



COMPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS EN LA INVESTIGACIÓN DE *SALMONELLA* EN AGUAS

Benassi, Fernando / Naidich, Alfredo

Facultad de Cs. Ex. Ocas. y Nat. - Cátedra de Microbiología Industrial - U.Na.M.

PERFORMANCE OF CULTURE MEDIA IN THE RESEARCH OF WATERBORNE *SALMONELLA*

Presence of microorganisms belonging to *Salmonella* genus was studied from Zaiman creek waters and Posadas city inner creek waters.

1.730 suspected colonies were isolated. Elevated temperature technique for the isolations of *Salmonella* was applied (41.5°C) and these organisms were recovered in 28% of the examined samples.

Isolation frequency of serovars is presented, with *S. Saphra* prevailing among the studied samples.

Typical, well-isolated *Salmonella*-like colonies were recovered by streaking plating media, from incubated broths (24-72 hours).

Performance of the following enrichment broths and plating media were tested: Tetrathionate broth with addition of 0,004% of Novobiocin (Tet), Dulcitol Selenite broth (DS) and Rappaport-Vassiliadis broth (RV), EMB agar (Eosin-Methylene Blue), DCLS agar (Desoxycholate-Citrate-Lactose-Sacarose), XLD agar (Xilose-Lysine-Desoxycholate) and BS agar (Bismuth Sulphite).

The efficiency of broth culture media DS and RV, proved to be similar. Best results were obtained, when both, DS and BS media were used, followed by RV and BS combination.

KEY WORDS: *Salmonella*, culture media performance, water pollution.

Se compararon distintos medios de cultivo para el aislamiento y caracterización de *Salmonella* en cursos de agua que recorren la ciudad de Posadas, Misiones.

Se aislaron 1.730 cepas de las cuales, 484 (28%) fueron confirmadas como pertenecientes al género *Salmonella*. Se señala a *S. Saphra* como la serovar de mayor abundancia.

Se aplicaron técnicas de incubación de alta temperatura (41,5°C) con plaqueos sucesivos efectuados a distintos tiempos de incubación (24 y 72 horas).

Se emplearon los siguientes caldos de enriquecimiento y medios de aislamiento: caldo Tetratonato con el agregado de 40 mg/l de Novobiocina (Tet); Dulcitol Selenito (DS) y Rappaport-Vassiliadis (RV); agar Eosina-Azul de Metileno (EMB); agar Desoxicolato-Citrato-Lactosa-Sacarosa (DCLS), agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD) y agar Sulfito de Bismuto (BS). Los caldos de enriquecimiento más eficaces fueron DS y RV y la mejor combinación de caldos de enriquecimiento y medios de aislamiento resultó ser DS/BS, seguida por RV/BS.

PALABRAS CLAVES: *Salmonella*, rendimiento de medios de cultivo, contaminación de aguas.

ABSTRACT

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Las salmonelosis son enfermedades frecuentes e importantes causadas por la ingestión de alimentos contaminados, manifestándose mediante cuadros clínicos inespecíficos, tales como diarreas y gastroenteritis [1, 2, 3]. Por ello resulta de gran interés determinar la presencia de *Salmonella* en los cursos de agua que en gran número recorren vastas zonas de la ciudad de Posadas cuya población aledaña las utiliza para consumo, lavado y esparcimiento. En numerosos casos las mismas reciben efluentes cloacales y excretas de la población, con lo cual se hallan ampliamente favorecidas las condiciones de diseminación y contagio.

Si bien existen numerosos trabajos que detallan diferentes técnicas para la recuperación de *Salmonella*, no hay disponible una metodología estandarizada para su investigación en aguas [4, 5, 6, 7, 8]. Este trabajo presenta una comparación entre distintos procedimientos empleados por nuestro grupo de trabajo para el aislamiento y caracterización de *Salmonella* y los principales resultados obtenidos a fin de contribuir a una posible normatización de las técnicas de recuperación de este microorganismo [9].

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras

Las muestras fueron obtenidas por el método de las gasas por ser uno de los más eficientes para cursos de agua [5, 8, 10, 11]. Las gasas fueron recogidas 48 horas después de ser colocadas, fueron transportadas al laboratorio en recipientes térmicos y procesadas dentro de las 6 horas de recibidas.

Investigación de *Salmonella*

a) Enriquecimiento

Se emplearon tres caldos de enriquecimiento: Tetracionato con el agregado de 40 mg/l de Novobiocina (Tet), Dulcitol Selenito (DS) y Rappaport-Vassiliadis (RV) [12, 13, 14, 15, 16]. Los caldos se incubaron a 41,5°C (método de las altas temperaturas) [17, 18], tomándose muestras del material a las 24 y 72 horas de incubación.

b) Aislamiento

Se utilizaron placas de agar Eosina-Azul de Metileno (EMB) (Britania), incubadas a 41,5°C, agar Desoxicolato-Citrato-Lactosa-Sacarosa (DCLS) (Merck), agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD) (Merck) y agar Sulfito de Bismuto (BS) (Merck). Se incubaron a 37°C durante 24 ó 48 horas, según requerimientos.

Se seleccionaron colonias características, las cuales se propagaron en tubos estría de agar Tripteína-Soya (TSA) (Britania), con el fin de lograr los cultivos adecuados para los ensayos bioquímicos [6, 7].

c) Identificación primaria

Se realizó tinción de Gram y las siguientes pruebas bioquímicas:

- citocromooxidasa;
- producción de ureasa;
- producción de fenilalanina deaminasa;
- prueba de Voges-Proskauer;
- licuefacción de la gelatina;
- asimilación de glucosa, lactosa y sacarosa;
- producción de sulfuro y gas de glucosa;
- producción de indol;
- producción de lisina decarboxilasa;
- B-galactosidasa.

d) Confirmación bioquímica y serológica

La identificación fue confirmada en el Servicio de Enterobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI), ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

e) Estadística

El tratamiento estadístico de los resultados del presente trabajo fue elaborado según el test de las proporciones [19].

RESULTADOS

Se realizaron un total de 47 campañas de muestreo, que comprendieron los arroyos interiores de la ciudad de Posadas (Antonica, Itá, IV sin nombre, Mitre, Vicario, VII sin nombre, VIII sin nombre, Divisa), y el arroyo Zaimán que recorre vastas zonas suburbanas de la ciudad de Posadas.

Se examinaron finalmente 1.730 aislamientos, de los cuales 484 (28%) fueron caracterizados

como pertenecientes al género *Salmonella* por nuestro grupo de trabajo y confirmadas por el ANLIS.

En la Tabla 1 se indica el rendimiento relativo de los caldos de enriquecimiento. Se encontraron rendimientos similares entre el DS y el RV (diferencias no significativas), mientras que el caldo Tet fue marcadamente inferior ($P < 0,0006$).

En la Tabla 2 se representa el rendimiento de las combinaciones de medios de enriquecimiento y aislamiento.

En la Tabla 3 se representan las serovariedades aisladas y su porcentaje de aislamiento. La serovariedad predominante resultó ser *S. Saphra*.

En la Tabla 4 se indican las serovariedades aisladas en cada uno de los tres caldos de enriquecimiento.

En la Tabla 5 se muestran las serovariedades aisladas en función de los tiempos de incubación (24 y 72 horas).

DISCUSIÓN

Si bien se conocen numerosos medios de cultivo aptos para el enriquecimiento y aislamiento de serovariedades pertenecientes al género *Salmonella*, se requiere una adecuada selección para obviar el crecimiento competitivo que presentan en dichos medios los microorganismos no patógenos, en especial los pertenecientes al grupo coliforme. Por otra parte, una muestra relativamente grande debe ser examinada para asegurar el éxito del aislamiento [6, 7].

El enriquecimiento es una de las etapas críticas, dado que la presencia de salmonelas es generalmente baja en relación con la flora acompañante; por ello se emplean caldos diseñados para la inhibición de ésta.

Este objetivo se logra por el agregado de colorantes, sales minerales o antibióticos, resultando conveniente trabajar con dos caldos en paralelo, ya que no todas las serovariedades de

Salmonella pueden ser recuperadas de un mismo caldo. Los caldos Dulcitol Selenito y Rappaport-Vassiliadis son los que presentaron mayor rendimiento.

Asimismo, se aconseja el empleo simultáneo de dos medios de aislamiento, uno de baja o mediana selectividad y otro de alta selectividad. El medio de aislamiento de mayor eficiencia resultó ser Sulfito de Bismuto ($P < 0,000001$), mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los otros medios.

Los caldos Dulcitol Selenito y Rappaport-Vassiliadis son los que presentaron mayor rendimiento.

El mayor número de serovariedades se obtuvo a las 72 horas, si bien resulta importante destacar que no todas las serovariedades aisladas a las 24 horas se recuperaron a las 72 horas, por lo que se confirmó la conveniencia de efectuar plaqueos en períodos consecutivos de 24 horas preconizado por otros autores [20].

La combinación más adecuada de medios de cultivo fue Dulcitol Selenito-Sulfito de Bismuto y en segundo lugar Rappaport-Vassiliadis-Sulfito de Bismuto. Ambas difieren significativamente del resto de las combinaciones ($P < 0,017$).

El esquema bioquímico de identificación primaria, que consta de 12 pruebas, fue seleccionado a partir de un sistema microcomputarizado de identificación de bacterias Gram (-) de 21 reacciones bioquímicas y mostró una eficiencia cercana al 100%.

Cabe señalar que en el enriquecimiento las muestras fueron procesadas en forma independiente, dado que por las características del método de muestreo no fue posible trabajar en paralelo.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora María Inés Caffer, de la División Enterobacterias del Instituto Nacional de Enfer-

Tabla 1: Rendimiento de caldos de enriquecimiento

Caldos de Enriquecimiento	DS	Tet	RV	Totales
Colonias examinadas	888	330	512	1.730
Colonias confirmadas	261	67	156	484
Porcentaje de confirmación	29,38%	20,30%	30,46%	27,98%

Tabla 2: Rendimiento de los medios de aislamiento

Medios de Aislamiento	DS		Tet		RV		Totales
	Colonias Examin.	Colonias Conf. %	Colonias Examin.	Colonias Conf. %	Colonias Examin.	Colonias Conf. %	
BS	314	46,14	154	24,02	240	37,50	708
EMB	261	22,60	140	15,00			401
DCLS	172	19,18	36	25,00	140	22,14	348
XLD	141	17,02			132	25,75	273
Totales	888		330		512		1730

Tabla 3: Serovariedades aisladas y frecuencia de aislamiento

Serovariedades	Frecuencia de Aislamiento	
	N	%
S. Saphra	131	27,06
S. Panama	38	7,85
S. Infantis	36	7,43
S. Newport	34	7,24
S. Typhimurium	31	6,40
S. Enteritidis	25	5,16
S. Oranienburg	25	5,16
S. Kentucky	20	4,13
S. Bredeney	17	3,51
S. Montevideo	15	3,10
S. Give	13	2,68
S. Zaimán	11	2,27
S. Anatum	9	1,85
S. Cerro	9	1,85
S. Miam	9	1,85
S. Seftenberg	9	1,85
S. Agona	8	1,65
S. Chester	8	1,65
S. Madelia	8	1,65
S. Belem	6	1,23
S. Heidelberg	6	1,23
S. San Diego	6	1,23
S. Blockley	2	0,41
S. Derby	2	0,41
S. Glostrup	2	0,41
S. Lichtfield	2	0,41
S.E IV 21:g; Z 51:-; CNK-	2	0,41
TOTAL	484	

Tabla 4: Serovariedades aisladas en función de los caldos de enriquecimiento

RV	DS	Tet
S. Bredeney	S. Agona	S. Anatum
S. Enteritidis	S. Anatum	S. Belem
S. Heidelberg	S. Belem	S. Enteritidis
S. Infantis	S. Blockley	S. Give
S. Montevideo	S. Bredeney	S. Infantis
S. Newport	S. Cerro	S. Newport
S. Saphra	S. Chester	S. Kentucky
S. Typhimurium	S. Derby	S. Oranienburg
	S. Enteritidis	S. Panamá
	S. Give	S. Saphra
	S. Glostrup	S. Seftenberg
	S. Heidelberg	S. E IV 21:g; Z51:-; CNK-
	S. Infantis	
	S. Lichtfield	
	S. Madelia	
	S. Miami	
	S. Oranienburg	
	S. Panamá	
	S. San Diego	
	S. Saphra	
	S. Seftenberg	
	S. Typhimurium	
	S. Zaimán	

medades Infecciosas, por su valiosa colaboración en la identificación serológica de las cepas. ✍

REFERENCIAS

- BINSTEIN, N.; EIGUER, T.; D'EMPAIRE, M., *Epidemia de salmonelosis en Buenos Aires y sus alrededores*. Medicina (Buenos Aires). 42: 161-167. 1982.
- BLASSER, M.; RAFUSE, E.; WELLS, J., *An outbreak of salmonelosis involving multiple vehicles*. Amer. J. Of Epidemiol. 114: 663-670. 1981.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, *Programa de control de enfermedades diarreicas*. Informe de grupos científicos de trabajo. 1978-1980.
- ANSELMO, R.; BARRIOS, H.; VIOVA, S.; LLORENTE, B.; EIGUER, T.; CAFFER, M.; FLIESS, E., *Estudio comparativo de cuatro métodos de aislamiento de salmonelas de aguas superficiales*. Rev. Arg. De Microbiol. 21: 127-132. 1989.
- HARVEY, R. W.; PRICE, T. H., *Sewer and drain swabbing as a mean of investigating salmonellosis*. J. Hyg. Cam. 68: 611-624. 1970.
- Media specifications. En: RAND, M. C.; GREENBERG, A. E.; TARAS, M. J., *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 14 de. p. 892-902. Washington, A.P.H.A. 1976.
- Analitical Methodology – Section E, *Salmonella* – En: BORDNER, R.; WINTER, J., *Microbiological Methods for Monitoring the Environment*. P. 154-185; Cincinnati, E.P.A. 1978.

Tabla 5: Serovariedades aisladas en función de los caldos de enriquecimiento

24 hs	72 hs
S. Anatum	S. Agona
S. Belem	S. Anatum
S. Blockley	S. Belem
S. Bredeney	S. Cerro
S. Enteritidis	S. Chester
S. Infantis	S. Derby
S. Miami	S. Enteritidis
S. Montevideo	S. Give
S. Oranienburg	S. Glostrup
S. San Diego	S. Heidelberg
S. Saphra	S. Infantis
S. Seftenberg	S. Kentucky
S. Typhimurium	S. Lichtfield
S. Zaimán	S. Madelia
S. E IV 21:g; Z 51:-; CNK-	S. Newport
	S. Oranienburg
	S. Panamá
	S. Saphra
	S. Typhimurium

8. *General qualitative isolation and identification procedures for Salmonella.* En: RAND, M. C.; GREENBERG, A.; TARAS, M. J. (de.) *Standard methods for the examinations of water and wastewater.* 14. de. p. 955-960. Washington, A.P.H.A. 1976.

9. BENASSI, F. O.; MARTÍNEZ VÁZQUEZ, F.; EIGUER, T., *Salmonella: su incidencia en aguas del arroyo Zaimán.* Rev. Arg. de Microbiol. 15: 169-175. 1983.

10. MOORE, B., *The detection of Paratyphoid carriers in towns by means of sewage examination.* Monthly Bull. Minist. P. Hh. (London); 7: 241-248. 1948.

11. ANSELMO, R. J.; BARRIOS, H. A.; VIARA, S.; CAFFER, M. I., *Aislamiento y caracterización de Salmonella de aguas del río Luján.* Rev. Arg. de Microbiol - 23: 204-210. 1991.

12. *Composition of media.* En: BORDNER, R.; WINTER, J., *Microbiological Methods for Monitoring the Environment.* Cincinnati, E.P.A. 1978.

13. JEFFRIES, L., *Novobiocin Tetrathionate Broth. A medium for improved selectivity for isolation of Salmonella from faeces.* J. Clin. Path. 12: 568-571. 1979.

14. TRICHOPOULOS, D.; DASKALOPOULOS, G.; KALAPOTHAKI, V.; KALANDIDI, A.; VASSILIADIS, P., *Enrichissement secondaire en milieu de Rappaport dans l'isolement de Salmonella, a partir d'organes de porcs.* Zbl. Bakt. I. Orig., A 219, 306-312. 1972.

15. VASSILIADIS, P., *The Rappaport-Vassiliadis enrichment medium for the isolation of Salmonella: an overview.* J. Applied Bact. 54: 69-76. 1983.

16. MONTICELLI, L. S.; LASTA, J. A.; GARIBOGLIO, M. A., *Aislamiento y cuantificación de Salmonella en aguas del Río de la Plata destinadas a recreación.* Rev. Arg. de Microbiol. 16 (1): 1-10. 1984.

17. NASSIM NABBUT, H., *Elevated temperature technique for the isolation of Salmonella from sewage and human faeces.* J. Hyg. Camb. 71: 49-54. 1972.

18. SPINO, D. F., *Elevated temperature technique for the isolation of Salmonella from streams.* Appl. Microbiol. 14: 591-596. 1966.

19. HICKS, C., *Fundamental concepts in the design of experiments.* Saunders Coll. P. p. 30-32. 1982.

20. YOSHPE, Y.; RIVKLIS, S. H.; PAIST, M., *A convenient method for isolation of Salmonella from sewage and contaminated sea water.* Water research. Pergamon Press. 4: 113-120. 1971.