

Empleo del sistema DIRAMIC en la determinación de la calidad microbiológica del agua

Fernando Travieso Ruiz, Mario Cruz Arias,* Eva Duarte Montero,* Eleonora Villa Juárez,* Marlén Alonso Hernández y Rolando Contreras Alarcón.**

Laboratorio de Microbiología, Dirección de Diagnóstico, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Apartado Postal 6414, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. *Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. **Departamento de Estudios sobre la Contaminación Ambiental, Dirección de Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

Recibido: 9 de mayo de 2001. Aceptado: 22 de julio de 2002.

Palabras clave: agua, determinación de la calidad, contaminación microbiana, coliformes, enterococos.
Key words: water, quality determination, microbial contamination, coliforms, enterococci.

RESUMEN. El objetivo fue demostrar la posibilidad de utilizar el sistema DIRAMIC para la detección de los microorganismos indicadores de calidad del agua en un tiempo menor que por los métodos estandarizados; así como establecer una correspondencia entre el tiempo invertido en la detección y la carga de microorganismos presente en la muestra. De forma experimental, se inocularon muestras de agua con diferentes concentraciones de las principales bacterias indicadoras de contaminación del agua y se determinaron los tiempos requeridos para detectar la aparición de turbidez en varios de los medios de cultivo que se utilizan en los métodos normalizados. Con estos resultados, se seleccionaron los medios de cultivo en los cuales se obtuvieron mayores índices de crecimiento en menor tiempo y se establecieron los intervalos de tiempo requeridos para la detección de diferentes cargas microbianas. Para la detección específica de *Escherichia coli* se adicionó 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronido y triptófano al caldo EC. Finalmente, se contaminó una muestra de agua potable estéril con inóculos de todas las bacterias en estudio, teniendo en cuenta sus concentraciones en muestras reales, y al realizar la detección se reprodujeron los resultados logrados para los microorganismos individuales. Todas las concentraciones celulares se comprobaron mediante las técnicas de fermentación en tubos múltiples y filtración por membrana. El empleo del sistema DIRAMIC en la determinación de la calidad del agua posibilitaría disminuir los tiempos de detección de los microorganismos indicadores de esta y los costos por materiales gastables.

ABSTRACT. The use of DIRAMIC system for the determination of microbiological quality of water is suggested. The objective was to demonstrate the possibility of using the DIRAMIC system to detect microorganisms that indicate the quality of water faster than standard method. Another objective was to establish a correspondence between the detection-spent time and the concentration of microorganisms in the sample. Experimentally water samples were inoculated with various concentrations of the main bacteria strains indicators of water contamination and the time required for the detection of turbidity developed in some culture media used in the standard methods, were determined. From the analysis of results, culture media with the higher growth indexes in the shortest times were selected and the range of time required for the detection of various microbial concentrations were established. For the specific detection of *Escherichia coli* 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide and tryptophan were added to EC broth. Finally, a sterile drinkable water sample was inoculated with a mix of the bacterial strains under study, adjusting its concentration to real samples; the results were the same as with the single strains of microorganisms. All cellular concentrations were verified through the multiple tube fermentation and membrane filter methods. DIRAMIC system for the determination of microbiological quality of water would allow shortening the time to detect the microorganisms that indicate such quality, and to decrease disposable material costs.

INTRODUCCION

La detección de microorganismos indicadores de contaminación es aceptada universalmente para el seguimiento, control y la estimación de la calidad microbiológica del agua.^{1,2} La evaluación de esta se realiza mediante las técnicas normalizadas de fermentación en tubos múltiples, haciendo uso de la tabla del número más probable, y de filtración por membrana. A pesar de que estos métodos son ampliamente utilizados y brindan resultados muy confiables se le señalan inconvenientes tales como, la gran cantidad de material que consumen y el tiempo requerido para obtener los resultados, en dichas técnicas se invierte un tiempo que fluctúa entre las 48 y 96 h para coliformes y las 48 y 72 h para enterococos y *Pseudomonas*.^{3,4}

La realización de los análisis con una gran calidad de detección en un tiempo menor es objetivo de los investigadores que laboran en este campo, por lo que continuamente se desarrollan nuevas metodologías y equipos de forma tal que un tratamiento adecuado pueda ser realizado rápidamente. Como ejemplos de la anterior afirmación se tiene la modificación de los medios de cultivo diseñados para el uso en la microbiología del agua mediante la adición de sustratos, fundamentalmente fluorogénicos y cromogénicos, que revelan la presencia de enzimas específicas de los microorga-

nismos de interés;⁵⁻⁸ también la automatización parcial o total de las técnicas establecidas para estos fines y el desarrollo de nuevos sistemas con principios de detección diferentes.⁹⁻¹¹

En el Centro Nacional de Investigaciones Científicas se viene desarrollando desde hace más de una década el sistema DIRAMIC para el diagnóstico rápido microbiológico, el cual ha encontrado aplicaciones en la microbiología clínica y la biotecnología.¹²⁻¹⁵ Dicho sistema presenta un lector turbidimétrico, calibrado con un equivalente de la escala McFarland, que permite detectar en términos de transmitancia óptica los cambios de turbidez que se producen en un medio de cultivo debido a la multiplicación de los microorganismos.¹⁶

El objetivo del presente trabajo fue demostrar la posibilidad utilizar el sistema DIRAMIC en la detección de los microorganismos indicadores de calidad del agua, así como establecer una correspondencia entre el tiempo invertido en la detección y la carga de microorganismos presente en la muestra analizada. La introducción del DIRAMIC posibilitaría contar con un sistema de producción nacional para el seguimiento y control de la calidad de las aguas, así como para la evaluación de la eficacia de los procesos de tratamiento de residuales hídricos en menor tiempo que por las técnicas normalizadas y con menos gasto de materiales.

MATERIALES Y METODOS

La contaminación experimental de las muestras de agua estériles se realizó con cepas de colección de la American Type Culture Collection (ATCC) de las principales bacterias indicadoras de calidad microbiológica; los cultivos correspondían a: *Escherichia coli* ATCC 25022, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Enterobacter cloacae* ATCC 23355, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Con las suspensiones de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter freundii* se hizo una mezcla y se trabajaron como coliformes totales.

Las muestras se prepararon con una concentración celular de cada microorganismo de interés de 10^7 cél./100 mL. La operación se realizó mediante el auxilio de un espectrofotómetro ajustado a una longitud de onda de 460 nm hasta ob-

tener una suspensión celular con una absorbancia de 0,003 a 0,004, valor que fue comprobado previamente para verificar su correspondencia con una concentración celular de 10^7 cél./100mL a 460 nm. La concentración de las suspensiones microbianas fue verificada mediante los métodos de fermentación en tubos múltiples, usando la tabla del número más probable, y filtración por membrana. Los filtros de celulosa se colocaron en placas de Petri con agar ENDO, para el crecimiento de coliformes y *Pseudomonas*, y medio selectivo para Enterococos. Los métodos de fermentación en tubos múltiples y filtración por membrana se realizaron según la metodología establecida.³

A partir de estas suspensiones, se prepararon inóculos, por diluciones seriadas, con una concentración celular de 10^6 , 10^3 y 10 cél./100 mL y se inocularon los distintos medios de cultivo, las concentraciones finales se comprobaron por los mismos métodos mencionados anteriormente. Se adicionó 1 mL o 500 μ L de cada muestra de agua, en dependencia del volumen de medio de cultivo y se realizaron 10 réplicas de cada experiencia.

Los medios de cultivo seleccionados en las determinaciones con el DIRAMIC fueron: caldo EC para coliformes totales y fecales, caldo SF para enterococos y caldo acetamida para *Pseudomonas*. Todos estos medios de cultivo se prepararon a simple y doble concentración, excepto para las sustancias inhibidoras; la elección de la concentración de trabajo se hizo mediante un prueba t de Student. Se analizaron las medias de las mediciones correspondientes a los tiempos en los cuales se hizo evidente la turbidez. Al medio de cultivo EC se le adicionó 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronido (MUG) y L-triptófano para la identificación específica de *Escherichia coli*. Los medios fueron dispensados en los frascos que se utilizan en las mediciones con el DIRAMIC a razón de 4 mL de caldo EC + MUG + triptófano o bilis verde brillante y 2 mL de caldo acetamida o SF.

Después de inocular los medios de cultivo, se determinó la turbidez de los cultivos a tiempo 0 h y se incubaron las muestras a 37 °C bajo agitación. A partir de las 2 h de incubación y cada 1 h, se realizaron las mediciones correspondientes a todos los frascos hasta llegar a las 10 h de incubación. Al día siguiente, se realizó una medición final en

aquellos casos en que no se detectó crecimiento.

Previo a la realización de las mediciones, el sistema DIRAMIC se compensa con el medio de cultivo que se va a utilizar en ese momento. Se consideró que había incremento de turbidez cuando las mediciones tenían un valor con respecto al blanco mayor que 0,04 unidades en la escala de McFarland. Una unidad en esta escala se corresponde con una concentración celular de $3 \cdot 10^8$ cél./mL.¹⁷

Para comprobar la coincidencia de los tiempos de detección establecidos en las diferentes concentraciones de los microorganismos individuales con relación a la mezcla de ellos, se contaminó de forma experimental una muestra de agua potable estéril con inóculos de los grupos bacterianos en estudio. Se mantuvo la relación de concentraciones que generalmente se encuentra en las aguas contaminadas. En este caso, las concentraciones celulares fueron comprobadas por la técnica de fermentación en tubos múltiples.

RESULTADOS Y DISCUSION

Todos los medios de cultivo se prepararon siguiendo las instrucciones establecidas para cada uno de ellos y su calidad se comprobó utilizando las cepas controles recomendadas. Al realizar la prueba de Student para comparar los resultados obtenidos con los medios de cultivo a simple y doble concentración, se encontraron diferencias significativas para $p < 0,05$ en los incrementos de turbidez de cada microorganismo; se requirió un menor tiempo para la detección del crecimiento en el caldo EC a doble concentración y en los caldos SF y acetamida a simple concentración por lo que el trabajo se continuó a estas concentraciones de los medios de cultivo.

La tabla 1 ofrece la comprobación por los métodos de Fermentación en tubos múltiples y filtración por membrana de las tres concentraciones celulares trabajadas, así como su relación con los tiempos requeridos para la detección del crecimiento mediante el sistema DIRAMIC. las suspensiones de los microorganismos se encontraron en un intervalo aceptable de concentración. Estas concentraciones de microorganismos estuvieron en correspondencia con los posibles usos del agua, definidos en las normas de calidad del agua establecidas en Cuba.^{2,18}

Tabla 1. Concentración de los inóculos y tiempo requerido para su detección con el sistema DIRAMIC.

Microorganismo	Concentración celular presumible (cél./100 mL)	Tubos múltiples (cél./100 mL)	Filtración por membrana (UFC/100 mL)	Tiempo de detección por el DIRAMIC ^a (h)
<i>E. coli</i>	10 ⁶	5 · 10 ⁷	1 · 10 ⁶	4
	10 ³	2 · 10 ⁴	9 · 10 ³	7
	10	5 · 10 ²	1 · 10	9
<i>E. faecalis</i>	10 ⁶	2 · 10 ⁷	9 · 10 ⁷	4
	10 ³	3 · 10 ⁴	2 · 10 ⁴	7
	10	9 · 10	9 · 10	11
<i>P. aeruginosa</i>	10 ⁶	8 · 10 ⁷	2 · 10 ⁷	6
	10 ³	3 · 10 ⁵	7 · 10 ⁴	11
	10	3 · 10	4 · 10	24

^a Intervalo de tiempo obtenido para n = 10.**Tabla 2.** Detección de microorganismos indicadores de la calidad del agua utilizando el sistema DIRAMIC.

Microorganismo	Medio de cultivo	Concentración celular (cél./100 mL)	Intervalo de tiempo de detección ^a (h)
<i>E. coli</i>	Caldo EC +MUG + triptófano	10 ⁶	3-4
		10 ³	6-7
		10	9-24
Coliformes	Caldo EC + MUG + triptófano	10 ⁶	4-5
		10 ³	7-8
		10	10-24
<i>E. faecalis</i>	Caldo SF	10 ⁶	4-5
		10 ³	7-8
		10	10-24
<i>P. aeruginosa</i>	Caldo acetamida	10 ⁶	6-7
		10 ³	10-11
		10	12-24

^a Promedio para n = 10.

El análisis de los resultados de los experimentos realizados para la detección de bacterias en aguas empleando el sistema DIRAMIC sugiere que existe correspondencia entre la concentración celular y el tiempo de aparición de turbidez, por lo que es posible establecer intervalos de tiempo que definen la carga de un determinado germen en una muestra de agua, identificado por el medio de cultivo donde se desarrolle (Tabla 2). En todos los casos, el tiempo requerido para la detección resultó inferior al de las técnicas normalizadas^{3,4} y al de los nuevos métodos reportados los cuales requieren del crecimiento microbiano.^{5,7-10}

En ensayos previos, todos los frascos contenían 4 mL de medio de cultivo, pero se comprobó que disminuyendo a la mitad el volumen

de medio y de inóculo, para mantener las proporciones, se mejoraban los resultados en la determinación de *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*. Con *Pseudomonas aeruginosa* se detectó más rápidamente el incremento de turbidez. Incluso, para la concentración celular de 10⁶ células/100 mL se observó cambio de color en el medio de cultivo entre las 9 y las 10 h, lo cual no se había evidenciado con el volumen anterior. El hecho de ser este un microorganismo estrictamente aerobio y haberse favorecido la capa de aire en el frasco, que estaba cerrado, justifica esta mejora. Con *Enterococcus faecalis* se favoreció igualmente el metabolismo celular, con lo que se produjo el cambio de color del indicador que conte-

nía el medio de cultivo a las 12 h para la concentración mayor de gérmenes. Para las concentraciones de 10³ y 10 células/100 mL, en ambos casos, continuó siendo necesaria la incubación hasta el siguiente día. Con estos inóculos la baja carga celular influye más en la demora de las respuestas.

Los medios de cultivos utilizados para la detección de *Pseudomonas* y *Enterococcus* son lo suficientemente selectivos como para impedir el crecimiento de otros microorganismos de interés. Esto no ocurre así con el caldo EC, en el cual, además de los microorganismos coliformes, pueden crecer otros. En la técnica de tubos múltiples se puede lograr la diferenciación de los coliformes por la detección de gas producido durante la fermentación de la lactosa, sin embargo, en los frascos del DIRAMIC el gas no puede ser detectado por no tener campanas de Durham incorporadas. La incubación a 44 °C posibilita diferenciar las bacterias coliformes en totales y fecales, igualmente, por el gas que producen estos últimos a esa temperatura. Por este motivo, se hacía necesario implementar otra prueba que diferenciara el crecimiento de *Escherichia coli* y los coliformes del resto de las bacterias indicadoras de calidad del agua y además, lograr diferenciar los coliformes fecales de los totales.

Esta fue la razón por la cual se le adicionó al caldo EC el MUG y el triptófano, substratos de las enzimas β-glucuronidasa y triptofanasa respectivamente, cuya presencia en un mismo microorganismo es específica de *Escherichia coli* en la microbiología del agua.^{19,20} La determinación de estas actividades enzimáticas hizo posible demostrar la presencia de *Escherichia coli* en 6 h a

una concentración de 10^6 cél./100 mL, 9 h para 10^3 cél./100 mL, o sea dos horas después de ser detectado el crecimiento, y al siguiente día para 10 cél./100 mL. La comprobación de las actividades enzimáticas directamente en el caldo que sirve para la detección de la contaminación bacteriana de las aguas, a diferencia de otras metodologías que utilizan medios con agar incorporado,^{9,19} ahorra el tiempo requerido para el desarrollo de las colonias.

Un trabajo similar debe desarrollarse para los microorganismos coliformes y así lograr su diferenciación de otras bacterias capaces de crecer en el caldo EC. La detección de la actividad β -galactosidasa es recomendada por la OMS para estos fines por ser incluso más sensible que la producción de gas.¹

Por último, la contaminación de la muestra de agua potable estéril con diferentes concentraciones de las bacterias reprodujo los resultados logrados en la detección del crecimiento de los microorganismos independientes. Los tiempos de detección de la turbidez estaban incluidos en los intervalos establecidos (Tabla 3). La identificación de *Escherichia coli*, sin embargo, demoró dos horas más que cuando se trabajó con los microorganismos por separado para la concentración de 10^6 UFC/mL.

Dada la posibilidad de detectar diferentes concentraciones de los microorganismos indicadores de la calidad del agua en diferentes períodos de tiempo, siempre menores que el tiempo requerido por los métodos normalizados, el sistema DIRAMIC puede ser utilizado además, en el seguimiento y control del tratamiento de los residuales hídricos para la evaluación de la eficacia del proceso.

CONCLUSIONES

Con el uso del sistema DIRAMIC fue posible la detección en diferentes intervalos de tiempo de distintas concentraciones de los principales microorganismos indicadores de contaminación microbiana en aguas. Fue posible además, la diferenciación entre estos microorganismos mediante el uso de medios de cultivo selectivos y la identificación de *Escherichia coli*. Dentro del grupo coliforme es necesario utilizar un medio de cultivo más selectivo para diferenciarlos en coliformes fecales y coliformes totales.

BIBLIOGRAFIA

- Organización Mundial de la Salud. Guías para la calidad del agua potable. Criterios de salud y otras informaciones. 2da edición, Vol. 2, Ginebra, 1996.
- NC-93-11. Higiene comunal. Fuentes de abastecimiento de agua. Calidad y Protección sanitaria. 1987.
- American Public Health Association. Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. 17ma edición, Ed. Díaz Santos, Madrid. 9.1-9, 120, 1992.
- Organización Mundial de la Salud. Guías para la calidad del agua potable. Vigilancia y control de los abastecimientos de agua de la comunidad. 2da edición, Vol. 3, Ginebra, 1998.
- Brenner K.P., Rankin C.C., Roybal Y.R., Stelma G.N., Scarpino P.V. and Dufour A.P. New medium for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* in water. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62**, 203-208, 1993.
- McFeters G.A., Broadaway S.C., Pyle B.H., Pickett M. and Egozy Y. Comparative performance of Colisure™ and accepted methods in the detection of chlorine-injured total coliforms and *E. coli*. **Wat. Sci. Tech.**, **31**, 259-61, 1995.
- Place B.M., Tillett H.E. and Lightfoot N.F. Development of an external quality assurance scheme for the detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* from water and comparison of results using modified King's A broth and a commercial agar. **J. Appl. Bacteriol.**, **80**, 682-86, 1996.
- Messer J.W. and Dufour A.P. A rapid, specific membrane filtration procedure for enumeration of enterococci in recreational water. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64**, 678-80, 1998.
- Brenner K.P., Rankin C.C., Sivaganesan M. and Scarpino P.V. Comparison of the recoveries of *Escherichia coli* and total coliforms from drinking water by the MI Agar Method and the US Environmental Protection Agency-Approved Membrane Filter Method. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62**, 203-08, 1996.
- Budnick G.E., Howart R.T. and Mayo D.R. Evaluation of Enterolert for enumeration of Enterococci in recreational waters. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62**, 3881-84, 1996.
- Francy D.S. and Darner R.A. Comparison of methods for determining *Escherichia coli* concentrations in recreational waters. **Wat. Res.**, **34**, 2770-78, 2000.
- Hernández J.E., Contreras R., Ponce P., Armenteros M. and Rodríguez F. Evaluación de un equipo turbidimétrico (DIRAMIC-03) en la estimación del conteo total de bacterias en muestra de leche cruda. **Tecnología Láctea Latinoamericana**, **2**, 44-50, 1995.
- Serufo J.C., Barbosa A., Goncalves S., Guimaraes O., Uehara I., Valle L.R., De Campos H.G., Diorio V.J., Contreras O.R. y Pascual A. Diagnóstico Rápido da Infecção do Trato Urinário. Estudo Comparativo com o Método Convencional. **Journal Brasileiro de Microbiologia**, **69**, 155-64, 1995.
- Blondeau J.M., Contreras R., Hernández S. y Sutor M.E. Evaluation of the DIRAMIC microbiology system. 97th General Meeting ASM, Miami Beach, Florida, May 4 through 8., No. C-92, 136, 1997.
- Hernández J.E., Dávila N., Ramírez I., Ponce P. y Contreras R. Utilización del sistema DIRAMIC en la detección de contaminación post-pasteurización en leche pasteurizada. Memorias, VI Congreso Panamericano de Lechería. Buenos Aires, 1997.
- Manual del Usuario, DIRAMIC 10, Versión 4.0, 1997.
- Remel McFarland Equivalence Turbidity Standard. Lenexa, KS 66215, 1997.
- NC-93-04 Piscinas. Requisitos higiénico-sanitarios, 1986.
- Tryland I y Fiksdal L. Enzyme characteristics of β -D-galactosidase- and β -D-glucuronidase- positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64**, 1018-23, 1998.
- Merck Microbiology Manual. Merck KGaA, Darmstadt, Germany, 349-59, 2000.

Tabla 3. Determinación de bacterias indicadoras de contaminación en una muestra de agua contaminada experimentalmente.^a

Microorganismo	Tubos múltiples (cél./100 mL)	DIRAMIC Detección turbidez (h) ^b [MUG+ / Indol+] (h) ^c
<i>E. coli</i> y coliformes	$5 \cdot 10^6$	5 [9 / 9]
<i>E. faecalis</i>	$2 \cdot 10^3$	8 [- / -]
<i>P. aeruginosa</i>	< 3	24 [- / -]

^a Promedio para n = 3. – Respuesta negativa.

^b tiempo promedio requerido para la detección de la contaminación.

^c tiempo promedio requerido para obtener reacciones positivas de las enzimas β -glucuronidasa y triptofanasa.