

INTERFERENCIAS DE LAS AGUAS MARINAS EN LA DETECCIÓN DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA MEDIANTE LA TECNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE

Danner Mora Alvarado¹

RESUMEN

En un estudio, realizado en 1992 en las aguas del mar Caribe costarricense, sobre "Relaciones y Tasas de declinación de los organismos indicadores de Calidad de las Aguas Marinas", se observó que los números más probables/100mL de pseudomona aeruginosa presentaban inhibición para la producción de fluorescencia, en las porciones (diluciones) de 10mL de agua de mar, no así en los tubos de 1 y 0.1mL. Estos resultados causaron incoherencias en la cuantificación de estas bacterias en dichas aguas. Para detectar el factor causante de la interferencia, se realizaron 2 tipos de experimentos con aguas de mar natural y agua con 3,5% de sal (NaCl). Los resultados demuestran que la concentración de sal en los tubos de 10mL de agua marina y 10mL de caldo Asparagina en la prueba presuntiva de NMP/100mL, causa una inhibición en la producción de fluorescencia (negatividad) en esta diluciones, no así en las de 1 y 0,1mL. Por lo tanto, los resultados demuestran que la técnica de NMP/100mL de P~~A~~ no es recomendable en aguas marinas.

INTRODUCCION

La calidad sanitaria de las aguas de recreación han sido evaluadas, utilizando indicadores bacterianos empleados en las aguas de consumo humano. Los Coliformes totales (C.T), Coliformes fecales (C.F), Streptococcus fecales (E.F) en aguas o alimentos, indican, en mayor o menor grado, la presencia de contaminación fecal y, por ende, el riesgo

de adquirir alguna enfermedad intestinal al ingerir esas aguas. Sin embargo, estos indicadores tradicionales no permiten valorar los riesgos de enfermedades transmitidas por contacto, como las infecciones de piel, oídos, garganta y vías respiratorias. Debido a estas limitaciones, se ha propuesto a las especies: Pseudomonas aeruginosa (P~~A~~), Staphylococcus aureus (SA) y Candida albicans (CA), como indicadores complementarios para evaluar el riesgo de nadar en aguas contaminadas (1, 3, 5, 6, 7 y 8). P~~A~~ es un saprofito y se encuentra ampliamente difundido en los suelos, aguas superficiales y subterráneas, en los intestinos de los animales de sangre caliente y en plantas. Esta bacteria causa graves problemas por infecciones intrahospitalarias y se ha aislado de enfermedades de oídos, garganta, vías respiratorias, tracto urinario y piel. Diferentes autores la han reportado como la causante de enfermedades a bañistas (7 y 9). La cuantificación de P~~A~~ en agua se hace con las mismas técnicas de Filtración de Membrana (FM) y el Número más Probable/100 mL (NMP/100 mL) (1). Carson y colaboradores (3) y Highsmith (5), analizaron, por aparte, los factores que influyen en su detección y enumeración, por medio de la técnica del NMP/100 mL en aguas superficiales, aguas de bebida y aguas de desecho.

La técnica del NMP/100 mL consta de tres etapas: pruebas presuntivas, Confirmada y Completa. En el caso de la detección de

¹ Lic. en Microbiología del Laboratorio Central de A y A, Tres Ríos, Cartago, Costa Rica.

PA en la prueba presuntiva se utiliza el caldo Asparagina, y en la confirmada, caldo o agar acetamida.

La prueba presuntiva consiste en la inoculación de diferentes alicuotas del agua en estudio en el caldo Asparagina. En el caso de las alicuotas de 10 mL, ellas se deben inocular en tubos de 22X150 mm, con 10 mL de caldo Asparagina simple. La presencia o detección de fluorescencia, por medio de una lámpara ultravioleta, después de 48 horas de incubación a 35° C, indica la presunción de positividad por PA. Los tubos con fluorescencia son pasados a caldo Acetamida, e incubados a 35° C por 36 horas. La presencia de un color púrpura confirma la presencia de PA.

La edición 17 del "Standard Methods" (1), recomienda esta técnica para determinar la densidad de PA en las diferentes aguas; sin embargo, señala limitaciones en su uso en aguas de mar, sin aclarar cuáles son sus inconvenientes.

Por otro lado, en los estudios de aguas de playas realizados en nuestro Laboratorio, se observa que en las pruebas presuntivas de PA, los tubos con 10 mL de Asparagina concentrados, con inóculos de 10 mL de agua de mar, dieron negativas en más de un 61%, mientras que los tubos con alicuotas de 1 mL, de la misma agua dieron positivos en su gran mayoría. Ante esta incoherencia, se decidió realizar la presente investigación, con el objetivo de identificar cuál es el factor que inhibe el crecimiento de la bacteria en los tubos de 10 mL.

MATERIALES Y METODOS

Nuestra hipótesis es que la concentración de sales, principalmente cloruro de sodio (NaCl), en las alicuotas de 10 mL, provocan una dilución 1 en 2 en los tubos de 10 mL con medio Asparagina. Es decir, el contenido de NaCl del agua del mar se diluye el 50%. Si bien es cierto Robertson y colaboradores indican que PA es poco halofílico, estudios de sobrevivencia bacteriana en aguas de las costas de Israel (9), señalan que su tasa de decaimiento muy

inferior a cualquier otro indicador utilizado. Por otra parte, alicuotas de 1, 0.1 mL, etc., no causan ningún trastorno en la Prueba Presuntiva. Otros factores, como el pH y los metales pesados, podrían causar la interferencia mencionada.

En razón de lo anterior y con el objetivo de comprobar o desvirtuar dicha hipótesis, se realizaron los siguientes experimentos:

I Inoculación de PA en Aguas de Mar versus NMP/100mL.

1. Se prepararon patrones de Mc. Farland de PA (ATCC 27853), con un 3×10^8 bacterias.
2. Se determinó el pH, los cloruros y conductividad de las aguas del mar Caribe (fresca).
3. Se analizó el pH, cloruros y conductividad en el caldo Asparagina, concentrado y simple.
4. Se inoculó 20 litros de aguas de mar con 2mL del inóculo de Mc. Farland de PA.
5. Se realizó el NMP/100mL de PA con diluciones de 10 a 10⁻⁹. Las pruebas presuntivas se incubaron a 35° C por 24 horas.
6. Se observó la presencia de fluorescencia por medio de una lámpara de luz ultravioleta (Modelo UVL-56 y 115 Volts). Luego se pasaron 0.1 mL de los tubos positivos, con el objetivo de confirmar la presencia de PA. Los tubos negativos también fueron pasados, para corroborar la ausencia de la bacteria.
7. Este ensayo se realizó diez veces, con su debido control de agua sin sal (dulces).

II Inoculación de PA en agua "dulce", con 3.5% de NaCl.

1. Se preparó un litro de agua de nacimiento o pozo, con 35 gramos de NaCl (3,5%) estéril y se inoculó con 0.1 mL del patrón de PA, de 24 horas de crecimiento.
2. Se preparó un litro de agua sin NaCl,

como control o blanco, con la misma alícuota de la suspensión bacteriana.

- De ambos litros de agua se inocularon 30 tubos con caldo Asparagina, concentrado con 10 mL cada uno. Luego se incubaron a 35° C, por 48 horas. Posteriormente se observó la presencia o no de fluorescencia. Finalmente, de todos los 60 tubos (positivos y negativos), se pasó 0.1 mL de caldo Acetamida, para confirmar la presencia de PA.

III Análisis de Datos del NMP/100 de PA, en sedimentos y Aguas Marinas.

Previo a la realización de los experimentos, se muestreó, mensualmente, durante 1992, las aguas y sedimentos de las playas de la ciudad de Limón, con el afán de evaluar su calidad sanitaria; dentro de los indicadores estudiados estaba PA, CF, EF, y CA. Del total de las 120 y 115 muestras de agua y sedimento, respectivamente, se sacaron las lecturas de la prueba presuntiva que dieron interferencias.

Además, de un ensayo en una pecera de 75 litros -utilizada para otros fines diferentes a éste estudio- con agua de mar y sedimento, se anotaron las pruebas presuntivas con problemas.

RESULTADOS

De las 120 y 115 muestras de agua de mar y sedimento estudiadas, el 51% de las pruebas presuntivas, presentó interferencia o negatividad (fluorescencia) en las alícuotas de 10 mL, no en las porciones de 1 y 0.1 mL. Por el contrario, en los sedimentos sólo se observó una prueba presuntiva con problemas, es decir, un 0.87%. Lo mismo sucedió con las 31 y 23 muestras de agua y sedimento de la pecera. En este caso, el 61% de los NMP/100 mL tuvo problemas en las porciones de 10 mL de agua de mar, y solamente el 4% de las pruebas en los sedimentos mostró interferencias.

En el cuadro 2 se resumen los resultados de los experimentos de las aguas de mar,

inoculadas con PA. Los datos demuestran un 100% de interferencia en las pruebas presuntivas, del NMP de PA/100 mL, principalmente en las porciones de los tubos de 10 mL de agua, mientras que los controles (agua sin sal + PA) dieron todos positivos, lo que indica que no tenían interferencia en la prueba presuntiva (experimento 2).

Los resultados del experimento 2 se presentan en el cuadro 3. Aquí se resumen los promedios de pH, cloruros y conductividad de las aguas de mar, caldo Asparagina concentrado y simple, 50 mL de Asparagina + 50 mL de agua de mar (dilución 1 en 2), y 100 mL de Asparagina + 20 mL de agua (dilución 1 en 6).

Los resultados de los 60 tubos de caldo Asparagina (concentrado) -30 inoculados con aguas de manantial + 3.5% de NaCl + PA, y 30 con agua de manantial + PAU- se resumen en el cuadro 4. Además se anotan los datos de conductividad, pH y cloruros, en ambos tipos de aguas.

DISCUSION

La observación de las 120 pruebas de NMP/100 mL de PA en las aguas del mar Caribe, nos indica que en un 51% de los tubos conteniendo 10 mL de agua de mar no presentaban fluorescencia, por lo que fueron reportadas como negativas a las 48 horas de incubación. Por otro lado las diluciones de 1 y 0.1 mL se comportaron normalmente, es decir, la dilución mayor dió más tubos positivos que las de la dilución menor. En los 115 sedimentos estudiados, prácticamente no hubo resultados incoherentes. Esto se debe a que el procedimiento de siembra de NMP consiste en diluir 10 gramos de arena en 90 mL de agua destilada, y de esta suspensión se hace el NMP. Por esta razón no hay suficiente concentración de NaCl para afectar la producción de fluorescencia de PA.

Nuestra hipótesis se comprueba con los resultados de los experimentos 1 y 2. En el primero -a pesar de la presencia de PA- las

porciones de 10 mL de las aguas de mar presentan inhibición en la producción de fluorescencia por PA. En el experimento 2, las aguas con 3,5% de NaCl (semejante al agua de mar) más PA, dieron un 0% de fluorescencia; por el contrario, las diluciones de las aguas control dieron un 100% de positividad. Los pasajes de 0,1 mL de los tubos de Asparagina, negativos por fluorescencia, se pasaron al caldo Acetamida, y se incubaron a 35° C por 36 horas. Los resultados indican que, a pesar de la no presencia de fluorescencia en el caldo Asparagina, se confirmó el crecimiento de P A. Esto indica que la interferencia en la prueba presuntiva del NMP está en la producción de la fluorescencia y no en el crecimiento de la bacteria.

Estos simples experimentos demuestran que la concentración de sales en las aguas de mar, al diluir uno en dos en los tubos de Asparagina, inhiben que la bacteria produzca la fluorescencia, que sirve para decir si el tubo es positivo o no. Por otro lado, en los tubos de 5 mL de caldo asparagina simple, al agregar una alícuota de 1, 0,1 o menos, la concentración de NaCl de diluye 1 en 6, para la alícuota de 1 mL. La concentración de NaCl, en estos tubos, permite el crecimiento y la producción de la fluorescencia de PA. Con base en lo anterior, no extraña obtener resultados negativos en las porciones de 10 mL, con positividad en las diluciones de 1 y 0,1 mL. El factor de pH se descarta como interferencia, debido a que las diluciones del agua del mar con el medio de cultivo, bajan en pH de 8:10 a 7, lo cual favorece el crecimiento de las bacterias.

En conclusión, se demuestra que la PA es afectada en la producción de fluorescencia y el pigmento prosanina, cuando se encuentra en aguas con concentraciones de sal, parecidas al agua de mar. Esto nos permite especular que la PA es deficiente en factores osmoprotectores, como la Glicina-Betaina, la cual protege más a la E. coli de este factor (NaCl) en el agua marina (4). Por lo tanto, la técnica de NMP/100 mL de PA no es un instrumento confiable para detectar su presencia en aguas de mar, pero si la recomendamos en muestras de sedimento,

debido a que la concentración de sal es mucho menor que el agua marina

CUADRO No 1
RESUMEN DE PRUEBAS PRESUNTIVAS DE PA CON INTERFERENCIAS
EN AGUAS MARINAS Y SUS RESPECTIVOS SEDIMENTOS

No. Muestra	Prueba Presuntiva en Series de Tres Tubos					
	Diluciones		Aguas	Diluciones		Sedimentos
	10	1	0.1	10	1	0.1
1	0	3	1	0	0	0
2	0	0	1	0	0	0
3	0	3	1	0	0	0
4	0	1	0	0	0	0
5	0	1	0	1	0	0
6	0	1	0	0	0	0
7	0	0	1	0	0	1
8	0	0	1	0	0	0
9	0	0	1	0	0	0
10	0	1	0	0	0	0
11	0	0	2	3	2	1
12	0	1	1	2	0	0
13	0	2	1	1	0	0
14	0	2	1	2	0	0
15	0	2	0	1	0	0
16	0	2	2	3	0	0
17	0	3	1	3	3	0
18	0	3	2	3	1	0
19	0	2	3	3	3	2
20	0	3	3	3	3	3
21	0	0	2	3	3	2
22	0	1	1	3	0	0
23	0	3	3	2	1	0
24	0	1	1	3	0	0
25	0	1	0	3	3	0
26	0	1	1	2	1	0
27	0	1	0	3	0	0
28	0	2	0	0	0	0
29	1	3	0	3	3	0
30	1	2	3	3	3	0
31	0	1	1	3	3	2
32	0	2	1	0	1	0
33	0	1	1	3	1	0
34	0	1	0	1	0	0
35	0	1	0	2	0	1
36	0	1	1	2	0	1
37	0	1	0	3	1	0
38	0	2	0	3	1	1
39	0	1	0	3	1	0
40	0	3	3	0	0	3
41	0	2	1	2	0	0
42	0	2	1	2	1	0
43	0	2	3	3	1	0
44	0	2	1	1	2	1
45	0	2	1	3	1	0
46	1	2	2	3	2	1
47	0	0	1	3	3	3
48	0	0	1	2	3	3

No. Muestra	Prueba Presuntiva en Series de Tres Tubos					
	Diluciones		Aguas	Diluciones		Sedimentos
	10	1	0.1	10	1	0.1
49	0	1	0	2	2	2
50	0	1	0	3	3	2
51	0	1	0	3	3	0
52	0	1	0	2	0	0
53	0	1	0	3	3	0
54	0	2	0	1	1	0
55	0	0	1	0	0	0
56	0	1	0	0	0	0
57	0	0	2	0	0	0
58	0	1	1	0	0	0
59	0	2	0	0	0	0

NOTA: El total de muestras analizadas fue de 120 y 115 para agua y sedimento, respectivamente. El promedio del NMP con interferencia en el tubo de 10 cc de Caldo Asparagina, es de 51%, y 0,87 para sedimentos.

CUADRO No. 2
RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS
DE INOCULACION DE AGUAS DE MAR CON PA

No. Ensayos	Aguas de Mar + PA			Agua Dulce (Control) + PA		
	Diluciones			Diluciones		
	10	1	0.1	10	1	0.1
1	1	3	3	3	3	3
2	0	3	0	3	3	0
3	1	3	3	3	3	3
4	2	3	3	3	3	3
5	1	3	3	3	3	3
6	0	3	3	3	3	3
7	0	3	3	3	3	3
8	2	3	3	3	3	3
9	0	3	3	3	3	3
10	2	3	3	3	3	3

CUADRO No. 3
RESULTADOS DE pH, CLORUROS Y CONDUCTIVIDAD
DE LAS DILUCIONES DE AGUA DE MAR CON EL
CALDO ASPARAGINA

DILUCION	pH	CLORUROS *	CONDUCTIVIDAD **
Agua de Mar	8,10	14620	37000
Asparagina concentrada		0	
Asparagina (simple)		0	
50cc Asp+50 Agua de Mar	7,01	7550	20000
100cc Asp+20 Agua de Mar	7,10	2532	8100

MILIGRAMOS POR LITRO *
MS/cm **

CUADRO No. 4
RESULTADOS DEL AGUA CON NaCL
A 35° C Y PA

PRUEBAS	AGUA CON 3,5 DE NaCL + PA	AGUA + PA
Conductividad MS/cm	44000	185
pH	8,03	7,79
Cloruros	19000	10
Tubos de 10cc Asp* % Positividad de los tubos de Asp (48 horas)	0	100 %

Asp: Caldo Asparagina

NOTA: El número de tubos de Asparagina (concentrada) inoculados cono aguas + PA, fue de 30.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo se llevó a cabo con las colaboraciones de la *Dra. Ana V. Mata, Gabriela Catarinella, Manuel Sanabria, Moisés Coto, Felipe Portuguez y la Srta. Ileana Garbanzo.*

REFERENCIAS

- 1- APHA, AWWA, WPCF, 1989. Standar Methods of Examination of Water and Wastewater. Washington D.C., Pag. 9-49 a 9-55.
- 2- Cabelli V. J. et al. 1983. A Marine Recreational Water Quality. Criterios Consistent with Concepts and Risk Analysis Journal of Water Pollution Control Federation, 55 (10) pag. 1306 - 1314.
- 3- Carson L. A., Petersen N. J., Favero M. S., Doto I. L., 1975. Factors Influencing Detection and Enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* by Most-Probable-Number and Membrane Filtration Techniques. Applied Microbiology, Vol. 30, No. 6, pag. 935 - 942.
- 4- Ghoul Mostefa, et al., 1990. Evidence that *Escherichia coli* Accumales Glycine Betaine from Marine Sediments. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 52, No. 2, pag. 551-554.
- 5- Hingstmith Anita K. and Abshirs Robert L. 1975. Evaluation of a Most-Probable-Number Technique for Enumeration de *Pseudomonas aeruginosa*. Applied Microbiology, Vol. 30, No. 4. pag. 596-601.
- 6- Hoadley A. W., Ajello Gloria and Masterson Nola, 1974. Preliminary Studies of Fluorescent *Pseudomonas* Capable of Growth al 41 C in Swimming PoolWaters. Applied Microbiology, Vol. 29, No. 4, pag. 527-551.
- 7- Robertson W. J. and Tobin R. S., 1983. The Relationship Between three Potential Pathogens and

Pollution Indicator Organisms in Nova Scotian Coastal Waters. Can J. Microbiol. Vol. 29, pag. 1261-1209.

8- Purer and Sicilia Golderman, Yona Yoshpe, 1987. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in Israeli. Coastal Water, Vol. 53, No. 5, pag. 1138-1141.

9- Seyfried Patricia L. and Fraser David J., 1980. Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in Chlorinated Swimming pool Can J. Microbiol, Vol, 26, pag. 350-355.