

**COMPARACIÓN DE COLIFORMES Y COLIFAGOS
COMO INDICADORES MICROBIOLÓGICOS DE LA CALIDAD DEL AGUA
EN LOS EMBALSES DOS BOCAS Y LAS CURIAS EN PUERTO RICO**

AUTORES: Zorimar Rivera, Elba J. Maldonado, Rafael A. Rios

Zorimar Rivera es microbióloga industrial graduada del Recinto de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico en 1998. Trabajó como microbióloga en la industria farmacéutica en Puerto Rico por un año y luego comenzó sus estudios de posgrado en el Recinto de Ciencias Medicas en la Universidad de Puerto Rico. Durante el verano del 2000 llevó a cabo un internado en el US Department of Health and Human Services en Maryland, EEUU, trabajando en programas de abasto de agua potable rural. Obtuvo el grado de Maestría en Ciencias en Salud Ambiental en mayo del 2001 y desde entonces trabaja con el Departamento de Agricultura Federal, Servicio de Conservación de Recursos Naturales, en Madison, Wisconsin. Elba J. Maldonado también es graduada del Departamento de Microbiología Industrial del Recinto Universitario de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico y del Departamento de Salud Ambiental del Recinto de Ciencias Medicas de la Universidad de Puerto Rico. Actualmente trabaja como consultora en asuntos ambientales. Rafael A. Rios es graduado de Ingeniería Ambiental de la Universidad de Texas en 1975. Actualmente es catedrático del Departamento de Salud Ambiental del Recinto de Ciencias Medicas de la Universidad de Puerto Rico.

DIRECCIÓN: Toda comunicación debe ser dirigida a Rafael A. Rios, Apartado 22628, San Juan, Puerto Rico, 00931, Teléfono: (787) 758-5808, Fax: (787) 763-9597, Correo electrónico: rafaelrios@altavista.com

FIRMAS: Zorimar Rivera

Elba J. Maldonado

Rafael A. Rios

TITULO: COMPARACIÓN DE COLIFORMES Y COLIFAGOS COMO INDICADORES MICROBIOLÓGICOS DE LA CALIDAD DEL AGUA EN LOS EMBALSES DOS BOCAS Y LAS CURIAS EN PUERTO RICO

RESUMEN

Este estudio tuvo como propósito comparar los coliformes fecales y los colifagos como indicadores microbiológicos de la calidad del agua en los embalses Dos Bocas y Las Curias, correlacionarlos con las prácticas humanas llevadas a cabo en los terrenos de las cuencas y determinar la calidad del agua en los lagos. Estudios realizados anteriormente en países tropicales, incluyendo Puerto Rico, presentan evidencia de que los coliformes fecales no son buenos indicadores de contaminación fecal. Estudios realizados en los embalses Dos Bocas por agencias pertinentes han establecido su contaminación por coliformes fecales.

El embalse Dos Bocas está ubicado entre la jurisdicción de Arecibo y Utuado, en Puerto Rico. Su uso principal es la producción de energía eléctrica y además forma parte del Proyecto del Súper Acueducto de la Costa Norte para suplir agua potable al área metropolitana. El embalse Las Curias esta localizado en el Barrio Cupey de Rio Piedras en el Municipio de San Juan. Originalmente fue utilizado como abasto de agua potable, pero actualmente no esta en uso. El estudio se realizó tomando muestras semanales en tres estaciones en diversos puntos del embalse Dos Bocas y en cuatro estaciones en el embalse Las Curias por un periodo de doce semanas.

Los resultados revelaron la capacidad de los colifagos como indicadores microbiológicos de la calidad del agua en los embalses. Pudieron ser detectados en presencia de materia fecal al igual que los coliformes. Se establecen correlaciones entre colifagos y coliformes fecales. Los colifagos no son estándares de contaminación fecal pero se presenta evidencia para revisar los estándares actuales. De igual manera se confirma la contaminación por material fecal en los lagos, aunque las concentraciones de coliformes en Las Curias fueron sustancialmente menores.

Se recomienda hacer estudios en otros cuerpos de agua y utilizarlos para comparar las cantidades de colifagos con la degradación ambiental de los mismos.

INTRODUCCIÓN

Los recursos naturales son de gran importancia para un país. Uno de los recursos naturales más importantes son los recursos de agua. Los cuerpos de agua son versátiles debido a sus múltiples usos. Sirven como abastos de agua potable, generación de energía, navegación y riego, entre otros. En Puerto Rico la demanda por abastos de agua aumenta cada día. El consumo humano, la agricultura y las industrias requieren grandes cantidades de agua. Debido a su vital uso es importante protegerlos de cualquier tipo de contaminación. La protección de los abastos de agua de la contaminación fecal resulta de gran importancia en la salud pública.

La superficie del agua está frecuentemente sujeta a dramáticos cambios en la calidad microbiológica como resultado de una gran cantidad de actividades en las capas del agua (Geldreich, 1990). Estos cambios pueden darse de forma natural o ser auspiciados por el hombre. A consecuencia de esto pueden llegar hasta los cuerpos de agua diferentes tipos de contaminación incluyendo heces fecales humanas y de animales. Esto es de vital importancia en países tropicales incluyendo a Puerto Rico.

La transmisión de enfermedades a través del agua es uno de los grandes problemas de la salud pública, especialmente en áreas tropicales. Muchas de estas enfermedades son causadas por bacterias enteropatógenas, parásitos y virus. Es por esta razón que la calidad de los abastos de agua debe mantenerse de forma que no afecte la salud de la población. Para mantener la calidad del agua se crean estándares de calidad de agua. Estos se asignan a base de los usos que se le dé a los diferentes cuerpos de agua. Dentro de los estándares de calidad de agua se destacan los parámetros químicos, físicos y biológicos del agua. Algunos de estos son color, pH, turbiedad, oxígeno disuelto y coliformes, entre otros. Los coliformes son el parámetro indicador que se utiliza para determinar la calidad bacteriológica del agua. Los coliformes son indicadores microbiológicos del agua. Un organismo indicador es aquel que su presencia indica que organismos similares podrían estar presentes.

Tradicionalmente se han utilizado tres grupos de organismos como indicadores de la calidad microbiológica del agua: coliformes totales, coliformes fecales y enterococos. Los coliformes son organismos aeróbicos y aeróbicos facultativos, Gram negativos, bacilos no formadores de esporas, que producen ácido y gas de la fermentación de lactosa. Los coliformes no tienen requerimientos especiales para su desarrollo y pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Usualmente se encuentran en los intestinos de los vertebrados. Los coliformes se dividen en dos grupos, los coliformes totales y los coliformes fecales. Los coliformes fecales se diferencian por su habilidad de fermentar lactosa y crecer a 44.5 °C. Los coliformes más comunes son

Escherichia coli y *Enterobacter aerogenes*. Sin embargo, existe evidencia en contra de los coliformes como indicadores de contaminación.

Estudios recientes en diferentes países tropicales, incluyendo Puerto Rico, han encontrado a *Escherichia coli* en lugares no contaminados. Por ejemplo, se ha encontrado coliformes río arriba en el Río Mameyes entre los pueblos de Río Grande y Luquillo (Toranzos y Delgado, 1992). *E. coli* puede sobrevivir y permanecer fisiológicamente activa y crecer dependiendo de los niveles de nutrientes (Bermúdez y Hazen, 1988). De acuerdo con Hazen y Toranzos (1990) no existe una correlación positiva entre la presencia de *E. coli* y otras bacterias patógenas como *Yersinia enterocolitica*, *Legionella pneumophila* y algunas levaduras.

Otro problema que se confronta en las pruebas es la alta frecuencia de falsos positivos y falsos negativos cuando se utilizan técnicas y medios de cultivo con baja especificidad y selectividad (Santiago-Mercado y Hazen, 1987). Los virus que infectan bacterias, especialmente los colifagos, han sido propuestos como alternativa para determinar contaminación fecal.

Los virus que infectan bacterias son denominados bacteriófagos. Los colifagos son parásitos de *E. coli*. Estos están presentes o asociados con microorganismos relacionados a la contaminación fecal. Se encuentran en la flora natural del intestino de animales de sangre caliente. Por lo tanto, su presencia se asocia con contaminación fecal. Se han propuesto los bacteriófagos como indicadores de contaminación fecal porque se encuentran en heces fecales, aguas residuales, son más resistentes a métodos para el procesamiento de agua y los ensayos de laboratorio son más fáciles y menos costosos, entre otras razones.

Los coliformes son estándares microbiológicos obligatorios desde 1914. Hoy día se conoce que existen deficiencias en este grupo para utilizarlo como indicadores de calidad de agua. En Puerto Rico la calidad de agua de los lagos o embalses tiene su punto más crítico en los problemas de exceso de nutrientes, sedimentación y contaminación fecal.

El lago Dos Bocas está localizado entre los municipios de Arecibo y Utuado. Fue construido en 1942 para la producción de energía eléctrica. Está clasificado por la Junta de Calidad Ambiental¹ bajo el reglón de contaminación moderada afectándose algunos de sus usos. Según la JCA (1999), las posibles fuentes de contaminación son aguas usadas sin tratar provenientes de la planta de filtración de agua potable río arriba. Actualmente este embalse se utiliza para la producción de energía eléctrica, para suplir agua a algunas comunidades del área y forma parte del proyecto del Superacueducto de la Costa Norte que sirve agua potable al área metropolitana.

¹ En adelante la JCA

El lago Las Curias esta localizado en el Barrio Cupey de Rio Piedras en el municipio de San Juan. Fue construido en 1946, originalmente fue utilizado como abasto de agua potable. Evaluaciones de la JCA para el año 1995 clasifican este embalse como uno mesotrófico, pero para 1997 fue clasificado como oligotrófico. Las posibles fuentes de contaminación del lago son descargas sanitarias de comunidades aledañas y desperdicios sólidos que son depositados a sus orillas.

La calidad de las aguas en los embalses de Puerto Rico ha ido disminuyendo a través del tiempo. Esta merma se debe a la falta de mantenimiento y a las prácticas humanas inadecuadas en las áreas cercanas a los embalses y sus respectivas cuencas hidrológicas.

Conforme lo dispone la Ley Federal de Agua Limpia de 1977 la JCA prepara reportes cada dos años sobre la calidad de los cuerpos de agua en Puerto Rico. La JCA establece sus propios estándares para calidad de agua los cuales incluyen coliformes fecales según los usos del cuerpo de agua. Estos estándares se presentan en la Tabla 1.

TABLA 1. ESTÁNDARES DE COLIFORMES FECALES PARA LA CALIDAD DE AGUA EN PUERTO RICO

Clasificación del cuerpo de agua	Estándar para coliformes fecales
Aguas Clase SA	Este parámetro no será alterado, excepto por causas naturales
Aguas Clase SB	200 colonias/100 ml
Aguas Clase SC	2,000 colonias/100 ml
Aguas Clase SD	2,000 colonias/100 ml
Aguas Clase SE	Este parámetro no será alterado, excepto por causas naturales
Aguas Clase SG1	0 colonias/10 ml
Aguas Clase SG2	No aplica

En las Tabla 2 y 3 se presentan datos del estado de calidad de agua en los embalses de Puerto Rico. En términos generales se puede observar que la

calidad de las aguas en los embalses de Puerto Rico ha disminuido. Han aumentado los embalses eutroficados y los embalses con problemas de oxígeno disuelto. Como se ha señalado anteriormente esto demuestra la falta de manejo y la inacción en la búsqueda de prácticas correctivas para el control de las fuentes de contaminación.

Este trabajo recopila estudios sobre la habilidad de los colifagos para servir como indicadores de calidad de agua y algunos estudios sobre la calidad de agua de los lagos Dos Bocas y Las Curias, además de realizar un análisis comparativo entre colifagos y coliformes fecales. Con esta información se pretende evaluar los colifagos como indicadores de calidad de agua. De igual manera se pretende determinar la calidad de agua en los lagos con el fin de hacer recomendaciones para uso y manejo de las áreas circundantes a las cuencas.

METODOLOGÍA EMPLEADA

Procedimiento de Campo

Para determinar la cantidad de coliformes y colifagos se realizaron los siguientes procedimientos. Se llevó a cabo un muestreo para recolectar doce muestras en cada lago. Las muestras se tomaron una o dos veces por semana. El muestreo se realizó durante los meses de diciembre del 2000 y abril del 2001. Las muestras fueron tomadas en tres estaciones en el lago Dos Bocas y en cuatro estaciones en Las Curias. Las Figuras 1y 2 muestran las donde fueron tomadas las muestras en los lagos respectivos.

Toma de muestras

Todas las muestras fueron tomadas superficialmente a una distancia aproximada de diez pies de la orilla. Se utilizó una vara a la cual se le amarró un envase plástico estéril de medio galón. Una vez obtenida la muestra en el envase plástico, esta fue transferida a una botella plástica estéril de 1,000 ml. Una vez transferidas las muestras a las botellas plásticas se colocaron en una nevera con hielo, para mantenerlas a 4°C (39°F) o menos para preservar los organismos a ser analizados.

TABLA 2. ESTADO Y CAUSAS DE CONTAMINACIÓN PARA LOS EMBALSES DE PUERTO RICO 1993-1995

Embalse	Estado Trófico	Usos de Aguas				Causa
		R1	R2	VA	AP	
Lago Guajataca	Oligotrófico	S	S	NS	PS	Oxígeno disuelto, otros inorgánicos
Lago Dos Bocas	Mesotrófico	NS	S	NS	S	Coliformes fecales, oxígeno disuelto
Lago Caonillas	Eutrófico	S	S	NS	S	Oxígeno disuelto
Lago Garzas	Oligotrófico	S	S	NS	S	Oxígeno disuelto
Lago Guineo	Eutrófico	S	S	NS	S	Oxígeno disuelto
Lago Matrullas	Eutrófico	S	S	NS	S	Oxígeno disuelto
Lago La Plata	Eutrófico	S	S	NS	S	Oxígeno disuelto
Lago Carite	Mesotrófico	PS	S	NS	S	Oxígeno disuelto, coliformes fecales
Lago Cidra	Oligotrófico	S	S	NS	S	Oxígeno disuelto
Lago Las Curias	Mesotrófico	S	S	NS	S	Oxígeno disuelto
Lago Loíza	Eutrófico	NS	NS	NS	S	Oxígeno disuelto, coliformes fecales
Lago Patillas	Eutrófico	S	S	NS	S	Oxígeno disuelto
Lago Guayabal	Eutrófico	S	S	NS	S	Oxígeno disuelto
Lago Toa Vaca	Eutrófico	S	S	NS	S	Oxígeno disuelto
Lago Luchetti	Eutrófico	S	S	NS	S	Oxígeno disuelto
Lago Loco	Eutrófico	S	S	NS	S	Oxígeno disuelto
Lago Guayo	Eutrófico	S	S	NS	S	Oxígeno disuelto
Lago Cerrillos	Eutrófico	S	S	NS	S	Oxígeno disuelto

Fuente Junta de Calidad Ambiental. R1= Recreación primaria R2= Recreación secundaria VA= Vida acuática AP= Agua potable S= Contaminación mínima PS= Contaminación moderada NS= Contaminación severa.

TABLA 3. ESTADO Y CAUSAS DE CONTAMINACIÓN PARA LOS EMBALSES DE PUERTO RICO 1995-1997

Embalse	Estado Trófico	Usos de Aguas				Causa
		R1	R2	VA	AP	
Lago Guajataca	Oligotrófico	S	S	S	PS	Ninguna
Lago Dos Bocas	Oligotrófico	PS	S	S	S	Coliformes fecales
Lago Caonillas	Oligotrófico	PS	S	NS	S	Coliformes fecales, oxígeno disuelto
Lago Garzas	Oligotrófico	S	S	NS	S	Oxígeno disuelto
Lago Guineo	Mesotrófico	S	S	S	S	Ninguna
Lago Matrullas	Oligotrófico	S	S	S	S	Ninguna
Lago La Plata	Eutrófico	PS	S	S	S	Coliformes fecales
Lago Carite	Oligotrófico	S	S	S	S	Ninguna
Lago Cidra	Oligotrófico	S	S	S	S	Ninguna
Lago Las Curias	Oligotrófico	S	S	S	S	Ninguna
Lago Loíza	Eutrófico	NS	NS	NS	S	Oxígeno disuelto, coliformes fecales
Lago Patillas	Oligotrófico	S	S	S	S	Ninguna
Lago Guayabal	Mesotrófico	PS	S	S	S	Coliformes fecales
Lago Toa Vaca	Eutrófico	PS	S	NS	S	Coliformes fecales, oxígeno disuelto
Lago Luchetti	Oligotrófico	S	S	S	S	Ninguna
Lago Loco	Oligotrófico	S	S	S	S	Ninguna
Lago Guayo	Oligotrófico	S	S	S	S	Ninguna
Lago Cerrillos	Oligotrófico	S	S	S	S	Ninguna

Fuente Junta de Calidad Ambiental. R1= Recreación primaria R2= Recreación secundaria VA= Vida acuática AP= Agua potable S= Contaminación mínima PS= Contaminación moderada NS= Contaminación severa

Análisis de las muestras

Las muestras se analizaban el mismo día que fueron recolectadas. El método utilizado en el análisis bacteriológico para los coliformes fecales fue la filtración por membrana según descritas en el Standard Methods (1999). La membrana de acetato de celulosa permite al agua pasar fácilmente atrapando las bacterias en su superficie. El conteo de coliformes se obtiene luego de filtrar el volumen correspondiente a través de la membrana. Para obtener los volúmenes adecuados se realizó un muestreo de prueba para poder obtener entre 20 y 250 colonias de coliformes. Luego del filtrado la membrana se transfiere a la placa con mFC como medio de cultivo y se incubaba a 44.5°C por 24 horas.

Los coliformes fecales crecen como colonias azul claro y oscuro en el medio. Para realizar pruebas confirmatorias se transferían colonias positivas a EC broth con tubos Durham invertidos en su interior y se incubaban a 44.5°C. De esta manera se eliminan los falsos positivos o falsos negativos. Las concentraciones de bacterias fueron expresadas como:
(#colonias contabilizadas/volumen filtrado) * 100% = (unidad formadora de colonia (ufc) por 100 mililitros)

Para realizar el análisis de colifagos se utilizó el método directo de placas descrito por Hernández y Toranzos, (1992). El procedimiento consistía en mezclar 10 ml de la muestra, 10 ml de 2X TSA y 1 ml de una suspensión de la bacteria *Escherichia coli* cepa 3000 ATCC 15597. Luego la mezcla se vertía en una placa estéril. El procedimiento se repetía 10 veces por cada muestra obteniendo un volumen final de 100ml. La formación de placas virales en los platos de cultivo era indicativo de la lisis en las bacterias. Para determinar la concentración de colifagos se sumaba el total de ufc presentes en las placas. Los resultados se expresaron en ufc/ 100 ml. Al realizar este procedimiento se utilizaba un control negativo solo con la bacteria hospedero y agua deionizada. Ocasionalmente se procesaba un control positivo de un "stock" de fagos (Bacteriophage M52) ATCC 15597-B1.

Todos los resultados fueron tabulados para determinar promedios, varianzas, desviación estándar y coeficientes de correlación. Se utilizó Excel Microsoft Office Profesional 2000.

FIGURA 1. LOCALIZACIÓN DE LAS TRES ESTACIONES EN EL EMBALSE DOS BOCAS

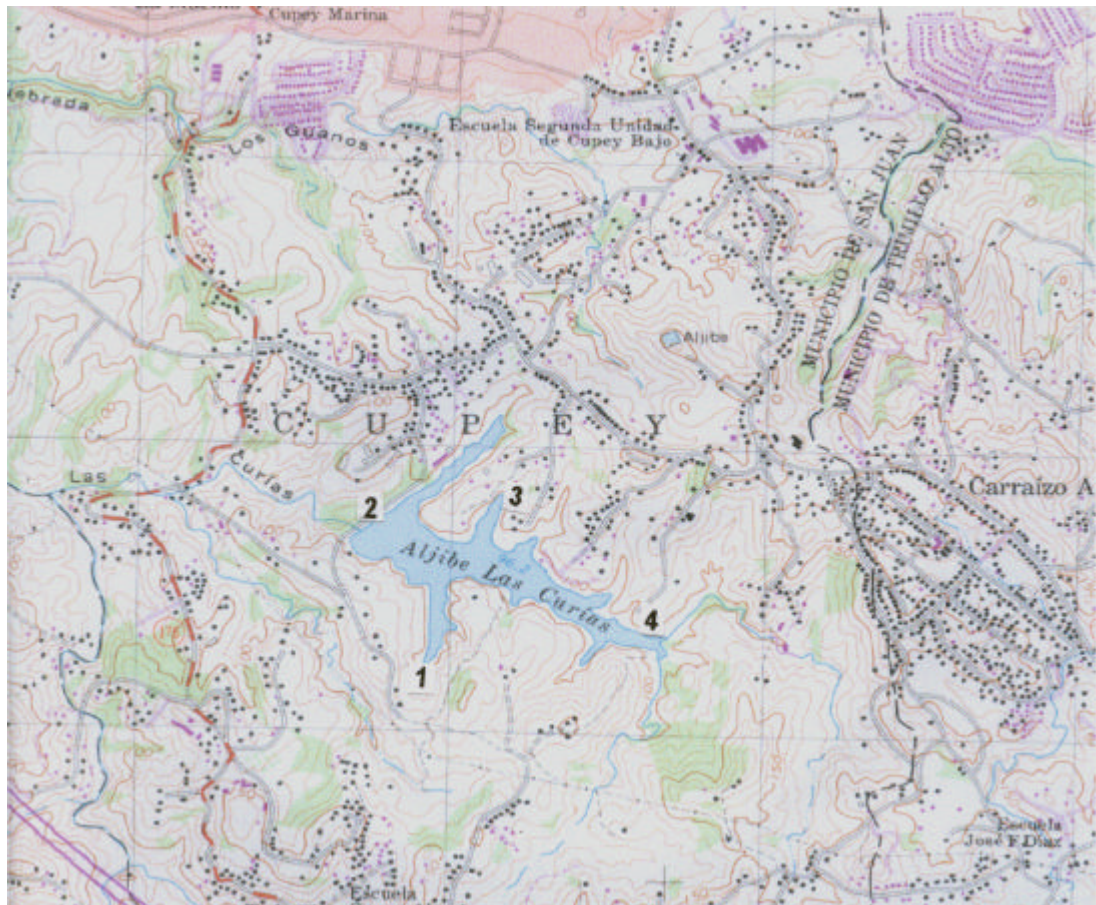


Estacion 1. Río Caonillas

Estacion 2. Represa

Estacion 3. Río Grande de Arecibo

FIGURA 2. LOCALIZACIÓN DE LAS CUATRO ESTACIONES EN EL LAGO LAS CURIAS



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Coliformes fecales

La Tabla 4, muestra los resultados encontrados en este estudio para coliformes y colifagos en las diferentes estaciones del lago Dos Bocas. La Tabla 5 presentan los mismos resultados para el lago Las Curias. Se enumeraron coliformes fecales y colifagos en este análisis. Se detectaron coliformes fecales en todas las estaciones de muestreo durante el periodo de estudio. Se encontraron altas concentraciones de coliformes fecales en la Estación #3 del lago Dos Bocas al compararlas con las concentraciones establecidas por la Junta de Calidad Ambiental como estándar para aguas superficiales (Clase SD). Se puede observar que la concentración promedio para esta estación sobrepasa 2,000 ufc/100ml que es el estándar para esta clase de agua. Utilizando este parámetro se encontró que el agua que llega al embalse desde el Río Grande de Arecibo, que es el tributario principal del Embalse, sobrepasó en promedio geométrico el límite de coliformes fecales durante el periodo este estudio. De la misma manera se puede decir que durante el periodo de estudio la mayor parte de la contaminación fecal que llegó al embalse provenía del tributario Río Grande Arecibo. En el lago Las Curias ninguna de las estaciones excedió el estándar de la JCA, según se presenta en la Tabla 5.

La mayor parte de los coliformes fecales que llegan al tributario principal del embalse Dos Bocas provienen de comunidades que viven en la parte río arriba, las cuales carecen de sistema de alcantarillado, y de las descargas de la planta de filtración de agua potable localizada río arriba. También existen comunidades que mantienen animales como vacas, caballos y aves de corral a orillas del río lo que significa otra fuente de contaminación fecal.

La Estación #1 en promedio no sobrepasó los estándares de la JCA para coliformes fecales y presentó las concentraciones más bajas. El 28 de enero 2001 se muestran las concentraciones más altas para las Estaciones #1 y #3. En la Estación #1 se detectaron 2,193 ufc/100 ml y 14,433 ufc/100 ml para la Estación #3. Para esa misma fecha en la Estación #2 se detectaron 90 ufc/100 ml. Durante esa semana se puede destacar un periodo de lluvia río arriba en los pueblos en la parte superior de la cuenca. A partir del 9 de enero de 2001 las concentraciones para coliformes en la Estación #2 comenzaron a bajar drásticamente con relación a las fechas anteriores. Esto se debe en gran medida a la dilución del contaminante en el embalse. Las condiciones ambientales también varían en el área del lago con respecto a los tributarios. Por ejemplo, en el área del lago las temperaturas suelen ser más bajas. En promedio las concentraciones de coliformes fecales para las Estaciones #1, #2 y #3 fueron las siguientes, 317 ufc/100 ml, 360 ufc/100 ml, 3,164 ufc/100 ml respectivamente.

TABLA 4. CANTIDAD DE COLIFORMES Y COLIFAGOS EN LAS MUESTRAS DEL LAGO DOS BOCAS.

Fecha	Estacion #1*		Estacion #2**		Estacion #3***	
	coliformes	colifagos	coliformes	colifagos	coliformes	colifagos
10 de diciembre de 2000	182	8	2700	11	359	15
16 de diciembre de 2000	188	10	413	14	1,405	4
20 de diciembre de 2000	135	11	813	10	1,433	4
9 de enero de 2001	101	2	55	9	1,085	11
14 de enero de 2001	277	4	57	6	1,822	7
19 de enero de 2001	52	8	12	11	2,457	4
24 de enero de 2001	193	2	22	7	4,887	5
28 de enero de 2001	2193	24	91	5	14,433	67
2 de febrero de 2001	267	11	12	12	2,733	25
5 de febrero de 2001	120	3	12	3	823	3
10 de febrero de 2001	59	2	97	6	2,347	15
14 de febrero de 2001	78	3	36	6	4,180	18
Promedio	317	7	366	8	3,164	15

* Rio Caonillas, ** Represa, *** Rio Grande de Arecibo. Los resultados están expresados en unidades formadoras de colonias (ufc) en 100ml.

TABLA 5. CANTIDAD DE COLIFORMES Y COLIFAGOS EN LAS ESTACIONES #1, #2, #3 Y #4 DEL LAGO LAS CURIAS

FECHA	ESTACION #1		ESTACION #2		ESTACION #3		ESTACION #4	
	coliformes	colifagos	coliformes	colifagos	coliformes	colifagos	coliformes	colifagos
8 de diciembre del 2000	52	6	230	12	31	6	27	2
15 de diciembre del 2000	32	6	185	5	120	3	130	10
20 de diciembre del 2000	21	8	245	4	162	3	283	4
13 de enero del 2001	72	7	35	6	366	2	91	4
24 de enero del 2001	61	6	176	10	53	3	585	17
30 de enero del 2001	TNTC	2	TNTC	1	431	2	1003	2
9 de marzo del 2001	332	3	24	19	445	2	41	1
15 de marzo del 2001	28	2	56	2	2576	3	121	1
22 de marzo del 2001	48	1	151	3	2210	1	30	6
28 de marzo del 2001	41	8	17	4	43	1	49	10
10 de abril del 2001	35	5	17	8	30	5	233	7
21 de abril del 2001	108	1	41	2	233	2	59	4
PROMEDIO	75	5	107	7	570	3	150	6

Los resultados están expresados en unidades formadoras de colonias (ufc) en 100ml.

La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos para coliformes y colifagos en las estaciones del lago Las Curias. Se detectaron coliformes fecales en todas las estaciones de muestreo durante el periodo de estudio. Las concentraciones de coliformes fecales y colifagos fueron sustancialmente mas bajas que las encontradas en el lago Dos Bocas. En la Tabla 5 se puede observar que la concentración mayor de coliformes se encontró en la Estación #3. Las Estaciones #1, #2 y #4 presentaron concentraciones entre 75 ufc/100ml y 150 ufc/100ml. Sin embargo la Estación #3, presento concentraciones de 570 ufc/100ml, lo cual podría estar influenciado por la entrada de nutrientes

provenientes de la fertilización de terrenos aledaños utilizados para la agricultura. En promedio las concentraciones de coliformes fecales para las cuatro estaciones fueron 75 ufc/100ml, 107 ufc/100ml, 570 ufc/100ml, 150 ufc/100ml, respectivamente.

Colifagos

En la Estación #3 del lago Dos Bocas se encontraron las concentraciones más altas para colifagos durante el periodo de muestreo, al igual que los coliformes fecales. No existe un estándar establecido para determinar un número alto o un número bajo de colifagos. Para los colifagos el número promedio más bajo lo fue en la Estación #1. Para las Estaciones #3 y #1 el número más alto ocurrió el 28 de enero de 2001 y para la Estación #2 en el 16 de diciembre de 2000. Las concentraciones altas para colifagos corresponden a los mismos periodos de lluvia río arriba que las concentraciones altas de coliformes. Los números para colifagos en la Estación #2 fueron los más consistentes durante el periodo de estudio. Esta es la estación localizada en el embalse. Esto se debe en gran medida a la dilución. Las concentraciones en esta estación no varían grandemente ya que el tiempo de retención es mayor en esta área y las condiciones tienden a estabilizarse. Las concentraciones para las estaciones #1, #2 y #3 colifagos fueron las siguientes: 7 ufc/100 ml, 8 ufc/100 ml, 15 ufc/100 ml, respectivamente.

Al igual que en el caso de los coliformes en el lago Las Curias, las concentraciones de colifagos fueron inferiores a las concentraciones encontradas en el lago Dos Bocas. En gran medida, esto se debe a la ausencia de fuentes de contaminantes microbiológicos en el lago Las Curias. Además el lago Dos Bocas tiene dos tributarios que recogen agua de una extensa cuenca hidrológica, mientras que el lago Las Curias solo recibe agua de una pequeña quebrada en su parte este. El área de captación de esa quebrada es significativamente menor que la de los tributarios del lago Dos Bocas la cual hace que el insumo de contaminantes sea mucho menor.

Las Figuras 3 y 4 muestran las concentraciones promedios para coliformes y colifagos en las tres estaciones del lago Dos Bocas. En estas gráficas también se puede apreciar la contaminación fecal durante el periodo de muestreo. Tanto coliformes como colifagos muestran las más altas concentraciones en la Estación #3. Las Estaciones #1 y #2 muestran una correspondencia ya que son similares en las cantidades que presentan y al compararlas con la Estación #3 se puede determinar que la contaminación fecal llega al embalse a través del tributario Río Grande de Arecibo y no del Río Caonillas. Por esto, esta estación se utiliza en este análisis para presentar la relación entre coliformes y colifagos para determinar materia fecal. Tanto coliformes como colifagos son consistentes en números para la Estación #3 y esta relación muestra una correlación de 0.785 ($P < 0.05$) (Figura 5). Un

coeficiente de correlación en este rango sugiere una correlación de moderada a alta (Calvo, 1998).

FIGURA 3. NÚMERO PROMEDIO DE COLIFORMES EN CADA UNA DE LAS ESTACIONES DEL LAGO DOS BOCAS

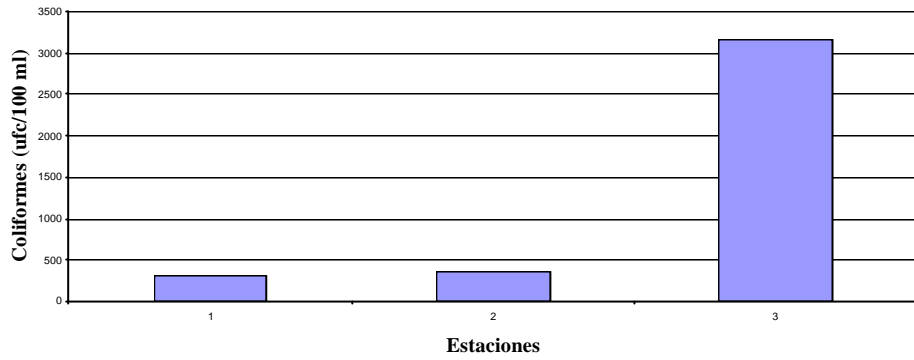


FIGURA 4. NÚMERO PROMEDIO DE COLIFAGOS EN CADA UNA DE LAS ESTACIONES DEL LAGO DOS BOCAS

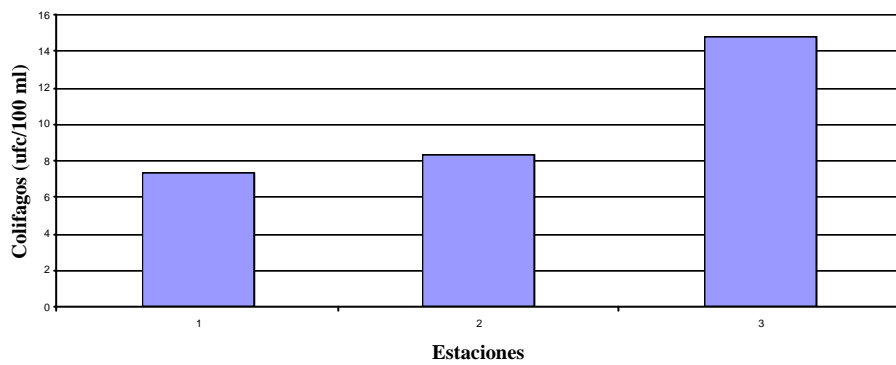
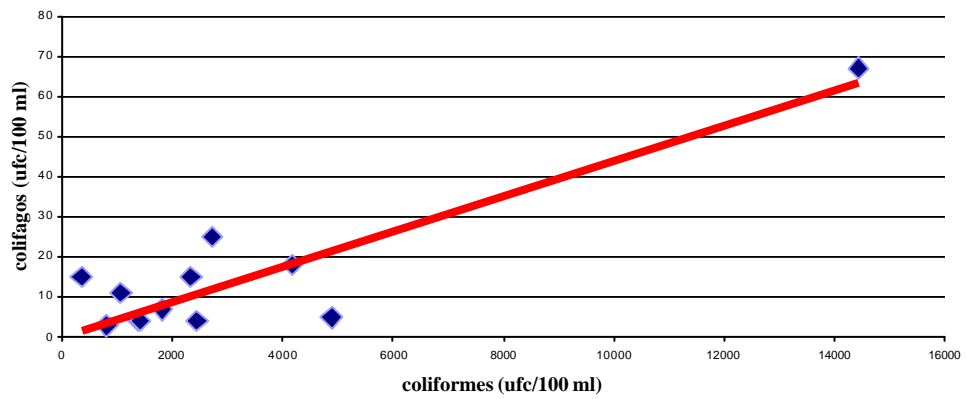


FIGURA 5. COLIFORMES Y COLIFAGOS EN LA ESTACIÓN #3 DEL LAGO DOS BOCAS



La presencia de ambos indicadores microbiológicos representa contaminación fecal proveniente del tributario Río Grande de Arecibo. La alta correlación entre ambos indica que siendo los coliformes el estándar para contaminación fecal los colifagos también pueden ser indicadores ya que son detectados en presencia de contaminación microbiológica. De la misma manera correlacionan con la cantidad de materia fecal. Esta es una característica que debe tener un indicador microbiológico. Según aumentan los coliformes fecales en esta estación también aumentan los colifagos ya que es de este tributario que viene la mayor cantidad de materia fecal. En las Estaciones #1 y #2 las concentraciones se mantienen bajas debido a la baja presencia de materia fecal. Las concentraciones disminuyeron a medida que el agua fluye hacia el lago. Eso es indicativo de que no se están reproduciendo los colifagos en el ambiente a medida que disminuye la distancia desde las Estaciones #1 y #3 localizadas en los tributarios hasta la Estación #2 localizada en la represa. Esta es otra característica que debe tener un indicador microbiológico. La diferencia en el promedio de colifagos entre la Estación #1 y la Estación #2 es muy baja, lo que es indicativo de que la mayoría de la materia fecal no proviene del tributario Río Caonillas. De la misma manera la diferencia entre coliformes en ambas estaciones es relativamente baja, en comparación con la Estación #3, y las concentraciones son menores.

La correlación entre ambos indicadores en la Estación #3, donde hay presencia de materia fecal, muestra además que los colifagos poseen las mismas características que tienen los coliformes para ser indicadores. Sin embargo, el análisis para la relación de ambos en la Estación #2 puede presentar a los colifagos con una ventaja sobre los coliformes. La correlación que muestra la Figura 6 es una relación pobre para este tipo de asociación. La gráfica muestra una correlación de 0.129 $P < 0.05$). Las concentraciones de colifagos para la Estación #2 fueron las más estables pero no las de coliformes para esta misma estación. Se puede observar que a diferencia de la Estación #3, donde la presencia de materia fecal hace que ambos indicadores correlacionan con la cantidad de materia fecal, en esta estación la concentración de colifagos no corresponde a las concentraciones de coliformes. Cuando se detectan números altos de colifagos, los números de coliformes no son altos sino que disminuyen mientras que los colifagos aumentan. En lo que sería una correspondencia, los números de colifagos tendrían que aumentar si aumentan los coliformes o disminuir si disminuyen los coliformes como sucedió en la Estación #3. Esto puede ser indicio de que los colifagos resisten más que los coliformes las condiciones ambientales. Los colifagos no se reproducen a través del tiempo pero su número es más alto que los coliformes, lo que le atribuye una característica constante. Se detectan en mayor número si hay mayor cantidad de materia fecal pero sobreviven o persisten más que los coliformes.

La sobrevivencia y persistencia es una característica de un indicador microbiológico para materia fecal. Los coliformes pueden ser más susceptibles

a condiciones ambientales que los colifagos según su correlación en la Estación #2. De otra manera algunos investigadores han observado que se pueden encontrar coliformes en ambientes donde no existe contaminación fecal en los cuales no se detectan colifagos (Toranzos, 1992). De igual forma han encontrado que no existe correlación entre *E. coli* y bacterias patógenas como *Y. enterocolitica* o *L. pneumophilla*. (Hazen y Toranzos, 1990). Por lo tanto, los coliformes pueden estar presentes en ambientes no contaminados con materia fecal pero cuando indican materia fecal no se reproducen a través del tiempo y sobreviven menos que los colifagos. En tal caso, el factor nutrientes podría estar también afectando la duración de estos organismos en el agua.

La correlación para coliformes y colifagos en la Estación #1 es de 0.703 ($P < 0.05$). Al igual que la correlación de la Estación #3 y las cantidades promedio de coliformes y colifagos, este resultado muestra presencia de material fecal aunque en mucho menor grado que en la Estación #3.

Las correlaciones para coliformes y colifagos en el lago Las Curias presentan resultados similares a los obtenidos en la Estación #2 del lago Dos Bocas. El valor de los coeficientes de correlación en las Estaciones #1, #2, #3 y #4 del lago Las Curias fueron 0.102, 0.001, 0.092 y 0.486, respectivamente. Estos son valores extremadamente bajos, de por sí, y en comparación con los valores obtenidos en el lago Dos Bocas. En términos generales, la diferencia entre ambos lagos es la relativa ausencia de materia fecal en el lago Las Curias. Según se explicó anteriormente, cuando las cantidades de materia fecal en el agua son extremadamente bajas, la correlación entre coliformes y colifagos tiende a ser mínima. En las estaciones de muestreo del lago Las Curias aparecen concentraciones de colifagos bajas, aunque las concentraciones de coliformes son mayores que las de colifagos aún así estos valores son bajos. Esto tiende a indicar que los coliformes que se midieron no están relacionados a materia fecal, similar a lo obtenido por Rivera et al. También existe la posibilidad de que las concentraciones de coliformes fecales encontradas sean indicativas de su reproducción en el ambiente y no de su procedencia con materia fecal.

No se detectaron coliformes y colifagos en los grupos controles lo que muestra la ausencia de los indicadores en muestras que no son de naturaleza fecal.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Este trabajo presenta evidencia adicional de la capacidad de los colifagos como indicadores microbiológicos de la calidad del agua. Las correlaciones altas de coliformes y colifagos en el lago Dos Bocas demuestran que los colifagos pueden ser indicadores microbiológicos ya que son detectados en presencia de contaminación fecal. A través del estudio se pudieron identificar las características que deben tener los indicadores de calidad de agua utilizando los colifagos. Estos fueron detectados en presencia de materia fecal, los

números correlacionan con la cantidad de materia fecal, no se reproducen en el ambiente, sobreviven en el mismo, no están presentes en ausencia de materia fecal y son fáciles de detectar.

El método para procesar las muestras de colifagos es más rápido que el método para procesar coliformes. Además, disminuye la presencia de falsos negativos y positivos que es uno de los problemas que se confrontan con la metodología tradicional para coliformes.

Este estudio ha encontrado concentraciones mayores de 2,000 cfu/ml de coliformes, el cual es el estándar establecido por la Junta de Calidad Ambiental para clasificar un embalse como contaminado con materia fecal. Estas concentraciones demuestran que el lago Dos Bocas recibe grandes cantidades de materia fecal a lo largo de su cuenca hidrológica. Los resultados reflejaron que el tributario principal del lago, el Río Grande de Arecibo, trae consigo grandes cantidades de materia fecal. Esto se debió en gran medida a las comunidades cercanas a la cuenca que en su mayoría carecen del servicio sanitario de alcantarillado. Se observó que muchas de las viviendas se encuentran localizadas cerca del río Grande de Arecibo. Igualmente existen viviendas a lo largo del tributario Río Caonillas. Estas comunidades operan pozos sépticos en el área de drenaje de los ríos, contribuyendo a la contaminación de los mismos y por ende a la del embalse.

Por otro lado, el uso de terrenos destinados a la agricultura y la presencia de ganado y otros animales domésticos en el área contribuyen en gran manera a la contaminación de embalse con materia fecal. El embalse Dos Bocas actualmente presenta problemas de sedimentación y a la misma vez forma parte del Proyecto del Súper Acueducto de la Costa Norte.

Para poder lograr que los colifagos sean considerados como estándares microbiológicos de calidad de agua se deben hacer estudios en otros cuerpos de agua además de los lagos. También debe incluirse plantas de tratamiento de agua potable y de aguas residuales. Por otro lado, se deben realizar comparaciones de cantidades de colifagos con el nivel de degradación ambiental. De esta manera se pueden describir los ambientes donde se puede encontrar materia fecal utilizando colifagos. De esta forma se minimizan las probabilidades de identificar un lugar como contaminado cuando no lo está, lo que ha resultado de la práctica con coliformes.

Este estudio refleja solo un trimestre del ciclo anual del lago. Se recomienda que se realicen estudios continuos para obtener patrones de comportamiento anual. Se deben realizar estudios en las áreas aledañas al mismo los cuales incluyan uso de terreno, el número de viviendas sin alcantarillado sanitario y la operación de los pozos sépticos en el área. La mala operación de los pozos sépticos causa derrames que llegan al lago a través de

escorrentías. De esta manera se puede lograr un mejor control de las prácticas de manejo y uso de terrenos alrededor de la cuenca.

En términos de los resultados encontrados en el lago Las Curias, podemos decir, que en áreas con contaminación fecal baja, se recomienda la utilización de otras técnicas de laboratorio para aislar colifagos, por ejemplo, la técnica de filtración-elución. Según Toranzos (1992a), el método directo para aislar colifagos utilizado en este estudio es recomendado para aguas con contaminación moderada o alta debido a sus límites de sensibilidad. El método directo utiliza pequeñas cantidades de agua. En cuerpos de agua con concentraciones de colifagos menores de una unidad formadora de colonia el método directo no es suficientemente sensitivo porque sería necesario procesar grandes cantidades de agua.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alderisio K.A., De Lucca N. (1999). Seasonal Enumeration of Fecal Coliform Bacteria from the Feces of Ring-Billed Gulls and Canada Geese. Applied and Environmental Microbiology. Diciembre, 5628-5630.

Araujo R.M., Arribas A.M., Launa F. and Pares R. (1989). Relation Between Aeromonas and Faecal Coliform in Fresh Waters. Journal of Applied Bacteriology. 67, 213.

Araujo R.M., Puig A., Lasobras J., Lucena F., Jofre J. (1997). Phages of Enterica Bacteria in Fresh Water with Different Levels of Faecal Pollution. Journal of Applied Microbiology. 82, 281-286.

Arvanitidou M., Papa A., Constantinidis T. C., Danielides V., Katsouyannopoulos. (1997). The occurrence of Listeria spp. and Salmonella spp. in Surface Waters. Microbiological Research. 152, 395-397.

Bazin M. J. (1982). Microbial Population Dynamics. CRC Press Inc.

Bitton G. (1987). Fate of Bacteriophage in Water and Wastewater Treatment Plants. In Phage Ecology. John Wiley and Sons.

Bitton G. (1994). Wastewater Microbiology. Wiley-Liss Inc.

Cintrón Rodríguez Y. (2000). Estudio sobre las concentraciones de nitrógeno y fósforo en el embalse Toa Vaca. Tesis de Maestría. Recinto de Ciencias Médicas, Universidad de Puerto Rico. Río Piedras.

Concepción M., Gómez M. A. González-López J. (1998). Fecal Coliform-Related Bacterial and Coliphage Population in Five Lakes of Southeastern Spain. Microbiological Research. 153, 283-288.

Daniel Wayne W. (1999). Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences. Seventh Edition. Georgia State University. John Wiley & Sons.

Departamento de Recursos Naturales. Sin fecha. Problemáticas de los Embalses Artificiales en Puerto Rico.

Departamento de Recursos Naturales. (1976). Lagos de Puerto Rico.

Dobsey M. (2000). Environmental Infection Agents and Their Health Effects. Department of Environmental Sciences and Engineering. University of North Carolina.

El-Abagy M.M., Dutka B. J., Kamel M. (1988). Incidence of Coliphages in Potable Water Supplies. Applied and Environmental Microbiology. 54, 1632-1633.

Environmental Protection Agency. (2000). Method 1602: Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Single Agar Layer (SAL) Procedure. Office of Water, Washington DC.

Environmental Quality Board. (2000). Goals and Progress of Statewide Water Quality Management Planning Puerto Rico.

Grabow W.O.K., Coubrough. (1986). Practical Direct Plaque Assay for Coliphage in 100 ml Samples of Drinking Water. Applied and Environmental Microbiology. 52, 430-433.

Greenberg A. E., Hunt D. A. (1985). Laboratory Procedure for the Examination of Seawater and Shellfish. The American Public Health Association.

Hamilton Harbor Home Page. <http://hamiltonharbor.com.html>.

Havelaar A. H., Furuse K., Hogeboom W.B. (1986). Bacteriophages and Indicator Bacteria in Human and Animal Faeces. Journal of Applied Bacteriology. 60, 255-262.

Hayes W. (1964). The Genetics of Bacteria and Their Viruses. Second Edition. John Wiley & Sons.

Hazen T., Toranzos G. (1988). Comparison of Methods for the Enumeration of Fecal Coliforms in Tropical Waters. Department of Microbiology, University of Puerto Rico. Río Piedras.

Hilton M.C., Stotzky G. (1973). Use of Coliphages as Indicators of Water Pollution. Canadian Journal of Microbiology. 19, 747-751.

Hirotsu H., Chiaki S., Hisanori K. (1999). Correlations of Aeromonas hydrophila with Indicator Bacteria of Water Quality and Environmental Factors in a Mountain Stream. Water Environmental Research. 71, 2.

Junta de Calidad Ambiental. (1995). Declaración de Impacto Ambiental del Proyecto del Super Acueducto de la Costa Norte.

Junta de Calidad Ambiental. (1997). Embalses de Puerto Rico

Junta de Calidad Ambiental. (1999). Embalses de Puerto Rico

Keith G., Allen M.J., Rice E.W. (1999). Comparison of E. coli, Total Coliform and Fecal Coliform Population as Indicator of Wastewater Treatment Efficiency. Water Environmental Research. 71, 3.

Kenard R.P., Valentine R.S. (1974). Rapid Determination of the Presence of Enteric Bacteria in Water. Applied Microbiology. 27, 484-489.

Kott Y. (1966). Estimation of Low Number of E. coli Bacteriophage by Use of the MPN Method. Applied Microbiology. 14, 141-144.

Lavoie M.C. (1983). Identification of Strains Isolated as Total and Fecal Coliforms and Comparison of Fecal Pollution in Tropical Climates. Canadian Journal of Microbiology. 29:689-693.

Madden R.H., Gilmurg A. (1995). Impedance as an Alternative to MPN Enumeration of Coliforms in Pasteurized Milks. Letters in Applied Microbiology. 29, 387-388.

Muniesa M., Jofre J., Lucena F. (1999). Occurrence and Numbers of Bacteriophages and Bacterial Indicators in Faeces of Yellowlegged Seagull (Larus Cachinnans). Letters in Applied Microbiology 29, 421-423.

Pelcazar M., Chan E. C., Krieg N. R. (1986). Microbiology. McGraw-Hill Book Company.

PR Aqueduct and Sewers Authority, Department of Interior and US Geological Survey. (1997). Sedimentation Survey of Lago Dos Bocas, PR.

Rivera S. C., Hazen T. C., Toranzos G. A. (1988). Isolation of Fecal Coliforms from Pristine Sites in a Tropical Rain Forest. Applied and Environmental Microbiology. 54, 513-517.

Rodina A. G. (1972). Methods in Aquatic Microbiology. University Park Press.

Santiago O. (1993). Estudio de Algunos Parámetros Físico-químicos e Indicadores de Calidad Microbiológica del Agua Antes y Después de una Filtración Lenta. Tesis de Maestría. Recinto de Ciencias Médicas, Universidad de Puerto Rico. Río Piedras

Solo H. M., Gabriel M. A., Desmaras T. R., Palmer C. J. (2000). Sources of E.coli in a Costal Subtropical Environment. Applied and Environmental Microbiology. 66, 230-237.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 1999.

The American Water Works Association. (1971). Water Quality and Treatment: A Handbook of Public Water Supplies.

Torres Román L, Rodríguez Martínez A. (1994). Water Quality Improvement at Cayo Santiago, Puerto Rico. Tesis de Maestría. Recinto de Ciencias Médicas, Universidad de Puerto Rico. Río Piedras.

Toranzos G. A., Hernández-Delgado E. (1992)a. Coliphages as Indicators of Fecal Contamination in Tropical Waters. Department of Biology, University of Puerto Rico. Río Piedras.

Toranzos G. A., Hernández-Delgado E. (1992)b. Manual de Microbiología Ambiental. Departamento de Biología, Universidad de Puerto Rico.

Toranzos G.A. (1991). Current and Possible Alternate Indicators of Fecal Contamination in Tropical Waters: Short Review. Environmental Toxicology and Water Quality. 6, 121-130.

Tortora G.J., Funke B.R. (1992). Microbiology. The Benjamin / Cumming Publishing Company Inc.

US Army Corps of Engineers. (1993). Río Grande de Arecibo, PR: Final Feasibility Report & Environmental Impact Statement : A Study to Determine the Feasibility of Providing Flood Control for the Río Grande de Arecibo and its Tributaries in the Vecinity of Arecibo, PR.

Van Duin M. (1976). Phages. University Hospital Vrije. Amesterdan Netherlands.

_____. (1997). Coliphages as an Indicator for Fecal Contamination in Rural Drinking Water Sources. International Research Centre, Ottawa Canada. <http://www.idrc.ca/library/document/053714/053714b.htm>

_____. *Sistema Hidroeléctrico de Caonillas y Dos Bocas.* Autoridad de Energía Eléctrica.
<http://premium.caribe.net/irbaspr/dbfotos.html>.