

Higiene y Sanidad Ambiental, **9**: 422-430 (2009)

Medios de cultivo fluorogénicos y cromogénicos y su evaluación en aguas de consumo y costeras

María Isabel GONZÁLEZ GONZÁLEZ,¹ Teresa TORRES ROJAS,¹ Sergio CHIROLES RUBALCABA¹ y Mohammad MANAFI²

¹ Laboratorio de Microbiología de Aguas, Vicedirección Salud Ambiental, Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. Infanta 1158 e/ Clavel y Llinás, Centro Habana, CIP 10300, Cuba. Tel. (53-7) 870-5531-34. Correo-e: isa@nhem.sld.cu; mariaisa@infomed.sld.cu

² Instituto de Higiene, Universidad de Viena, Austria.

RESUMEN

El monitoreo de la calidad sanitaria del agua es de notable importancia para la salud humana debido a la posibilidad de transmisión de microorganismos patógenos causantes de enfermedades por vía hídrica. El objetivo del presente trabajo fue incorporar y evaluar varios medios de cultivo, cromogénicos y fluorogénicos, en los métodos microbiológicos empleados en aguas para los indicadores bacterianos de contaminación (coliformes totales y fecales, enterococos, *Escherichia coli*) y patógenos seleccionados (*Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Aeromonas* spp, *Escherichia coli* O 157) en aguas de fuentes de abasto (32), sistema de distribución (57) y aguas costeras con fines recreativos (42). El análisis estadístico empleado fue la prueba de correlación lineal y de variables dependientes, encontrándose una buena correlación entre los medios de cultivo convencionales utilizados para coliformes totales y fecales y los cromogénicos, lo que permitió la determinación de los mismos de una forma más rápida y específica. Se obtuvieron mayores recobrados con caldo Readycult Coliformes 100 y Readycult Enterococos 100, el primero con resultados excelentes para su empleo en brotes de enfermedades de transmisión hídrica en aguas de consumo, y el segundo, para la vigilancia de aguas costeras utilizadas para usos recreativos por contacto directo. También, se encontraron resultados satisfactorios en ambos tipos de agua marinas y frescas (fuentes de abasto) con caldo LMX para la determinación de coliformes y *E. coli*. La presencia de *Aeromonas* en ausencia de coliformes fecales reitera la necesidad de considerar este microorganismo como parámetro dentro de los criterios microbiológicos a tener en cuenta en determinadas situaciones, especialmente en aguas de consumo superficiales. Estos medios de cultivo se recomienda que sean utilizados en el sistema de vigilancia de aguas, principalmente para aguas de consumo y costeras con riesgos de brotes de enfermedades de transmisión digestiva o situaciones de emergencia.

INTRODUCCIÓN

El deterioro de la calidad sanitaria del agua constituye un riesgo potencial para la salud humana debido a la posibilidad de transmisión por vía hídrica de microorganismos causantes de enfermedades, de ahí que la determinación de indicadores bacterianos de contaminación sea de notable importancia para el monitoreo de la calidad microbiológica.

En las últimas décadas, se han desarrollado técnicas bien novedosas para la detección y diferenciación de bacterias de determinados grupos

bacterianos tales como, las del grupo coliforme y enterococos. Estas técnicas se basan en la utilización de sustratos cromogénicos y fluorogénicos que detectan reacciones enzimáticas específicas de los microorganismos, lo que conduce a una mayor sensibilidad y más rápida detección, ya que pueden aplicarse a los medios de cultivo de aislamiento primario sin tener que efectuar necesariamente la etapa de identificación (Manafi *et al.*, 1991).

Una de las reacciones fluorogénicas o cromogénicas más utilizada, es la hidrólisis de sustratos sintéticos por enzimas bacterianas, que

provocan una reacción de fluorescencia cuando se les irradia con luz UV de longitud de onda entre 365 y 440 nm, siendo uno de los más utilizados los derivados del 4-metilumbeliferona (4-MU).

Los métodos convencionales para la detección de coliformes fecales, enterococos y *Escherichia coli* son laboriosos y consumidores de tiempo. El uso de medios con los sustratos cromogénicos y fluorogénicos, para las enzimas galactosidasa (LAC) y β -glucuronidasa (GUD), se ha incrementado notablemente a escala mundial. La incorporación del sustrato MUG (4-metil-umbeliferona glucurónido) usado como indicador en el ensayo de tubos múltiples o en la técnica de filtración de membrana es considerado de notable importancia. Este sustrato es hidrolizado por la enzima β -glucuronidasa, enzima que poseen el 90% de las cepas de *Escherichia coli*, produciendo en el medio un compuesto fluorogénico, fácil de detectar con luz UV en alrededor de 18-24 horas.

También es de importancia la determinación, en algunos casos, de patógenos bacterianos tales como, *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella*. *E. coli* O157:H7 se considera un enteropatógeno bacteriano emergente de interés clínico debido a su asociación como agente causal en la diarrea con sangre y el síndrome urémico hemolítico. *Salmonella* spp está involucrada en gastroenteritis en humanos. La presencia de estos microorganismos en el agua se considera un factor de riesgo para la salud, por lo que su vigilancia es fundamental, al igual que los estudios especiales que se llevan a cabo en caso de brotes.

Entre estos medios se pueden citar caldo Readycult 100 para coliformes (Merck, 2000), caldo Readycult 100 para enterococos (Merck, 2000), caldo Fluorocult LMX, agar Chromocult para coliformes y agar Fluorocult para *Escherichia coli* O157:H7. Estos medios poseen las siguientes ventajas:

- **Conveniencia.** En algunos casos como los caldos Readycult, el medio se comercializa en un paquete listo para usar, se puede utilizar en los lugares de muestreo, no requiere preparación del medio de cultivo, sólo se agrega el medio a la muestra de agua y después del tiempo de incubación se leen los resultados.
- **Rapidez.** Los resultados están a las 18-24 h, antes que con los medios convencionales.
- **Fácil de leer.** La interpretación se da con un cambio de color o una fluorescencia.
- **Económico.** Se utiliza menos cristalería y menos tiempo de trabajo del personal técnico.
- **Alta confiabilidad.** La reacción enzimática es altamente específica con el sustrato.

El objetivo del trabajo ha sido incorporar y evaluar los medios de cultivo cromogénicos y fluorogénicos de dos firmas productoras (Merck y BIOGEN) empleados en la determinación de indicadores de contaminación y patógenos bacterianos seleccionados en muestras de diferentes tipos de agua.

MATERIAL Y MÉTODOS

La procedencia y número de muestras ha sido la siguiente:

- Aguas subterráneas: pozos: 16
- Aguas superficiales: fuente de abastecimiento de agua: 16
- Aguas del sistema de distribución: 57
- Aguas costeras utilizadas en fines recreativos: 42

Las muestras de agua fueron recolectadas entre los años 2000 (febrero-diciembre) y 2001 (enero-mayo) con una frecuencia semanal, efectuándose la toma, transporte y conservación de las mismas según recomendaciones de APHA (1995) y procedimientos normalizados de operación (PNO) para el muestreo del laboratorio.

Se llevó a cabo el control de cada lote de medios de cultivo empleados utilizando cepas de referencia y salvajes procedentes del laboratorio de Control de Calidad y Medios de Cultivo del INHEM. Para la preparación, empleo e interpretación de los medios de cultivo con sustratos cromogénicos y fluorogénicos se siguieron las recomendaciones de los fabricantes.

La metodología empleada para la determinación de los indicadores bacterianos de contaminación (coliformes totales y fecales, *Escherichia coli* y enterococos) fue la técnica de tubos múltiples, la técnica de filtración por membrana y la técnica de presencia y ausencia recomendada por APHA (1995). La determinación de enterococos se realizó sólo para las muestras de aguas costeras.

Los medios de cultivo utilizados para la determinación de indicadores bacterianos se citan a continuación, con las siglas y fabricante entre paréntesis: Caldo Bilis Verde Brillante (BRILA, Merck), caldo Bilis Verde Brillante (BVB, Biocen), caldo EC (EC, Merck), caldo EC (ECB, Biocen), caldo LMX (LMX), agar Chromocult (CC, Merck), agar ECD (ECD, Fluorocult), agar mFC (mFC), agar mEndo LES (mEndo LES).

La determinación de patógenos bacterianos (*Salmonella*, *Escherichia coli*, *Vibrio* y *Aeromonas*) se realizó según recomendaciones de APHA (1995), OPS (1994), SCA (1994) y procedimientos normalizados de operación (PNO) del laboratorio, incorporándose en la etapa de aislamiento el agar Rambach (Merck) para *Salmonella* y el agar Fluorocult *Escherichia coli* O157:H7 (Merck) para *E. coli*. La técnica de *Salmonella* se llevó a cabo sólo en fuentes de abasto de agua (aguas subterráneas y superficiales) mientras que los otros patógenos bacterianos se realizaron en los diferentes tipos de agua.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Indicadores bacterianos

En la Tabla 1 se observa el 100 % de recobrado con los medios de cultivo novedosos y los convencionales,

TABLA 1. Número (%) de muestras positivas en aguas de fuentes de abasto (N=32). INHEM 2000-2001.

MEDIOS DE CULTIVO	COLIFORMES TOTALES		COLIFORMES FECALES		Escherichia coli	
	N (+)	%	N (+)	%	N (+)	%
BRILA	32	100.0				
BVB	32	100.0				
LMX	32	100.0			32	100.0
EC			32	100.0		
ECB			32	100.0		
mENDO LES	30	93.75				
mFC			30	93.75		
CC					15	46.87
ECD					14	43.75
READYCULT COLIFORMES 100	32	100.0			32	100.0

empleados para coliformes totales y fecales en las aguas de fuentes de abasto analizadas con la técnica de tubos múltiples. Con respecto al caldo Readycult para coliformes y *E. coli* todas las muestras analizadas fueron positivas, lo que coincide con lo detectado en los medios de cultivo anteriormente citados.

Sin embargo, por la técnica de filtración de membrana sí hubo diferencias entre agar mFC y agar CC y ECD, para la determinación de coliformes fecales y *E. coli*. En agar mFC se obtuvo un 93.75%

de positividad a coliformes fecales con relación a un 46.87% en agar CC y un 43.75% en agar ECD.

En agar CC y agar ECD se observó la presencia de *Aeromonas* spp lo que justifica los bajos porcentajes de coliformes en dichos medios. Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores (Geissler *et al.*, 2000) que han encontrado una interferencia notable en los conteos de coliformes en agar CC con otras bacterias no coliformes, en especial de

los géneros *Aeromonas* y *Vibrio*. Se ha demostrado que las bacterias de estos géneros son capaces de producir β -D-galactosidasa (Alonso *et al.*, 1996; Davies *et al.*, 1995) por lo que se recomienda la incorporación del cefsulodin para la obtención de mayores recobrados de coliformes. En la actualidad, se está comercializando un nuevo medio de agar CC (Merck), con la inclusión de este antibiótico para evitar los falsos positivos.

TABLA 2. Número (%) de muestras positivas en aguas marinas (N = 42). INHEM, 2000-2001.

MEDIOS DE CULTIVO	COLIFORMES TOTALES		COLIFORMES FECALES		Escherichia coli		Enterococos	
	N (+)	%	N (+)	%	N (+)	%	N (+)	%
BRILA	42	100.0						
BVB	42	100.0						
LMX	42	100.0			39	92.85		
EC			42	100.0				
ECB			42	100.0				
mENDO LES	41	97.61						
mFC			41	97.61				
CC					30	71.42		
ECD					36	85.71		
READYCULT COLIFORMES 100	42	0			42	0		
READYCULT ENTEROCOCOS 100							42	100.0
Caldo enterococos							42	100.0
Caldo púrpura bromocresol							42	100.0
Agar Slanetz -Bartley							39	92.85

Tabla 3. Coeficiente de correlación lineal entre los medios de cultivo de coliformes totales (convencional y cromogénico-fluorogénico) en las aguas analizadas.

Medio de cultivo	r	Y
BRILA-BVB	0.969949*	0.937115*
BRILA-LMX	0.834992*	0.717291*
BVB-LMX	0.850232*	0.755973*

*p<0.05; r: coeficiente de correlación; y: pendiente.

En las 57 muestras de agua procedentes del sistema de distribución, los resultados obtenidos fueron negativos en su mayoría para coliformes totales y fecales y *Escherichia coli*. Sólo dos muestras fueron positivas (3.5%) con el caldo Readycult coliformes 100 en las de fuentes de abasto de aguas superficiales, lo que reitera la especificidad del caldo. Este medio de cultivo se comercializa en ampulas plásticas con el medio deshidratado para volúmenes de 100 ml de la muestra de agua a analizar, lo que resulta muy práctico y sencillo de

Tabla 4. Coeficiente de correlación lineal entre los medios de cultivo de coliformes fecales y *Escherichia coli* (convencional y cromogénico-fluorogénico) en las aguas analizadas.

Medio de cultivo	r	Y
EC-ECB	0.957441*	0.947621*
EC-LMX	0.720073*	0.551026*
ECB-LMX	0.721830*	0.558094*

*p<0.05; r: coeficiente de correlación; y: pendiente.

utilizar para la determinación de coliformes y *Escherichia coli*, especialmente en brotes de enfermedades de transmisión hídrica y en situaciones de emergencia. Estos resultados reiteran la efectividad y conveniencia de este medio de cultivo para la evaluación de la calidad del agua principalmente en dichas situaciones y así, obtener resultados más rápidos y confiables.

En la Tabla 2 se observan los resultados obtenidos en aguas marinas. De las 42 muestras analizadas se obtuvo un 100% de positividad para coliformes totales y fecales, y un 92.85% para *Escherichia coli* con los medios empleados por la técnica de tubos múltiples, similar a lo detectado en aguas subterráneas y superficiales. Sin embargo, los recobrados por la técnica de filtración de membrana fueron inferiores, en mFC fue mayor (97.6%) con relación a agar CC (71.42%) y agar ECD (85.7%). En estos dos últimos medios, se detectó la presencia de *Aeromonas* interfiriendo en los resultados de *E. coli*.

Los resultados para caldo Readycult coliformes 100 fueron negativos para todas las muestras de aguas marinas analizadas. El incremento de la concentración de sales en el medio debido a la salinidad del agua de mar, afecta el recobrado de *Escherichia coli*. Diferentes estudios realizados por investigadores (Barcina *et al.*, 1997; Pommepuy *et al.*, 1996) han demostrado el impacto de varios factores abióticos y bióticos que afectan la supervivencia de los coliformes y *Escherichia coli* en agua de mar, entre los que se encuentran la temperatura, la luz solar, la presión osmótica y la salinidad.

Por otra parte, Fujisawa *et al.* (2000) describieron los efectos de varias concentraciones de cloruro de sodio sobre la actividad de la β -glucuronidasa de células intactas y sonicadas de *C. perfringens* y *E. coli* en heces fecales humanas. Las células de *E. coli* presentaron mayor actividad de β -glucuronidasa en 0.1% NaCl y menores a 0.1%, 0.5% y 0.95% de NaCl. Estos resultados indicaron que las diferentes concentraciones de NaCl influían sobre la permeabilidad de las células de ambas especies y afectaba la actividad de la enzima. Todo ello podría ser una justificación a los resultados negativos para coliformes con caldo Readycult coliformes 100, ya que este medio posee una concentración de 0.25g de NaCl en 100 ml de la muestra de agua. Si a ello se le incrementa el contenido de sales que presenta el agua de mar, la concentración de sal en el medio de cultivo aumenta y por ende, podría disminuir la actividad enzimática.

En estudios más recientes se propone medir la actividad de la β -D glucuronidasa en las bacterias alóctonas, entre ellas *E. coli*, por su actividad metabólica celular del estado viable y no cultivable de la bacteria en el medio acuático (George *et al.*, 2000; 2001). También, se ha reportado por Caruso *et al.* (1998), la rápida detección de *E. coli* con la aplicación de un ensayo enzimático usando el sustrato 4-metil umbeliferona- β -D glucuronido (MUG) por espectrofluorimetría para la determinación de la contaminación fecal en aguas costeras demostrándose una correlación significativa entre esta técnica y las de cultivo en placa (agar m-FC) y microscopía (inmunofluorescencia directa).

Con respecto a los análisis llevados a cabo para la determinación recomendada de enterococos para las aguas marinas, se obtuvo una alta positividad en todos los medios de cultivo empleados (100% en caldo Enterococos, caldo Readycult enterococos 100 y caldo púrpura de bromocresol y un 92.85% en agar Slanetz Bartley). Estos resultados coinciden con los reportados por otros investigadores (Amorós y Alonso, 1996) donde se recuperan altos porcentajes de estos microorganismos, indicadores bacterianos de contaminación fecal, en este tipo de agua. En la actualidad, la determinación de enterococos es parte de las normativas y criterios microbiológicos para la evaluación de riesgo al bañista en aguas con fines

Tabla 5. Número de muestras positivas (%) de patógenos bacterianos en diferentes tipos de agua. INHEM 2000-2001.

Fuente de agua	<i>Vibrio</i>		<i>Aeromonas</i>	
	N	%	N	%
Subterráneas (N=16)	4	25.0	8	50.0
Superficiales (N=16)	9	56.25	10	62.5
Sistema de distribución (N=57)	1	1.75	9	15.7
Marinas (N=42)	42	100.0	13	30.9

recreativos para numerosos países, en especial de climas templados.

El análisis estadístico llevado a cabo entre los medios de cultivo convencionales y cromogénicos de coliformes totales y fecales y *E. coli* se observan en las Tablas 3 y 4. En la Tabla 3 se observan los resultados de la correlación lineal existiendo una buena correlación entre estos medios con el mayor valor entre BRILA-BVB (0.969). A pesar de que con la prueba de correlación se obtuvieron resultados positivos entre los medios de cultivo para coliformes, al aplicar el test de variables dependientes hubo diferencias significativas entre BRILA-LMX y BVB-LMX. Al analizar las medias geométricas, se observaban mayores valores para el caldo LMX (2.3821) con relación al BVB (2.0321) y BRILA (1.9957), lo que concuerda con los mejores recobrados para el caldo LMX.

En la Tabla 4 se aprecia una correlación lineal entre los medios de coliformes fecales con valores más altos entre EC y ECB (0.9574) y valores más

bajos entre EC-LMX (0.720) y ECB y LMX (0.721). Al aplicar el test de variables dependientes, se encontró que entre los medios convencionales (EC y ECB) no hubo valores significativamente diferentes, sin embargo si existían diferencias entre EC-LMX y ECB-LMX. Los mayores valores de medias geométricas encontrados fueron para LMX (1.9492) con relación a EC (1.5603) y ECB (1.5929).

En ambos casos, para coliformes totales con los medios convencionales (BV y BRILA) y los medios empleados para coliformes fecales y *Escherichia coli* (EC y ECB) se obtuvieron resultados semejantes. Sin embargo, a pesar de ser positivas las correlaciones sí se observaron diferencias en el recobrado con el medio de nueva introducción: LMX.

La conveniencia de este medio de cultivo para la determinación de coliformes totales y *Escherichia coli*, se ha reportado por otros investigadores (Manafi y Kneifel, 1989; Geissler *et al.*, 2000) ya que los resultados se obtienen en un día en comparación a 4-6 días utilizando los métodos tradicionales. Además, la especificidad y rapidez de este medio lo hace muy útil en la evaluación sanitaria de aguas, ya que el grupo coliforme está presente en la mayoría de las normativas higiénicas sanitarias vigentes.

Patógenos bacterianos

En las muestras analizadas de aguas de fuentes de abasto (subterránea y superficial), del sistema de distribución y marinas no se aisló *Salmonella* ni *E.*

TABLA 6. Número de cepas de las especies identificadas según el medio de cultivo empleado y la técnica. INHEM, 2000-2001.

Especies bacterianas	Filtración de Membrana				Tubos múltiples-presencia / ausencia				TOTAL
	Agar mFC	Agar Endo	Agar CC	Agar ECD	R-C 100	Caldo LMX	Caldo EC	Caldo ECB	
<i>Escherichia coli</i>	34	44	27	14	61	86	34	29	329
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	14	3	3	18	11	6	5	65
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	3	-	-	2	14	1	5	26
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	2	2	3	2	6	-	-	16
<i>Citrobacter freundii</i>	-	3	-	-	2	2	1	-	8
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	1	1	-	2	2	-	-	7
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	4	1	1	-	-	-	-	6
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	-	1	-	-	-	3	-	5
<i>Citrobacter diversus</i>	-	2	-	-	-	-	2	1	5
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	2	-	-	-	2
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	1
TOTAL	43	74	35	21	89	121	47	40	470

coli O157:H7, sólo se detectaron microorganismos de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas* (Tabla 5).

Como se muestra en los resultados obtenidos, la presencia del género *Aeromonas* es frecuente en las aguas dulces y más baja en aguas marinas donde prevalece el género *Vibrio* lo que concuerda con sus requerimientos con respecto a la concentración de sales. El género *Aeromonas* se recobró en altos porcentajes en aguas superficiales y subterráneas, lo que justifica su hábitat de ambientes dulceacuícolas. Este género se ha aislado en fuentes de aguas superficiales con distintos estados tróficos y diferentes niveles de contaminación fecal (Holmes *et al.*, 1996) relacionándose con indicadores de bacterianos de contaminación fecal como coliformes, por lo que en algunos casos se incluye en criterios para el monitoreo de la calidad microbiológica de agua.

Se debe señalar que *Aeromonas* spp no se encuentra como microflora autóctona en aguas subterráneas (Holmes *et al.*, 1996), pero sí se ha reportado como parte de ella en pozos de aguas mineromedicinales con un bajo número de bacterias (Mosso *et al.*, 1994). Debido al riesgo para la salud que implica la presencia de dicho enteropatógeno en estas fuentes de aguas subterráneas, se ha propuesto (Warburton, 1993; Warburton, 2000) la determinación de *Aeromonas hydrophila* dentro de los requisitos microbiológicos en las nuevas normativas para aguas de bebida envasada de algunos países, como por ejemplo Canadá.

El género *Vibrio* tampoco se encuentra formando parte de la microflora autóctona de las aguas subterráneas sin embargo, existen algunos reportes donde se plantea su presencia, por ejemplo, durante el brote de cólera en Portugal (Blake *et al.* 1977). *Vibrio cholerae* se asoció al agua contaminada procedente de un río que se infiltraba a través de las fisuras que presentaban las rocas calizas del subsuelo, dando lugar a la contaminación de dos manantiales que suministraban agua para embotellar.

Es de destacar la presencia reiterada del género *Aeromonas* en las muestras de agua recolectadas en los sistemas de distribución, a pesar de no detectarse coliformes por las técnicas empleadas. De 57 muestras analizadas, nueve fueron positivas (15.7%), en presencia de cloro lo que indica una vez mas que la presencia de coliformes propuestos en la mayoría de las normativas para la vigilancia de aguas de consumo, no garantiza que el agua esté libre de bacterias patógenas, fundamentalmente si las aguas del sistema de distribución proceden de aguas superficiales.

Las bacterias del género *Aeromonas* se han aislado en aguas de sistemas de distribución como resultado de un tratamiento de desinfección inadecuado y pueden favorecer la formación de biopelículas que se forma en las tuberías del sistema formando parte de ella. En estas se pueden multiplicar y persistir debido a su nutrición, a partir de un amplio rango de compuestos de bajo peso

molecular (aminoácidos, carbohidratos y ácidos carboxílicos), péptidos y ácidos grasos, en concentraciones tan bajas como 0.1µg de carbono por litro (Holmes *et al.*, 1996).

Por otra parte, algunos investigadores (Sisti *et al.*, 1998) demostraron que dichas bacterias mostraban una resistencia moderada al cloro a su vez influenciada por la temperatura del agua. Ellos observaron que cuando la temperatura era de 20°C (de verano), la eficacia de las concentraciones de cloro examinadas eran de dos a tres veces más bajas que a temperaturas de 5°C (invernales). Si se considera que la temperatura media anual aproximada de las aguas en Cuba es de 23°C, se pudiera pensar que la dosis de cloro en el sistema de distribución pierde efectividad frente a las bacterias de este género y no inhibe su crecimiento.

Con respecto al género *Salmonella*, en anteriores investigaciones llevadas a cabo en esas mismas fuentes de aguas subterráneas y superficiales, sí se aisló *Salmonella* con la ausencia de coliformes fecales (González *et al.*, 1993) a diferencia de este estudio donde no hubo aislamiento con ninguno de los medios de cultivo utilizados, quizás debido a una mejor protección sanitaria actual de las fuentes de abasto de agua analizadas.

De forma general, los agentes patógenos son excretados constantemente al ambiente acuático por seres humanos y animales con concentraciones variables. Las aguas residuales domésticas y las escorrentías pluviales son las vías de transporte de estos microorganismos a los cuerpos receptores superficiales, y a través de barreras inadecuadas según el tipo de suelo y zona no saturada, llegan a las aguas subterráneas. De ahí la importancia de las actividades de monitoreo, el tratamiento de las aguas residuales, el control de las aguas de escorrentía y el tratamiento y abastecimiento adecuado de la fuente de agua.

Entre los microorganismos que afectan la calidad microbiológica de las aguas costeras se encuentran las especies de *Vibrio* y *Aeromonas*, bacterias naturales del medio marino que pueden estar asociados con infecciones en el hombre y se han relacionado con indicadores de contaminación convencional como los coliformes totales y fecales, *C. perfringens*, enterococos y otros patógenos (*Salmonella*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*) en aguas costeras con fines recreativos. Por lo general, las infecciones más frecuentes asociadas con estas aguas causadas por el género *Vibrio* son gastroenteritis, otitis e infecciones en heridas.

Esto es de interés, ya que se obtuvo positividad para los géneros de *Vibrio* (100%) y *Aeromonas* (30.9%) en aguas marinas y aunque estos microorganismos son autóctonos de aguas, se deben considerar en determinadas ocasiones, como patógenos potenciales de posible riesgo para la salud humana.

La especie más frecuentemente detectada dentro del género *Vibrio* fue *V. cholerae* no O1. La amplia distribución de *V. cholerae* no O1 en diferentes tipos

de agua se ha reportado por diversos investigadores (Chowdhury *et al.*, 1992; González, 2002; Huq y Colwell, 1996). Los miembros de esta especie son autóctonos de los ecosistemas acuáticos y su presencia, no necesariamente, está asociada con la contaminación fecal. Ellos pueden sobrevivir en aguas dulces y marinas en su estado viable y cultivable y en condiciones adversas, convertirse en una forma viable pero no cultivable.

Numerosas infecciones humanas asociadas con *Vibrio cholerae* no O1 se han reportado mundialmente. Entre ellas se encuentran gastroenteritis, septicemia, bacteriemia, meningitis, infecciones en heridas y oído, especialmente después del consumo de alimentos marinos crudos o mal cocidos o el contacto con el agua de mar (Fernández *et al.*, 2000; Hlady y Klontz, 1996). De ahí la importancia de considerar su presencia en las aguas estudiadas, principalmente las de aguas de consumo y las recreativas.

Con respecto al género *Aeromonas*, la especie prevalente especialmente en aguas dulces fue *A. hydrophila*. Esto coincide con resultados encontrados anteriormente por otros investigadores (Araujo *et al.*, 1991; González, 2002; Holmes *et al.*, 1996) donde este biotipo aerogénico predominaba en aguas oligotróficas, destacándose también un alto porcentaje de cepas enterotoxigénicas de esta especie en un estudio llevado a cabo en aguas recreativas (González *et al.*, 1992), lo que indica la importancia de considerarlas en determinadas ocasiones como posibles patógenos potenciales. *Aeromonas hydrophila* se ha reportado por otros autores en aguas subterráneas, en especial en aguas mineromedicinales (Mosso *et al.*, 1994) y es de especial interés en la actualidad en las normativas de Canadá en aguas envasadas (Warburton y Austin, 2000), contemplándose dentro de los criterios microbiológicos junto con otros indicadores sanitarios para el monitoreo de los lotes de agua envasada en una industria, desde su captación hasta su procesamiento y comercialización.

Un total de 470 cepas (173 con los medios de filtración de membrana y 297 en los medios de presencia y ausencia y de tubos múltiples) fueron aisladas de los diferentes medios utilizados siendo la especie más frecuente *E. coli* (329 cepas), seguida de *K. pneumoniae* (65 cepas), *K. oxytoca* (26 cepas), *E. aerogenes* (16 cepas), *C. freundii* (8 cepas), *S. liquefaciens* (7 cepas), *E. agglomerans* (6 cepas), *E. cloacae* (5 cepas), *C. diversus* (5 cepas).

Los mayores recobrados de cepas de coliformes, en los medios de agar para filtración de membrana, se detectaron en agar Endo y agar mFC con 74 y 43 cepas respectivamente. En los medios líquidos se obtuvieron mayores aislamientos con el caldo LMX (121 cepas) y ReadyCult coliformes 100 (89 cepas).

Los grupos de indicadores bacterianos de mayor importancia sanitaria en la calidad microbiológica del agua son los coliformes totales y fecales (termotolerantes) y *E. coli*. El grupo coliforme com-

prende a un grupo heterogéneo de bacterias fermentadoras de la lactosa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* cuyos principales géneros son *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Escherichia* (APHA, 1995; Farmer, 1992). Los miembros del grupo coliforme pueden tener su origen fecal o no fecal considerándose *E. coli* presente en la flora intestinal del hombre y animales de sangre caliente y se recomienda como un indicador de la posible presencia de patógenos bacterianos, por ello la importancia y la taxonomía del grupo coliforme en aguas permanecen siempre en estudio (Alonso *et al.* 1999).

Según Leclerc y Moriamez (1980), y Leclerc *et al.* (1981), las especies de coliformes de origen fecal y su frecuencia de aislamiento en heces es la siguiente: *E. coli*, 100%; *C. diversus*, 70%; *C. amalonaticus*, 70%; *C. freundii*, 70%; *K. pneumoniae*, 49%; *K. oxytoca*, 49%; *E. cloacae*, 9%; y *E. aerogenes*, 9%. Las especies que se consideran probablemente de origen no fecal son las siguientes: *K. trevisanii*, *E. agglomerans*, *E. gergoviae*, *E. sakazakii*, *Hafnia alvei*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. marinorubra* y *S. odorifera*.

Además, algunos autores (Caplenas y Kanarek, 1984; Mossel, 1997) plantean, que el término de coliformes fecales debe ser sustituido por coliformes termotolerantes debido a que algunas especies dentro del grupo pueden tener un origen no fecal, por ej. *Klebsiella* reportando que el 15% de *K. pneumoniae* eran termotolerantes. Por otra parte, existen reportes donde se encuentran los géneros *Klebsiella* y *Citrobacter* con alta frecuencia en aguas tropicales (Hazen y Toranzos, 1990) y en este estudio el género *Klebsiella* ocupó el segundo lugar entre las cepas aisladas. Esto coincide con otras investigaciones de caracterización de coliformes fecales en aguas de fuentes de abasto y recreativas realizadas en el INHEM (González *et al.*, 1990; González *et al.*, 1996), donde siempre se encontró *E. coli*, seguido de *K. pneumoniae*, por lo que es recomendable el empleo de técnicas para la determinación del grupo de coliformes termotolerantes.

En conclusión, los medios de cultivo cromogénicos y fluorogénicos empleados en los métodos microbiológicos de aguas, permitieron la determinación de los indicadores bacterianos más utilizados (coliformes totales y fecales, *Escherichia coli*, enterococos), de una forma más rápida y específica, que con los convencionales, obteniéndose mayores recobrados para caldo ReadyCult coliformes 100 y ReadyCult enterococos 100, el primero con resultados excelentes para su empleo en brotes hídricos en aguas de consumo, y el segundo para vigilancia en aguas costeras. También, se encontraron resultados satisfactorios en ambos tipos de agua (marinas y de fuentes de abasto) con caldo LMX para la determinación de coliformes y *E. coli*. Estos medios de cultivo se deben incorporar en el sistema de vigilancia de aguas, principalmente para aguas de

consumo y costeras en episodios de enfermedades de transmisión digestiva o situaciones de emergencia.

Además, se debe destacar que la presencia de *Aeromonas* en ausencia de coliformes fecales, reitera la necesidad de considerar este microorganismo dentro de los criterios microbiológicos a tener en cuenta en determinadas situaciones, especialmente en aguas de consumo tales como, las que procedan de aguas superficiales y que la identificación hasta especie bacteriana, en determinadas ocasiones, enriquece la valoración del resultado en las aguas a investigar, especialmente en las asociadas a brotes de enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alonso JL, Amorós I, Alonso MA. Differential susceptibility of aeromonads and coliforms to cef-sulodin. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:1885-8.
2. Alonso JL, Soriano A, Carbajo O, Amorós I, Garelick H. Comparison and recovery of *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms in water with a chromogenic medium incubated at 41 and 44.5°C. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:3746-49.
3. American Public Health Association. Microbiological examination of water. En: *Standards Methods for the examination of water and wastewater*. 19 ed. 1995; Washington: APHA, AWWA, JWPCF.
4. Amorós I, Alonso JL. Determination of enterococci in fresh water with chromogenic medium. En memorias del International Symposium on Health Related Water Microbiology, Mallorca, 6-10 Octubre 1996.
5. Araujo RM, Arribas RM, Parés R. Distribution of *Aeromonas* species in waters with different levels of pollution. *J Appl Bacteriol* 1991;71:182-6.
6. Barcina I, Lebaron P, Vives-Rego J. Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach. *FEMS Microbiol Ecol* 1997;23:1-9.
7. Caplenas NR, Kanarek MS. Thermotolerant non-fecal source *Klebsiella pneumoniae*: validity of the fecal coliform test in recreational waters. *Am J Publ Health* 1984;74:1273-5.
8. Caruso G, Zaccone R, Crisafi E, Monticelli L. Rapid detection of *Escherichia coli* in coastal waters by use of the fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide: preliminary results. *Rapp Comm int Mer Médit* 1998;35:342-3.
9. Carnahan AM, Behram S, Joseph SW. Aerokey II: A flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *J Clin Microbiol* 1991;29:2843-9.
10. Chowdhury MAR, Shinichi M, Yamanaka H, Shinoda S. Ecology and distribution of toxigenic *Vibrio cholerae* in aquatic environments of temperate region. *Microbios* 1992;72:203-13.
11. Davies CM, Apta SC, Peterson SM. Possible interference of lactose-fermenting marine vibrios in coliforms β-D-galactosidase assays. *J Appl Bacteriol* 1995;78:387-93.
12. Farmer JJ III. *Enterobacteriaceae*: Introduction and Identification. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 1992; 438-49, Washington, DC:ASM Press.
13. Fernández JM, Serrano M, DeArriba JJ, Sánchez MV, Escribano E, Ferreras P. Bacteremic cellulitis caused by non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae*: report of a case in a patient with hemachromatosis. *Diag Microbiol Infect Dis* 2000;37:77-80.
14. Furuwatari C, Kawakami Y, Akahane T, Hidaka E, Okimura Y, Nakayama J, Furihata K, Katsuyama T. Proposal for Aeroscheme (modified Aerokey II) for the identification of clinical *Aeromonas* species. *Med Sci Res* 1994;22:617-9.
15. Fujisawa T, Aikawa K, Tabahashi T, Yamai S. Influence of sodium chloride on the β-glucuronidase activity of *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol* 2000;31:255-58.
16. Geissler K, Manafi M, Amorós I, Alonso JL. Quantitative determination of total coliforms and *Escherichia coli* in marine waters with chromogenic and fluorogenic media. *J Appl Microbiol* 2000;88:280-5.
17. Geldreich EE. Pathogenic agents in freshwater resources. *Hydrol Process* 1996;10:315-33.
18. George I, Petit M, Servais P. Use of enzymatic methods for rapid enumeration of coliforms in freshwaters. *J Appl Microbiol* 2000;88:400-13.
19. George I, Petit M, Theate C, Servais P. Use of rapid enzymatic assays to study the distribution of faecal coliforms in the Seine river (France). *Wat Sci Tech* 2001;43:77-80.
20. González MI. Aislamiento de *Vibrio cholerae* y especies asociadas en aguas. Tesis Doctoral para optar por el grado de Doctor en Ciencias de la Salud. INHEM, Ciudad de la Habana, 2002.
21. González MI, Junco R, Valdés M, Domínguez I. Aislamiento de *Aeromonas* sp. y determinación de su enterotoxigenicidad en aguas recreativas. *Bol Epidemiol INHEM* 16 (1-6), 1992.
22. González MI, Torres T, Nolasco T. Relación entre indicadores bacteriológicos y aislamiento de *Salmonella* spp. en aguas de fuentes de abastecimiento de la Ciudad de la Habana. *Acta Microbiológica Chilena* 1993;4:91-2.
23. González MI, Torres T, Nolasco T. Bacterias enteropatógenas e indicadores de contaminación en aguas recreativas para campismo. En: *Salmonella en el ambiente*, 1996; *Serie Salud Ambiental No4*. INHEM, ECIMED, México.
24. González MI, Valdés M, Domínguez I. Coliformes fecales caracterizados y sus biotipos en

- fuentes de abastecimiento de aguas de Ciudad de la Habana. *Bol Epidemiol INHEM* 1990;14:7-12.
25. Hazen T, Toranzos G. Tropical source water. En: McFeters GA, eds. *Drinking Water Microbiology. Progress and Recent Developments*. New York:Springer Verlag 1990;33-53.
 26. Hlady WG, Klontz KC. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. *J Infect Dis* 1996;173:1176-83.
 27. Holmes P, Niccolls LM, Sartory DP. The ecology of mesophilic *Aeromonas* in the aquatic environment. En: Austin B, Altwegg M, Gosling PJ, Joseph S, eds. *The genus Aeromonas*. England: John Wiley & Sons Ltd. 1996;127-49.
 28. Huq A, Colwell RR. Vibrios in the marine and estuarine environment: tracking *Vibrio cholerae*. *Ecosystem Health* 1996;2:198-214.
 29. Kelly MT, Hickman-Brenner FW, Farmer III JJ. *Vibrio*. En: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 5ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 1991;384-95.
 30. Leclerc L, Gavini D, Oger C. Les indicateurs bacteriens dans controle bacteriologique de l'eau: exigences et limites. *J Fr Hydrol* 1981;12:213-28.
 31. Leclerc L, Moriametz JC. Etude quantitative de la flore fécale de l'adulte et du nourrisson alimenté artificiellement. *Pathol Biol* 1980;28:217-26.
 32. Manafi M, Kneifel W. A combined-fluorogenic medium for the simultaneous detection of total coliforms and *E. coli* in waters. *Zbl Hyg Umweltmed* 1989;189:225-34.
 33. Manafi M, Kneifel W, Bascomb S. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnosis. *Microbial Rev* 1991;55:335-48.
 34. Merck. *Microbiology Manual* 2000. Alemania; Merck, 1996.
 35. Mossel DAA. Request for opinions on abolishing the term "fecal coliforms". *ASM News* 1997;63:175.
 36. Mosso MA, de la Rosa MC, Vivar C, Medina MR. Heterotrophic bacterial populations in the mineral waters of thermal springs in Spain. *J Appl Bacteriol* 1994;77:370-81.
 37. Organización Panamericana de la Salud. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*. Washington, DC: CDC/NCID-OPS, 1994.
 38. Pommepuy M, Fiksdal L, Gourmelon M, Melikechi H, Caprais MP, Cormier M, Colwell RR. Effect of seawater on *Escherichia coli* β -D galactosidase activity. *J Appl Bacteriol* 1996;81:174-80.
 39. Standing Committee of Analysts. *The Microbiology of Water* 1994. Part 1-Drinking Water. Report on Public Health and Medical Subjects No71, London, HSMO, 1996. (Methods for the Examination of Water and Associated Materials).
 40. Sisti M, Albano A, Brandi G. Bactericidal effect of chlorine on motile *Aeromonas* spp. In drinking water supplies and influence of temperature on disinfection efficacy. *Lett Appl Microbiol* 1998;26:347-51.
 41. Warburton DW. A review of the microbiological quality of bottled water sold in Canada. Part 2. The need for more stringent standards and regulations. *Can J Microbiol* 1993;39:158-68.
 42. Warburton DW. The microbiological safety of bottled waters. En: Farber JM, Todd ECD, eds. *Safe Handling of Foods*. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000;479-518.