



# Supervivencia de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* en agua potable de cuatro distritos de Trujillo (Perú)

## Survival of *Salmonella typhi* and *Salmonella enteritidis* in drinking water of four Districts from Trujillo (Peru)

Raquel Moya-Egoavil<sup>1</sup>, Pedro Alvarado-Salinas<sup>2</sup> y Nelly Vásquez-Valles<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tesista de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). <sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología UNT. Trujillo, Perú

### RESUMEN

Se determinó la supervivencia de *Salmonella typhi* y *S. enteritidis* en agua potable proveniente de los distritos de Florencia de Mora, El Porvenir, La Esperanza y Laredo (Trujillo, Perú). En cada distrito se recolectó 1000mL de agua potable, que fue esterilizada por filtración a través de membrana y se distribuyó en dos matraces con 300 mL a cada uno a los cuales se inoculó *S. typhi* y *S. enteritidis*, a una concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/mL. Para construir las curvas de supervivencia, los recuentos se realizaron cada 30 minutos durante 12 horas, para lo cual se utilizaron placas petri conteniendo PCA usando el método de siembra por superficie. El agua potable mantuvo sus características físico-químicas según el rango establecido según la OMS. De acuerdo al análisis estadístico se encontró que no existe diferencia significativa entre las curvas de supervivencia de *S. typhi* en agua potable de los distritos antes mencionados, lo mismo ocurrió para las curvas de supervivencia de *S. enteritidis*. *S. enteritidis* sobrevive por tiempo más prolongado que *S. typhi*.

**Palabras clave:** Supervivencia, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, agua potable.

### ABSTRACT

Survival of *Salmonella typhi* and *Salmonella enteritidis* in fresh water from the districts of Florencia de Mora, El Porvenir, La Esperanza and Laredo (Trujillo, Peru) were determined. Samples of water (approximately 1000mL) were collected, immediately sterilized by membrane filtration technique and distributed in two glass flasks, placing 300 mL of sterile water each. Then, *Salmonella typhi* and *Salmonella enteritidis*, at concentration of  $3 \times 10^8$  CFU/mL, were inoculated in each flask. To construct the survival curves, the counts were performed every 30 minutes for 12 hours, which were used petri dishes containing PCA using the method of planting area. Drinking water continued its physicochemical characteristics as the range set by WHO. According to statistical analysis found no significant difference between the survival curves of *Salmonella typhi* in drinking water of the districts mentioned above, so did the survival curves for *Salmonella enteritidis*. Significantly, *Salmonella enteritidis* can survive much longer than *Salmonella typhi*.

**Keywords:** Survival, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, drinking water.



## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas por toxoinfecciones causan a nivel mundial alrededor de 1,8 millones de muertes, el 90% de las cuales corresponden a niños menores de cinco años de países en vías de desarrollo, porque el 88% de tales enfermedades diarreicas son producto de un abastecimiento de agua insalubre, así como de un saneamiento ambiental y una higiene sanitaria deficientes<sup>1,2,3</sup>.

Las salmonelosis constituyen la primera causa de toxoinfecciones alimentarias o por consumo de agua insalubre en el mundo, habiéndose determinado que están implicados más de 2.000 serotipos, de los cuales el serotipo *Salmonella enteritidis* es el predominante (56,8% de casos), seguido por el serotipo *Typhimurium*<sup>4,5,6</sup>.

Al mismo tiempo que se ha registrado los brotes de diarrea por bacterias entre ellas *Salmonella*, se ha investigado el efecto del cloro y sus derivados, con el propósito de determinar la cantidad que debe usarse sin ocasionar daños laterales a la salud; estas investigaciones han dado ha conocer que *S. enteritidis* necesita del incremento en la concentración de HClO para ser eliminada en presencia de materia orgánica y que las buenas prácticas en la desinfección del agua y de los alimentos debe iniciarse en la producción y procesamiento habiéndose establecido las Normas para su regulación<sup>7,8,9,10,11,12</sup>.

Teniendo en cuenta la importancia que tiene el agua en la alimentación y que, como se ha mencionado es el principal vehículo para contraer diversas infecciones, entre ellas las causadas por agentes de intoxicación y, asimismo, que no se ha determinado qué tiempo de sobrevivencia tienen las especies de bacterias en el agua de consumo de los distritos de la provincia de Trujillo, se diseñó una investigación que estuvo dirigida a evaluar la supervivencia de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* en agua potable de los distritos de Florencia de Mora, El Porvenir, Laredo y La Esperanza, aledaños a la ciudad de Trujillo (Perú).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### **Bacterias:**

Los cultivos puros de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* fueron proporcionados por el Laboratorio Referencial de Salud de la ciudad de Trujillo (Perú).

### **Muestra y muestreo de agua:**

Se obtuvo muestras de 1000mL de agua potable de grifos domiciliarios en un punto específico de muestreo de los distritos aledaños a la ciudad de Trujillo: El porvenir, Florencia de Mora, Laredo y La Esperanza. El tipo de muestreo fue No Probabilística (por conveniencia). Estos distritos están localizados en la zona marginal de Trujillo, capital del Departamento de La Libertad (Perú).

### **Reactivación del cultivo<sup>6</sup>**

Para la reactivación, se sembró *S. typhi* y *S. enteritidis* en agar nutritivo y se llevó a incubación durante 24 horas a una temperatura de 37°C.

### **Toma de muestra y transporte:**

De los distritos mencionados anteriormente, de grifos de un punto específico, se recolectó muestras de agua potable en volumen aproximadamente de 1000 ml, los mismos que fueron transportados al laboratorio de Microbiología de Alimentos del Departamento Académico de Microbiología y Parasitología, para su procesamiento.

### **Preparación del inóculo<sup>16</sup>**

Se sembró *S. typhi* y *S. enteritidis* en agar nutritivo y se llevó a incubación durante 24 horas a una temperatura de 37°C. Transcurrido el tiempo indicado, se realizó una suspensión, en solución salina fisiológica estéril, hasta obtener un equivalente al tubo número 01 de Mac Farland (concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/ml).

### **Esterilización del agua potable**



Se esterilizó las muestras de agua potable (aprox. 1000 ml) mediante la técnica de filtración por membrana <sup>(25)</sup>. Posteriormente se distribuyó en 2 matraces estériles, 300 ml de agua potable estéril en cada uno.

### Mediciones de parámetros de agua potable<sup>14,16</sup>

Del agua potable estéril restante, se procedió a realizar las mediciones de: pH; Temperatura; Conductividad eléctrica mediante un conductímetro; Cloro libre residual mediante el método del DPD; DQO (Demanda Química de Oxígeno) por el método de oxidabilidad con permanganato de potasio.

### Inoculación<sup>19,20</sup>

En el matraz conteniendo 300 ml de agua potable estéril, se le inoculó 1mL de la suspensión de *S. typhi*. De igual manera se trabajó para *S. enteritidis*.

### Condiciones de ensayo

Se incubó a temperatura ambiente y se monitoreó cada 30 minutos. Este sistema de ensayo se realizó por cuadruplicado, utilizándose 4 muestras diferentes para cada uno de los distritos

### Determinación de la población bacteriana<sup>6,15,18</sup>

Se determinó mediante la técnica de recuento en placa<sup>3</sup>, utilizando el medio de cultivo sólido PCA. Se realizaron las diluciones pertinentes, utilizando solución salina fisiológica con tiosulfato de sodio (diluyente), a una concentración final de 100 µg TS/ml y se procedió a sembrar en superficie 0,1ml de las últimas diluciones, cada 30 minutos durante 12 horas, realizando cada ensayo por triplicado.

### Análisis estadístico

Se realizó cuadros y gráficas unidimensionales, medidas Estadísticas tales como la media y promedios aritméticos. Además del análisis de varianza al realizar los contrastes de hipótesis, aplicando la prueba F (Fisher) se realizó la prueba T-student<sup>17</sup>.

## RESULTADOS

Se encontró que los parámetros físico-químicos tomados en cuenta (pH, DQO, conductividad eléctrica, cloro libre residual) del agua de los distintos distritos, se hallan dentro de los parámetros establecidos por Organizaciones Internacionales (Tabla 1). Asimismo, que las curvas de crecimiento adoptan el mismo comportamiento (Figs. 1 y 2) y que en todos los casos, *S. enteritidis* permanece viable por mayor tiempo que *S. typhi* (Figs. 3, 4, 5 y 6).

**Tabla 1:** Parámetros físico-químicos del agua potable de los distritos de Florencia de Mora, El Porvenir, La Esperanza y Laredo (Trujillo, Perú) y los establecidos por la OMS y otras Organizaciones Internacionales\*.

Parámetros	U.M	Florencia de Mora	La Esperanza	El Porvenir	Laredo	Parámetros establecidos *
Cloro libre residual	Cl mg/L	0,23	0,20	0,27	0,25	0,2-0,5
DQO	mg/L	6,51	7,23	7,11	6,8	<10
pH		7,28	7,23	7,13	7,29	6,5-8,5
Conductividad eléctrica	µs/cm	278	276.5	308	304	50-1500
Temperatura	°C	24-25	24-25	24-25	24-25	22-27

DQO= Demanda Química de Oxígeno; µs/cm= micro-siemens por centímetro.

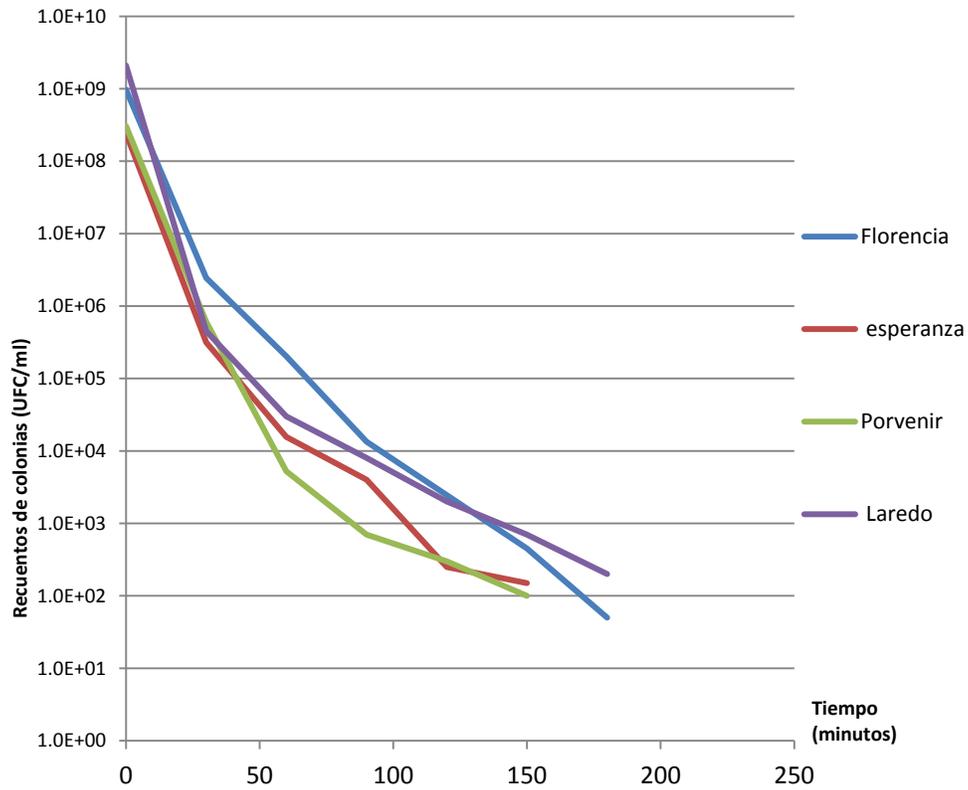


Fig. 1. Curvas de supervivencia ( $p < 0,05$ ) de *Salmonella typhi* en agua potable provenientes de los distritos de Florencia de Mora, La Esperanza, El Porvenir y Laredo (Trujillo, Perú).

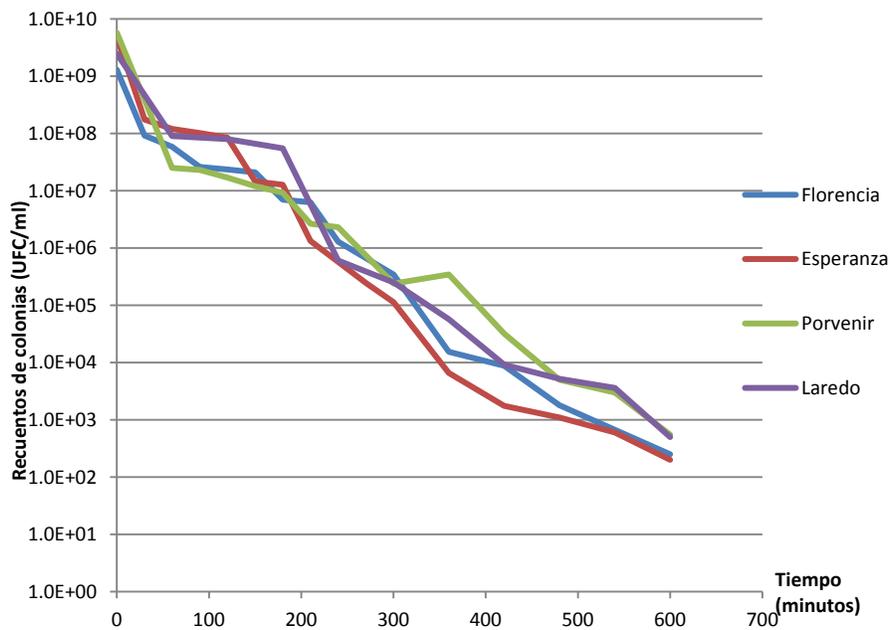


Fig. 2. Curva de supervivencia ( $p < 0,05$ ) de *Salmonella enteritidis* en agua potable provenientes de los distritos de Florencia de Mora, La Esperanza, El Porvenir y Laredo (Trujillo, Perú).

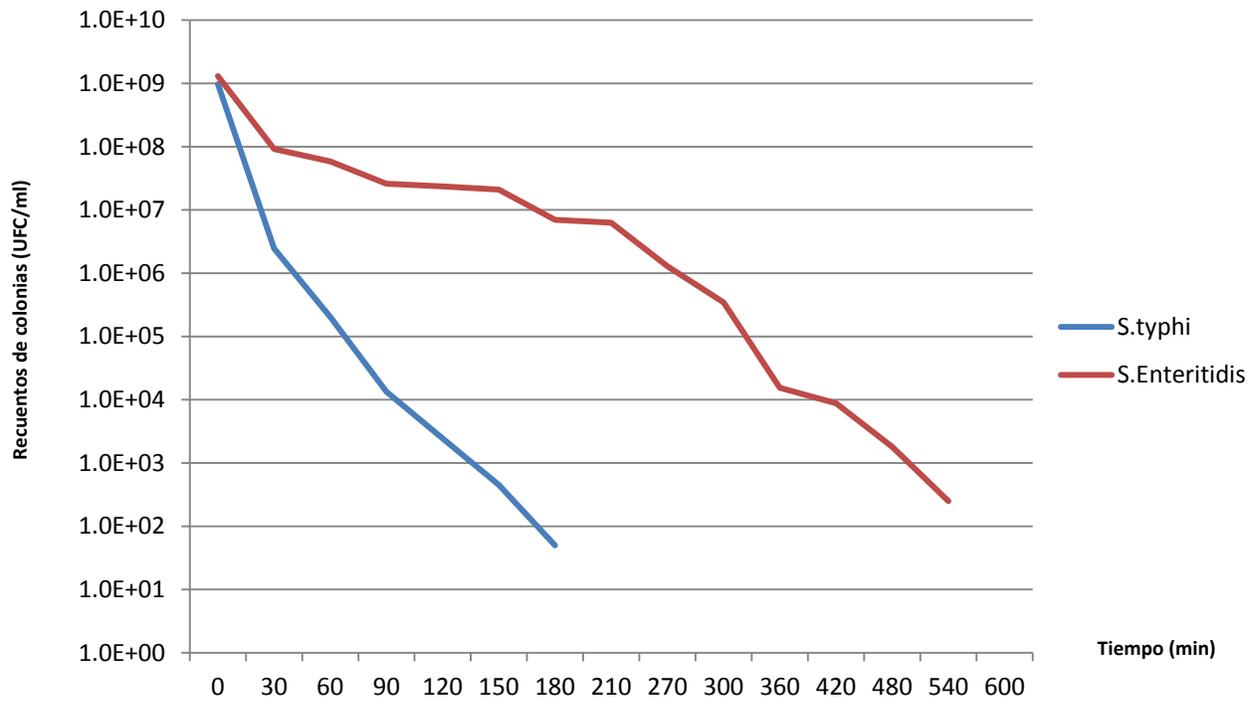


Fig. 3. Curva de supervivencia de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* en agua potable proveniente del distrito de Florencia de Mora, Trujillo-Perú (valor de T = 0.00).

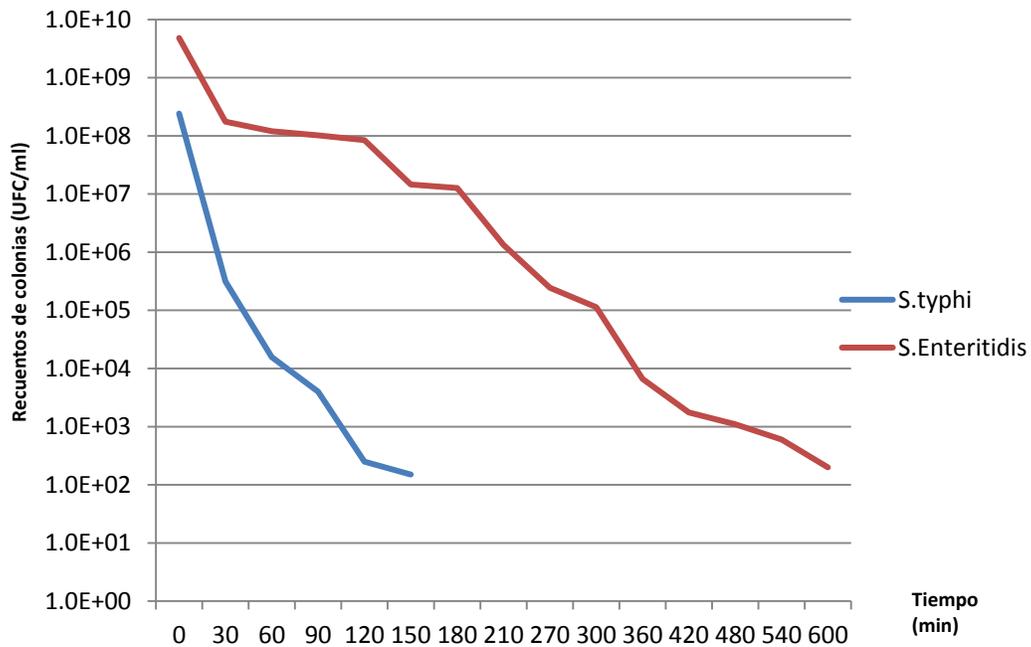


Fig. 4. Curva de supervivencia de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* en agua potable proveniente del distrito de La Esperanza, Trujillo-Perú (valor de T = 0.00).

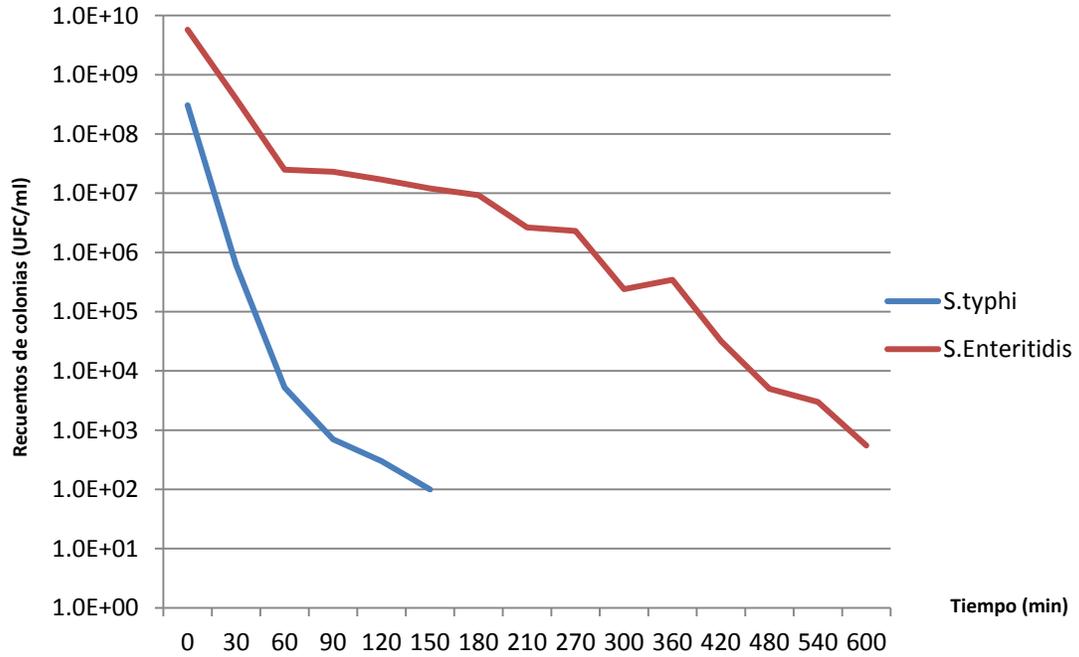


Fig. 5. Curva de supervivencia de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* en agua potable proveniente del distrito de El Porvenir, Trujillo-Perú (valor de T = 0.00).

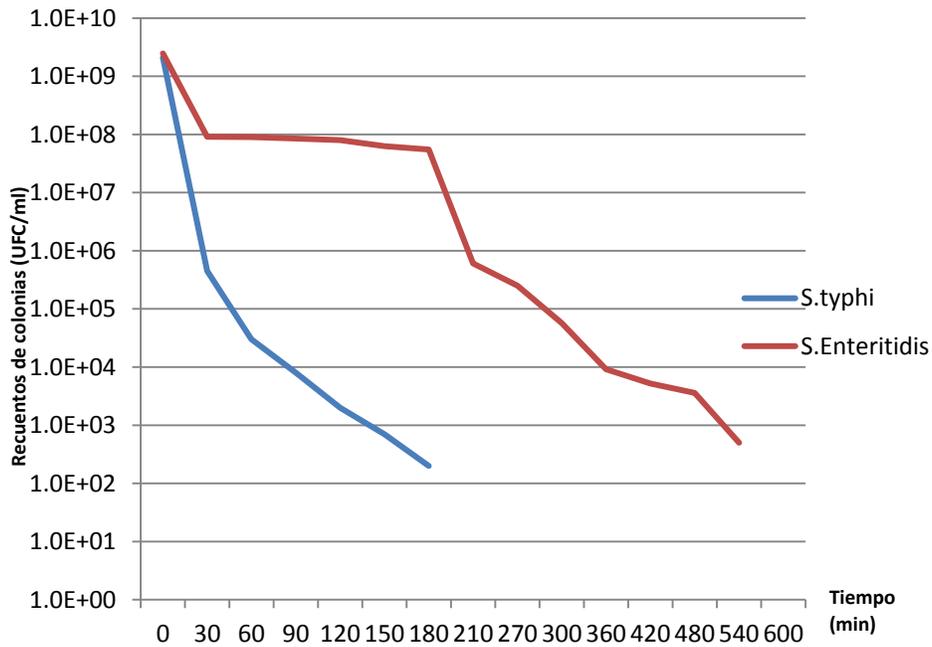


Fig. 6. Curva de supervivencia de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* en agua potable proveniente del distrito de Laredo, Trujillo-Perú (valor de T = 0.00).



## DISCUSIÓN

Todos los parámetros determinados en el presente trabajo son indicadores de la calidad del agua potable, pero parámetros como temperatura, pH y cloro libre residual, van a influenciar en la calidad microbiológica a diferencia de los parámetros como la DQO, y la conductividad eléctrica del agua, las cuales son pruebas indicadoras de contaminación pero no de contaminantes para la salud humana. De hecho, todos los seres humanos consumen a diario bebidas (soluciones acuosas) que poseen valores increíblemente altos en estos parámetros, sin perjuicio para su salud<sup>14</sup>.

El DQO se emplea para determinar el contenido de materia orgánica en aguas; estos compuestos orgánicos son oxidados, en un medio ácido, por un agente químico (dicromato de potasio), pero no necesariamente pueden ser biodegradables (acción microbiológica)<sup>14,18</sup>. El DQO del agua potable se encontró en un rango de 6,51-7,23 mg/l; estando dentro de los límites permisibles para DQO en agua potable (<10 mg/l)<sup>21</sup>. Al estar dentro de los límites permisibles se podría deducir que no tuvo influencia en la supervivencia de *S. typhi* y *S. enteritidis*.

Se debe tener en cuenta que el pH no ejerce efectos directos en los consumidores, pero es importante por ser uno de los parámetros indicadores de la calidad del agua potable, por lo tanto su determinación debe hacerse in situ, inmediatamente después de haberse recogido la muestra, ya que puede sufrir variaciones grandes en el transcurso del tiempo debido al transporte o una permanencia prolongada en recipientes<sup>19</sup>. El agua potable tuvo rangos pH de 7,13 a 7,29; los cuales estuvieron entre los valores establecidos por la OMS (6,5-8,5) y están dentro de los valores que no afectan a *S. typhi* y *S. enteritidis*<sup>14,15,18</sup>. Las bacterias experimentan diferentes tipos de “estrés” en su vida diaria, a los cuales deben adaptarse. *Salmonella* tendrá que sobrevivir al pH extremadamente bajo del estómago y a la acción antibacteriana de los ácidos grasos de cadena corta presentes en el intestino y además, tendrá que tolerar episodios de bajo pH cuando se encuentre en el interior del fago-lisosoma del macrófago<sup>6,15</sup>. El fenómeno de tolerancia inducida a estrés ácido estriba en que se induce la síntesis de proteínas específicas, las cuales protegen a las células a pHs extremadamente ácidos. Los pH intracelular bajos, activa la expresión de genes que codifican descarboxilasas de aminoácidos y así pueden elevar el pH interno, ya que catalizan reacciones en las que se consumen protones<sup>20,21</sup>.

Asimismo, la conductividad eléctrica estuvo en el rango de 278 a 308  $\mu\text{s}/\text{cm}$ ; al igual que los demás parámetros, dentro de los rangos establecidos por la OMS (50-1500  $\mu\text{s}/\text{cm}$ ), se debe tener en cuenta que mientras más impurezas hay en el agua potable, mayor es la conductividad eléctrica, es por ello la importancia de monitorearla<sup>14,21</sup>. Desde luego, por encima de los niveles 1500-1800  $\mu\text{s}/\text{cm}$  se puede esperar que ocurran cambios en los cultivos más sensibles<sup>7</sup>. El valor de la conductividad es directamente proporcional a la concentración de sólidos disueltos, se conoce además que la conductividad de una solución se determina por un movimiento molecular, la temperatura influye en dicho movimiento, por lo que es necesario tomarla en cuenta cuando se realizan mediciones de precisión. Generalmente, para realizar mediciones comparativas, la temperatura de referencia es de 20 °C ó 25 °C<sup>14,16,21</sup>. En el presente trabajo la temperatura se mantuvo dentro de dicho rango.

El parámetro químico más importante, puesto que interviene en la supervivencia de *S. typhi* y *S. enteritidis*, es la presencia de cloro libre residual en el agua potable de los diferentes distritos de Trujillo. El cloro residual libre es la cantidad de cloro en el agua en forma de ácido hipocloroso o hipoclorito, las cuales son la forma activa del cloro, dándole el poder desinfectante<sup>6,7</sup>. En el presente trabajo la cantidad de cloro libre residual estuvo en el rango de 0.2 a 0.3 mg Cl/L, cantidad aceptada que se encuentra dentro de los límites establecidos (0,5- 0,2 mg/L) en toda agua potable<sup>14,21</sup>.

Las muestras de agua potable al estar entre los valores permitidos, indican que tiene una adecuada desinfección, conteniendo la cantidad necesaria para eliminar los microorganismos. Esto explica las curvas de supervivencia; donde se observa que a tiempo transcurrido de 30 minutos de inoculada la suspensión bacteriana de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis*, se obtuvieron porcentajes de muerte de 99.8% y 94.71 %. Las células bacterianas afectadas por el cloro, liberan ácidos nucleicos, proteínas y potasio y las funciones de la membrana, tales como la respiración y transporte activo, son más afectadas que los procesos citoplasmáticos<sup>7,8,9</sup>. Existe la hipótesis que la pared celular, bajo estrés ambiental, podría



interactuar con el cloro, el cual parece causar alteraciones físicas, químicas y bioquímica, por lo tanto, destruye la barrera protectora de la célula, con lo que concluyen las funciones vitales y da lugar a la muerte del microorganismo. Una posible secuencia sería la interrupción de la barrera de la pared celular mediante reacciones del cloro con sitios proyectados en la superficie de células, terminación de las funciones asociadas con membranas y terminación de las funciones celulares<sup>8</sup>.

Al mismo tiempo, la efectividad del cloro también se ve afectada por el pH del agua, la cloración no es efectiva si el pH es mayor de 7,5 o menor de 6,5. Además, la acción bactericida se debe a la actividad de ácido hipocloroso (HClO), el cual se favorece a pH menores de 7,5 ya que a pH mayor tiende a generar ion hipoclorito (ClO<sup>-</sup>), el cual tiene una actividad reducida debido a su carga eléctrica y no atraviesa fácilmente la membrana celular de las bacterias<sup>7,8,9</sup>.

Al obtener los recuentos de las poblaciones de *S. typhi* y *S. enteritidis*, se utilizó diluciones de solución salina fisiológica (SSF) conteniendo tiosulfato de sodio, a una concentración final de 100µg/ml<sup>10,20</sup>, para poder inactivar el cloro tanto en las diluciones así como en las placas de siembra. Ya que al inicio de los ensayos utilizando sólo diluciones SSF, no permitió realizar los recuentos por falta de desarrollo bacteriano. Cabe resaltar además que a partir de las 18 horas de incubada *S. enteritidis*, mostró buen desarrollo bacteriano en las placas petri a diferencia de *S. typhi*, la cual aún a las 36 horas se pudo hacer lectura.

El hecho de que las curvas de supervivencia sean semejantes ( $p > 0,05$ ), significa que el agua de los distritos estudiados es similar en términos de calidad microbiológica, al margen de su cantidad. De igual modo, en lo que corresponde al tiempo de supervivencia, verificándose lo señalado para las curvas de supervivencia y corroborando que, efectivamente, *S. enteritidis* tiene más tiempo de supervivencia<sup>3,6</sup>, lo cual podría estar relacionado con el hecho de que *S. enteritidis* podría tener más resistencia al ácido hipocloroso que *S. typhi*<sup>6,7</sup>. En efecto, se ha logrado identificar algunos de los mecanismos defensivos de las salmonelas en ambientes de pH ácido extremo, determinando las formas en las que dos serovariedades del género *Salmonella* tales como: *S. typhimurium* y *S. senftenberg* se defienden ante esta agresión externa, resaltando que están implicados genes específicos (genes: *adi* y *cad*, respectivamente). Se identificó además sistemas de protección en 2 puntos concretos como es en la membrana bacteriana y en sus sistemas homeostáticos; esto podría inducir que *S. enteritidis* podría actuar de la misma manera respecto a la tolerancia al cloro o poseer algunos de estos genes en estudio, explicando así su supervivencia en este trabajo diferenciándola de *S. typhi*<sup>6,15</sup>.

Se debe recalcar que si bien es cierto las curvas de supervivencia no tienen significancia estadísticamente, *S. enteritidis* sobrevive más tiempo que *S. typhi*; y tomando en cuenta que el parámetro determinante del agua potable que influye en la supervivencia de éstas bacterias, es la concentración de cloro libre residual; se concluye que se debe mantener los niveles de desinfección indicados para el agua potable, ya que si no fuese así, en una posible contaminación con *Salmonella enteritidis*, podría ser perjudicial para la comunidad.

## CONCLUSIONES

- *Salmonella enteritidis* tiene estadísticamente el mismo comportamiento en agua potable de diferentes distritos, pero en base a sus recuentos, mantiene una curva de supervivencia decreciente por más tiempo que *Salmonella typhi*.
- No existe diferencia significativa entre las curvas de supervivencia de *Salmonella typhi* en agua potable de los distritos de Florencia de Mora, La Esperanza, el Porvenir y Laredo.
- No existe diferencia significativa entre las curvas de supervivencia de *Salmonella enteritidis*, en agua potable de los distritos de Florencia de Mora, La Esperanza, el Porvenir y Laredo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Panamericana de la Salud-Lima. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. Guía para mejorar la calidad del agua Ámbito rural y pequeñas ciudades. 2007.



2. Fuentes F, Campas N, Aguilar-Apodaca M, Meza-Montenegro M. Calidad Microbiológica del Agua de Consumo Humano de Tres Comunidades Rurales del Sur de Sonora. *Rev Salud Pública y Nutrición* 2007; 8 (3): 21-28.
3. Gloria Vásquez de Plata. La Contaminación de los Alimentos, un Problema por Resolver. *Salud UIS*. 2003; 35: 48-57
4. Escartin EF. Potential *Salmonella* transmission from ornamental fountains. *J Environm Health*. 2002; 65: 9-12.
5. Rodríguez D, Torres F, Gutiérrez E, et al. *Salmonella typhimurium*, determination in compost artificially inoculated in a lettuce crop. *Acta biol Colomb* 2008; 13 (3): 61-72.
6. Hernandez-domínguez C, Hernandez A, Chaidez C, Rendon SG, et al. Detección de *Salmonella* y coliformes fecales en agua de uso agrícola para la producción de melón. *Redalyc (México)*. 2008; 34: 75-84.
7. Henao RS, Sierra PR, Gaitán AJ. Actividad Bactericida del Acido Hipocloroso. *Rev Fac Med*. 2003; 51(3): 136-142
8. Muñoz CJ, Mafla CL. Monitoreo y Evaluación del cloro residual libre en el sistema principal de distribución del Acueducto Cestillal El diamante ACUCESDI, área rural del municipio Pereira-Risaralda. Universidad tecnológica de Pereira; 2007
9. Organización Mundial de la Salud. Guidelines for drinking water quality, 3ra ed. Ginebra: OMS, 2009.
10. CEPIS/OPS. Principios básicos de la desinfección del agua. Guías para la selección y aplicación de tecnologías de desinfección del agua para consumo humano en pueblos pequeños y comunidades rurales en América Latina y el Caribe/OPS. 2001; pp.1-12
11. Organización Panamericana de la Salud. Las condiciones de salud en las Américas. 19th ed. Washington D.C. 1990; pp.34-56.
12. Ramesh N, Carr LE, Wheaton FW. Serial disinfection with heat and chlorine to reduce microorganism populations on poultry transport containers. *J Food Froto* 2003; 66(5):793-7.
13. Ingram, PR, Homer NZ, Smith RA, Pitt AR, Wilson CG, Olejnik O. et al. The interaction of sodium chlorite with phospholipids and glutathione: a comparison of effects in vitro, in mammalian and microbial cells. *Arch Bioch Bioph*. 2003; 410(1):121-133.
14. American Society for testing and Materials (ASTM). Annual book of Standards. Determinación de Conductividad Eléctrica del agua. USA. 1994.
15. Caffer MI, Terragno N, Binsztein R. Manual de Procedimientos Diagnostico y Caracterización de *Salmonella* spp. Departamento Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán". Centro Regional de Referencia del WHO Global *Salmonella* Surv. para América del Sur. 2008.
16. Microorganismos de los alimentos, Técnicas de análisis microbiológico. ICMSF. 2da edición. Zaragoza España: Editorial Acribia;1994
17. Moya R. Estadística Descriptiva. España: Editorial San marcos EIRL; 2007
18. Organización Mundial de la Salud. Norma Técnica Nacional para la Calidad del Agua Potable. OPS/OMS. Acuerdo No.O84del 31 de Julio de 1995.
19. APHA, AWWA, WPCF. Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales. México: Edit. Díaz de Santos. 2003.
20. Koutsomanis K, Tassou CC, Taoukis PS, Nychas GJE. Modeling of the effectiveness of a natural antimicrobial on *Salmonella enteritidis* as a function of concentration, temperature and pH, using conductance measurements. *J Appl Microbiol*. 1998; 84: 981.
21. American Society for testing and Materials. Annual book of Standards. Determinación de Conductividad eléctrica del agua. Método ASTM D 1125-91; 1994.