

Evaluación comparativa de métodos fluorogénicos y cromogénicos para el recuento de bacterias coliformes y de *Escherichia coli* en el río Salado (Santa Fe, Argentina)

Emiliani, Federico; Lajmanovich, Rafael; Bonetto, Susana Mónica;
Acosta, María Alejandra

Instituto Nacional de Limnología (INALI, CONICET) J Maciá 1933, 3016 Santo Tomé (Santa Fe), Argentina, Telefax 54-342-4750394. E-mail: inali@arcrde.edu.ar

Cátedra de Microbiología Ambiental, Fac. Ing. y Cienc. Hídricas (UNL), CC217, 3000 Sta. Fe. Telefax: 54-342-571143

RESUMEN: Se evaluaron comparativamente tres medios de cultivo comerciales que contienen indicadores para detectar la actividad β -D-glucuronidasa, en relación con su capacidad para el recuento de *Escherichia coli*: X-GLUC "Chromocult" (CC), MUG "Fluorocult" (FC) y BCIG "Petrifilm EC" (PEC). Los resultados de 24 muestras de aguas recreativas analizadas con el test de Wilcoxon/Mann-Whitney no demostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en el recuento de *E. coli* con esos medios. Sin embargo, con el FC el recuento de *E. coli* fue mayor en el 58,1% de las muestras (con respecto al PEC y al CC). Por otra parte, se comparó el FC y CC versus el método usual con el caldo Mac Conkey para el recuento de coliformes termotolerantes ($44,5 \pm 0,21^\circ\text{C}$), los recuentos resultaron equivalentes siempre que el tiempo de incubación no superara las 24 h. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el recuento de coliformes totales ($36 \pm 0,5^\circ\text{C}$) realizado con FC y MC. Eso puede ser debido al mayor número de cepas GAL+ no fermentadoras que se pueden desarrollar a 36°C . El coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman resultó significativo en todas las comparaciones realizadas.

SUMMARY: COMPARATIVE EVALUATION OF FLUOROGENIC AND CHROMOGENIC METHODS FOR ENUMERATING COLIFORM BACTERIA AND ESCHERICHIA COLI IN THE SALADO RIVER (SANTA FE). Emiliani, Federico; Lajmanovich, Rafael; Bonetto, Susana Mónica; Acosta, María Alejandra. Three commercially available culture-media containing chromogenic and fluorogenic indicator for β -D-glucuronidase activity were compared for enumerating *Escherichia coli*: X-GLUC Chromocult (CC), MUG Fluorocult (FC) and BCIG Petrifilm EC (PEC). Wilcoxon/Mann-Whitney test of data from 24 recreational water samples did not demonstrate any statistically significant differences ($p > 0.05$) in the enumeration *E. coli* with these media. Although, the FC recovered more *E. coli* than CC and PEC (58.1% of the samples). The comparison of yields of thermotolerant coliforms ($44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$) by using CC and FC with an usual Mac Conkey Broth (MC) gas fermentation method, showed that the FC and CC was equivalent to currently used test, if the incubation time does not overcome 24 h. There was a statistically significant difference between FC and MC for the detection of total coliforms ($36 \pm 0.5^\circ\text{C}$). The disagreement could be attributed to the larger number of anaerogenic GAL-positive strains that can develop at 36°C . Significant Spearman's rank correlations was found between new methods versus conventional ones, and between themselves.

Introducción

El interés por los coliformes, y por *Escherichia coli* en particular, como indicadores de la calidad bacteriológica del agua ha motivado el desarrollo de nuevos medios de cultivo para su detección. Estos contienen derivados de azúcares que, al escindirise por la actividad enzimática, producen fluorescencia o un determinado color (soluble o insoluble) (1-3). Actualmente, varias empresas comerciales han difundido esta llamada "tecnología de sustratos definidos" o métodos de detección enzimática, como alternativa de los métodos clásicos para enumerar grupos o especies en poblaciones heterogéneas de bacterias.

Por lo general, en los métodos nuevos, el recuento de coliformes totales (CT) y termotolerantes

(CTe) se basa en la detección de β -D-galactosidasa (GAL). Esta enzima actúa sobre sustratos como el 5-Bromo 6-dicloro-3-indoxyl- β -D-galactopiranosido (X-GAL), produciendo una coloración azul-verdosa. Otros sustratos utilizados (4) son el o-nitro-fenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), el p-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (PNPG), el 4-metilumbelliferil- β -D-galactopiranosido (MUGA), etc. En cambio, el recuento de *E. coli* se basa en la detección de la actividad de la β -D-glucuronidasa (GUR). Para ello, en medio de cultivos líquidos se agregan sustratos como el 4-metilumbelliferil- β -D-glucuronido (MUG) que es hidrolizado por la enzima específica resultando un producto final fluorescente (metilumbelliferona) a la luz ultravioleta (5). En medios sólidos también se ha utilizado (con o sin filtros membrana) el MUG, el indoxil- β -D-glucuronido

(X-GLUC) y, más frecuentemente, el 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β glucuronido (BCIG) el cual, por acción de la GUR produce un precipitado azul oscuro (que colorea las colonias de *E. coli*) (6,7).

Los métodos (cromogénicos o fluorogénicos) tienen reconocidas ventajas como, por ej., la simplicidad y la rapidez. Sin embargo, se han detectado, en un variado porcentaje, falsos positivos y falsos negativos (7-11); por supuesto, los métodos clásicos no están exentos de esos problemas (12-14). En su revisión, Gleeson y Gray (15) concluyen que, dado a que la performance entre los diferentes medios puede diferir con el origen del agua, se deberían hacer ensayos comparativos para identificar el o los más convenientes para un recurso acuático específico. Igualmente, una comisión de la Unión Europea (*Measurements & Testing Project* -16) demostró que no existe un método único, aplicable a todo tipo de aguas, que produzca resultados homogéneos.

Se han publicado numerosos ensayos comparativos entre varias alternativas propuestas (ver, p. ej., las revisiones de Gleeson y Gray -15-, Lee *et al.*, -17), en alimentos (8,18), en aguas potables (5,19,20) y en aguas naturales (21-25); y, principalmente, en relación a los métodos por filtración con membrana del *Standard Methods* (26). Para la vigilancia de la calidad bacteriológica de balnearios de agua dulce, nuestro país ha adoptado preferentemente métodos europeos (27) basados en las pruebas de fermentación de lactosa y producción de ácido en tubos múltiples y en el caldo MacConkey -en adelante: MC-. Quizás debido a que esta variante no fue incluida en los métodos estándares de la APHA, son relativamente pocas las comparaciones publicadas utilizando este caldo (28,29); en nuestro país, no encontramos trabajos publicados al respecto, excepto en aguas potables (30).

En el muestreo rutinario de las aguas para uso recreativo, también en nuestro país los métodos presuntivos -confirmativos, posiblemente, serán reemplazados en breve plazo por los métodos de detección enzimática, por las ventajas antedichas. Por lo tanto, creímos conveniente iniciar una serie de ensayos para comprobar si brindan resultados similares. Esto es particularmente importante pues los estándares vigentes para la vigilancia de aguas recreativas se basan en las tecnologías anteriores. En este trabajo, nuestro objetivo fue comparar los índices del NMP de CT y CTe obtenidos con el caldo

MC vs Fluorocult (en adelante: FC). También nos propusimos comparar las concentraciones de las UFC obtenidas en sustratos cromógenos (*Chromocult*- en adelante: CC- con las UFC obtenidas en Petrifilm EC - en adelante: PEC, como así también con el índice del NMP de *E. coli* obtenido usando sustratos fluorógenos (FC).

En un trabajo anterior (31) comparamos las UFC de CTe obtenidas con PEC, *versus* el NMP con el medio MC. No hemos encontrado antecedentes publicados sobre el uso del CC y del PEC para el recuento de *E. coli* termotolerantes en aguas recreativas, por lo que sería la primera contribución al respecto.

Material y Métodos

Muestreos y análisis a campo

Los muestreos se realizaron durante los meses de verano 1998-1999 en el balneario Brig. López, situado en la ribera derecha del río Salado (Santo Tomé, Santa Fe; 31° 39' 59" Latitud Sur y 60° 45' 20" Longitud Oeste). Los caudales medios mensuales, medidos cerca de la localidad de Esperanza (Sta. Fe), varían entre 64 y 158 m³/s; la superficie total de la cuenca es de 247.000 km² (INCYTH, com. pers.). Aguas arriba de este balneario se vierten aguas residuales municipales y de industrias agropecuarias (32) que inciden (según factores climáticos e hidrológicos) sobre su calidad bacteriológica y, por consiguiente, en su aceptabilidad como balneario (33).

Las muestras de agua superficial se recolectaron entre 15-30 cm de profundidad, cerca de las boyas que delimitan la zona balnearia y que generalmente se sitúan distantes, aproximadamente, a 1,20 m del fondo. Se utilizaron frascos de vidrio estériles (*Simax*), de 500 ml de capacidad. Las muestras se mantuvieron en una conservadora con refrigerante *FriopaQ* (en bolsitas) hasta su análisis, el que fue completado dentro de las dos horas de su recolección (dada la cercanía del INALI al lugar de muestreo).

En cada muestreo se midió *in situ* la transparencia (disco de Secchi), pH (modelo B213 Twin, de Horiba, con reproducibilidad de $\pm 0,1$ pH), conductividad (B173 Twin, de Horiba, de $\pm 1\%$), el mismo instrumento calcula la salinidad a partir de

la conductividad; temperatura y oxígeno disuelto (ambos con el modelo D-25 de Horiba, reproducibilidad: $\pm 0,5\%$). El nivel hidrométrico se leyó en la escala existente en el INALI.

Para calcular el déficit de oxígeno se restó el porcentaje de saturación de 100. Para calcular el porcentaje de saturación se usaron las tablas generadas por las ecuaciones de Weiss y publicadas por la US Geological Survey -34). Las concentraciones de oxígeno se corrigieron por el factor de salinidad.

Análisis microbiológicos

En la Tabla 1 se transcriben los medios y las variables medidas. Para el recuento de CT se utilizó el método del NMP descrito en el manual de la OMS (27), usando la solución de Ringer 1/4 como diluyente, cinco tubos por dilución, incubando durante 48 ± 3 h a $36 \pm 0,5$ °C, y usando los medios MC y FC (Tabla 1). En el primero, se consideran positivos los tubos con formación de gas (fermentación de la lactosa) y ácido (viraje al amarillo del indicador púrpura de bromocresol). En el se-

Tabla 1. Medios, métodos de recuento y variables medidas (En la dirección de INTERNET indicada al pie del cuadro, se puede recabar detalles de composición, uso e interpretación de los resultados)

Nombre comercial	Empresa	Fluorógeno o cromógeno	Método	Variables medidas
Mac Conkey	Merck *	ninguno	MP	CT y C Te
Fluorocult™	Merck	MUG y X-GAL	NMP	CT, C Te y E. coli
Chromocult™	Merck	X-GLUC y Salmon-GAL	UFCC Te y E coli	C Te y E coli
Petriofilm™	3M**	BCIG	UFC	E coli

(*) E. Merck AG (Darmstadt, Alemania)

http://www.merck.de/english/services/labor/1_uba/emibio/efluoro.htm

(**) 3M Co., St. Paul, MN, EE UU)

http://www.mmm.com/US/mfg_industrial/microbiology/home/products/petriefilm/petripod/ecoli/intguide.htm

gundo, la coloración azul-verdosa que denota la actividad de la GAL. Para el cálculo del NMP y de los límites de confianza al 95 %, se usó el programa *MPN Calculator* (v. 4.0, 1996) de la US EPA (35).

Para el recuento de CTe se usaron los mismos medios de cultivo y técnicas que las citadas anteriormente (Tabla 1), pero incubados en baño termostático a $44,5 \pm 0,2$ °C. (*Precision Warbug*, de Precision Scientific) durante 24 ± 2 h, anotando también las lecturas a las 48 h. Los tubos con MC fueron sembrados repicando los tubos MC que resultaron positivos a 36° C, mientras que el FC (y los demás medios) fueron sembrados directamente a partir de la muestra y sus diluciones (36).

El medio agarizado CC, se usó mezclando un ml de muestra con 10 ml de medio, en una caja de Petri de plástico estéril (cinco repeticiones). Luego, las cajas eran envueltas con un film adherente (*Spontex*) y se introducían, cada una, en una bolsita de plástico estéril (*Whril-Pack*, de Nasco). El conjunto, en el baño termostático, manteniéndolas

sumergidas entre los separadores de una gradilla de acero inoxidable, incluyendo pesas. En ensayos preliminares, se probaron otras alternativas de uso del CC (filtración por membrana y siembra en superficie). Tales alternativas se desecharon por el excesivo desarrollo bacteriano que prometía interferir las lecturas y su interpretación. Para el recuento, se consideraron coliformes termotolerantes las colonias de color salmón a rojas, más las azules o violetas.

Para el recuento de *E. coli* se usó FC y CC, con cinco repeticiones e incubación a $44,5$ °C $\pm 0,2$ °C durante 24 h. En el primero, se consideraron positivos los tubos con fluorescencia celeste bajo luz UV de onda larga (366 nm) y que, al agregar unas gotas del reactivo del indol (según Kovacs, Merck), mostraban una coloración rojo cereza sobre la superficie del medio (al cabo de un minuto). En el segundo, se consideraron *E. coli* las colonias azules o violetas que, al cubrir las con una gota del reactivo del indol, mostraban una coloración rojo cereza.

Para el recuento de *E. coli* también se usó PEC, según detalles operativos publicados en un trabajo anterior (31). En resumen, se agregaba un ml de muestra a cada placa de *Petrifilm*, se cubría con el film y se la distribuía con el aplicador. Cada placa se envolvía con papel absorbente (*Multicorte Scott*) y, el conjunto de repeticiones, se introducía en una bolsa de plástico estéril a prueba de agua. Se incubaron a la misma temperatura y sumergidas en el mismo baño termostático mencionado anteriormente, y durante el mismo tiempo. Se computaron como *E. coli* las colonias azules con una burbuja de gas (fermentación de la lactosa).

Para confirmar la identificación de *E. coli*, se utilizó el sistema API 20E (*bioMérieux*, Marcy l'Etoile, Francia) y el software APILAB plus versión 3.3.3 (1998) de la misma empresa. Cada tira incluye 20 reacciones bioquímicas (ONPG, arginina dihidrolasa; descarboxilasa de lisina y ornitina; triptófano desaminasa; producción de indol y sulfhídrico; Voges Proskauer; utilización de citrato, urea y gelatina; producción de ácido a partir de glucosa, manitol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melibiosa, amigdalina y arabinosa; además, se puede leer la reducción de nitratos a nitritos y la producción de oxidasa. El aislamiento previo y siembra de los microtubos se realizó de acuerdo a lo sugerido por Benson (37), Murray (38) y a las técnicas clásicas de separación y aislamiento por el método de agotamiento sobre la superficie de medios sólidos (37). En resumen, se realizaron estrías sobre el medio EMB (Merck), las colonias típicas y bien separadas fueron tres veces purificadas por dilución y por estrías sobre el mismo medio y, finalmente, se desarrollaron y mantuvieron en Agar nutritivo n° 2 (*Oxoid*, Basingstoke, Inglaterra). Se realizó una suspensión en 5ml del *Suspension Medium* (*bioMérieux*) y con una micropipeta automática se sembraron los microtubos del sistema API. Las lecturas se realizaron entre las 18 - 24 h, a 36 °C, utilizándose el kit de reactivos y la tabla de lectura (ambos de *bioMérieux*). En total, se realizaron 90 tipificaciones. Para detectar falsos negativos, se realizaron 20 aislamientos de cada medio. Los resultados destinados a cuantificar la diversidad de fenotipos bioquímicos de *E. coli* y otras bacterias termotolerantes (en este ambiente y de otros cinco ambientes acuáticos de la cuenca del río Paraná), se dan a conocer en otro artículo (39).

Análisis estadístico

Para comparar los recuentos de UFC vs NMP algunos autores (6, 31, 40, 41) asumen una distribución normal y una varianza homogénea y calculan el coeficiente de Pearson y/o analizan si las diferencias entre las medias son significativas (42). En nuestro caso, dado el número relativamente bajo de muestras por tratamiento y la no distribución normal, los datos se procesaron utilizando métodos no paramétricos, según lo aconsejado por Kehr (43). Para el test de normalidad se utilizó el *GraphPad InStat™*, versión 3.0 (1998) de *GraphPad Soft.* (que utiliza la aproximación de Dalla y Wilkinson al método de Lilliefors, que es una modificación al método original de Kolmogorov - Smirnov). Las pruebas no paramétricas, en general, parten de la premisa que las observaciones bivariadas son mutuamente independientes, proviniendo cada una de la misma población continua (44). Como medida de la tendencia central se usó la mediana y como medida de dispersión se calculó el rango semi-intercuartílico (45). Dado que por razones de infraestructura la mayor parte de los ensayos de hicieron comparando dos alternativas por vez, para saber si las diferencias entre las medianas, obtenidas entre las diversas metodologías, difería significativamente de cero, se utilizó el test *W* de *Wilcoxon / Mann-Whitney* de dos colas (45) para dos muestras. Para estimar si los valores obtenidos estuvieron asociados, se calculó el coeficiente no paramétrico de *Spearman* (r_s). Para los cálculos, se usó el programa *StatGraphics™ plus*, versión 4.0 (1998) para entorno *Windows*.

El problema de comparar los recuentos realizados por el método del NMP con aquellos realizados por el método de las UFC - problema detallado y explicado por *Geldreich et al.*, 46 - reside en las limitaciones del primero; es decir, en su falta de precisión. El mismo autor (46), y posteriormente otros (por ejemplo: 6, 31, 40), demostraban si había concordancia entre ambos métodos en el caso de que los recuentos UFC se situaban dentro de los límites superior e inferior de confianza (al 95%) del NMP. Cada recuento UFC situado fuera de los límites de confianza se considera diferente, en forma significativa, del recuento por NMP. (Posteriormente, se puede utilizar el test de los signos para comparar el número de recuentos superiores e inferiores al índice NMP, - 31). Dada la falta de precisión

del NMP, mencionada anteriormente, la comparación convencional entre los métodos NMP y UFC puede no ser apropiada; por consiguiente, también comparamos los recuentos UFC (PEC y CC) con los límites de confianza del NMP (FC). Para graficar los resultados, se usó el *SlideWrite™ plus v. 4.2* (1999) de *Advanced Graphic Soft.* para entorno *Windows*.

Resultados y Discusión

Características físicas, químicas y microbiológicas

La composición química del río Salado durante el período de muestreo, se caracterizó, justamente, por su relativamente elevada salinidad (Tabla 2).

Tabla 2. Características abióticas del ambiente muestreado (n = 24)

	mediana	mínimo	máximo	RSI (*)
Temperatura (1C)	25,5	23,0	31,0	1,2
Deficiencia de O ₂ (en %)	23,0	4,2	53,0	8,7
Conductividad (μS/cm)	1790	840	3800	616
Salinidad (%)	0,09	0,04	0,24	0,02
pH	8,0	7,0	8,3	0,2
Transparencia(Secchi, cm)	13,3	8,0	19,0	2,8
Nivel hidrométrico (m)	4,4	3,2	5,6	0,9
Lluvias (mm)	11	1	60	13,5

(*) Rango semi-intercuartílico

No obstante, se registraron algunos valores bajos (cerca de 800 μS/cm) posiblemente por la intrusión del río Santa Fe (cuya conductividad suele oscilar entre 100-600 μS/cm, según el nivel hidrométrico). Durante toda la temporada de habilitación de la zona balnearia se registraron, en el pluviómetro del INALI, 364 mm de lluvia, de los cuales 219 se registraron en solo tres días (de diferentes meses). El caudal, siendo el Nh = 4 y la velocidad de corriente 0,39 m/s, resultó alrededor de 50 m³/s. Las concentraciones más bajas de oxígeno (4 - 5 mg O₂/l) se detectaron *a posteriori* de lluvias importantes (> de 50 mm) y luego de períodos secos (> 20 días) y bajos niveles hidrométricos (Nh < 4). Los extremos inferior y superior registrados del pH (7,00 - 8,24) se mantuvieron dentro del rango recomendado (pH 6,0 - 9,0) por la Unión Europea (UE) (47), o por las "guidelines" de Alberta -Canadá- (pH 6,5 - 8,5) para el uso recreativo del agua (48). En cambio, el porcentaje de saturación de oxígeno fue, en el 50% de los muestreos, inferior al porcentaje mínimo recomendado por la UE: 80% -

120% (47). Tampoco hubiese cumplimentado los estándares de Alberta, que requieren, en cualquier muestreo, > 5 mg O₂/l (48).

Con cualquier alternativa metodológica, las concentraciones de CT y de CTe resultaron altas, especialmente con los sustratos FC y CC (Tabla 3) y en relación con los límites máximos establecidos por la UE (≤10.000 CT/100 ml y ≤ 2.000 CTe/100 ml) (47) y, más aún, si se consideran estándares menos permisivos como los de Alberta (48). Si las concentraciones de *E. coli* se las compara con las 200 *E. coli* /100 ml aconsejadas por la Manitoba Environment (*Water Quality Management Section*) (49) o por la US EPA (≤126 *E. coli* /100 ml) (50), se pueden considerar elevadas; sin embargo, hasta el momento no existe uniformidad de criterio en cuanto a los valores máximos permisibles. Van desde las concentraciones más bajas recién citadas hasta igualar a los estándares para coliformes termotolerantes (16,51): 2.000 *E. coli* / 100 ml.

Tabla 3. Concentraciones de coliformes totales (CT), termotolerantes (CTe) y de *Escherichia coli* según diversos sustratos: MC (*Mac Conkey*), FC (*Fluorocult*, con X-GAL y MUG), CC (*Chromocult*, con S-GAL y X-GLUC) y PEC (*Petrifilm*, con BCIG). Número de muestras (n) = 24, excepto PEC, n = 14)

		CT	CTe	E. coli
MC(*)	mediana	8000	900	-
	mínimo	2300	40	-
	máximo	50000	11000	-
	RSI (***)	5000	1000	-
FC(*)	mediana	22000	1430	500
	mínimo	5000	110	70
	máximo	90000	9100	3000
	RSI	6500	748	1775
CC(**)	mediana	-	1820	416
	mínimo	-	77	66
	máximo	-	7360	2300
	RSI	-	1028	506
PEC(**)	mediana	-	-	260
	mínimo	-	-	100
	máximo	-	-	1300
	RSI	-	-	465

(*) NMP / 100 ml

(**) UFC / 100 ml

(***) Rango semi-intercuartílico

— No se determinó

Comparación entre las concentraciones de CT y CTe en función de las alternativas metodológicas

Las medianas de los recuentos de CT realizados con FC y MC difirieron significativamente (Tabla 4), aunque los valores estuvieron asociados (Tabla 5). El mayor número obtenido con FC pudo haberse debido, por lo menos en parte, a los denominados "falsos positivos", es decir, a cepas de especies bacterianas que no están típicamente incluidas en el grupo coliforme. Entre éstas se han citado, por ejemplo (19, 52-54), las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Flavobacterium*, *Hafnia*, *Yersinia* y *Vibrio*, con cepas GAL+. Incluso, se encontró la actividad galactosidasa en bacterias viables no cultivables

(55), en algas (56), y en detrito marino (57). De los géneros mencionados, en el río Salado se aislaron frecuentemente los tres primeros (39). Covert *et al.* (52) sugieren confirmar los resultados GAL+ en caldo lactosado si los resultados fueron leídos después de las 30 h de incubación. Nosotros comprobamos la existencia de GAL+ no fermentadores agregando una campanita de Durham en el mismo medio FC: al comparar los resultados del MC solamente con el NMP de fermentadores en FC, las medianas no difirieron ($p = 0,940$, $n = 21$).

Con respecto a las concentraciones de CTe obtenidas con diferentes medios de cultivo (MC, FC y CC), sus medianas no difirieron significativamente (Tabla 4) y los valores estuvieron asociados (Tabla 5). Comprobamos, sin embargo, que si el tiempo

Tabla 4. Significancia de las diferencias entre las medianas de los recuentos de coliformes totales, termotolerantes y *E. coli* en los medios Mac Conkey (MC), Fluorocult (FC), Chromocult (CC) y Petrifilm EC (PEC) según el test W de Wilcoxon/Mann Withney. (n = 24, excepto para PEC, n = 14). Técnicas de recuento y unidades de medida igual que en la tabla anterior.

Coliformes totales

		MC
FC	W	18
	p	0,050

Coliformes termotolerantes

		MC	FC
CC	W	183	200
	p	0,248	0,171
FC	W	274	
	p	0,991	

Escherichia coli

		MC	FC
CC	W	108	279
	p	0,662	0,391
FC	W	59	
	p	0,947	

Tabla 5. Coeficientes de correlación (no paramétricos) de Spearman (r_s), entre los recuentos realizados con las diversas alternativas metodológicas (las mismas abreviaturas y demás aclaraciones que en la Tabla 3)

Coliformes totales

		MC
FC	r_s	0,802
	p	0,023

Coliformes termotolerantes

		MC	FC
CC	r_s	0,941	0,885
	p	0,00001	0,0001
FC	r_s	0,862	
	p	0,0001	

Escherichia coli

		PEC	FC
CC	r_s	0,988	0,968
	p	0,004	0,0001
FC	r_s	0,933	
	p	0,003	

de incubación del medio CC se prolongaba hasta las 48 h, el número obtenido superaba al de las 24 h en un 123% y las diferencias resultaban significativas con respecto al MC ($p = 0,041$, $n = 20$). Si bien las concentraciones obtenidas con el FC incubando por más de 24 h no llegaron a ser estadísticamente significativas con respecto al MC, el NMP fue un 135% mayor.

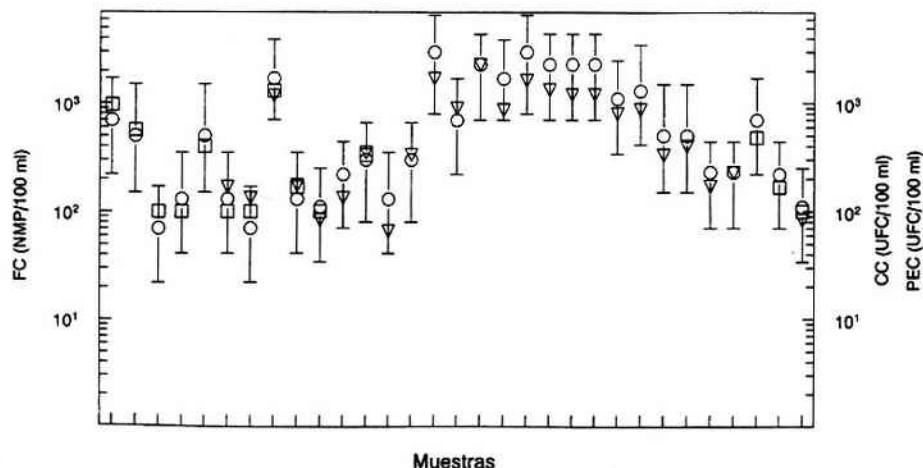
Si se comparan los precios de los medios de cultivo, la ventaja del método clásico (con el caldo MacConkey) radica en su menor costo ($MC < CC < FC$). Su gran desventaja es el tiempo necesario para obtener los resultados de C Te (72 horas vs. 24 h) ($MC > FC = CC$) y, por otra parte, no brinda información sobre el número de *Escherichia coli*.

Comparación entre sustratos cromogénicos y fluorogénicos para la detección de *E. coli*

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de los recuentos de *E. coli* obtenidos con los tres

sustratos (Tabla 4). Por otra parte, como muestra la Figura 1, el 100% de los recuentos CC y PEC estuvieron dentro de los intervalos de confianza al 95% del NMP (FC). Tampoco influyó significativamente ($p = 0,999$, $n = 14$) si el tiempo de incubación se prolongaba de 24 a 48 h, sea $44,5^{\circ}\text{C}$ o a 36°C ($p = 0,831$, $n = 14$). Por lo tanto, no se justifica, a los fines del monitoreo de aguas recreacionales, incubar más de 24 horas (a cualquiera de las dos temperaturas y con cualquiera de los tres métodos). A veces, sin embargo, en los tubos con las mayores diluciones, la observación de la fluorescencia (en FC) era más nítida después de las 24 h. En el caso del CC, las colonias GAL + y las no coliformes, que se desarrollan después de ese lapso, pueden entorpecer los recuentos de *E. coli* y, a veces, la nítida diferenciación de los colores. Esto lo comprobamos más frecuentemente en las incubaciones a 36°C . Este inconveniente posiblemente se puede subsanar agregando cefsulodin (58), pero la técnica se complica y encarece.

Figura 1. Representación del \log_{10} del índice del NMP/100ml (○) de *E. coli* de recuentos con *Fluorocult*™ (FC).



Las barras indican los límites de confianza superior e inferior (al 95%). El símbolo □ indica la ubicación del valor del recuento (UFC/100ml) obtenido con las placas *Petrifilm*™ (PEC) y, el símbolo ▽, el valor correspondiente al *Chromocult*™ (CC), UFC/100 ml.

Como se sabe (15), la incubación a 44,5 °C se usa para diferenciar, del grupo coliforme, los termotolerantes (entre ellos, *E. coli*) los cuales se los considera, en países no tropicales, de origen fecal. Incluso con los nuevos métodos puede ser importante incubar a 44,5 °C para el recuento de *E. coli* de origen fecal, pues la producción de GUR es temperatura dependiente (baja a 37°C y alta a 44,5° C), tal como encontraron Chang *et al.* (9) en muestras de materia fecal humana. En el río Salado no detectamos diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,257$, $n = 14$), entre los recuentos realizados a 36 °C vs los realizados a 44,5 °C, por lo

que suponemos que las cepas de *E. coli* en este río son mayormente termotolerantes. Las temperaturas del río Salado fueron relativamente elevadas (Tabla 2); por eso, quizás, el test de alta temperatura no haya sido muy selectivo, tal como se encontró en países tropicales (59-61). De todas formas, las incubaciones a 44,5 °C inhibe muchos microorganismos acompañantes lo cual facilita la lectura y previene eventuales interferencias en el desarrollo de las colonias de *E. coli* (31,54). En este ensayo no detectamos falsos positivos (en ningún medio); en el PEC solamente detectamos falsos negativos (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de colonias de *E. coli* confirmadas por el sistema API 20E (*) en distintos medios de cultivo; n = número de colonias aisladas de cada medio. (Las mismas abreviaturas y demás aclaraciones que en la Tabla 3)

	colonias confirmadas (n = 30)	Falsos positivos (n=30)	Falsos negativos (n=20)
FC	100%	0%	0%
CC	100%	0%	0%
PEC	100%	0%	10% **

* bioMérieux, Marcy l'Étoile (Francia)

** colonias rojas con gas (GUR -)

La ventaja del CC con respecto a los restantes métodos, consistió en poder diferenciar fácilmente (y, si fuera de interés, eventualmente aislar) especies bacterianas GUR positivas pero GAL negativas - algunas cepas de *Salmonella* (44%), *Sigheilla* (29%) y otras enterobacterias (54,62,63). Sin embargo, en el río Salado, la frecuencia de aparición y el porcentaje relativo de colonias celestes, con respecto a CTe, fue bajo (1,5%) como para influir en los recuentos. Por otra parte, el agregado del test del indol, hace, probablemente, que el recuento con CC y FC sea más específico, tal como encontraron Perez *et al.* (64) en muestras ambientales y clínicas. Con respecto al *Petrifilm*, el CC tuvo la ventaja, además, de brindar una mayor superficie y volumen lo cual permitió una mejor distribución y la posibilidad de desarrollar un eventual mayor número de colonias (es decir, las interferencias en el desarrollo son menos probables). La ventaja del PEC con respecto a las restantes alternativas, fue su

extremada sencillez operativa, escasez de materiales necesarios y el ahorro considerable de tiempo. (se puede procesar una muestra por minuto o poco más). Además, dada la pequeña cantidad de espacio que ocupan en las incubadoras, también por esta razón, se puede procesar un gran número de muestras. La desventaja aparece si interesara el recuento de C Te y si es necesario concentrar la muestra (por filtración y pre rehidratación - 31)) pues los coliformes, que no sean *Escherichia coli*, son difícilmente distinguibles. La ventaja del FC, fue la posibilidad de detectar *E. coli* aún en bajas concentraciones (<1/ml). Si bien con los otros métodos también eso es posible (mediante filtración y aplicación de filtros de membrana), tal alternativa les quita la ventaja de la rapidez operativa. Además, las muestras de agua del río Salado, con elevadas concentraciones de sedimentos suspendidos -promedio de 680 g/l, con máximos mayores a 2000 mg/l - (65) pueden tapar los filtros antes de

que se hayan filtrado 100 ml. De todas maneras, la ventaja mencionada para el FC -de importancia en agua potable- no tendría aplicación en la vigilancia de la calidad bacteriológica de las aguas naturales, dado que las concentraciones máximas permisibles superan el valor antedicho (ver p. ej., la recopilación de Harding -66).

La mayor desventaja del FC, con respecto a los demás, es el costo (FC > PEC > CC). Además, el tiempo necesario para realizar la siembra de todas las diluciones (FC > CC > PEC). Por otra parte, el FC, es el único de los tres que requiere la adquisición de una lámpara de UV para la detección de *E. coli*.

En conclusión, no existe un método ideal para el río Salado (aunque se pueden desechar las alternativas por filtración por membrana); cada uno tiene sus ventajas y desventajas, sea de índole operativo u económico. Desde el punto de vista estadístico, las medias resultaron similares, pero el FC tendió a registrar recuentos más altos (el 58,1 % de los casos). Esto puede ser importante en circunstancias críticas; es decir, cuando los valores se sitúan cerca de las concentraciones máximas permitidas por los estándares, donde generalmente no se tienen en cuenta la significancia estadística de los resultados (67). Por eso concluimos sugiriendo tener siempre en cuenta la imprecisión del método del NMP; es decir, determinar si las diferencias entre las concentraciones encontradas y la fijada por el estándar elegido, son estadísticamente significativas ($p < 0,05$). De lo contrario, puede darse que el ajuste o no a un determinado estándar dependa del medio de cultivo elegido (entre otros detalles técnicos). Esto es una cuestión ampliamente ignorada, tanto en monitoreos de rutina como en los trabajos que tratan de establecer una interrelación cuantitativa entre las concentraciones de coliformes y el riesgo sanitario (67).

Agradecimientos

A las autoridades municipales de Santo Tomé (prov. Santa Fe) por el apoyo económico brindado para la realización del trabajo. Deseamos agradecer también al personal del Instituto Nacional de Limnología (CONICET): Stella Maris González de Paíra, Ramón Regner, Jorge Lordi, Pedro Garcilazo, Gladis Beguelín y Silvia Regner, por su colabora-

ción en los tareas de laboratorio y de campo.

A los revisores de la revista FABICIB, por las sugerencias realizadas destinadas a mejorar el manuscrito original.

Bibliografía

- 1- Bascomb S., 1987. Enzyme tests in bacterial identification. *Methods Microbiol.*, **19**: 105-160.
- 2- Manafi M. and Kneifel, W., 1989. A combined chromogenic-fluorogenic medium for the simultaneous detection of coliform groups and *E. coli* in water. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.*, **189**: 225-234.
- 3- Manafi M., Kneifel W. and Bascomb S., 1991. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiol. Rev.*, **55**:335-348
- 4- Hofstra H. and Huis Veld J. H., 1989. Methods for the detection and isolation of *E. coli* including pathogenic strains. *J. Appl. Bacteriol. (Symposium Supplement)*: 1975-2125..
- 5- Clark D. L., Milner B. B., Stewart M. H., Wolfe, R. L. and Olson B. H., 1991. Comparative study of commercial 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide preparations with standard methods membrane filtration fecal coliform test for the detection of *Escherichia coli* in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 1528-1534.
- 6- Curriale M. S., Sons T., McIver D., McAllister J. S., Halsey B., Roblee D. and Fox T. L., 1991. Dry rehydratable film for enumerating of total coliforms and *Escherichia coli* in foods; collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**: 635-648.
- 7- Ciebin B.W., Brodsky M. H., Eddington R., Horsnell G., Choney A., Palmateer G., Ley A., Joshi R. and Shears G., 1995. Comparative evaluation of modified m-FC and m-TEC media membrane filter enumeration of *Escherichia coli* in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 3940-3942.
- 8- Venkateswaran K., Murakoshi A. and Satake M., 1996. Comparison of commercially available kits with standard methods for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in food. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**:2236-2243.
- 9- Chang G. W., Brill J. and Lum R., 1989. Proportion of β -D-glucuronidase-negative *Escherichia coli* in human fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 335-339
- 10- Brenner K., Rankin C. C., Roybal Y. R., Stelma G. N., Scarpino P. and Dufour A.D., 1993. New medium for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**:3534-3544.
- 11- Blood R. M. and Curtis G. D., 1995. Media for total Enterobacteriaceae, coliforms and *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.*, **26**: 93-115.
- 12- Evans T. M., Waarvick C. E., Seidler R. J. and LeChevallier

- M. V., 1981. Failure of the most-probable-number technique to detect coliforms in drinking water and raw water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**: 130-138.
- 13- Adamek R., Daubner I., Johnova V. and Jezova E., 1990. The problems of microbial indication of water quality. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.*, **189**: 465-472.
- 14- Lupo L., Strickland E. and Cabelli V., 1977. The effect of oxidase positive bacteria on total coliform density estimates. *Health Lab. Sci.*, **14**:117-121.
- 15- Gleeson C. and Gray N., 1997. "The Coliform Index and Waterborne Disease". Spon, (Londres).
- 16- Figueras M. J., Polo F., Inza I., Borrell N. and Guarro J., 1997. Past, present and future implementation of the EC bathing waters directive in relation to coliforms and *E. coli* (p.; 101-11). In: Kay & Fricker (eds). *AColiforms and E. coli@*. The Royal Society of Chemistry (Cambridge).
- 17- Lee J. V., Lightfoot N. F. and Tillett E. H., 1995. An evaluation of presence-absence techniques for coliform organisms and *Escherichia coli*. In: "Methods for the Enumeration of Waters and Associated Materials". Dep. of the Environment, HMSO (Londres).
- 18- Hahn G. and Wittrock E., 1991. Comparison of chromogenic and fluorogenic substances for differentiation of coliforms and *Escherichia coli* in soft cheese. *Acta Microbiol. Hung.*, **38**: 265-271.
- 19- Edberg S. C., Allen M. J. and Smith D. B., 1988. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: comparison with the standard multiple tube fermentation methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**: 1595-1601.
- 20- Grant M. A., 1997. A new membrane filtration method for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* (p.; 18-29). In: Kay & Fricker (eds). "Coliforms and *E. coli*". The Royal Society of Chemistry (Cambridge).
- 21- Edberg S. C., Allen M.J. and Smith D.B., 1991. Define substrate technology method for rapid and specific simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from water: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**: 526-529.
- 22- Shadix L. C. and Rice E. W., 1991. Evaluation of b-glucuronidase assay for the detection of *Escherichia coli* from environmental waters. *Can J. Microbiol.*, **37**: 908-911.
- 23- Muller H. E., Aleksie S., Bockemuhl J., Hollander R., Kopper F. G. and von Pritzbuere E., 1993. A comparison of BRILA-MUG and lauryl sulfate-MUG bouillon as detection media for total and fecal coliform bacteria in bathing waters in conformity with the Economic Community Guideline 76/160 EWG. *Zentralbl Hyg. Umweltmed*, **195**:9-21.
- 24- Gaudet I. D., Florence L. Z. and Coleman R. N., 1996. Evaluation of test media for routine monitoring of *Escherichia coli* in nonpotable waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 4032-4035.
- 25- Eckner K. F. 1998. Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the collert 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.*, **64**: 3079-3083.
- 26- American Public Health Association. 1992. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 18 th Ed. American Public Health Association (Washington, D. C.).
- 27- Organización Mundial de la Salud. 1983, "Sistema Mundial de Monitoreo del Ambiente". GEMS/Agua. OMS & CEPIS (Genebra).
- 28- Schindel P. R., 1991. MUG-lauryl sulfate bouillon- an optimal medium for the detection of total coliforms and fecal coliform bacteria in relation to hygienic evaluation of bathing waters according to the European Community Guideline 76/160 EWG. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.*, **191**: 438-444.
- 29- Cenci G., De Bartolomeo A. and Caldini G., 1993. Comparison of fluorogenic and conventional membrane filter media for enumerating coliform bacteria. *Microbios*, **76**: 47-54.
- 30- Calderón E., 1993. Actualización en temas relacionados con microbiología de aguas. (p.: 45- 74). En: All Coloquio Argentino sobre optimización de aguas para la ingestión humana@. IVESS (B. Aires).
- 31- Emiliani F. y Lajmanovich R., 1998. Evaluación de las placas Petrifilm *E. coli* para el recuento de coliformes termotolerantes en aguas recreacionales de Santa Fe (Argentina). *Rev. Fac. Bioq. Cienc. Biol.*, **2**: 99-105.
- 32- Emiliani F., 1980. Ecología de la contaminación de la cuenca inferior del río Salado. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral*, **11**:41-69.
- 33- Emiliani F. y González de Paira S. M. 1996. Concentraciones de coliformes termotolerantes en un balneario fluvial. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral*, **27**: 23-33
- 34- US Geological Survey. 1998. "National Field Manual for the Collection of Water-Quality Data". Documento electrónico. Accesible en INTERNET (<http://www.usgs.gov/public/owq/Fieldprocedures.htm>)
- 35- Klee A. J. 1996. "Most Probable Number Calculator (versión 4.0)" US Environmental Protection Agency (Cincinnati, Ohio) (recuperable en Internet: <http://www.epa.gov/nerlc/www/other.htm>)
- 36- Alonso J. L., Soriano A., Carbajo O., Amoros I. and Garelick H. 1999. Comparison and recovery of *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms in water with chromogenic medium incubated at 41 and 44.5 °C. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 3746-3749.
- 37- Benson H. J. 1994. "Microbiological Applications" (60 ed.). Wm. C. Brown Pub. (Dubuque)
- 38- Murray P. R., 1978. Standardization of the Analytab Enteric (API 20E) system to increase accuracy and reproducibility of

- the test for biotype characterization of bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **8**: 46-49.
- 39-** Emiliani F., Lajmanovich R. y González Paira S. M. 1999. Diversidad de fenotipos bioquímicos de *Escherichia coli*: en aguas naturales de Santa Fe (Argentina) y de otras bacterias asociadas (*inédito*).
- 40-** Matner R. R., Fox T. L., McIver D. E., Curiale M. S. 1990. Efficacy of Petrifilm™ *E. coli* count plates for *E. coli* and coliform enumeration. *J. Food. Prot.*, **53**: 145-150.
- 41-** Ogden G. C., Brown G. C., Gallacher S., Garthwait P. H., Gennari M, Pilar González M., Jørgensen L. B., Lunestad B. T., MacRae M., Celeste Nunes M., Petersen A. C., Rosnes J. T. and Vliegert J. 1998. An interlaboratory study to find an alternative to the MPN technique for enumerating *Escherichia coli* in shellfish. *Int. J. Food Microbiol.*, **40**: 57-64.
- 42-** Gaudet I. D., Florence L. Z. and Coleman R. N. 1996. Evaluation of test media for routine monitoring of *Escherichia coli* in nonpotable waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 4032-4035.
- 43-** Kehr A. I. 1994. Usos y abusos de las correlaciones en biología. *Cuad. Herp.*, **8**: 222-228.
- 44-** Potvin C. D. and Roff, D. A. 1993. Distribution-free and robust statistical methods: viable alternatives to parametric statistics. *Ecology* **74**: 1617-1628.
- 45-** Prosser J. L., 1998. Mathematical modeling and Statistical Analysis (p.: 408 - 437). In: Burlage *et al.* (eds). "Techniques in Microbial Ecology". Oxford Univ. Press (Oxford).
- 46-** Geldreich E. E., Jeter H. L. and Winter J. A. 1967. Technical considerations in applying the membrane filter procedure. *Health Lab. Sci.*, **4**: 113-125.
- 47-** Council of the European Communities. 1975 Bathing water quality. Directive 76/160/EEC. Documento electrónico. Accesible en INTERNET (<http://europa.eu.int/water/water-bathing>)
- 48-** Alberta Environmental Protection. 1998. "Alberta Ambient Surface Water Quality: Interim Guidelines" Documento electrónico. Accesible en INTERNET (<http://ec.gc.ca/water>)
- 49-** Manitoba Environment (Canadá), Water Quality Management Section. 1997. "Clean Water Guide: Bacteria and other pathogens" (Documento electrónico. Accesible en INTERNET (<http://www.ec.gc.ca/wa/ter>)
- 50-** US EPA. 1986. AAmbient water quality criteria for bacteria@. EPA440/5-84-002. Office of water Regulations and Standard Division (Washington).
- 51-** Holmes P. R., 1997. Bacteria in recreational waters: A regulator's concern (p.: 145-154). In: Kay & Fricker (eds). "Coliforms and *E. coli*". The Royal Society of Chemistry (Cambridge).
- 52-** Covert T. C., Shadix L. C. and Rice E. W., 1992. Comparative defined-substrate coliforms tests for the detection of *E. coli* in water. *J. Am. Water Works Assoc.*, **84**: 98-104.
- 53-** Manafi M. 1996. Fluorogenic and chromogenic enzyme substrates in culture media and identification tests. *Int J Food Microbiol.* **31**: 45-58.
- 54-** Tryland I. and Fiksdal L., 1998. Enzyme characteristics of β -D-galactosidase and b-D-glucuronidase positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 1018-1023
- 55-** Davies C. M., Apte S. C. and Peterson S. M., 1995. Beta-D-galactosidase activity of viable, non-culturable coliform bacteria in marine waters. *Lett. Appl. Microbiol.*, **21**: 99-102.
- 56-** Davies C. M., Apte S.C., Peterson S.M. and Stauber J. H. 1994. Plant and algal interference in bacterial b-D-Glactosidase and b-D-Glucuronidase Assays. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 3959-3964.
- 57-** Rath J. and Hernde G. J. 1994. Characteristics and diversity of B-D*Glucosidase activity en marine snow. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 807-813.
- 58-** Alonso J. L., Amoros I and Alonso M. A. 1996. Differential susceptibility of aeromonads and coliforms to cefsulodin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 1885-1888.
- 59-** Evison L. M. and James A., 1973. A comparison of the distribution of intestinal bacteria in Britain and East African water sources. *J. Appl. Bacteriol.*, **36**: 109-118.
- 60-** Ramteke P. W., Bhattacharjee J. W., Pathak S. P. and Kaira N. 1992. Evaluation of coliforms as indicators of water quality in India. *J. Appl. Bacteriol.*, **72**: 352-356.
- 61-** Hazen T. C. and Toranzos G. A., 1990. Tropical source water (p.: 32-54). In: Mc Feters (ed) "Drinking Water Microbiology". Springer-Verlag (N. York)
- 62-** Feng P. C. and Hartman P. A., 1982. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**: 1320-1329.
- 63-** Frampton E. W. and Restaino L., 1993. Methods for *Escherichia coli* identification in food, water and clinical samples based on beta-glucuronidase detection. *J. Appl. Bacteriol.*, **74**: 223-233.
- 64-** Perez J. L., Berrocal C. I. and Berrocal L., 1986. Evaluation of a commercial b-glucuronidase test for the rapid and economical identification of *Escherichia coli*. *J. Appl. Bacteriol.*, **61**: 541-545.
- 65-** Maglianesi R. y Depetris P., 1970. Características químicas de las aguas del río Salado inferior (prov. Santa Fe, República Argentina). *Physis*, **30**: 19-32.
- 66-** Harding W. R., 1993. Faecal coliform densities and water quality criteria in three coastal recreational lakes in the SW Cape, South Africa. *Water South Africa*, **19**: 235-246.
- 67-** Fleisher J. M., 1985. Implications of coliform variability in the assesment of the sanitary quality of recreational waters. *J. Hyg. Camb.* **94**:193-200.