

Tasas de declinación de microorganismos indicadores de la calidad del agua en el Mar Caribe costarricense

¹ Darner Mora Alvarado

Resumen

Con el objetivo de contribuir a la creación de criterios de calidad sobre las aguas marinas utilizadas para recreación, se determinaron los tiempos de declinación del 90% (T90) de los microorganismo indicadores de calidad, en las aguas del Mar Caribe Costarricense. Los bioensayos se hicieron durante el año 1992, con una frecuencia mensual en el ambiente natural de la ciudad de Limón. En la determinación de las T90 diurnas se utilizaron envases de 20 litros cristalinos o transparentes, y en las T90 nocturnas envases opacos. Los microorganismos a los que les determinaron las T90 fueron: *Escherichia coli* (EC), *Enterococcus* (ET), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Staphylococcus aureus* (SA) y *Candida albicans* (CA). Los promedios de las T90 ET, PA, SA, respectivamente. El hongo CA no presenta una declinación del 90% en las condiciones nocturnas. Las T90 en las horas diurnas fueron: 60, 66, 45, 104, 118 minutos para EC, ET, PA, SA, y CA respectivamente.

Introducción

Tradicionalmente, la evaluación del riesgo de contraer una enfermedad en aguas marinas, se ha realizado utilizando los mismos

indicadores que determinan la calidad sanitaria del agua de consumo humano. El primer grupo de bacterias que se usó fue el denominado "Coliformes totales" (CT). Posteriormente algunos autores detectaron las limitaciones de los CT como indicadores de calidad en aguas superficiales (Mates & Schaffer 1991, Mora *et al.*, 1989). En 1958 varios autores recomendaron las bacterias del grupo coliforme fecal (CF) como un grupo indicador de contaminación fecal (Hazen 1988, UNEP/WHO/IAEA 1988). Años después, se propone a la bacteria *Escherichia coli* como la representante de la flora normal del intestino de los animales de sangre caliente, incluido el hombre, Cabelli *et al.*, (1983) concluyó que los Enterococos (ET)-subgrupo de los Estreptococos fecales (EF)-son un mejor indicador que la EC, pues encontró una mayor correlación entre los ET y las enfermedades gastrointestinales adquiridas por los bañistas. En razón de lo anterior la gran mayoría de las normas y criterios bacteriológicos sobre la calidad del agua de mar se basan en estudios que utilizan los coliformes fecales y totales y los Enterococos, para evaluar la calidad de dichas aguas (Mora *et al.*; 1989, Salas 1984). Sin embargo, diferentes investigadores han comprobado, con respecto al agua marina, que existe una mayor incidencia de enfermedades de la piel, garganta, oídos y

Laboratorio Central. Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados.
Apartado 5120 - 100^o Tres Ríos - Costa Rica

pulmones en comparación con las enfermedades gastrointestinales.

Al respecto Saliba (1990) encontró un 2% de morbilidad en enfermedades de la piel, un 1.5% en los ojos y menos de 1% de infecciones digestivas entre los bañistas que frecuentan el mar Mediterráneo.

Debido a esto algunos investigadores (Alico y Dragonjas 1986, Purer-Yoshpe y Golderman 1987) recomiendan el uso de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* como indicadores complementarios de origen no fecal, para evaluar el riesgo de contraer infecciones por contacto con aguas de recreación.

Sin embargo, antes de incorporar otras bacterias como indicadoras de la calidad del agua, es necesario conocer sus tasas de declinación en este medio, tanto en las horas diurnas como en las nocturnas. En Israel, Purer-Yoshpe y Golderman (1987) determinaron las relaciones y tasas de sobrevivencias de PA y SA en las aguas del mar Mediterráneo. Sin embargo, en nuestro medio, no se conocen informes relacionados con el mar Caribe, que permitan conocer las diferentes tasas de declinación de los indicadores antes mencionados. Debido a esto, y con el afán de contribuir a la unificación de criterios para el análisis de la calidad en las aguas del mar Caribe costarricense, realizamos la presente investigación, que pretende determinar las tasas de declinación del 90% (T90) de los indicadores EC, ET, SA, PA, y *Candida albicans* (CA), en las horas diurnas y nocturnas, y buscar los mejores microorganismos indicadores que permitan establecer los criterios de la calidad del agua.

Materiales y Métodos

La determinación del tiempo de declinación de los microorganismos indicadores se realizó

en el medio ambiente natural de la ciudad de Limón con frecuencia mensual durante todo el año 1992.

Preparación de los inóculos.

Se hicieron patrones de Mc. Farland de 3×10^8 células por mililitro de cada microorganismo. En el caso de las bacterias los patrones se prepararon con cultivos de 24 horas en agar tripticosa soya. De ahí se pasaron con asa bacteriológica algunas colonias de microorganismos, correspondientes a 10 ml de solución salina fisiológica y su turbiedad se comparó con la serie No. 1 de Mc. Farland. De cada suspensión se agregaron 10 ml (inóculo mixto) en un envase de vidrio blanco y otro ámbar, con 20 litros cada uno con agua de mar sin esterilizar.

Las cepas utilizadas son las siguientes:

E. coli, 396 (UCR).

E. coli, ATCC 25922.

Pseudomonas aeruginosa, ATCC 27853 y ATCC 27855.

Staphylococcus aureus, ATCC 2593 y ATCC 2594.

Streptococcus faecalis, (Enterococos)- UCR 322.

Streptococcus faecalis, (Enterococos) aislada en la Costa de Limón.

Candida albicans, (Sin código y de origen intestinal).

Bioensayos de T90.

Los bioensayos se hicieron durante el año 1992 y abril y junio de 1993. Se practicaron de día y de noche, respectivamente, en el siguiente orden de frecuencia para cada especie de microorganismo: EC 13 y 13, ET 7 y 5, PA 10 y 9, CA 4 y 3, SA 7 y 7.

Se realizaron inoculando el cultivo mixto de microorganismos en dos tipos de envases

(Cristalino y opaco), con aguas de mar recogidas en una zona sin contaminación bacteriana de origen terrestre. Una vez inoculado se determinó el Número más probable/100 ml (NMP) de EC, PA, ET, SA y el recuento de CA por medio de la técnica de filtración por membrana. Luego se recolectaron muestras a 70 cm de profundidad, y se hicieron las determinaciones cada hora durante un período de ocho horas.

El uso del envase cristalino y opaco representa las "horas diurnas" y las "horas nocturnas", respectivamente.

Análisis Físico-Químico.

A las aguas de mar utilizadas en los bioensayos se les cuantificó el pH y la temperatura, oxígeno disuelto (OD), demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y conductividad (estas determinaciones se hicieron al principio (tiempo 0) y otras al final del ensayo (tiempo 8)).

Efectos de la luz solar y la temperatura.

Con el objetivo de observar la influencia que tiene la exposición de la luz solar y la temperatura ambiental sobre la declinación de los microorganismos, se aprovecharon los datos del Instituto Meteorológico Costarricense, quien tiene una estación ubicada en el aeropuerto de la ciudad de Limón, a 2 kilómetros del sitio en donde se llevaron a cabo los bioensayos.

Cálculos para la determinación de los T90.

Se calcularon las tasas de declinación de los diferentes microorganismo estudiados, utilizando la siguiente ecuación:

$CT = C_0 e^{-kt}$ en el que:

CT = Concentración de bacterias en el tiempo t expresada en NMP/100 ml.

K = Constante de declinación (seg^{-1}).

C₀ = Concentración de microorganismo.

Simplificando $\frac{C_0}{CT} = e^{kt} = K = \frac{2.3}{T90} \Rightarrow T90 = \frac{2.3}{K}$

A las T90 de cada microorganismo se le aplicó el promedio aritmético, el mínimo, máximo y la desviación estándar.

Análisis de variación de Friedman entre las "T90 día" y las "T90 noche".

Para detectar si existe o no diferencia significativa entre las T90 de día y de noche, se hizo el análisis estadístico utilizando la variación de Friedman. Los resultados de T90 se relacionaron con la cantidad de luz solar total imperante en cada ensayo, manteniendo constantes el pH, la concentración de cloruros y la temperatura.

Resultados y Discusión

Antes de iniciar el análisis de los resultados, es importante indicar que los que corresponden a las tasas de declinación obtenidas en nuestro estudio, no se pueden calificar como tasas de mortalidad bacteriana. Colwell (1985) demostró la presencia de bacterias viables, lo que indica que estos microorganismos, al llegar al mar no se mueren en su totalidad, sino que se quedan en estado de lactancia.

El promedio mínimo, máximo y la desviación estándar de las T90 de cada microorganismo, tanto en las horas nocturnas como diurnas, se presentan en el cuadro 1, que indica que las T90 nocturnas de los microorganismos estudiados mostraron el siguiente comportamiento:
PA < ET < SA < EC < CA.

Por otra parte, en las horas diurnas la secuencia, en orden creciente, es:
PA < EC < EF < SA < CA.

Las comparaciones de las T90 nocturnas con

Las comparaciones de las T90 nocturnas con las diurnas demuestran que los microorganismos declinan con mucho mayor rapidez durante el día, debido, principalmente, a la acción de los rayos ultravioleta solares. Sin embargo, el análisis de varianza indica que solo existe diferencia, estadísticamente significativa, entre las T90 de EC y PA con respecto a los resultados correspondientes al día y a la noche.

Una observación interesante es que las T90 de *Staphylococcus* en el día y la noche, tienen muy poca diferencia entre sí (104 y 122 minutos) contrario a lo ocurrido con *E. coli.*, bacteria que sí muestra una marcada diferencia entre los datos de declinación diurna y nocturna. Esto sugiere que el brillo solar tiene menos efecto sobre *Staphylococcus*. (Figs. 1, 2, 3 y 4). *Candida albicans* mostró ser el microorganismo más resistente al medio ambiente marino, debido a que en las ocho horas de estudio de cada T90, no se detectaron tasas de declinación del 90%. Además, demostró ser el microorganismo más resistente al efecto de la luz solar.

Los resultados de T90 para la EC, obtenidos en nuestro estudio, son semejantes a los obtenidos en Brasil por diversos autores. En relación con la descarga de las aguas domésticas de las ciudades costeras, por medio de emisarios submarinos, es importante no solo tomar en cuenta las T90 diurnas sino también las nocturnas, debido a que muchas ciudades descargan las aguas servidas durante las noches, para disimular el mal efecto estético.

Con respecto a la búsqueda de microorganismos indicadores, que evidencien el riesgo de las enfermedades por contacto, nuestros resultados demuestran que *Pseudomonas* es muy sensible a la luz solar, lo que la califica como un mal indicador, porque desaparece más rápido que otros patógenos. Estos resultados concuerdan con los de Purer-

Yoshpe y Golderman (1987). Además, en el agua de mar existen factores que interfieren en la detección de PA (Carson *et al.*, 1975). en el caso de la EC, parece que el compuesto glicina-betaina es un factor que protege a esta bacteria contra la salinidad, influyendo en la osmorregulación de la célula bacteriana (Gauthier y Rudulier 1990, Mostafa *et al.*, 1990). Esta cualidad, unida a su presencia, en grandes cantidades, en los intestinos de los animales de sangre caliente, hace que esta bacteria sea un buen indicador de contaminación fecal (Hazen, 1988).

Con respecto a los SA, los resultados de las T90 indican una mayor resistencia de esta bacteria ante los factores adversos del medio marino; sin embargo, su detección o cuantificación no es fácil en agua de mar, debido a que existen muchas bacterias marinas que producen falsos resultados positivos. Sin embargo, perfeccionando dichas técnicas podría, utilizarse como indicador complementario para evaluar las aguas marinas de recreación (APHA, 1989, Havelcar y During, 1985).

En el caso de CA, su resistencia en el medio marino la convierte en un buen indicador para considerar los riesgos de enfermedades de piel, garganta y de aparato digestivo, ocasionados por otras bacterias que le acompañan.

Por último, los estudios realizados en los Estados Unidos por Cabelli *et al.*, (1983), Dufour (1991) demuestran que los *Streptococos* fecales, principalmente los *Enterococos* (ET), tienen una mejor correlación con las enfermedades intestinales; sin embargo, esta característica no los convierte en un buen indicador, debido a dos aspectos: su sensibilidad al agua de mar es semejante a la de la EC y además se encuentran en menor cantidad en las heces de los seres humanos, con relación a la *E. coli.* Por este motivo, no es posible relacionarles con las infecciones intestinales de

los bañistas.

Es necesario entonces hacer estudios de T90 con ET en otros lugares, especialmente en los sitios donde se hicieron los estudios epidemiológicos de Cabelli, para corroborar su eficiencia como indicador.

Recomendaciones

Para formar criterios de la calidad del agua es necesario tomar en cuenta la diferencia de las T90 nocturnas y diurnas de los diferentes indicadores debido al efecto que tiene el medio marino contra las bacterias indicadoras, es necesario hacer los análisis de laboratorio lo más pronto posible, después de recolectada la muestra de agua. Lo ideal sería hacer los análisis en el campo. En el caso de que esto sea posible, el tiempo transcurrido entre la toma de la muestra, y los análisis no debe sobrepasar las 6 horas.

Finalmente, es necesario hacer más estudios, con el objetivo de incorporar a Candida albicans (CA) como indicador complementario, para evaluar la calidad sanitaria del agua de mar y descartar a Pseudomonas aeruginosa, debido a su sensibilidad al medio marino.

Agradecimiento

Agradezco la valiosa colaboración de los compañeros que participaron en la elaboración de este trabajo.

Bibliografía

1. Alico, K.R & Dragonjas, F.M. 1986. Evaluation of culture media recovery of Staphylococcus aureus from swim

ming pools. Appl. & Envir. Microbiol. 51 (4): 699 - 702.

2. American Public Health Association. 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater, 18th ed. A.P.H.A, Washington. D.C.
3. Cabelli, V.J., A.P. Dufour, L. J. McCabe & M.A. Levin. 1983 A Marine Recreational water quality criterion consistent with indicator concepts and risk analysis. J. Water. Pollut. Cont. Fed. 55: 1306 - 1314.
4. Carson. L.A., N.J. Petersen., M.S. Favero & I.L. Doto. 1975. Factors influencing detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa by most-probable number and membrane filtration techniques. Appl. Microbiol. 30 (6): 935 - 942.
5. Cowell R.R. 1985. Viable but non culturable Vibrio cholerae and related pathogens in the environment implications for release of genetically engineered microorganism. Biotec.. 3: 817 -820.
6. Dufour, A.P. 1991. Water quality health effects: criteria for marine and fresh recreational water. In: Report on joint WHO-UNEP meeting. 1991: 8 - 23.
7. Gauthier. M.J. & D. le Rudulier. 1990. Survival in seawater of Escherichia coli cells grown in marine sediments containing Glycine-Betaine. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2915 - 18.
8. Greenbergs, E.A., 1956. Survival of organisms enteric in sea water. Publi. Health Rep. Dis. Atl. 71 (1): 77 - 86.
9. Havelcar, H.A. & During, M. 1985. Model studies on a membrane filtration method for enumeration of coagulase positive Staphylococci in swimming pool water using rabbit plasmabovine fibrinogen agar. J. Microbiol. 31: 331 - 34.
10. Hazen, T. 1988. Fecal coliform as indicator in tropical water: A review toxicity Assesment. An. Intl . J. 3: 461 - 477.

11. Mora, D.A. y Moisés .C. 1989. Efecto del tiempo y la temperatura de almacenamiento de las muestras de agua sobre los indicadores bacterianos de calidad. En: Tercer Certamen Ciencia y Tecnología en Marcha. 8: 15 - 22.
12. Mostafa, G. Theophile, B & Michel, C. 1990. Evidencie that *Escherichia coli* accumulates Glycine-betaine from marine sediments. Appl. Environ Microbiol. 56: 551 - 54.
13. Purer-Yoshpe, Y & Golderman, S. 1987. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in Israel. Appl. Envir. Microbiol. 53 (5): 1138 - 41.
14. Ealth-Relates Aspects of Marine Pollution By Domestic Wastes in the Mediterranean Athens. Grece. p. 1 -4.
15. Salas, J.H. 1984. Historia y aplicación de normas microbiológicas de calidad del agua en el medio marino. Hojas de Divulgación Técnica. C.E.P.I.S.: 1 -14.
16. Saliba J.L. 1990. Health-Related aspects of marine pollution by domestic wastes in the Mediterranean Athens. Grece: 1 -4.
17. U.N.E.P, W.H.O., I.A.E.A. 1988. Guidelines for monitoring quality areas reference methods for marine pollution studies. UNEP No. 1 (1): 1 -36.

CUADRO No. 1
PROMEDIO DE LAS TASAS DE DECLINACION DIURNAS
Y NOCTURNAS DE LOS MICROORGANISMOS EN EL
MAR CARIBE COSTARRICENSE

MICROORGANISMO	n	Xa	DS	MINIMO	MAXIMO
DIURNAS					
EC	14	59	16	42	96
EF	5	66	9	52	73
PA	10	45	13	39	84
SA	6	104	41	85	191
CA	3	118	30	91	152
NOCTURNAS					
EC	14	140	123	64	532
EF	7	94	45	53	164
PA	10	82	37	43	155
SA	7	122	53	98	245
CA	4	ND	ND	ND	ND

Xa: Promedios aritméticos
 ND: No se determinó
 n: Número de datos.