Prescott, A. Pyle, B. Fricker, C. and McFeters, C. 1998. Effects of starvation on physiological activiy and Chlorine disinfection Resistance in *E. coli* O157:H7, Applied and Environmental Microbiology (AEM), Vol. 64, No. 12, p. 4658-4652
- Merck. 2000. Manual de Microbiologia
- Meza, R., Monroy, A., Mercado, M., Poutou, R., Pedroza, A., Rodríguez, P. 2002. Estudio de estabilidad a tiempo real de bancos de cepas criopreservados. V Feria Congreso Latinoamericano de Biotecnología. Montevideo, Uruguay.
- Ministerio de Salud. Normas técnicas de calidad del agua potable. Decreto 475 del 10 de Marzo de 1998.
- OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 1995. Guías para la Calidad del Agua Potable: Recomendaciones, Volumen 1. Ginebra (Informe Técnico sin número).
- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. 1987 "Guías para la Calidad del Agua Potable. Volumen 2, Criterios relativos a la salud y otra información de base". Organización Mundial de la Salud, Publicación Científica n° 506. Washington D.C.
- Pedroza, A.2001. Conservación de cepas. Manual de laboratorio de Biotecnologia, Practica No. 9, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Riano, A., Rodríguez, A., Rodríguez, P. 2000. Aislamiento y identificación microbiológica de las bacterias presentes en la biopelícula formada en las paredes de la tubería de 78 pulgadas, proveniente de la planta de tratamiento de tibatoc, utilizada por la E.A.A.B. para la distribución de agua potable a bogota. Tesis de pregrado. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Facultad de Ciencias.

#### Recursos electrónicos

- Urbaneja, S. 2004. Determinación del índice de Bacterias coliformes totales y fecales en muestras de alimentos y determinación del índice de *Streptococo* del grupo "D" en muestras de alimentos. **[on line]**.

< <http://www.monografias.com/trabajos11/bacte/bacte.html>>. Consultado en Marzo del 2004.

- Palmateer,G and Van Dake, M. (2001: Ontario) Rehabilitating the Walkerton drinking water distribution system. **[on line]**. GAP Enviromicrobial Service. <<http://www.esemag.com/0901/rehab.html>>. Consultado en Junio del 2004.