

CRECIMIENTO BACTERIANO EN LAS REDES DE DISTRIBUCIÓN DE AGUA POTABLE: UNA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Juliana Knobelsdorf¹ y Rafael Mujeriego¹

RESUMEN: Los sistemas de almacenamiento y distribución de agua potable constituyen un ambiente propicio para el desarrollo bacteriano; el flujo de agua favorece el transporte de nutrientes y bacterias, mientras que las paredes de las tuberías y las partículas presentes en el agua pueden servir de superficie de crecimiento para las bacterias. En este artículo se realiza una revisión de los diferentes métodos propuestos para evaluar el contenido de materia orgánica de un agua, como factor limitante del crecimiento bacteriano en las redes de abastecimiento. Se describe el fundamento de los métodos analíticos, el proceso de formación y desarrollo de la biopelícula en los sistemas de abastecimiento, el efecto de los desinfectantes sobre el crecimiento microbiano y la influencia de los materiales de las tuberías sobre el desarrollo de la biopelícula.

INTRODUCCIÓN

Hasta hace unos treinta años, se consideraba generalmente que la calidad del agua potable que se introduce en un sistema de abastecimiento se conserva inalterada hasta su llegada al punto de consumo. Sin embargo, artículos científicos publicados desde principios de los años 1970 (Perramón y Pou, 1971; O'Connor *et al.*, 1975; Donlan y Pipes, 1988) evidencian la existencia de una pérdida de calidad del agua a lo largo de su recorrido por la red de abastecimiento, debida a la acción de los microorganismos presentes en las paredes de las tuberías.

El crecimiento bacteriano en los sistemas de almacenamiento y distribución de agua potable produce un deterioro de la calidad del agua, alterando su sabor y olor, aumentando su turbiedad e incluso llegando a afectar su conformidad con las normas microbiológicas de calidad. Además, la película bacteriana formada en las paredes de las tuberías puede reducir la capacidad hidráulica de las mismas, acelerar su corrosión y hacer más difícil el mantenimiento de una concentración residual de desinfectante (Characklis, 1988). El crecimiento bacteriano en los sistemas de abastecimiento de agua potable ha suscitado un interés creciente en los países desarrollados durante los últimos quince años, debido al creciente número de reclamaciones presentadas por los consumidores en relación con el sabor, el olor e incluso el color del agua potable. El crecimiento bacteriano se ha asociado en algún caso con la presencia de bacterias potencialmente patógenas en el agua de abastecimiento (Sonntag, 1986; van der Kooij, 1992; De Leon *et al.*, 1993).

Las fuentes de abastecimiento de agua contienen compuestos orgánicos capaces de promover el crecimiento bacte-

riano en el sistema de distribución, incluso después de la desinfección final a la que se somete al agua durante su potabilización. Este desarrollo bacteriano depende fundamentalmente del contenido de materia orgánica biodegradable y de nutrientes inorgánicos, de la eficiencia del desinfectante residual (LeChevallier *et al.*, 1988), de la temperatura, del tiempo de residencia del agua en los conductos y depósitos de almacenamiento, del pH del agua y del material de construcción de las tuberías (Colbourne *et al.*, 1988; Schoenen, 1989). El proceso de potabilización puede significar así mismo la incorporación de ciertos compuestos orgánicos o la transformación de aquellos presentes en el agua mediante los procesos de oxidación (ozonación, cloración).

Los sistemas de almacenamiento y distribución de agua potable constituyen un ambiente idóneo para la proliferación bacteriana; el flujo de agua favorece el transporte de nutrientes y bacterias, mientras que las paredes de las tuberías y las partículas presentes en el agua sirven de superficie adherente para los microorganismos. Los organismos adheridos tienen una mayor eficacia para absorber nutrientes y además son más resistentes a los ambientes adversos tales como la escasez de nutrientes y la presencia de desinfectantes. Debido a toda la problemática creada por la presencia y proliferación bacteriana en los sistemas de abastecimiento, diversos investigadores (van der Kooij *et al.*, 1982; Joret y Levi, 1986; Servais *et al.*, 1987; Lucena *et al.*, 1990; Frías *et al.*, 1992; Hermanowicz *et al.*, 1991) han desarrollado diferentes métodos para evaluar el factor limitante del crecimiento bacteriano en el agua potable, a fin de evitar o limitar el crecimiento biológico en las redes de abastecimiento.

¹ Departamento de Ingeniería Hidráulica, Marítima y Ambiental. E.T.S. Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos de Barcelona. Universidad Politécnica de Cataluña

Artículo publicado en *Ingeniería del Agua*. Vol.4 Num.2 (junio 1997), páginas 17-28, recibido el 9 de octubre de 1996 y aceptado para su publicación el 9 de junio de 1997. Pueden ser remitidas discusiones sobre el artículo hasta seis meses después de la publicación del mismo. En el caso de ser aceptadas, las discusiones serán publicadas conjuntamente con la respuesta de los autores en el primer número de la revista que aparezca una vez transcurrido el plazo indicado.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este artículo es revisar y comparar los métodos propuestos para medir el contenido de materia orgánica biodegradable (MOB) de un agua y el crecimiento bacteriano que esta materia orgánica puede generar en las instalaciones de tratamiento y distribución de agua potable. Por otra parte, este artículo contiene una descripción del proceso de formación y desarrollo de la película biológica en los sistemas de abastecimiento de agua, y una valoración de la influencia que los materiales de construcción de las tuberías tienen sobre el crecimiento bacteriano.

MOB: FACTOR LIMITANTE DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

El crecimiento bacteriano en los sistemas de abastecimiento de agua está constituido en gran parte por bacterias heterótrofas, organismos que obtienen energía y carbono para su crecimiento y reproducción a partir de la materia orgánica biodegradable (MOB). La mayor parte de la energía y del carbono utilizados por los heterótrofos la aportan las moléculas de carbono orgánico disueltas (COD) en el agua de origen (Kaplan *et al.*, 1992). Además de la fracción de MOB presente en el agua de origen, el carbono biodegradable de un agua aumenta generalmente cuando se la somete a procesos de oxidación parcial de la materia orgánica, tales como la ozonación y la cloración (Frías, 1992). Por otra parte, autores como Schoenen (1989) postulan la teoría de que el crecimiento bacteriano en las redes de abastecimiento no es debido al carbono contenido en el agua, sino al liberado por los materiales de las tuberías.

El hecho de que no todo el carbono presente en un agua pueda ser utilizado por las bacterias para su crecimiento

ha llevado a diferentes investigadores a desarrollar métodos para medir la fracción de carbono que puede ser utilizado por éstas. Los métodos propuestos se clasifican en dos grandes grupos: por una parte, un grupo de investigadores ha tratado de medir el carbono orgánico disuelto biodegradable (CODB) (Joret y Levi, 1986; Servais *et al.*, 1987 y 1989; Ribas *et al.*, 1991) mediante la determinación de la disminución que experimenta el carbono orgánico disuelto debido a la actividad bacteriana y, por otra parte, otro grupo de investigadores ha tratado de determinar el contenido de carbono orgánico asimilable (COA) de un agua (van der Kooij *et al.*, 1982; Jago y Stanfield, 1984) mediante la determinación de la fracción de carbono que es convertida en biomasa bacteriana. La *Tabla 1* resume la definición de los parámetros CODB y COA.

MÉTODOS DE EVALUACIÓN DEL CODB

El carbono orgánico disuelto biodegradable (CODB) juega un papel importante en el ciclo de la materia orgánica de las aguas naturales, y su determinación es de especial interés en el campo de la producción y distribución de agua potable. Actualmente, la información relativa al contenido de CODB de un agua puede influir en la selección de las alternativas de tratamiento (filtración, ozonación) que permitan asegurar una mejor gestión de la calidad del agua potable (Lucena *et al.*, 1990). En cuanto a las formas de valorar el CODB, los investigadores han optado por desarrollar métodos que permitan determinar la disminución experimentada por el carbono orgánico disuelto en una muestra de agua, tras inocularla con una flora bacteriana autóctona y someterla a un proceso de incubación. La *Tabla 2* resume los diferentes métodos propuestos para determinar el CODB.

Carbono orgánico disuelto biodegradable CODB	Carbono orgánico disuelto asimilable COA
Es la porción de carbono orgánico disuelto en el agua que puede ser mineralizada por microorganismos heterótrofos.	Es la porción de carbono orgánico biodegradable que puede ser convertida en masa celular, expresada como la concentración equivalente de carbono mediante un factor de conversión del crecimiento celular.

Tabla 1: Definición de los parámetros utilizados para valorar el potencial de crecimiento bacteriano de un agua a partir de su contenido de carbono orgánico biodegradable

Método	Preparación muestra	Inóculo	Incubación días	Temperatura °C	Parámetro medido
Joret y Levi, 1986	Ninguna	Arena de filtro de planta de tratamiento sin precloración	11	≈20	COD
Servais <i>et al.</i> , 1987, 1989	Esterilización por filtración	Agua de la muestra o de río	10-30	20±0,5	COD
Ribas <i>et al.</i> , 1991	Filtración	Agua de río y de salida de filtros de carbón	2 horas a 5 días	21±2	COD

Tabla 2: Métodos de medida del CODB basados en la determinación de la disminución del COD (apartado de Huck, 1990 y Frías, 1992)

Método de Jorety Levi (1986)

Este método fue propuesto en el año 1986 para determinar el CODB de un agua utilizando como inóculo una flora bacteriana mixta fijada de forma natural sobre granos de arena prelavados obtenidos de una planta potabilizadora (sin precloración); el método consiste en seguir la disminución del carbono orgánico disuelto (COD) entre 3 y 7 días, manteniendo la muestra aireada y a temperatura ambiente. Es un método sencillo que no requiere la preparación de la muestra, evitando de este modo posibles modificaciones de la calidad del carbono orgánico biodegradable inicialmente presente en el agua.

Método de Servais et al. (1987, 1989)

Este método fue propuesto en 1987 para determinar el CODB de un agua valorando por un lado la disminución del COD y por otro la evolución de la biomasa con el tiempo. Es un método laborioso que requiere la preparación previa de la muestra. La muestra se hace pasar por un filtro de 0,2 μm . A continuación se inocula con un 1% en volumen de agua de un proceso de potabilización (generalmente el efluente de la filtración con arena) que ha sido filtrada con un filtro de 2 μm de poro para eliminar los protozoos presentes. La incubación se realiza a 20 °C aproximadamente y en la oscuridad durante un período de 10 a 30 días. La primera variante del método se basa en la medida de la disminución del COD durante el período de incubación y es fácil de realizar; sin embargo, tiene poca sensibilidad debido a la escasa precisión de los equipos de medida para bajas concentraciones de COD.

La segunda variante del método consiste en medir diariamente, durante el periodo de incubación, el número de bacterias y su volumen total. La utilización de materia orgánica por parte de las bacterias se estima a partir de la medida de la biomasa total y de su mortalidad total, ya que la mortalidad total equivale a la producción total de biomasa, y es más fácil de determinar experimentalmente. El CODB se obtiene dividiendo la mortalidad total (igual a la producción total de biomasa) por el factor de crecimiento celular (masa bacteriana producida por unidad de materia orgánica utilizada) obtenido experimentalmente.

Método de Ribas et al. (1991)

Este método se basa en la utilización de un reactor de 2 columnas de vidrio conectadas en serie y rellenas de un material inerte colonizado con bacterias heterótrofas propias del agua a analizar; el tiempo empleado en la colonización del material de las columnas es de 5 a 8 días a fin de conseguir la adaptación de la biopelícula al agua que se trata de analizar. El agua potable se hace circular a contracorriente y a caudal constante por el reactor (Figura 1) de manera que el carbono presente en la muestra pueda ser consumido por las bacterias de la biopelícula. El tiempo empleado por el agua para atravesar las columnas es de 2 horas. La concentración de COD se mide a la entrada y a la salida del reactor, y la diferencia entre ambos resultados constituye el valor del CODB.

El seguimiento del COD se realiza durante 5 días hasta obtener un valor estable o constante.

La característica esencial de los métodos basados en la medida de la disminución del COD es el uso de un medio de soporte (arena de filtro, vidrio poroso sinterizado) que permite aumentar enormemente la cantidad de biomasa presente. La incorporación de una biopelícula hace que este ensayo sea más representativo del proceso de tratamiento y distribución de agua que aquellos métodos que evalúan el crecimiento de bacterias en suspensión (Huck, 1990). Una limitación importante de los métodos basados en la medida del CODB es su reducida sensibilidad cuando se aplican a aguas con bajas concentraciones de COD, pues es difícil detectar diferencias menores de 0,1 mg C/l. La precisión y exactitud de la medida de niveles bajos de COD depende del equipo utilizado y de la posible contaminación tanto bacteriana como de carbono que pueda producirse en el laboratorio.

MÉTODOS DE EVALUACIÓN DEL COA

El carbono orgánico asimilable (COA) es la porción de carbono orgánico biodegradable de un agua que puede ser convertida en masa celular, medida mediante el máximo crecimiento bacteriano (N_{max}) que una muestra de agua puede promover en condiciones normalizadas. Los métodos de determinación del COA se basan en el seguimiento de la evolución de la biomasa bacteriana de una muestra de agua previamente inoculada; el nivel máximo alcanzado por la biomasa bacteriana se transforma en unidades de carbono orgánico mediante un factor experimental que relaciona la biomasa bacteriana con el carbono asimilable presente en el agua (Huck, 1990). La Tabla 3 resume los diferentes métodos propuestos para determinar el COA.

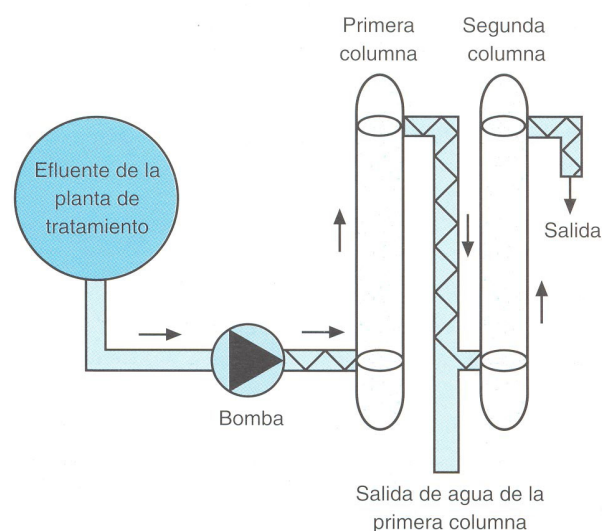


Figura 1: Reactor para la determinación del CODB (Frias et al)

Método	Inóculo	Preparación muestra	Incubación días	Temperatura °C	Calibración	Parámetro medido
Van der Kooij et al., 1982	Cepas puras P17 y NOX	Pasteurización	<20	15°	Acetato sódico	UFC/ml
Kemmy et al., 1989	<i>P. fluorescens</i> <i>Curtobacterium sp.</i> <i>Corynebacterium sp.</i> <i>Corynebacterium</i> no identificadas	Esterilización por filtración	6	20°	Mezcla de compuestos orgánicos	UFC/ml
Rice et al., 1989 USEPA-coliform growth response	<i>E. coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	Esterilización por filtración	5	20°	Ninguna	UFC/ml
Werner, 1985	Agua de una muestra	Esterilización por filtración	2,5 a 5	≈20°	Ninguna	Pendiente de la curva
Jago y Stanfield, 1984	Agua de río o de sistemas de abastecimiento	Esterilización por filtración	Hasta alcanzar el máximo valor de ATP	20°	Factor de conversión estándar asumido	ATP
Servais et al, 1987	Efluente de la planta	Esterilización por filtración	10 a 30	≈20°	Ninguna	Células/ml y tamaño

Tabla 3: Métodos de obtención del COA basados en la medida de la biomasa celular

Método de van der Kooij (1982)

Este método se basa en la medida del nivel máximo de crecimiento ($N_{m\acute{a}x}$) de una bacteria específica, *Ps. fluorescens* P17 (presente comúnmente en aguas de abastecimiento, aguas superficiales y aguas subterráneas). El principio básico del método es la existencia de una relación lineal entre el nivel máximo de crecimiento de la cepa P17 (UFC/ml) y la concentración de acetato sódico (0-50 $\mu\text{g C/l}$ añadido a una muestra de agua de abastecimiento, tal como se muestra en la Figura 2. El factor de producción (Y) de la cepa P17, cuando utiliza acetato sódico como sustrato, viene dado por la pendiente de la recta patrón de la Figura 2. Para la determinación de compuestos que no son utilizados por la cepa P17, tales como los ácidos carboxílicos (oxálico, fórmico) frecuentemente producidos durante la ozonación, van der Kooij y Hijnen (1984) han propuesto una modificación del método original, consistente en la utilización de *Spirillum* (NOX) que es capaz de usar el oxalato. El contenido de COA de una muestra de agua obtenido mediante la cepa P17 puede calcularse con la siguiente expresión (Frías, 1992):

$$\frac{N_{MAX} (UFC / ml) \times 1000}{Y(UFC) / \mu\text{gC} - \text{acetato}} = COA(\mu\text{gC} - \text{acetato} / l)$$

Cuando se utilizan las cepas P17 y NOX como inóculo, es necesario calcular por separado el valor de Y para el acetato y el valor de Y para el oxalato, obteniéndose el valor del COA total como la suma de los obtenidos usando cada cepa.

Frías y colaboradores (1994) realizaron una serie de investigaciones para evaluar el método de van der Kooij, observando que el factor de producción (Y) y la asimilación de carbono de la cepa de *Ps. fluorescens* P17 variaban con el tiempo de almacenamiento de los stocks de P17. Además, la relación lineal entre la concentración de carbono y el máximo crecimiento deja de existir

a elevadas concentraciones de carbono (100 $\mu\text{gC/l}$). Frías y colaboradores (1994) concluyeron que el método propuesto por van der Kooij para la determinación del COA evidenciaba una reproductibilidad variable, lo que dificulta su normalización y utilización de forma sistemática.

El método de van der Kooij puede considerarse el protocolo de análisis básico para la determinación del COA; los métodos desarrollados posteriormente, y que se describen a continuación, introducen modificaciones específicas que se indican en cada caso.

Método de Kemmy et al. (1989)

Este método es similar al de van der Kooij y consiste en la incubación a 20°C de una muestra de agua previamente filtrada con un filtro de membrana adecuado para

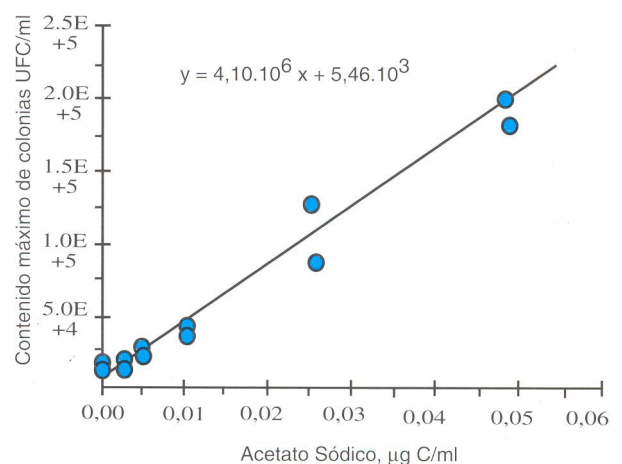


Figura 2: Recta patrón de la relación entre el máximo crecimiento de P17 y diferentes concentraciones de acetato sódico añadido a una muestra de agua de abastecimiento (van der Kooij et al., 1982)

eliminar su contenido bacteriano, e inoculada con un cultivo mixto de bacterias (Tabla 2). El cálculo del COA se realiza a partir del crecimiento de un conjunto de especies microbianas, obtenido mediante recuento por vertido en placa con agar nutritivo. La conversión del crecimiento bacteriano en COA se efectúa mediante una curva de calibración obtenida con una mezcla estándar de compuestos orgánicos (peptona y extracto de levadura complementados con acetato y glucosa) (Huck, 1990).

Método de Rice et al. (1989)

Este método trata de determinar la capacidad de un agua para promover el crecimiento de coliformes. Una muestra de agua filtrada se inocula con una o más especies de coliformes y se incuba a 20 °C durante 5 días; se miden las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) al comienzo y al final del período de incubación, y por comparación se valora el crecimiento que registrarían los coliformes en ese agua.

Método de Werner (1985)

Este método se basa en la existencia de una correlación entre la turbiedad de un agua y su contenido total de células bacterianas. Las muestras de agua a analizar son filtradas con un filtro de membrana adecuado para eliminar su contenido bacteriano; posteriormente se inoculan con una misma suspensión de bacterias obtenidas de uno de los filtros. La muestra inoculada se incuba a 20 °C entre 2,5 y 5 días, midiéndose la turbiedad diariamente. Los resultados se representan mediante una curva de variación de la turbiedad (log biomasa) con el tiempo; la pendiente de esta línea representa la biodegradabilidad del sustrato, y el logaritmo del cociente entre la biomasa final y la inicial es una medida de la cantidad de sustrato utilizado.

Método de Jago y Stanfield (1984)

Este método se basa en la evaluación del crecimiento experimentado por un inóculo mixto de bacterias autóctonas mediante la determinación de la concentración de adenosintrifosfato intracelular (ATP). La concentración de ATP se mide diariamente hasta alcanzar un máximo que se transforma en concentración de COA por medio de un factor de conversión.

En general, los métodos basados en la medida de la biomasa bacteriana (COA) son bastante similares entre sí y consisten en obtener el número máximo de microorganismos que se han desarrollado a partir de un inóculo y transformarlo en carbono orgánico asimilable mediante un factor experimental o supuesto, según el método en cuestión. La diferencia básica radica en el inóculo utilizado, bien sea un inóculo de una cepa conocida y normalizada, o bien un inóculo mixto de microorganismos autóctonos (desconocidos).

El uso de un inóculo conocido permite controlar el comportamiento de la cepa y comparar los resultados obtenidos por diferentes autores. Por otra parte, un inóculo autóctono ofrece una evaluación más representativa de las condiciones existentes en el agua y su entorno.

COMPARACIÓN ENTRE MÉTODOS DE MEDIDA DEL COA Y DEL CODB

La diferencia básica entre ambas tendencias radica en el parámetro a medir, ya sea la disminución del COD cuando se trata de valorar el CODB o la evolución de la biomasa cuando se trata de medir el COA. La cuantificación del COA proporciona valores sistemáticamente inferiores a los estimados para el CODB, y no ofrece una estimación del carbono orgánico refractario. Todos los métodos requieren una buena técnica de limpieza del instrumental utilizado en los ensayos, a fin de evitar la contaminación por bacterias y carbono.

Ninguno de los métodos es necesariamente más rápido que los demás. Mientras que algunos métodos requieren poco tiempo (5 días), otros necesitan hasta 30 días para completar los ensayos. El método de Ribas *et al.* (1991) parece ofrecer una reducción considerable del tiempo de análisis pues, una vez colonizado el material de soporte y alcanzada la adaptación de la biopelícula al agua de estudio (5-8 días), el tiempo requerido para la valoración de la disminución del COD es sólo de 2 horas.

Los métodos propuestos hasta el momento evidencian una gran dispersión en los procedimientos de trabajo, tales como el inóculo utilizado (entre 1 y 4 especies de bacterias conocidas normalizadas o un inóculo mixto de bacterias autóctonas), el tiempo de incubación de las muestras inoculadas y la forma de manipulación de las mismas, la forma y el instrumental de laboratorio, y el procedimiento de limpieza. Todos estos factores han dificultado la normalización de los métodos, por lo que ninguno puede ser considerado apto para un uso sistemático en los sistemas de potabilización de agua. Sin embargo, y a pesar de todos los problemas que presenta la determinación del COA, el método de van der Kooij ha sido propuesto en la última edición del *Standard Methods* (1995) como método de referencia.

PELÍCULA BIOLÓGICA EN LAS REDES DE ABASTECIMIENTO

La capacidad de las bacterias para adherirse a las superficies internas de los conductos y colonizar un sistema de abastecimiento ha sido estudiada por numerosos investigadores (Dott y Schoenen, 1981; Ridgway y Olson, 1981; Herson *et al.*, 1987; LeChevallier *et al.*, 1987; Schoenen y Colbourne, 1987; vander Wende *et al.*, 1989; Costerton, 1993; LeChevallier *et al.*, 1993; Keevil *et al.*, 1995). La presencia de una biopelícula en las redes de abastecimiento tiene importancia debido a la formación de productos que pueden deteriorar la calidad organoléptica del agua, o a la creación de problemas sanitarios derivados de la presencia de bacterias potencialmente patógenas que han conseguido sobrevivir a los procesos de potabilización (Donlan *et al.*, 1994; Keevil *et al.*, 1995). Como punto de referencia basta citar que el número de bacterias presentes en una biopelícula de una red de abastecimiento oscila entre 10^5 y 10^7 células/cm², dependiendo de los nutrientes disponibles y de las ca-

racterísticas fisicoquímicas del medio, mientras que el número de bacterias en suspensión varía entre 10 y 10^3 células/ml (Keevil *et al.*, 1995).

Una red de abastecimiento tiene dos fases diferenciadas que interactúan entre sí formando un ecosistema particular. Por un lado se encuentra el agua circulante, que sirve de medio de transporte para los nutrientes y las bacterias, y por otro están las paredes de las tuberías, donde ocurren fenómenos de fijación bacteriana y formación de la película biológica (Figura 3). El desarrollo y acumulación de la biopelícula en la pared de las tuberías es el resultado de al menos tres procesos (Characklis, 1988):

- Transporte y adsorción de células en las paredes de las tuberías.
- Reproducción celular y formación de subproductos.
- Desprendimiento parcial de la biopelícula por efecto de la erosión y la pérdida de adherencia.

La Figura 3 muestra las diferentes etapas de que consta el proceso de formación de la película biológica. En primer lugar existe un acondicionamiento de la superficie de la tubería por adsorción de materia orgánica en las paredes, ayudado por el transporte de células microbianas desde la masa de agua circulante. Parte de las células que llegan a la superficie del tubo se adhieren irreversiblemente y otras vuelven al flujo de agua. Las células que han conseguido mantenerse adheridas a la superficie crecen a expensas del sustrato contenido en el agua, aumentando así el número de microorganismos integrantes de la biopelícula. Además, estas células ex-

cretan sustancias poliméricas (SPE) que pasan a formar parte de la película biológica, aumentando su tamaño. Posteriormente, y una vez formada una capa base de biopelícula, ésta se convierte en un lecho viscoso que permite el atrapamiento de células y nutrientes, formando en ocasiones una superposición de microcolonias entre las cuales puede circular agua. Por último, la biopelícula experimenta un desprendimiento parcial de su masa por efecto del movimiento del fluido y de la acción mecánica de otras partículas que chocan contra ella, pudiendo llegar a producirse desprendimientos masivos de capas por pérdida de cohesión o adherencia (Characklis, 1988).

Durante la formación de la biopelícula, las condiciones hidrodinámicas del flujo regulan el transporte de microorganismos desde la masa de agua hacia la superficie; una vez formada la película, las condiciones hidrodinámicas en las inmediaciones de la superficie modificada controlan el transporte de nutrientes y metabolitos hacia, desde y en la biopelícula (Lewandowski y Stoodley, 1995). El fenómeno de transporte de materia (nutrientes, oxígeno y desinfectante) en la biopelícula está limitado por la transferencia y difusión hacia el interior de la misma, así como por el consumo celular de oxígeno y de nutrientes (Figura 4) (Tejero *et al.*, 1995). Las concentraciones de nutrientes, de oxígeno y de desinfectante disminuyen desde la zona de libre circulación del agua hacia el interior de la biopelícula. Las biopelículas pueden contener microorganismos aerobios y anaerobios formando diferentes microambientes, en función de su accesibilidad al sustrato y al oxígeno (LeChevallier *et al.*, 1987; Characklis y Marshall, 1990).

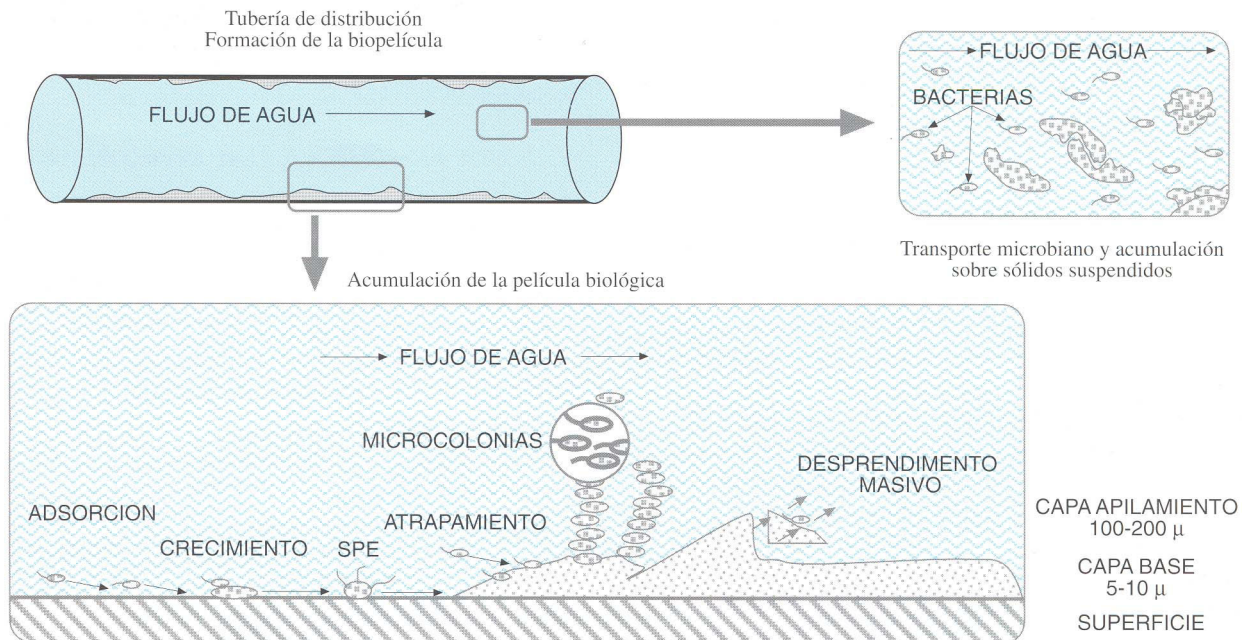


Figura 3: Proceso de crecimiento bacteriano sobre las paredes de las tuberías y las partículas suspendidas (adaptado de Costerton, 1993 y Keevil *et al.*, 1995)

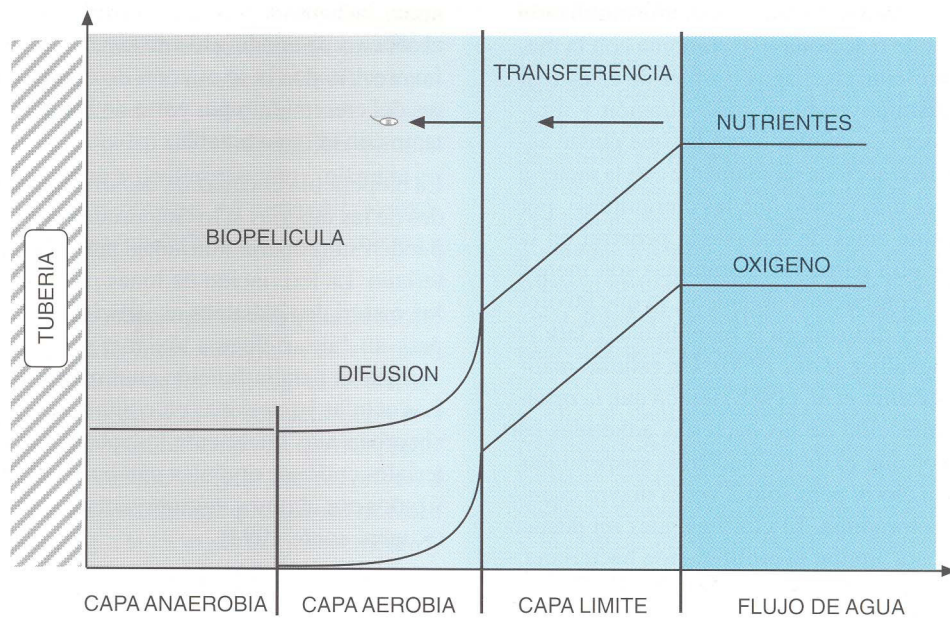


Figura 4: Transporte de los materiales en la biopelícula (Tejero et al., 1995)

DESINFECTANTES Y COLONIZACIÓN BACTERIANA

La biopelícula es un lecho viscoso que dificulta y reduce la penetración del cloro hacia sus capas interiores y por tanto actúa como barrera protectora de los microorganismos que allí se encuentran (LeChevallier *et al.*, 1988). Diferentes investigadores han demostrado que la mayoría de las bacterias presentes en aguas cloradas están adheridas a partículas suspendidas o a las paredes de las tuberías, lo que hace suponer que los microorganismos asociados a una superficie están protegidos frente a una desinfección convencional (cloro residual de 0,1 a 0,3 mg/l) y no son normalmente inactivados (LeChevallier *et al.*, 1990; Ridgway y Olson, 1981; Herson *et al.*, 1991).

La eficiencia desinfectante del cloro sobre los microorganismos fijados en una biopelícula depende al menos de cuatro factores:

- 1° Demanda de cloro del agua y de la biopelícula.
- 2° Cantidad de película biológica acumulada.
- 3° Concentración de cloro en la interfase agua-materia.
- 4° Dosis de cloro aplicada (Characklis y Marshall, 1990).

Sin embargo, la dificultad para estimar dicha eficiencia reside en la imposibilidad de predecir exactamente los niveles de tratamiento necesarios para eliminar o limitar la acumulación de una película biológica responsable del deterioro de la calidad del agua, así como de aplicar el desinfectante más adecuado en razón del tipo y la edad de la biopelícula acumulada (LeChevallier *et al.*, 1990).

El desarrollo de técnicas avanzadas de visualización microscópica —*Confocal Scanning Laser Microscopy* (CSLM), *Episcopic Differential Interference Contrast* (EDIC), *Laser Doppler Anemometry* (LDA), *Nuclear*

Magnetic Resonance Imaging (NMRI)— ha permitido obtener imágenes de biopelículas extremadamente heterogéneas (diversidad microbiana, reacciones internas, presencia de sustancias poliméricas extracelulares (SPE), células muertas, propiedades físicas) con una estructura de canales que permite la penetración de los nutrientes y posiblemente de los desinfectantes (Figura 3). Sin embargo, la variación observada en la morfología celular de las microcolonias integrantes de una biopelícula sugiere una estrecha relación fisiológica entre las especies presentes, lo que confiere a las células una mayor protección frente a los desinfectantes (Keevil *et al.*, 1995; de Beer y Stoodley, 1995; Bishop y Rittmann, 1995; Lewandowski y Stoodley, 1995).

Trabajos recientes han confirmado que las células adheridas experimentan una expresión genética diferencial que favorece la producción de polímeros extracelulares, aumentando así la adherencia o la consolidación de la estructura de la biopelícula (Davies *et al.*, 1993). Los organismos adheridos también alteran su morfología y su tasa de crecimiento dependiendo del sustrato y de las características físico-químicas del medio. Por estas razones, la resistencia aparente de la biopelícula a los biocidas puede ser el resultado de la alteración química de la superficie celular y de los mecanismos de adsorción, afectando de este modo la penetración del desinfectante en la película biológica; por otra parte, una tasa de crecimiento lento de las células hace que su metabolismo y sus ácidos nucleicos sean menos sensibles al efecto de los biocidas en puntos específicos (Keevil *et al.*, 1995).

De este modo, las células presentes en la biopelícula están protegidas y solamente son inactivadas con concentraciones de biocida un orden de magnitud superior al necesario para inactivar las células suspendidas (Characklis, 1988; Clark *et al.*, 1994). Durante el tiempo que el agua

permanece en la red, el cloro utilizado como desinfectante reacciona o se combina con la materia orgánica presente en el agua o adherida a la pared de la tubería, disminuyendo su concentración y limitando así el número de células sobre las que puede actuar. El cloro libre reacciona rápidamente con la materia orgánica (2 veces más rápido que las cloraminas), por lo que se consume antes de que pueda penetrar en la biopelícula. Por otra parte, las cloraminas son menos reactivas con los compuestos orgánicos, lo que favorece su penetración y difusión en la biopelícula (Clark *et al.*, 1994; LeChevallier *et al.*, 1990). Un estudio realizado por LeChevallier *et al.* (1988) indica que la resistencia a la desinfección de las bacterias adheridas es 150 veces mayor que el de las bacterias suspendidas cuando se utiliza cloro, pero sólo 2 veces mayor cuando se usa monoclóramina. El cloro es pues un desinfectante eficaz para limitar la proliferación bacteriana, pero no consigue impedir la totalmente (de Beer *et al.*, 1994).

La elección del desinfectante residual depende de los mecanismos de resistencia observados en las bacterias de la biopelícula. Estudios realizados por LeChevallier *et al.* (1990) muestran que la adherencia a una superficie altera el mecanismo de interacción del desinfectante con las bacterias. Teóricamente, la barrera física que una superficie representa puede afectar la capacidad de un desinfectante para acceder a la membrana celular; dicho de otro modo, un organismo adherido es susceptible de ser atacado por una sola zona, mientras que los organismos suspendidos libremente pueden ser atacados por todo su perímetro. Estos mismos autores concluyen que la eficacia desinfectante del cloro depende del tipo de superficie a la que está adherida la biopelícula, de la edad de la película biológica, del encapsamiento de las células y de la concentración de nutrientes presente; por el contrario, el mismo estudio concluye que la eficacia desinfectante de la monoclóramina tan sólo se ve afectada por el tipo de superficie. Estas diferencias entre los mecanismos de acción de los desinfectantes y entre los mecanismos de resistencia de las bacterias han sugerido la posibilidad de desarrollar programas de desinfección basados en una alternancia de los desinfectantes utilizados, como forma de controlar el desarrollo de la biopelícula (LeChevallier *et al.*, 1990).

EFFECTOS DEL MATERIAL DE LAS TUBERÍAS

El contacto del agua con ciertos materiales de la red de abastecimiento puede favorecer el crecimiento bacteriano. Algunos materiales usados en las conducciones de las viviendas pueden permitir incluso la multiplicación de bacterias patógenas oportunistas (van der Kooij y Veenendall, 1993). Mantener la estabilidad biológica de los sistemas de abastecimiento de agua requiere medidas que van más allá de un buen tratamiento del agua en la planta potabilizadora. El crecimiento bacteriano en las redes de abastecimiento de

agua, incluyendo los depósitos de almacenamiento y el sistema de conducción de las viviendas, puede verse favorecido por la liberación de compuestos promotores del crecimiento por parte de los materiales en contacto con el agua potable.

La biopelícula es capaz de desarrollarse sobre las paredes de las tuberías si los materiales que las constituyen pueden suministrar nutrientes para el crecimiento bacteriano. La lixiviación de iones metálicos por parte de los materiales plásticos es suficientemente baja como para no causar efectos tóxicos, pero aportan cationes esenciales para la función enzimática de las bacterias. Las células bacterianas en contacto con los materiales absorben más fácilmente los iones, por lo que los materiales con base orgánica pueden ser directamente utilizados por algunos microorganismos de la biopelícula (Rogers *et al.*, 1994).

La colonización bacteriana de los sistemas de abastecimiento de agua está ampliamente descrita en la bibliografía. LeChevallier *et al.* (1987) describen la presencia de coliformes en forma de biopelículas dispersas sobre nódulos de corrosión, hasta alcanzar valores de 2×10^4 bacterias/cm², y concluyen que la presencia de este tipo de microorganismos en el agua puede depender del tipo de material y de la edad de la propia red. Se ha aislado *Legionella pneumophila* en biopelículas formadas sobre la superficie de instalaciones de fontanería (duchas, grifos, tuberías y válvulas) (Rogers *et al.*, 1994). Colbourne *et al.* (1988) han atribuido la presencia de patógenos en sistemas de abastecimiento de agua potable a la supervivencia de estos organismos en biopelículas formadas sobre las juntas de caucho integrantes de grifos y duchas.

Los materiales de base orgánica (revestimientos, sellantes, plásticos y caucho) o con aditivos orgánicos (mortero de cemento con compuestos orgánicos) pueden favorecer un intenso crecimiento microbiano. Diferentes observaciones de campo (Schoenen, 1989; Rogers *et al.*, 1994) realizadas en depósitos recubiertos con pinturas bituminosas y resinas epóxicas, películas de PVC, tuberías de poliamida y algunos plásticos han revelado un considerable incremento de la concentración de microorganismos en el agua y un crecimiento microbiano visible sobre la superficie del material. El crecimiento microbiano sólo fue observado sobre los materiales que liberan materia orgánica.

Los materiales inorgánicos (fibrocemento, hormigón, hierro colado, hierro dúctil y acero) se han utilizado desde hace muchos años para la construcción de sistemas de abastecimiento de agua. Los nódulos producidos por corrosión de las tuberías metálicas reaccionan con los desinfectantes y favorecen el desarrollo microbiano al impedir la penetración del cloro. Pedersen (1990) examinó la formación de biopelículas sobre superficies de acero inoxidable y cloruro de polivinilo (PVC), observando que el tiempo necesario para detectar la formación de una biopelícula sobre acero inoxidable

(cloro libre residual = 0,1 mg/l; v = 100 mm/s) fue de 4 meses aproximadamente, mientras que Donlan *et al.* (1994) observaron el desarrollo de una biopelícula sobre hierro colado al cabo de 1 mes. Estas diferencias podrían deberse a la composición química de los materiales o al tipo de desinfectante utilizado en el tratamiento del agua potable, así como a la velocidad del agua, a la composición biológica de la misma y a la temperatura.

Schoenen (1989) realizó estudios comparativos del comportamiento de diferentes materiales en contacto con el agua. Las muestras de los materiales fueron colocadas en un depósito de agua en servicio durante 5 meses. Los resultados obtenidos indican que las pinturas bituminosas y el caucho clorado dieron origen a crecimientos superficiales, siempre que la dosis de cloro en el agua fue inferior a 0,15 mg/l. El fibrocemento y el polimetilmetacrilato no registraron crecimiento superficial en ningún momento.

Por otro lado, Rogers *et al.* (1994) realizaron un extenso estudio comparativo entre diferentes materiales utilizados en sistemas de abastecimiento de viviendas y observaron que todos tenían un alto nivel de colonización en comparación con el vidrio (patrón). A las 24 horas de comenzado el estudio, el acero inoxidable registró la menor concentración de flora bacteriana ($5,24 \times 10^4$ UFC/cm²), mientras que los elastoméricos (látex y etileno-propileno usados como control positivo de crecimiento) exhibieron concentraciones superiores a 1×10^7 UFC/cm². El acero dulce y los materiales plásticos llegaron a desarrollar biopelículas con concentraciones del orden de 10^5 a 10^6 UFC/cm² en el mismo período de tiempo. En la *Tabla 4* se presenta la media del crecimiento bacteriano registrado en cada material al cabo de los 28 días de duración del ensayo.

RESUMEN FINAL

Durante los últimos 15 años se han propuesto distintos métodos para determinar la fracción de carbono orgánico que puede ser utilizado por las bacterias para su desarrollo en las redes de abastecimiento de agua, diferenciándose dos tendencias claras de investigación. Por una parte, se han desarrollado métodos destinados a evaluar los efectos de los procesos de tratamiento sobre el nivel de materia orgánica biodegradable de un agua, tratando de estimar su contenido de carbono orgánico disuelto biodegradable (CODB) mediante la disminución registrada por el carbono orgánico disuelto (COD) en condiciones normalizadas. Por otra parte, se han desarrollado métodos para estimar el contenido de carbono orgánico asimilable (COA) de un agua, mediante el crecimiento registrado por la masa bacteriana y la utilización de un factor de conversión entre biomasa y sustrato.

A pesar del gran número de métodos desarrollados para evaluar el potencial de actividad bacteriana de un agua de abastecimiento, ninguno de ellos ha sido normalizado para ser utilizado de forma sistemática en las plantas potabilizadoras y asegurar así la obtención de resultados comparables. El método de van der Kooij (1982) ha sido propuesto en la última edición del Standard Methods (1995) para su posible adopción como método estandarizado para la determinación del COA.

La red de abastecimiento constituye un ambiente favorable para la formación y desarrollo de una película bacteriana. Las condiciones hidrodinámicas del flujo regulan el transporte de nutrientes hacia, desde y en la biopelícula. Además, el transporte de materia (nutrientes, oxígeno y desinfectantes) hacia el interior de la película está limitado por los procesos de transferencia y difusión. La estructura de la biopelícula parece espe-

Material de tubería	Película biológica (a) UFC/cm ²	COT (b) mg/l
Vidrio (control)	1.90×10^5	2.78 ± 0.40
Cobre	4.15 ± 0.17
Acero inoxidable	2.13×10^5
Polipireno	4.54×10^5	5.98 ± 1.56
PVC _c (clorado)	5.14×10^5	6.02 ± 0.11
PVC _n no plastificado	6.23×10^5	5.42 ± 0.11
Acero dulce	1.69×10^6
Polietileno	2.75×10^6	179 ± 0.82
Etileno-propileno	1.08×10^7	157 ± 0.84
Látex	5.50×10^7	320 ± 19.4

a) Valores medios tras un período de incubación de 28 días

b) Valores medios del carbono orgánico total después de tres días de incubación

... No medido

Tabla 4: Análisis comparativo de materiales de tuberías en función de su capacidad para permitir el desarrollo de una biopelícula y lixiviar nutrientes

cialmente diseñada para permitir el intercambio de nutrientes y productos (oxígeno y desinfectante) con el medio ambiente, favoreciendo su transporte y difusión. Los microorganismos adheridos, integrantes de la biopelícula, están más protegidos frente a la acción de los biocidas que los microorganismos en suspensión en el agua. Los microorganismos adheridos tienen una resistencia al cloro 150 veces mayor que los microorganismos en suspensión, mientras que su resistencia a la monocloramina es solamente 2 veces mayor.

El cloro libre reacciona rápidamente con la materia orgánica (2 veces más rápido que las cloraminas), por lo que se consume antes de que pueda penetrar en la biopelícula; por otra parte, las cloraminas son menos reactivas con los compuestos orgánicos, lo que favorece su penetración y difusión en la biopelícula. Las diferencias observadas entre los mecanismos de acción de los desinfectantes y entre los mecanismos de resistencia de las bacterias han sugerido la idea de desarrollar programas específicos de desinfección, basados en una alternancia de desinfectantes, que permita asegurar un control adecuado del crecimiento de la biopelícula.

La composición química de los materiales en contacto con el agua es un factor determinante del desarrollo de la biopelícula, pues los compuestos orgánicos liberados por dichos materiales favorecen el crecimiento de los microorganismos que la integran. El polietileno favorece el mayor crecimiento bacteriano (10^6 UFC/cm²), mientras que el acero inoxidable propicia el menor (10^4 UFC/cm²).

En definitiva, la consecución y el mantenimiento de una adecuada calidad bacteriológica y organoléptica del agua requiere no sólo limitar la concentración de nutrientes en el agua, antes y después del tratamiento de potabilización, sino también efectuar un control de los materiales utilizados en las conducciones de agua, un riguroso mantenimiento de las instalaciones de distribución y un programa de desinfección adecuado. El objetivo último de esta estrategia es limitar o evitar el desarrollo de una biopelícula en las paredes de los depósitos y en las conducciones de agua. Aunque ninguno de los métodos disponibles para determinar el carbono orgánico disuelto biodegradable (CODB) y el carbono orgánico asimilable (COA) han sido normalizados, todos ellos permiten valorar el contenido de carbono orgánico disuelto de un agua, facilitando así una mejor gestión de su calidad en los sistemas de distribución y almacenamiento.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento al Lic. Leonard Matia de la Sociedad General de Aguas de Barcelona y al Dr. Domènec Jolis por sus oportunos comentarios y provechosas sugerencias técnicas, así como al Prof. Francisco Torrella por sus comentarios sobre el manuscrito inicial.

BIBLIOGRAFÍA

- Bishop, P.L. y Rittmann, B.E. (1995) *Modelling heterogeneity in biofilms: report of the discussion session*. Wat. Sci. Tech., 32, 8, 263-265.
- Characklis, W.G. (1988) *Bacterial regrowth in distribution systems*. AWWA Research Foundation and AWWA, Denver.
- Characklis, W.G. y Marshall, K. (1990). *Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach*. Characklis, W.G. y Marshall, K.C. (Eds.), Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Clark, R.M., Lykins, B.W., Block, J.C., Wymer, L.J. y Reasoner, D.J. (1994) *Water quality changes in a simulated distribution system*. Aqua, 43, 6, 263-277.
- Colbourne, J.S., Trew, R.M. y Dennis, P.J. (1988) *Treatment of water for aquatic bacterial growth studies*. J. Appl. Bacteriol., 65, 79-85.
- Costerton, J. W. (1993) *Bacterial transport, biofilms and bioremediation*. Center for Biofilm Engineering News, 1,2, 2-3.
- Davies, D.G., Chakrabarty, A.M. y Geesey, G.G. (1993) *Exopolysaccharide production in biofilms: sub-stratum activation of alginate gene expression by Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol., 59, 4, 1181-1186.
- de Beer, D., Srinivasan, R. y Stewart, P. (1994) *Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection*. Appl. Environ. Microbiol., 60, 12, 4339-4344.
- de Beer, D. y Stoodley, P. (1995) *Relation between the structure of an aerobic biofilm and transport phenomena*. Wat. Sci. Tech., 32, 8, 11-18.
- De Leon, R., Rose, J.B., Bosch, A., Torrella, F. y Gerba, C.P. (1993) *Detection of Giardia, Cryptosporidium and enteric virus in surface and tap water samples in Spain*. International J. Environ. Health Res., 3, 121-129.
- Donlan, R.M. y Pipes, W.O. (1988) *Selected drinking water characteristics and attached microbial population density*. Journal AWWA, 80, 11, 70-76.
- Donlan, R.M., Pipes, W.O. y Yohe, T.L. (1994) *Biofilm formation on cast iron substrata in water distribution systems*. Wat. Res., 28, 6, 1497-1503.
- Dott, W. y Schoenen, D. (1981) *Qualitative and quantitative examination of bacteria found in aquatic habitats 4. Communication: comparison of bacteria of the water and its layer of scum both derived from a reservoir for drinking water*. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B. 174, 171-181.

- Rogers, J., Dowsett, A.B., Dennis, P.J., Lee, J.V. y Keevil, C.W. (1994) *Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of Legionella pneumophila in potable water systems.* Appl. Environ. Microbiol., 60, 6, 1842-1851.
- Schoenen, D. (1989) *Influence of materials on the microbiological colonization of drinking water.* Aqua, 38, 101-113.
- Schoenen, D. y Colbourne, J.S. (1987) *Microbiological evaluation of drinking water construction materials. Comparison of two test procedures.* Zbl. Bakt Hyg., B183, 505-510.
- Servais, P., Billen, G. y Hascoët, M.C. (1987) *Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters.* Wat. Res., 21, 4, 445-450.
- Servais, P., Anzil, A. y Ventresque, C. (1989) *Simple method for determination of biodegradable dissolved organic carbon in water.* Appl. Environ. Microbiol., 55, 10, 2732-2734.
- Sonntag, H.G. (1986) *Experience with bacterial growth in waterworks systems.* Water Supply, 4, 195-197.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1995). APHA, AWWA, and WPCF. Washington, D.C., 19th ed.
- Tejero, I., Jácome, A., Lorda, I. y Santamaría, C. (1995) *Procesos biopelícula de depuración de aguas residuales: procesos convencionales.* Medio Ambiente, RETEMA, 45, 68-84.
- van der Kooij, D., Visser, A. y Hijnen, W.A.M. (1982) *Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water.* Journal AWWA, 74, 10, 540-545.
- van der Kooij, D. y Hijnen, W.A. (1984) *Substrate utilization by an oxalate-consuming Spirillum species in relation to its growth in ozonated water.* Appl. Environ. Microbiol., 47, 3, 551-559.
- van der Kooij, D. (1992) *Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth.* Journal AWWA, 84, 2, 57-65.
- van der Kooij, D. y Veenendaal, H.R. (1993) *Assessment of the biofilm formation potential of synthetic materials in contact with drinking water during distribution.* Presentado a AWWA WQTC, 7-11 nov., Miami.
- van der Wende, E., Characklis, W.G. y Smith, D.B. (1989). *Biofilms and bacterial drinking water quality.* Wat. Res., 23, 10, 1313-1322.
- Werner, P. (1985) *Eine methode zur bestimmung der verkeimungsneigung von trinkwasser.* Vom Wasser, 65, 257-270.