

Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura

Jeny Adina Larrea-Murrell, Marcia María Rojas-Badía, Beatriz Romeu-Álvarez, Nidia Mercedes Rojas-Hernández y Mayra Heydrich-Pérez.

Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 25 No. 455 entre calles J e I Vedado, La Habana, Cuba. mayra@fbio.uh.cu, marcia@fbio.uh.cu

Recibido: 11 de mayo del 2012

Aceptado: 4 de junio del 2012

Palabras clave: indicadores, contaminación fecal, calidad del agua, filtración por membrana, *E. coli*.

Key words: indicators, fecal contamination, water quality, membrane filtration, *E. coli*.

RESUMEN: El aumento del uso del agua para diferentes fines y el crecimiento de la población a nivel mundial han contribuido al incremento de los niveles de contaminación de los sistemas acuáticos. La contaminación de estos ecosistemas es una problemática que se presenta en la actualidad, debido al constante vertimiento de desechos domésticos e industriales que constituyen una fuente de deterioro del medio ambiente. El control de la calidad microbiológica del agua de consumo y de vertido, requiere de análisis dirigidos a determinar la presencia de microorganismos patógenos. La alternativa para realizar un control fiable, económico y rápido de la calidad microbiológica del agua es el uso de indicadores de contaminación fecal. Entre los indicadores de contaminación fecal más utilizados se encuentran los coliformes totales y termotolerantes, *Escherichia coli* y enterococos. Las bacterias indicadoras permiten realizar la clasificación sanitaria de las aguas para diferentes usos, la determinación de criterios para las normas de calidad, la identificación de contaminantes, el control de procesos de tratamiento de agua y estudios epidemiológicos, etc. El presente trabajo aborda los principales aspectos que han sido reportados acerca de la utilidad de las bacterias indicadoras en la evaluación de la calidad del agua. Se exponen estudios que demuestran la factibilidad del uso de *E. coli* y enterococos como indicadores de contaminación fecal para la evaluación de la calidad de agua y las técnicas utilizadas para su detección, así como el uso de la relación *E. coli*/enterococos para determinar el origen de la contaminación. Además, se aborda brevemente la situación actual en Cuba con respecto a este tema.

ABSTRACT: The increasing use of water for different purposes and worldwide population growth has contributed to increase levels of pollution of aquatic systems. Currently, the contamination of these ecosystems is a problem, due to the constant dumping of domestic and industrial wastes as a constant source of environmental pollution. Control of the microbiological quality of fresh water and discharge requires targeted analysis to determine the presence of pathogenic microorganisms. The alternative for a reliable, economical and rapid microbiological water quality is the use of indicators of fecal contamination. Among the fecal pollution indicators used are total and thermotolerant coliforms, *Escherichia coli* and enterococci. Unlike pathogenic bacteria, indicator bacteria allows the sanitary classification of water for different uses, the determination of criteria and compliance of quality standards, the identification of contaminant discharges, the control of processes of water treatment, and epidemiological studies among others. This paper focuses on the main issues addressed in literature regarding the utility of fecal indicator bacteria in the assessment of water quality. Studies which demonstrate the feasibility of using *E. coli* and enterococci as indicators of fecal contamination for evaluation of water quality and the techniques used for their detection are presented, as well as the use of the rate *E. coli*/ enterococci just to determine the source of contamination. Moreover, it is briefly discussed the current situation in Cuba regarding this subject.

INTRODUCCIÓN

La contaminación de los cuerpos naturales de agua es una problemática que se presenta en la actualidad, principalmente en los países en vías de desarrollo, debido a que los desechos domésticos e industriales se vierten a estos ecosistemas acuáticos sin tratamiento previo o pobremente tratados y por lo que constituyen una fuente constante de deterioro del medio ambiente.¹⁻³

Para determinar la calidad microbiológica de los ecosistemas acuáticos, se utilizan las bacterias indicadoras de contaminación fecal. Entre las más utilizadas se encuentran los coliformes totales y termotolerantes, aunque la abundancia de *Escherichia coli* se ha asociado más al riesgo sanitario en comparación con el resto de los coliformes⁴⁻⁶. El empleo de estas bacterias para la evaluación de la calidad del agua ha sido aceptado ampliamente en países de clima templado.^{7,8} Los indicadores fecales tales como *Escherichia coli* mueren en aguas templadas, debido a factores como la temperatura, la disponibilidad de nutrientes y la depredación por protozoos. Sin embargo, en aguas tropicales numerosos estudios han mostrado resultados cuestionables en cuanto a la factibilidad de utilizar estos microorganismos para el monitoreo de la calidad de las aguas.^{9,10}

Las condiciones de temperatura, radiación solar, elevadas concentraciones de nutrientes y la gran diversidad de la comunidad microbiana hace que el ambiente en los trópicos sea diferente comparado con los de regiones templadas,¹¹ por lo que se sospecha que los indicadores fecales clásicos proliferan en aguas tropicales y que son detectados a niveles que no reflejan la extensión original de la contaminación fecal,^{12,13} o aún peor, se vuelven autóctonos de estos ecosistemas acuáticos pudiendo ser aislados en ausencia de una fuente fecal conocida.¹²

El presente trabajo aborda los principales aspectos reportados relacionados con la utilidad de las bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas.

CALIDAD DE LAS AGUAS

La calidad biológica de las aguas es un modo de definir la riqueza biológica y el valor ambiental de las comunidades de seres vivos asociados al ecosistema de un curso fluvial, o de un tramo concreto de él.¹⁴

Todos los seres vivos necesitan agua para su supervivencia, con una adecuada calidad. Entre los contaminantes naturales del agua se encuentran virus, bacterias y otras formas de vida; especies minerales disueltas; productos orgánicos solubles y sólidos orgánicos e inorgánicos suspendidos. La concentración de estos contaminantes naturales puede incrementarse o aún ser suplida por otros materiales producto de la tecnología industrial o agrícola. Con el fin de asegurar y preservar la calidad del agua en los sistemas de abastecimiento hasta la entrega al consumidor, la misma debe ser sometida a tratamientos de potabilización.¹⁴ Un alto riesgo de contaminación representa el agua potable que contenga material fecal.^{15,16}

Uno de los problemas sanitarios más críticos en los países de América Latina y el Caribe es la descarga incontrolada de aguas residuales domésticas sin tratamiento, las cuales contaminan los recursos hídricos superficiales, subterráneos y las zonas costeras. La eliminación inadecuada de excretas, dada por la ausencia o el deficiente sistema de alcantarillado y tratamiento, están asociados a la contaminación del agua y causa numerosas enfermedades, tales como el cólera, la amebiasis, la hepatitis, la fiebre tifoidea y paratifoidea, entre otras.¹⁷ La epidemia del cólera y los brotes causados por microorganismos patógenos como *Cryptosporidium*, cuya vía fundamental de transmisión es el agua, han originado una alerta en diferentes países para tratar de prevenir estos eventos que han provocado una marcada morbilidad y mortalidad en la población mundial.⁹

Indicadores de contaminación fecal

El control de la calidad sanitaria de los recursos del ambiente puede llevarse a cabo mediante la enumeración de bacterias indicadoras de contaminación fecal. Estas bacterias pueden ser utilizadas para valorar la calidad de los alimentos, sedimentos y aguas destinadas al consumo humano, la agricultura, la industria y la recreación. No existe un indicador universal, por lo que se debe seleccionar el más apropiado para la situación específica en estudio.¹⁸⁻²⁰

Los indicadores de contaminación fecal más utilizados son los coliformes totales y termotolerantes, *Escherichia coli* y enterococos.²¹ De acuerdo con González *et al.*,²² y Méndez *et al.*,²³ existen numerosas limitaciones asociadas con la aplicación de estas bacterias como indicadores, como es su escasa supervivencia en cuerpos de agua y fuentes no fecales, su habilidad para multiplicarse después de su liberación en una columna de agua y debilidad frente a los procesos de desinfección, entre otras. Por esta razón, se han utilizado como indicadores alternativos las bacterias anaerobias fecales (*Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium perfringens*), virus (colifagos) y componentes orgánicos fecales (coprostanol).²⁴⁻²⁶

Los microorganismos indicadores son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos en cuanto a concentración en las aguas y reacción frente a factores ambientales, pero son más fáciles, rápidos y económicos de identificar.²³ Una vez que se ha demostrado la presencia de estos grupos indicadores, se puede inferir que microorganismos patógenos se encuentran presentes y su comportamiento frente a diferentes factores como pH, temperatura, presencia de nutrientes y tiempo de retención hídrica.^{27,28}

Del Pilar *et al.*²⁷ y Boehm y Soller²⁹ refieren que un microorganismo indicador de contaminación fecal debe cumplir algunos requisitos para ser considerado como un buen indicador: debe ser un constituyente normal de la microbiota intestinal de individuos sanos, estar presente de forma exclusiva en las heces de animales homeotermos y cuando los microorganismos patógenos intestinales lo están, presentarse en número elevado, lo que facilita su aislamiento e identificación, debe ser incapaz de reproducirse fuera del tracto gastrointestinal del ser humano y de los animales homeotermos, su tiempo de supervivencia debe ser igual o superior al de las bacterias patógenas, su resistencia a los factores ambientales debe ser igual o superior al de los patógenos de origen fecal, debe ser fácil de aislar y cuantificar.

Bacterias coliformes como indicadores de contaminación fecal

El grupo de microorganismos coliformes es adecuado como indicador de contaminación fecal debido a que estos forman parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal, tanto del ser humano como de los animales homeotermos y están presentes en grandes cantidades en él. Los microorganismos coliformes constituyen un grupo heterogéneo de amplia diversidad en términos de género y especie. Todos los coliformes pertenecen a la familia Enterobacteriaceae.^{25,30}

Coliformes totales

Los coliformes totales se definen como bacterias Gram negativas en forma bacilar que fermentan la lactosa a temperatura de 35 a 37 °C y producen ácido y gas (CO₂) en 24 h, aerobias o anaerobias facultativas, son oxidasa negativa, no forman esporas y presentan actividad enzimática β-galactosidasa. Entre ellas se encuentran *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*.³¹

La prueba más relevante utilizada para la determinación de coliformes, es la hidrólisis de la lactosa. El rompimiento de este disacárido es catalizado por la enzima β-D-galactosidasa. Para la determinación de la β-D-galactosidasa se utilizan medios cromogénicos tales como el Agar Chromocult para coliformes.³¹

Actualmente, no se recomienda para la evaluación de la calidad de las aguas debido a que muchos de sus miembros pueden encontrarse de forma natural en aguas, suelos o vegetación.³²

Coliformes termotolerantes

Los coliformes termotolerantes (CTE), denominados así porque soportan temperaturas hasta de 45 °C, comprenden un número muy reducido de microorganismos, los cuales son indicadores de calidad por su origen. En su mayoría están representados por *E. coli*, pero se pueden encontrar de forma menos frecuente las especies *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae*. Estas últimas forman parte de los coliformes termotolerantes, pero su origen normalmente es ambiental (fuentes de agua, vegetación y suelos) y solo ocasionalmente forman parte de la microbiota normal.^{25,33} Por esto algunos autores plantean que el término de coliformes fecales, comúnmente utilizado, debe ser sustituido por coliformes termotolerantes.^{34,35}

Los coliformes termotolerantes integran el grupo de los coliformes totales, pero se diferencian de estos últimos, en que son indol positivo, su intervalo de temperatura óptima de crecimiento es muy amplio (hasta 45 °C) y son mejores indicadores de higiene en alimentos y agua. La presencia de estos microorganismos indica la existencia de contaminación fecal de origen humano o animal, ya que las heces contienen coliformes termotolerantes que están presentes en la microbiota intestinal, siendo *E. coli* la más representativa, con un 90-100 %.³¹

Escherichia coli

Escherichia coli es miembro de la familia Enterobacteriaceae. Es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa que forma parte de la microbiota normal del intestino del ser humano y los animales homeotermos, siendo la más abundante de las bacterias anaerobias facultativas intestinales. Se excreta diariamente con las heces (entre 10⁸-10⁹ Unidades Formadoras de Colonias (UFC).g⁻¹ de heces) y por sus características, es uno de los indicadores de contaminación fecal más utilizados últimamente.³⁶

Carrillo y Lozano³¹ señalan que es la única especie dentro de las enterobacterias que posee la enzima β-D-glucuronidasa (GUD), que degrada el sustrato 4-metilumbeliferil-β-D-glucurónico (MUG), formando 4-metilumbeliferona. Por otra parte, Carrillo y Lozano³¹ refieren que son bacilos capaces de producir indol a partir de triptófano, en 21 ± 3h a 44 ± 0.5 °C. Poseen la enzima β-D-galactosidasa (GAL), que reacciona positivamente en el ensayo del rojo de metilo y pueden descarboxilar el ácido L-glutámico, pero no son capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono o de crecer en un caldo con cianuro de potasio.

Sobrevivencia de *E. coli* fuera de hospedantes animales

E. coli reside en la parte baja del intestino de los seres humanos y animales homeotermos, un ambiente que provee un vasto suplemento de nutrientes para el crecimiento bacteriano.³⁷ El tiempo de supervivencia de *E. coli* en su hábitat primario se ha estimado en dos días.³⁸ Se ha sugerido que la mitad de la población de *E. coli* reside en el hábitat primario del hospedante y la otra mitad en el ambiente externo (hábitat secundario).³⁹ De acuerdo

con esto, *Escherichia coli* crece y se divide en su hábitat primario, pero tiene una proporción neta negativa de crecimiento en el hábitat secundario, con una supervivencia de aproximadamente un día en agua,³⁹ 1,5 d en sedimentos⁴⁰ y tres días en el suelo.⁴¹ Estos estimados implican que *E. coli* no vive en ambientes inertes, pero que el continuo volumen transferido de fuentes humanas y animales mantienen una estable población fuera del hospedante animal.³⁸

Las poblaciones de *E. coli* encontradas en el hábitat secundario son aparentemente mantenidas por el constante arribo de microorganismos del hábitat primario.³⁸

La falta de nutrientes y las condiciones ecológicas severas en ambientes templados evitan que *E. coli* pueda sostener una división celular de la población fuera del hospedante animal. Este modelo implica que *E. coli* no vive fuera de organismos hospedantes y que su presencia en tales sitios resulta de la excreción de desechos por hospedantes animales. Esta es la lógica del empleo de *E. coli* como un microorganismo indicador para la contaminación fecal ambiental.⁴²

Sin embargo, en los trópicos se plantea que las condiciones ambientales de elevadas temperaturas y grandes concentraciones de nutrientes en los ecosistemas acuáticos, favorecen la proliferación de *E. coli*. Por ejemplo en aguas de Nigeria,⁴³ Hawaii,⁴⁴ Nueva Guinea,⁴⁵ Puerto Rico,^{46,47} Sierra Leona,⁴⁸ y la Costa de Marfil,⁴⁹ se han encontrado marcadas concentraciones de *E. coli*, en ausencia de fuentes fecales conocidas. En contraste con este planteamiento, Byamukama *et al.*⁷ encontraron que *E. coli* era el mejor indicador de contaminación fecal en los ambientes estudiados de Uganda, país tropical africano. Estos autores informaron que esta bacteria no se encontró con frecuencia en agua y en suelos, lo cual sugiere que no es un miembro autóctono de los ecosistemas estudiados. Esto se corresponde con estudios previos realizados en Uganda y en Sierra Leona.

En estudios realizados en el laboratorio de los autores en las aguas del Complejo Turístico Las Terrazas, ubicado en áreas forestales de la Sierra del Rosario en Cuba, se informó que los niveles de concentración de *E. coli* encontrados en estas aguas eran muy bajos, por lo que *E. coli* no constituye un miembro de la microbiota de estos ecosistemas acuáticos y su presencia es muestra del aporte de materia fecal, posiblemente por animales de vida salvaje.³⁶

Enterococos

Inicialmente, los enterococos pertenecían al género *Streptococcus* grupo D de Lancefield. En 1970, fueron oficialmente clasificados por Kalina como un género independiente, la división de los géneros se basó en estudios taxonómicos y moleculares.^{50,51}

Los enterococos son células esféricas u ovoides, de tamaño 0,6 - 2,0 μm de ancho por 0,6 - 2,5 μm de largo. Se presentan en forma de pares o de cadenas cortas. Son cocos Gram positivos, no formadores de endosporas y no móviles. Son microorganismos anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, con metabolismo fermentativo. Su crecimiento óptimo es a 37 °C. Tienen la habilidad de crecer en presencia de 6,5 % de NaCl, a 10 y 45 °C y pH 9,6. Son capaces de hidrolizar la esculina en presencia de 40 % de bilis y poseen la enzima pirrolidoniil arilamidasa.⁵⁰ Las colonias en los medios agarizados, generalmente se presentan incoloras a grises, y tienen de 2 a 3 mm de diámetro a los dos días de incubación.⁵¹ Según Porte *et al.*,⁵² pueden presentar hemólisis de tipo α , β o pueden ser no hemolíticos, en tanto Díaz *et al.*⁵¹ plantean que una misma cepa puede variar en sus propiedades hemolíticas en dependencia del animal del que provenga la sangre empleada en el medio de cultivo.

Los enterococos forman parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal humano y del tracto genital de la mujer. Las especies más frecuentes en los aislamientos clínicos (90 %) son *E. faecalis* y *E. faecium*.⁵² Otras especies como *E. gallinarum*, *E. raffinosus*, *E. casseliflavus* y *E. avium* se aíslan en menor proporción.⁵⁰ Sin embargo, Díaz *et al.*⁵¹ y Köhler⁵³ indicaron que *E. faecalis* es la especie más abundante en el tracto gastrointestinal de los humanos, lo cual podría explicar su prevalencia en los aislamientos clínicos, además de su virulencia incrementada.

Por otro lado, los enterococos también pueden estar presentes en suelo, alimentos, agua, plantas, animales e insectos⁵³ y suelen considerarse buenos indicadores de contaminación fecal debido a que son muy resistentes a condiciones adversas como la congelación y la desecación.^{51,54}

El uso de *Enterococcus* como un indicador de contaminación fecal de aguas con fines recreativos fue recomendado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, de las siglas en inglés) en 1986.⁵⁵ Al respecto, Vergaray *et al.*⁵⁶ consideran al género *Enterococcus* como el indicador bacteriológico más eficiente para evaluar la calidad de agua de mar para uso recreativo, debido a que es muy resistente a las condiciones salinas de este medio y además, está relacionado directamente con gastroenteritis, enfermedades respiratorias, conjuntivitis y dermatitis, entre otras. Según Díaz *et al.*⁵¹ la presencia de *E. faecalis* y *E. faecium* es usada frecuentemente para indicar contaminación de origen fecal, *E. faecalis* es considerado como un indicador de contaminación fecal de fuentes humanas, mientras que *E. faecium* y otras especies indican contaminación de otras fuentes.

En el caso de las especies de *E. bovis* y *E. equinus* son utilizadas como indicadoras de contaminación producida por animales de granja. Estas especies mueren rápidamente en el medio exterior, por tanto, su detección indica contaminación reciente.⁵¹

MÉTODOS CLÁSICOS EMPLEADOS EN LA IDENTIFICACIÓN Y ENUMERACIÓN DE COLIFORMES

Técnica de fermentación en tubos múltiples

La técnica de fermentación en tubos múltiples (FTM) para enumerar coliformes se ha usado durante alrededor de 80 años como método de monitoreo de la calidad del agua. El método consiste en inocular una serie de tubos con diluciones decimales de la muestra de agua. La producción de gas, formación de ácido o abundante crecimiento en los tubos después de 48 h de incubación a 35 °C constituyen resultados presumiblemente positivos.⁵⁷ Todos los tubos con reacción presumiblemente positiva son inmediatamente sometidos a pruebas de confirmación. La formación de gas en caldo lactosado bilis verde brillante en los tubos de fermentación tras 48 h de incubación a 35 °C constituye una prueba de confirmación positiva.⁵⁸ La prueba de coliformes fecales usando medio *Escherichia coli* (EC), puede aplicarse para determinar coliformes totales y fecales,⁵⁹ la producción de gas después de 48 h de incubación a 44,5 °C en caldo EC se considera un resultado positivo.

Los resultados de la técnica FTM se expresan en términos del número más probable (NMP) de microorganismos presentes. Este número se estima estadísticamente del número medio de coliformes en la muestra. Como consecuencia de lo anterior, esta técnica ofrece una enumeración semicuantitativa de coliformes y la precisión de la estimación es bastante baja y depende del número de tubos usados para el análisis.⁵⁸

Esta técnica carece de precisión en términos cualitativos y cuantitativos y el tiempo requerido para obtener los resultados es mayor que el necesario cuando se utiliza la técnica de filtración por membrana (FM), la cual ha reemplazado en muchos casos a la técnica de FTM debido a la sistematicidad de los exámenes de agua potable. Sin embargo, la FTM resulta muy útil cuando se analizan muestras muy turbias o coloreadas en las cuales no es posible utilizar la filtración por membrana.⁵⁸

Técnica de filtración por membrana

La FM está completamente aceptada y aprobada como procedimiento para el monitoreo de la calidad del agua en muchos países. Este método consiste en la filtración de la muestra de agua a través de una membrana estéril con un poro de diámetro igual a 0,45 µm, el cual retiene las bacterias. Esta membrana se incuba sobre la superficie de un medio selectivo y posteriormente, se enumeran las colonias típicas crecidas sobre la membrana.⁵⁸

Los medios de cultivo más utilizados para el análisis de agua potable son el medio m-Endo-Type en América del Norte⁵⁷ y el medio Tergitol-TTC en Europa.⁶⁰ Las bacterias coliformes forman colonias rojas con brillo metálico en medio Endo-Type que contiene lactosa (incubación 24 h a 35 °C para coliformes totales) o colonias amarillo-naranjas en medio Tergitol-TTC (incubación 24 y 48 h a 37 y 44 °C para coliformes totales y termotolerantes respectivamente). Otros medios muy utilizados son el agar McConkey y el medio Teepol. Comparaciones entre diferentes medios han mostrado que el agar m-Endo produce mayores conteos que el agar McConkey o el Teepol.⁶¹

La preocupación predominante acerca del empleo de esta técnica es lo difícil que se hace recuperar coliformes dañados o estresados. Una serie de factores físicos y químicos involucrados en el tratamiento del agua, pueden causar daños subletales a las bacterias coliformes, que dan como resultado un daño celular que provoca la incapacidad de las células para formar colonias en un medio selectivo.⁵⁸ Sin embargo, este método presenta una significativa ventaja en comparación con la FTM, debido a su facilidad para examinar grandes volúmenes de muestras con mayor sensibilidad y confiabilidad. Además, esta técnica es útil para la mayoría de los laboratorios relacionados con la calidad de las aguas y es un método relativamente fácil de usar; sin embargo, no es lo suficientemente específico y son necesarios pasos adicionales para la confirmación de los resultados.

La nueva generación de medios de cultivo usa a la β-D-glucuronidasa (GUD) como indicador para *E. coli*. La GUD está presente en el 94 al 96 % de las cepas de esta especie. La prueba de la GUD se utiliza para la detección de *E. coli* en aguas y alimentos.⁶²

La actividad de la GUD se mide mediante el uso de diferentes sustratos cromogénicos y fluorogénicos como el p nitrofenol-β-D-glucurónido (PNPG), o el 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónido (X-GLUC) y el 4-metilumbeliferil-β-D-glucurónido (MUG).^{62,63}

En la actualidad, se han desarrollado medios comerciales que permiten la detección rápida y simultánea de *E. coli* y coliformes totales en agua, los cuales emplean sustratos cromogénicos o fluorogénicos, y se han descrito diversas aplicaciones de estos sustratos en la identificación de microorganismos.⁶⁴ Dentro de estos medios de cultivo pueden ser citados los medios Agar Fluorocult ECD, Agar Chromocult y el Rapid *E. coli* 2.

En Agar Fluorocult ECD, las colonias de *E.coli* se consideran positivas cuando fluorescen de color azul después de incubar a 44 °C durante 24 h. Esta fluorescencia se debe a la ruptura del sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferona-β-D-glucuronido MUG por la enzima β-D-glucuronidasa, lo cual produce 4-metilumbeliferona, la que fluoresce bajo una longitud de onda de luz UV de 360 nm.

En el medio Agar Chromocult, después de un período de incubación de 24 h a 37 °C, las colonias azul-violetas se consideran posibles *E. coli*. Esta coloración resulta de la ruptura del sustrato X-GLUC por la enzima GUD. En el medio Rapid *E coli* 2 aquellas colonias de color púrpura son el resultado de la hidrólisis del sustrato SalmónGlu por la misma enzima, tras una incubación de 24 h a 44 °C.⁶²

La adición de sustratos fluorogénicos y cromogénicos a los medios de cultivo, ya sean sólidos o líquidos para detectar la actividad enzimática de coliformes totales y *E. coli* proporciona una mayor sensibilidad y rapidez en la estimación de la contaminación microbiana en agua potable respecto a los métodos clásicos, pero aún no resuelve satisfactoriamente la problemática de la detección de coliformes viables pero no cultivables.

PROPORCIÓN *E. COLI*/COLIFORMES TERMOTOLERANTES EN AMBIENTES ACUÁTICOS

En la década del 60 del siglo xx el grupo de bacterias coliformes termotolerantes fue seleccionado como el mejor indicador, debido a que estaba mejor asociado con las fuentes de origen fecal.^{36,65} *Escherichia coli* representa un subgrupo dentro de los coliformes termotolerantes.

La USEPA propuso establecer como base de calidad de agua un nuevo criterio para *E. coli* (63 % de la concentración de los coliformes termotolerantes) para proveer niveles equivalentes de protección para patógenos presentes en las aguas.⁶⁶ Al respecto en estudios realizados por los autores en las aguas del Complejo Turístico Las Terrazas, Pinar del Río Cuba, se encontraron bajas concentraciones de este indicador al determinar la relación *E. coli*/CTE, (0,46) lo que significa que el 46 % de los coliformes termotolerantes pertenecían a la especie *E. coli* (Tabla 1). Esta relación ratifica el buen estado de estos ecosistemas.³⁶

Tabla 1. Estudios donde se determina la relación *Escherichia coli*/Coliformes termotolerantes en agua dulce

Localización del estudio	Relación EC/CTE	Medio de cultivo empleado	Técnica	Referencia
USEPA, Estados Unidos	0,63	m-TEC ^a	Filtración membrana ^a	por USEPA, 2002 ⁶⁶
Las Terrazas, Pinar del Río, Cuba	0,46	Agar Chromocult ^b y Agar Lactosa Tergitol con TTC ^c	Filtración membrana ^a	por Larrea <i>et al.</i> , 2009 ³⁶
Río Almendares, Cuba	0,75	Agar Chromocult ^b y Agar Lactosa Tergitol con TTC ^c	Filtración membrana ^a	por Prats <i>et al.</i> , 2006 ⁶⁷
Río Sena, Francia	0,77	Detección β-D-glucuronidasa ^b y Agar Lactosa Tergitol con TTC ^c	Número probable microplacas ^b y filtración membrana ^c	más en García-Armisen <i>et al.</i> , 2007 ⁶⁸ y por
Ríos de Sao Paulo, Brasil	0,84	EC-MUG ^b y m-FC ^c	Filtración membrana ^a	por Hachich <i>et al.</i> , 2012 ⁶⁹

^a Conteo de *E. coli* y coliformes termotolerantes. ^b Conteo de *E. coli*. ^c Conteo de coliformes termotolerantes.

Sin embargo, otros autores en estudios realizados en aguas de ríos contaminados han hallado un elevado grado de relación entre los conteos de *E. coli* y de coliformes termotolerantes (Tabla 1). Asimismo, Hamilton *et al.*⁷⁰ publicaron un artículo que incluye datos de estudios en los que se ha comparado la relación *E. coli*/CTE y en ella aparece una gran variabilidad de estas relaciones. Estos autores también publicaron que una relación por encima de 0,63 ha sido observada por numerosos investigadores en muchos ecosistemas acuáticos diferentes, los cuales incluyen: lagos, playas, ríos, estuarios, aguas albañales tratadas y aguas residuales sin tratamiento alguno.

Estas diferencias en los valores de relación *E. coli*/CTE, pueden estar dadas porque esta relación depende del sitio de estudio y además de los métodos que se apliquen para enumerar estos dos indicadores.⁷⁰

Con respecto al sitio de estudio, Vernberg *et al.*⁷¹ en una investigación realizada en la costa de Carolina del Sur, en una zona muy urbanizada y otra forestal, encontraron valores elevados en las proporciones *E. coli*/coliformes termotolerantes en la zona altamente urbanizada y una proporción mucho menor en la segunda zona evidenciando de esta manera que la microdiversidad de bacterias coliformes era mayor en la zona situada en el

área forestal donde existía un mayor número de bacterias de origen no fecal. Además estos autores relacionaron la marcada incidencia de *E. coli* y la baja microdiversidad con los efectos de la urbanización.

En cuanto a los métodos aplicados para la enumeración de *E. coli* y de coliformes termotolerantes, Noble *et al.*⁷² obtuvieron en un estudio realizado en aguas costeras un promedio *E. coli*/CTE de 0,88, en el cual *E. coli* se enumeró mediante el empleo del método del NMP, basado en la detección de la actividad enzimática de la enzima β-D-glucuronidasa. Sin embargo, esta relación fue igual a uno cuando los coliformes termotolerantes se enumeraron por el método de filtración por membrana y fue igual a 0,5 cuando se utilizó el método de fermentación en tubos múltiples; o sea que el procedimiento que se emplee para el conteo de ambos indicadores influye en el valor de la relación de *E.coli*/CTE.

RELACIÓN *E. COLI*/ENTEROCOCOS EN LOS AMBIENTES ACUÁTICOS ESTUDIADOS

Desde que el género *Enterococcus* fue recomendado en 1986 por la USEPA como indicador de contaminación fecal, han sido reportados escasos trabajos que abordan la relación entre este indicador y *E. coli* en diferentes ecosistemas.

Según Herrera y Suárez⁷³ los coliformes termotolerantes y los enterococos son los indicadores más apropiados para determinar la presencia de contaminación de origen fecal en los cuerpos de agua. Sin embargo, en agua de mar los enterococos tienden a sobrevivir por más tiempo que los coliformes termotolerantes debido a que son los que mejor soportan las condiciones salinas de este medio. Al respecto, Noble *et al.*⁷⁴ han estimado que la supervivencia de *E. coli* en agua marina es de aproximadamente 0,8 d, mientras que los enterococos es de 2,4 d.

El empleo de la relación *E. coli*/Enterococos (EC/E) puede ser de gran utilidad para la determinación del origen humano o animal de la contaminación fecal. Se ha sugerido que las cantidades de coliformes termotolerantes y enterococos fecales que son descargados por los seres humanos son significativamente diferentes a las descargadas por los animales.^{75,76} Cuando el cociente EC/E es mayor de 4 se está en presencia de una contaminación fecal de origen humano, y cuando este cociente es menor de 0,7 la contaminación es de origen animal. Sin embargo, en el intervalo entre 0,7 y 4 no se puede interpretar el origen de la contaminación, e incluso puede tratarse de una contaminación fecal mixta, es decir, donde haya presencia de materia fecal humana y animal.^{32, 77}

La correlación entre estos indicadores fue utilizada por Warren *et al.*⁷⁸ para analizar aguas de ríos. Estos autores obtuvieron un coeficiente de correlación de 0,84, mientras que Chiroles *et al.*³⁴ reportaron valores de 0,77, 0,76 y 0,68 en tres estaciones del río Almendares. En ambos estudios se detectó una buena correlación entre ambos indicadores, asociados al grado de contaminación de las aguas y al deterioro notable de su calidad.

SITUACIÓN ACTUAL EN CUBA

En Cuba existe un marcado interés por la preservación de los ecosistemas acuáticos y por la salud pública, razón por la cual se evalúa tanto la calidad del agua potable como la del agua que se emplea con fines recreativos. Con respecto a las aguas que se emplean para el baño tanto en costas como en masas de aguas interiores (ríos, lagunas, embalses), la Norma Cubana 22 de 1999,⁷⁹ establece los límites máximos permisibles de concentración de los indicadores de calidad bacteriológicos, coliformes totales, coliformes fecales y estreptococos fecales, calculados a través de la metodología del número más probable (NMP) (Tabla 2).

Tabla 2. Norma Cubana para lugares de baño en costas y en masas de aguas interiores.

Tipo de recreación	Coliformes totales/100 mL	Coliformes fecales/100 mL	Estreptococos fecales/100 mL
Con contacto directo	$> 1 \cdot 10^3$	$\leq 2 \cdot 10^2$	$\leq 1 \cdot 10^2$
Con contacto indirecto	$\leq 5 \cdot 10^3$	$\leq 1 \cdot 10^3$	—

como se ha comentado en acápites anteriores, esta metodología es muy engorrosa y consume una gran cantidad de tiempo, además los indicadores utilizados no son los más apropiados debido a que muchos de los miembros del grupo coliformes (totales y fecales) pueden formar parte de la microbiota normal de aguas, suelos y vegetación, sin que esto indique que existe una fuente de contaminación fecal.³² En este sentido, se han realizado algunos estudios en el país en los que se evalúa la calidad microbiológica de las aguas, teniendo en cuenta los aspectos anteriores. Entre estos trabajos se pueden citar las investigaciones llevadas a cabo en el río Almendares por Chiroles *et al.*,³⁴ Prats *et al.*⁵ y Larrea *et al.*³⁶ en los cuales se emplea la técnica de filtración por membrana y a *E. coli*, enterococos (anteriormente estreptococos fecales) o la combinación de ambos, como indicadores de contaminación fecal. Además, se ha incursionado en la evaluación de nuevos medios de cultivo que combinados con la técnica de filtración por membrana permiten una rápida detección de los indicadores de contaminación fecal, como es el caso de los trabajos presentados por González *et al.*⁸⁰ y Larrea *et al.*,⁸¹ en los cuales se realiza la

evaluación de medios de cultivos cromogénicos y fluorogénicos empleados en el análisis de aguas de consumo y costeras y en aguas de ríos respectivamente.

En la actualidad, en el Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN) se han elaborado medios cromogénicos y fluorogénicos, como el medio CromoCen CC, los cuales han sido utilizados en el análisis de aguas residuales.⁸² Estos medios de producción nacional pudieran representar una alternativa viable para la evaluación de la calidad microbiológica de las aguas en el país.

CONCLUSIONES

El empleo de las bacterias indicadoras de contaminación fecal continúa resultando de gran utilidad en el monitoreo de la calidad de las aguas; sin embargo, se hace necesario no sólo evaluar los medios y métodos de enumeración de estos indicadores, sino también, evaluar el empleo de algunos indicadores en ambientes tropicales, como los coliformes totales y termotolerantes. Dentro del grupo de bacterias indicadoras, *E. coli* constituye un buen indicador de contaminación fecal y combinada con otros indicadores como los enterococos puede brindar una mayor información acerca de las fuentes de contaminación del agua. Los medios de cultivo cromogénicos y fluorogénicos combinados con la técnica de filtración por membrana constituyen una buena alternativa para un análisis rápido y confiable, por lo que la producción de estos medios en el país contribuiría a mejorar la evaluación de la calidad de las aguas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sardiñas O, Chiroles S, Fernández M, Hernández Y, Pérez A. Evaluación físico-química y microbiológica del agua de la presa El Cacao (Cotorro, Cuba). *Higiene y Sanidad Ambiental*. 2006; (6):202-206.
2. Bonkosky M, Hernandez-Delgado EA, Sandoz B, Robledo IE, Norat-Ramirez J, Mattei H. Detection of spatial fluctuations of non-point source fecal pollution in coral reef surrounding waters in southwestern Puerto Rico using PCR-based assays. *Marine Pollution Bulletin* 2008; 58:45-54.
3. Campos-Pinilla C, Cárdenas M, Guerrero A. Comportamiento de los indicadores de contaminación fecal en diferentes tipos de agua de la sabana de Bogotá (Colombia). *Universitas Scientiarum*. 2008; 13 (2):103-108
4. Prats J, García-Armisen T, Larrea J, Servais P. Comparison of culture-based methods to enumerate *Escherichia coli* in tropical and temperate freshwaters. *Letters in Applied Microbiology*. 2008; 46 (2):243-248
5. Rivera R, De Los Ríos P and Contreras Á. Relations fecal coliforms/ fecal streptococci as indicators of the origin of fecal pollution in urban and rural water bodies of Temuco, Chile. *Cien Inv Agr*. 2010; 37(2):141-149.
6. Farnleitner AH, Ryzinska-Paier G, Reischer GH, Burtscher MM, Knetsch S, Kirschner AKT, Dirnböck T, Kuschnig G, Mach RL and Sommer R. *Escherichia coli* and enterococci are sensitive and reliable indicators for human, livestock and wildlife faecal pollution in alpine mountainous water resources. *J Appl Microbiol*. 2010; 109(5):1599-1608.
7. Byamukama D, Mach RL, Kansime F, Manafi M, Farnleitner AH. Discrimination Efficacy of Fecal Pollution Detection in Different Aquatic Habitats of a High Altitude Tropical Country, using presumptive coliforms, *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* spores. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71(1):65-71.
8. Parker AH, Youtlen R, Dillon M, Nussbaumer T, Carter RC, Tyrrel SF, Webster J. An assessment of microbiological water quality of six water source categories in north-east Uganda. *J Wat Health*. 2010; 8(3):550-560.
9. Staley C, Reckhow KH, Lukasik J, Harwood VJ. Assessment of sources of human pathogens and fecal contamination in a Florida freshwater lake. *Water Research*. 2012; 46:5799-5812.
10. Dorevitch S, Ashbolt NJ, Ferguson CM, Fujioka R, McGee CD, Soller JA, Whitman RL. Meeting report: knowledge and gaps in developing microbial criteria for inland recreational waters. *Environmental Health Perspectives*. 2010; 118 (6):871-876.
11. Hazen TC, Toranzos GA. Tropical source water. In McFeters GA, editor. *Drinking water microbiology. Progress and recent developments*. Berlin, Germany: Springer Verlag KG; 1990:32-53.
12. Ishii S, Sadowsky MJ. *Escherichia coli* in the environment: Implications for water quality and human health. *Microbes Environ*. 2008; 23:101-108.
13. Boehm AB, Ashbolt NJ, Colford JM, Dunbar LE, Fleming LE, Gold MA, Hansel JA, Hunter PR, Ichida AM, McGee CD, Soller JA, Weisberg SB. A sea change ahead for recreational water quality criteria. *Journal of Water and Health*. 2009; 7:9-20.
14. Martínez A, Fonseca K, Ortega JL, García-Luján C. Monitoreo de la calidad microbiológica del agua en la cuenca hidrológica del río Nazas, México. *Química Viva*. 2009; 8 (1):35-47.

15. Vaccari M, Collivignarelli C, Tharnpoophasiam P, Vitali F. Well sanitary inspection and water quality monitoring in Ban Nam Khem (Thailand) 30 months after 2004 Indian Ocean Tsunami. *Environ Monit Assess.* 2009; 161(1-4):123-133.
16. Mushi D, Byamukama D, Kirschner AKT, Mach RL, Brunner K, Farnleitner AH. Sanitary inspection of wells using risk-of-contamination scoring indicates a high predictive ability for bacterial faecal pollution in the peri-urban tropical lowlands of Dar es Salaam, Tanzania. *J Water Health.* 2012; 10(2):236-243.
17. Chigor VN, Umoh VJ, Okuofu CA, Ameh JB, Igbinosa EO, Okoh AI. Water quality assessment: surface water sources used for drinking and irrigation in Zaria, Nigeria are a public health hazard. *Environ Monit Assess.* 2012; 184(5):3389-3400.
18. Bachoon DS, Markand S, Otero E, Perry G, Ramsabaugh A. Assessment of non-point sources of fecal pollution in coastal waters of Puerto Rico and Trinidad. *Marine Pollution Bulletin.* 2010; 60:1117-1121.
19. Bastholm S, Wahlstrøm L, Appel L and Roslev P. A simple bioluminescence procedure for early warning detection of coliform bacteria in drinking water. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2008; 24:2323-2330.
20. Luby SP, Gupta SK, Sheikh MA, Johnston RB, Ram PK, Islam MS. Tubewell water quality and predictors of contamination in three flood-prone areas in Bangladesh. *Appl Microbiol.* 2008; 105:1002-1008.
21. Rossen A, Rodríguez MI, Ruibal AL, Fortunato MS, Bustamante A, Ruiz M, Angelaccio C, Korol S. Indicadores bacterianos de contaminación fecal en el embalse San Roque (Córdoba, Argentina). *Hig Sanid Ambient.* 2008; 8:325-330.
22. González AM, Paranhos R, Lutterbach MS. Relationships between fecal indicators and pathogenic microorganisms in a tropical lagoon in Rio de Janeiro, Brazil. *Environ Monit Assess.* 2010; 164B(1):207-219.
23. Méndez RI, San Pedro L, Castillo ER, Vázquez EB. Modelación del tiempo de conservación de muestras biológicas de agua. *Rev Int Contam. Ambient.* 2010; 26 (4):327-335.
24. Mushi D, Byamukama D, Kivaisi AK, Mach RL, Farnleitner AH. Sorbitol-fermenting Bifidobacteria are indicators of very recent human faecal pollution in streams and groundwater habitats in urban tropical lowlands. *J Water Health.* 2010; 8(3):466-478.
25. Santiago-Rodríguez TM, Tremblay RL, Toledo-Hernandez C, Gonzalez-Nieves JE, Ryu H, Santo Domingo JW, Toranzos GA. Microbial quality of tropical inland waters and effects of rainfall events. *Appl and Environ Microbiol.* 2012; 78(15):5160-5169.
26. Lamendella R, Santo Domingo JW, Kelty C, Oerther DB. Bifidobacteria in feces and environmental waters. *Appl and Environ Microbiol.* 2008; 74:575-584.
27. Del Pilar M, Ávila S, Mónica S, Gómez AC. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *NOVA - Publicación Científica.* 2005; 3(4):1794-2470.
28. Ávila de Navia SL y Estupiñán SM. Calidad sanitaria del agua de la Ciénaga Mata de Palma en el Departamento del Cesar, Colombia. *NOVA.* 2009; 7(11):85-91.
29. Boehm A, Soller J. *Recreational Water Risk: Pathogens and Fecal Indicators.* In: Laws EA, editor. *Environmental Toxicology: New York: Springer; 2013:441-59.*
30. Delgado Y, Miravet ME, Núñez R. Indicadores microbiológicos de calidad del agua en la costa oeste de la Ciudad de La Habana. *Hig San Ambient.* 2008; 8:387-391.
31. Carrillo EM, Lozano AM. Validación del método de detección de coliformes totales y fecales en agua potable utilizando Agar Chromocult. [Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de Microbióloga Industrial]. Facultad de Ciencias. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, 2008.
32. Marchand EO. Microorganismos indicadores de la calidad del agua de consumo humano en Lima Metropolitana. [Tesis para optar al título profesional de biólogo con mención en Microbiología y Parasitología]. Universidad del Perú, Decana de América, 2002.
33. Badgley BD, Thomas FIM, Harwood VJ. Quantifying environmental reservoirs of fecal indicator bacteria associated with sediment and submerged aquatic vegetation. *Environmental Microbiology.* 2011; 13(4):932-942.
34. Chiroles SR, González MI, Torres T, Valdés M, Domínguez I. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en aguas del río Almendares (Cuba). *Hig Sanid Ambient.* 2007;(7):222-227.
35. Narváez S, Gómez M y Acosta J. Coliformes termotolerantes en aguas de las poblaciones costeras y palafíticas de La Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia. *Acta Biol Colomb.* 2008; 13(3):111-120.

36. Larrea J, Rojas M, Heydrich M, Romeu B, Rojas N, Lugo D. Evaluación de la calidad microbiológica de las aguas del Complejo Turístico Las Terrazas, Pinar del Río (Cuba). Hig Sanid Ambient. 2009; 9:492-504.
37. Chung YC, Kim YS, Shadchehr A, Garrido A, Macgregor IL and Slesinger MH. Protein digestion and absorption in human small intestine. Gastroenterology. 1979; 76:1415-1421.
38. Winfield MD, Grosman EA. Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 2003; 69:3687-3694.
39. Faust MA, Aotaky AE, Hargadon MT. Effect of physical parameters on the *in situ* survival of *Escherichia coli* MC-6 in an estuarine environment. Applied Microbiology. 1975; 30:800-806.
40. Gerba CP, McLeod JS. Effect of sediments on the survival of *Escherichia coli* in marine waters. Applied Environmental Microbiology 1976; 32:114-120.
41. Temple KL, Camper AK, McFeters GA. Survival of two enterobacteria in feces buried in soil under field conditions. Applied Environmental Microbiology 1980; 40:794-797.
42. Jiménez L, Muniz I, Torazos GA, Hazen TC. Survival and activity of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in tropical freshwater. J Appl Bacteriol. 1989; 67:61-69.
43. Oluwande PA, Sridhar KC, Bammeke AO, Okubadejo AO. Pollution level in some Nigerian rivers. Water Res. 1983; 17:957-963.
44. Fujioka R, Shizumura LK. *Clostridium perfringens*: A reliable indicator of stream water quality. J Water Pollut Contr Fed. 1985; 57(10):986-992.
45. Feachem RG. Fecal coliforms and fecal streptococci in streams in the New Guinea highlands. Water Res. 1974; 8:367-374.
46. Hazen TC. Fecal coliforms as indicators in tropical waters: a review. Toxicity Assessment: An International Journal. 1988; 3:461-477.
47. Hazen TC, Fuentes FA, Santo Domingo JW. *In situ* survival and activity of pathogens and their indicators. Proc. IV ISME. 1988;406-411.
48. Wright RC. A comparison of the levels of faecal indicator bacteria in water and human faeces in a rural area of a tropical developing country (Sierra Leone). Journal of Hygiene. 1982; 89:69-78.
49. Lavoie MC. Identification of strain isolates as total and fecal coliforms and comparison of both groups as indicators of fecal pollution in tropical climates. Can J Microbiol. 1983;29: 689-693.
50. Quiñones PD, Marrero D, Falero B, Tamargo I, Llop A, Kobayashi N. Susceptibilidad antimicrobiana y factores de virulencia en especies de *Enterococcus* causantes de infecciones pediátricas en Cuba. Rev Cubana Med Trop. 2008; 60(2):123-129.
51. Díaz M, Rodríguez C, Zhurbenko R. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. Rev Cubana Hig Epidemiol. 2010; 48(2):47-161.
52. Porte L, Hervé B, Prat S, Chanqueo L. *Enterococcus* sp. Parte I. Rev Chil Infect. 2007; 24(3):231.
53. Köhler W. The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. Intern J Med Microbiol. 2007; 297(3):133-50.
54. Yamahara,Ç KM, Walters, SP, Boehm, AB. Growth of enterococci in unaltered, unseeded beach sands subjected to tidal wetting. Appl Environ. Microbiol 2009; 75:1517-1524.
55. Díaz ÁM, Izquierdo CCS, Fernández de la Paz T, Izquierdo AM. Características clínicas y epidemiológicas de las infecciones por enterococos en el niño. Rev Cubana Pediatr. 2008; 79(1) [Consultada: 19 de enero 2012] Disponible en:<http://scielo.sld.pdf/ped/v79n1/ped08107.pdf>.
56. Vergaray G, Méndez CR, Morante HY, Heredia VI, Béjar VR. Enterococcus y *Escherichia coli* como indicadores de contaminación fecal en playas costeras de Lima. Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica. 2007; 10(20):6-82.
57. Eckner KF. Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the colilert and enterolert methods for detection of waterborne coliform bacteria, *Escherichia coli*, and enterococci used in drinking and bathing water quality monitoring in southern Sweden. Appl Environ Microbiol. 1998; 64(8):3079-3083.
58. Rompré A, Servais P, Baudart J, De Roubin MR, Laurent P. Methods of detection and enumeration of coliforms in drinking water: a review. J Microbiol Methods 2002; 49:31-54.
59. (American Public Health Association): Standard Methods for the Analysis of Water and Wastewater, 22nd Edition. Joint publication of the American Public Health Association, Ciudad: American Water Works Association, and Water Environment Federation; 2012
60. AFNOR - Association Française de Normalisation. Qualité de l'eau. 2001 Analyses biochimiques et biologiques – Analyses microbiologiques. Tome 4. Agence Paris, France Française de Normalisation;
61. Grabow WOK, du Preez M. Comparison of m-Endo, LES, McConkey, and Teepol media for membrane filtration counting of total coliform bacteria in water. Appl Environ Microbiol. 1979; 38:351-358.

62. Manafi M. New development in chromogenic and fluorogenic culture media. *International Journal of Food Microbiology*. 2000; 60:205-218.
63. Chao K, Chao C, Chao W. Evaluation of colilert 18 for detection of coliforms and *Escherichia Coli* in subtropical freshwater. *Appl Environ Microb*. 2004;70:1242–1244.
64. Manafi M, Rotter ML. A new plate medium for rapid presumptive identification and differentiation of Enterobacteriaceae. *Int. J. Food Microbiol*. 1991; 14:127–134.
65. Kloot RW, Radakovich B, Huang X, Brantley D. A comparison of bacterial indicators and methods in rural surface waters. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2006; 121:275-287.
66. USEPA: 2002 Implementation guidance for ambient water quality criteria for bacteria (draft). EPA-823-B-003, Office of Water, Washington, DC.
67. Prats J, Larrea J, García-Armisen T, Lugo D, Rodríguez A, Servais P et al. Potential risk due to the microbial pollution in the Almendares river, Havana Cuba. *Contribution to the Education and Environmental Protection*. Editorial; 2006; Vol. 7.
68. García-Armisen T, Prats J, Servais P. Comparison of culturable fecal coliforms and *Escherichia coli* enumeration in freshwaters. *Can J Microbiol*. 2007; 53:798-801.
69. Hachich EM, Di Bari M, Christ APG, Lamparelli CC, Ramos SS, Sato MIZ. Comparison of thermotolerant coliforms and *Escherichia coli* densities in freshwater bodies. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012: 675-68.
70. Hamilton WP, Kim M, Thackston EL. Comparison of commercially available *Escherichia coli* enumeration test: Implications for attaining water quality standards. *Wat Res*. 2005; 39:4869-4878.
71. Vernberg WB, Scott GI, Strozier SH, Bemiss J, Daugomah JW. The effects of urbanization on human and ecosystem health. In: Vernberg FJ, Vernberg WB, Siewicki T, editors. *Sustainable Development in the Southeastern Coastal Zone*, Columbia, SC University of South Carolina Press;1996:221-239.
72. Noble RT, Leecaster MK, McGee CD, Weisberg SB, Ritter K. Comparison of bacterial indicator analysis methods in stormwater-affected coastal waters. *Water Res*. 2004; 38:1183-1188.
73. Herrera A, Suárez P. Indicadores bacterianos como herramientas para medir la calidad ambiental del agua costera. *INCI*. 2005; 30(3):171- 176.
74. Noble RT, Moore DF, Leecaster MK, McGee CD, Weisberg SB. Comparison of total coliform, fecal coliform, and *Enterococcus* bacterial indicator response for ocean recreational water quality testing. *Water Research*. 2003;37:1637–1643.
75. Tchobanoglous G, Burton FL, Stensel HD. *Wastewater engineering treatment and reuse*. 4th ed. Ciudad Metcalf and Eddy Inc., McGraw Hill; 2003.
76. Meeroff DE, Bloetscher F, Bocca T, Morin F. Evaluation of water quality impacts of on-site treatment and disposal systems on urban coastal waters. *Water Air Soil Pollut*. 2008; 192:11-24.
77. Coyne MS, Howell JM. The fecal coliform/fecal streptococci ratio (FC/FS) and water quality in the Bluegrass Region of Kentucky. *Soil and Science News and Views*. 1994; 15(9):1-8.
78. Warren L, Mallamann WL, Fifield CW. Comparison of the most probable numbers of *Escherichia coli* and *Enterococci* in river waters. *American Journal of Public Health*. 1955; 45:1049–1053.
79. NC 22:1999. Lugares de baño en costas y en masas de aguas interiores. Requisitos higiénicos sanitarios. 1ra edn. Oficina Nacional de Normalización. Cuba.
80. González MI, Torres T, Chiroles S, Manafi M. Medios de cultivo fluorogénicos y cromogénicos y su evaluación en aguas de consumo y costeras. *Hig Sanid Ambient*. 2009; 9:422-430.
81. Larrea J, Rojas M, Heydrich M, Romeu B, Rojas N, Lugo D. Empleo del medio agar Chromocult en la evaluación de la calidad microbiológica en ecosistemas acuáticos tropicales. *Hig Sanid Ambient*. 2010; 10:535-543.
82. Díaz M, Durán A, Zhurbenko R, Rodríguez I, Viera DR, Rodríguez C. Utilidad de los medios cromogénicos y/o fluorogénicos CromoCen CC y CromoCen SC en el análisis de aguas residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2002; 44 (4):425.