



Calidad del agua y Salud: Las biopelículas y *Legionella*

Water quality and Health: Biofilms and *Legionella*

Gea-Izquierdo Enrique^{1,2,3*}, Loza-Murguía Manuel^{4,5}

Datos del Artículo

¹Universidad Internacional SEK, Dirección de Investigación e Innovación. Quito, Ecuador.

²Universidad Internacional SEK, Facultad de Seguridad y Salud Ocupacional. Quito, Ecuador.

³Universidad de Málaga, Cátedra de Seguridad y Salud en el Trabajo. Málaga, España.

⁴Universidad Católica Boliviana San Pablo-UCB-SP, Unidad Académica Campesina Carmen Pampa-UAC-CP. Coroico- Nor Yungas- La Paz, Bolivia.

⁵Departamento de Enseñanza e Investigación en Bioquímica & Microbiología-EI&BM. Unidad Académica Campesina Carmen Pampa-UAC-CP. La Paz, Bolivia.

*Dirección de contacto. Enrique Gea-Izquierdo Tel.: + 593 983034963. E-mail: enriquegea@telefonica.net

Palabras clave:

Calidad del agua, salud, biopelículas, *Legionella*.

J Selva Andina Res Soc.
2012;3(2):45-51.

Historial del artículo

Recibido Septiembre, 2012.
Aceptado Enero, 2013.
Disponible en línea, Febrero, 2013.

Key words:

Water quality, health, biofilms, *Legionella*.

Editado por:
"Selva Andina
Research Society"

Resumen

En el trabajo se discute la calidad del agua potable y su relación con la Salud Pública. Se presenta el concepto de formación de biopelícula entendido desde la óptica de la contaminación biológica. En especial se atiende a *Legionella* sp., nichos ecológicos y enfermedad relacionada "legionelosis". También se desarrolla la evolución de las biopelículas, su influencia en la calidad del agua, tratamiento y control. Por último, se expone la relación entre ciertos microorganismos implicados en las biopelículas acuáticas con el sustrato donde se desarrollan y el método de prevención.

© 2012. *Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia. Todos los derechos reservados.*

Abstract

This paper discusses the drinking water quality and its relation to Public Health. It introduces the concept of biofilm formation understood from the perspective of biological contamination. In particular, attends to *Legionella* spp., ecological niches and related legionnaires' disease. It also develops the evolution of biofilms, their influence on water quality, treatment and control. Finally, shows the relationship between certain microorganisms included in aquatic biofilms, the substrate where they develop and method of prevention.

© 2012. *Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivian. All rights reserved.*

En la última década la aparición de patógenos en el agua potable ha tenido cada vez más importancia, incluyéndose algunos procedentes de fuentes fecales tales como *Cryptosporidium parvum*, *Campylobacter* sp., rotavirus y otros que son capaces de crecer en los sistemas de distribución de agua, como *Legionella* sp., micobacterias y *Aeromonas* sp. En el desarrollo de un análisis de riesgo de patógenos es necesario comprender la ecología de estos microorganismos, por lo que ésta tiene que ser evaluada en detalle en los sistemas de distribución, atendiendo especialmente a la diversidad y propiedades fisiológicas de las bacterias acuáticas. Además, sus interacciones con los patógenos potenciales, en hábitats tan diversos como el agua libre y biopelículas, son esenciales para la supervivencia o el crecimiento de microorganismos higiénicamente relevantes en el agua potable. Como consecuencia los resultados de estudios epidemiológicos en conjunción con datos ecológicos son la base (Szewzyk et al 2000) de la protección efectiva del recurso, tratamiento del agua y valoración del riesgo.

La formación de biopelículas es un suceso natural en los ambientes acuáticos, inclusive en los sistemas de distribución de agua, constituyéndose entre otros en el interior de las tuberías. En ocasiones, el flujo de agua es mínimo en las paredes de los tubos estancándose cuando los dispositivos no están en uso. Las partículas precipitan desde el agua hacia la cara interna de las conducciones, promoviendo la adherencia de microorganismos planctónicos. Una vez que estos llegan a ser sésiles cambian su fenotipo, presentando después de la adherencia un lapso de tiempo asociado a la superficie en el que entran en una fase de crecimiento y producción de exopolisacáridos, recubriéndolos en una capa de

“limo”. Dentro de las biopelículas los microorganismos pueden señalizarse, transferir nutrientes e intercambiar material genético. Los exopolisacáridos insolubles escudan a los microorganismos de los desplazamientos y de la penetración por organismos predadores, antibióticos y desinfectantes; entonces la capa exterior crece rápidamente pudiéndose formar “enjambres de células”. De esto se deduce que, en caso de que aconteciese la separación de microorganismos de las biopelículas, podrían producirse infecciones; tanto por su ingestión como por aerosolización de los mismos (Gea-Izquierdo et al 2012a).

Según lo descrito *Legionella* sp., es uno de los microorganismos críticos incluidos dentro de las biopelículas, pudiendo aislarse en ambientes diversos como ríos, arroyos, lagos y sistemas acuáticos confeccionados por el hombre. Las concentraciones de *Legionella* generalmente son más altas en superficies donde las biopelículas están presentes, sirviendo los protozoos como hospedadores para la replicación. En este caso, para que una persona resulte infectada, un individuo susceptible debería estar expuesto a aerosoles (generalmente con tamaño $<10 \mu$) conteniendo una concentración suficiente de la bacteria (Cooper et al 2004). Como consecuencia podría acontecer la enfermedad respiratoria denominada legionelosis, causada por especies de *Legionella* provenientes de fuentes ambientales y antrópicas, principalmente torres de refrigeración, equipos análogos y sistemas de distribución de agua. En ellas la bacteria crece intracelularmente en otros microorganismos dentro de las biopelículas acuáticas, por lo que es en estos nichos ecológicos donde la bacteria puede sobrevivir y proliferar. Además, es especialmente importante la supervivencia plantónica de

Legionella en el agua, que también debe ser considerada.

Hay que resaltar la relevancia del sustrato en el desarrollo de las biopelículas. Para ensayos realizados a 20 °C *Legionella pneumophila* aparece con una baja proporción en la flora presente en biopelículas sobre el polibutileno y cloruro de polivinilo clorado, estando ausente en las superficies de cobre. El patógeno es más abundante a 40 °C en biopelículas sobre plásticos, donde puede representar el 50% de la flora total. Así, las superficies de cobre se consideran inhibitorias a la contaminación biológica (Gea-Izquierdo 2009) e incluyen únicamente un bajo número de microorganismos. Otra alternativa preventiva en la formación de biopelículas, además de la selección de sustratos que no soporten el “acoplamiento” de microorganismos, es la inhibición de las mismas mediante el suplemento de sistemas de nutrientes. Por ello, hay que considerar que la formación de biopelículas es esencial en la supervivencia de *Legionella*, estando inducidas en cierta manera por el ser humano en su afán de control por medio de los distintos tratamientos (químico/térmico). En la práctica existen determinados aspectos que favorecen el desarrollo del microorganismo, en especial la presencia de capas de otros microorganismos (bacterias, protozoos y algas) en las paredes de dispositivos o conducciones. La formación de láminas en parte se ve favorecida por un deficiente mantenimiento de los sistemas, desuso, estancamiento del agua, existencia de ramales ciegos, etc. En otras ocasiones la contaminación local por *Legionella* sp., es el resultado de un flujo lento del agua, en combinación con una baja presión y temperatura de régimen de 35 °C (Halabi et al 2001). Adicionalmente, la

presencia de determinados materiales orgánicos mejora la adhesión de bacterias y por tanto la formación de biopelículas.

El crecimiento de *legionellae* en ausencia de protozoos ha sido documentado en laboratorios mediante medios complejos. Las matrices de biopelículas pueden proporcionar un hábitat y un gradiente de nutrientes, permitiendo la supervivencia y la multiplicación de *legionellae* en el exterior de la célula hospedada. Estudios realizados para la determinación de la colonización y crecimiento de *Legionella pneumophila* en biopelículas (compuestas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Flavobacterium* sp.) sobre acero inoxidable, con y sin asociación con *Hartmannella vermiformis*, demostró con monitorización durante 15 días que la bacteria es capaz de persistir aunque no de replicarse en ausencia de *Hartmannella vermiformis* (Murga et al 2001). Por ello se considera que la invasión y replicación intracelular de *Legionella* dentro de los protozoos en el medio ambiente juega un papel fundamental en la transmisión de la legionelosis. El crecimiento dentro del protozoo mejora la capacidad de supervivencia ambiental y la patogenicidad (virulencia) de la bacteria. De hecho, los requerimientos para su crecimiento, la habilidad para entrar en ciertos microorganismos, la asociación con protozoos y la ubicación entre las biopelículas complica su detección y la investigación epidemiológica de la enfermedad. Al objeto, para la detección molecular de la bacteria se han desarrollado métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) aplicados en estudios epidemiológicos y ambientales. Adicionalmente, varios métodos de desinfección físicos, químicos y físico-químicos han sido propuestos para su

eliminación de las fuentes medio ambientales, pero por desgracia las consecuencias en el control de la bacteria sugieren nuevos planteamientos para el dominio de la enfermedad (Atlas 1999, Wirthlin et al 2003). Así, se ha estudiado la evaluación de la eficacia de ciertos agentes antibacterianos sobre *Legionella pneumophila* en superficies cerámicas conteniendo biopelículas (Sessa et al 2000) y sobre otros materiales utilizados en la confección de tuberías en instalaciones de agua potable (polietileno endurecido, cloruro de polivinilo, acero y cobre). La comparación de biopelículas maduras (con meses) en términos de dependencia de materiales, biomasa y estado fisiológico; ha mostrado una diferencia significativa en el comportamiento de éste último en las poblaciones en función de las técnicas de desinfección. Resaltar por ejemplo que las actividades respiratorias de los microorganismos aumentan durante la desinfección por radiación ultravioleta (254 nm, 400 J/m²) en comparación con la desinfección por dióxido de cloro (0,12-0,16 mg/l) (Schwartz et al 2003).

Debido a la diversidad de biopelículas y al desarrollo de fenotipos especiales, los microorganismos de las biopelículas no son tan susceptibles a los biocidas como los planctónicos. Una vez que los microorganismos se adhieren a las superficies el desarrollo de los fenotipos en las biopelículas se produce rápidamente y a no ser que se realicen desinfecciones regulares, será muy difícil prevenir completamente la formación de la biopelícula. La eliminación y destrucción de biopelículas establecidas requiere tratamientos severos, mayormente usando biocidas oxidantes. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza de las biopelículas diferentes biocidas pueden ser útiles, aplicándose selectivamente bajo condiciones

prácticas.

En algunos dispositivos o sistemas como pueden ser los intercambiadores de calor y las conducciones de agua caliente sanitaria, la contaminación biológica puede influir de forma específica en el flujo de agua circulante impidiendo p.ej. en el primer caso la transferencia de calor, aumentando la corrosión y dañando seriamente la instalación. A su vez, los materiales de corrosión y las incrustaciones presentes en las conducciones de los sistemas, en el aporte de agua de suministro a los mismos y resto de equipos facilitan la presencia de la bacteria. Los procesos de biocorrosión y biocontaminación están mediados por microorganismos adheridos a las superficies metálicas o inmersas en una matriz gelatinosa que se ha denominado biopelícula. Éstas afectan la interacción entre los metales y el ambiente, no sólo con reacciones perjudiciales como la corrosión sino también a determinados procesos biológicos relacionados con los materiales de recubrimiento. Además, el crecimiento de los microorganismos capaz de inducir corrosión está condicionado por circunstancias ambientales favorables. En el tratamiento, cabe indicar que los agentes químicos que son generalmente usados para prevenir o proteger estructuras metálicas de la biocorrosión son altamente tóxicos y pueden tener un impacto negativo en el medio ambiente. Por ello, se está implementando el uso del ozono como un biocida “ecológico” que minimiza el impacto ambiental, el ensayo de la efectividad de biocidas naturales en bacterias sésiles y planctónicas, el uso potencial de inhibidores de películas formadoras de corrosión y el uso de sustancias preventivas innovadoras (De Saravia et al 2003). Adicionalmente, mediante modelos de laboratorio se han evaluado microbiológicamente un rango de productos desinfectantes para el control de grupos

de especies contaminantes en biopelículas, y mientras muchos consiguen una reducción suficiente en el recuento total de viables, no necesariamente remueven las biopelículas no deseadas de las superficies de las conducciones (Walker et al 2003). También se han determinado mediante microscopía electrónica de barrido muestras de biopelículas extraídas de líneas de agua antes y después del uso de dióxido de cloro, mostrando su efectividad en la descontaminación y presentando ventajas sobre otros productos derivados del cloro. Además, resultados de experimentos biológico-moleculares en combinación con ensayos en cultivos muestran que ciertos enterococos son capaces de franquear la barrera por radiación ultravioleta y persistir en la biopelículas de los sistemas de distribución de agua, pero no después de la desinfección por dióxido de cloro (Schwartz et al 2003). De esto se desprende que ciertos agentes no son eficaces en el tratamiento frente a los sistemas biológicos presentes en las biopelículas, debido principalmente a una baja penetración en el tapete microbiano (Hambidge 2001, Kusnetsov et al 1994). Así la irradiación ultravioleta es útil para la protección de sistemas acuáticos en áreas pequeñas, pero en ausencia de actividad residual tiene que ser combinada con otros métodos de desinfección.

Hay que asumir que el mantenimiento de un sistema acuático es necesario para reducir la formación de biopelículas y la recolonización por *Legionella* (Franzin et al 2002). Otros autores (Williams & Braun Howland 2003), han confirmado la resistencia de biopelículas bacterianas establecidas en sistemas frente a tratamientos con niveles recomendados de desinfectantes, en especial con presencia de especies como *Legionella*

pneumophila, *Escherichia coli* y proteobacterias delta y beta. Éstas han sido detectadas dentro de las biopelículas antes y después de ciertos tratamientos, y aunque no han sido identificadas usando técnicas rutinarias de monitorización, la observación de contenido ARNr de *Escherichia coli* en las biopelículas demuestra no sólo la supervivencia del microorganismo sino también la actividad metabólica dentro de los sistemas modélicos de distribución. En otros casos la aplicación de desinfectantes reduce la biopelículas, pero éstas se extienden rápidamente cuando se suspenden las desinfecciones periódicas (Tuttlebee et al 2002). Por lo tanto, la persistencia de diversas especies bacterianas dentro de las biopelículas advierte del riesgo biológico, inclusive en el tratamiento con desinfectantes.

Cabe comentar que el control de la temperatura en los dispositivos de distribución de agua es necesario para la inhibición de la formación de biopelículas y colonización por *Legionella* sp. (Martinelli et al 2000, Gea-Izquierdo 2012b). En principio los sistemas por donde se recircula agua son lugares potenciales de presencia de la bacteria y por tanto, bajo condiciones medio ambientales específicas, de desarrollo de la misma. En este tipo de sistemas a veces el agua se encuentra en un rango de temperatura de funcionamiento entre 30 y 60 °C, saturada de oxígeno, con exposición a la luz solar, y con niveles de pH entre 6-9. Ello puede conducir a la existencia de nutrientes abundantes y el desarrollo de un hábitat idóneo para la presencia microbiológica, con relevancia tanto por la posible afectación de la circulación del agua como por la “protección” que ejerce sobre otros microorganismos.

Desde hace tiempo se han identificado un gran número de factores de virulencia bacteriana que afectan al crecimiento de *Legionella*, tanto en protozoos como en macrófagos. En cambio, otras medidas para la prevención de la enfermedad se han centrado en la eliminación del patógeno de los suministros de agua; considerando como extremadamente importante la identificación y el análisis de *Legionella* en consorcios medio ambientales complejos. De esta forma y con la disponibilidad de nuevas herramientas moleculares se contribuye a que la investigación aplicada evolucione favorablemente (Steinert et al 2002) y la lucha frente a la enfermedad.

Conflictos de interés

El presente trabajo no genera conflictos de interés.

Literatura citada

- Arif MAS, Verstraete W. Methane dosage to soil and its effect on plant growth. *World J Microbiol Biotechnol.* 1995; 11:520-35.
- Atlas RM. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environ Microbiol.* 1999;1(4):283-293.
- Cooper AJ, Barnes HR, Myers ER. Assessing risk of *Legionella*. *ASHRAE Journal.* 2004;46(4):22-26.
- De Saravia SGG, Guiamet PS, Videla HA. Prevention and protection of the effects of biocorrosion and biofouling minimizing the environmental impact. *Revista de Metalurgia.* 2003;Suppl.S:49-54.
- Franzin L, Cabodi D, Fantino C. Evaluation of the efficacy of ultraviolet irradiation for disinfection of hospital water contaminated by *Legionella*. *J Hosp Infect.* 2002;51(4):269.
- Gea-Izquierdo E. Evaluación del desarrollo de *Legionella pneumophila* mediante el análisis de materiales de sistemas de distribución de agua. *Bol Mal Salud Amb.* 2009;49:167-171.
- Gea-Izquierdo E, Mezones-Holguín E, Haro-García L. Acciones de prevención y control de la legionelosis: Un reto para la Salud Pública Española. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2012a;29(2):272-276.
- Gea-Izquierdo E, García-Rodríguez A, Daponte-Codina A, Espigares-Rodríguez E, Maeso-González E, Mateo-Rodríguez I, et al. Prevención de *Legionella pneumophila* a través del control de la temperatura del agua. *Revista de la Sociedad Española de Medicina y Seguridad del Trabajo.* 2012b;7(1):9-16.
- Halabi M, Wiesholzer Pittl M, Schoberl J, Mittermayer H. Non-touch fittings in hospitals: a possible source of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella spp.* *J Hosp Infect.* 2001;49(2):117-121.
- Hambidge A. Reviewing efficacy of alternative water treatment techniques. *Health Estate.* 2001;55(6):23-25.
- Kusnetsov JM, Keskitalo PJ, Ahonen HE, Tulkki AI, Miettinen IT, Martikainen PJ. Growth of *Legionella* and other heterotrophic bacteria in a circulating cooling water system exposed to ultraviolet irradiation. *J Appl Bacteriol.* 1994;77(4):461-466.
- Martinelli F, Caruso A, Moschini L, Turano A, Scarcella C, Speziani F. A comparison of *Legionella pneumophila* occurrence in hot water tanks and instantaneous devices in domestic, nosocomial, and community environments. *Curr Microbiol.* 2000;41(5):374-376.

- Murga R, Forster TS, Brown E, Pruckler JM, Fields BS, Donlan RM. Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology*. 2001;147(11):3121-3126.
- Schwartz T, Hoffmann S, Obst U. Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and U.V. disinfection in a public drinking water distribution system. *J Appl Microbiol*. 2003;95(3):591-601.
- Sessa R, Di Pietro M, Zamparelli M, Schiavoni G, Del Piano M. Biofilm formation on the surface of ceramic tiles. *New Microbiol*. 2000;23(4):407-413.
- Steinert M, Hentschel U, Hacker J. *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS. Microbiol Rev*. 2002;26(2):149-162.
- Szewzyk U, Szewzyk R, Manz W, Schleifer KH. Microbiological safety of drinking water. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:81-127.
- Tuttlebee CM, O' Donnell MJ, Keane CT, Russell RJ, Sullivan DJ, Falkiner F, et al. Effective control of dental chair unit waterline biofilm and marked reduction of bacterial contamination of output water using two peroxide-based disinfectants. *Journal of Hospital Infection*. 2002;52(3):192-205.
- Walker JT, Bradshaw DJ, Fulford MR, Marsh PD. Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory model of a dental unit water system. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003;69(6):3327-3332.
- Williams MM, Braun Howland EB. Growth of *Escherichia coli* in model distribution system biofilms exposed to hypochlorous acid or monochloramine. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(9):5463-5471.
- Wirthlin MR, Marshall GW, Rowland RW. Formation and decontamination of biofilms in dental unit waterlines. *Journal of Periodontology*. 2003;74(11):1595-1609.
-