

División de Ciencias Biológicas. Centro Universitario del Sur. Universidad de Guadalajara. México

***Listeria monocytogenes* como bioindicador sanitario para el control ambiental de las aguas incorporadas a los embalses**

Adán Sepúlveda Montes,¹ Nanci Edid Martínez González,³ Aída Cecilia Ramírez Gómez,¹ Miguel Raygoza Anaya² y Francisco Trujillo Contreras²

Resumen

El presente estudio es un ensayo epidemiológico ambiental el cual tuvo como objetivo aislar e identificar la *Listeria monocytogenes* de las aguas incorporadas a los embalses. Se realizó en la laguna de Zapotlán con importancia turística en la región sur del estado de Jalisco y que abastece de peces a ciudades y poblaciones vecinas del lugar. Se utilizó la torunda de Moore para el aislamiento de *Listeria* spp. de las muestras obtenidas de tres canales con aguas residuales que provenían de dos municipios aledaños al lugar. Se emplearon dos tiempos de exposición de las torundas (de 1 h y de 24 h). Se tomaron un total de 60 muestras distribuidas en los meses de septiembre de 1997 a febrero de 1998 y en cada muestra fueron considerados los dos tiempos de exposición. Se encontró de las 60 muestras estudiadas 42 (70 %) positivas a *Listeria* spp. y 40 (66,6 %) a *Listeria monocytogenes*. Esta última fue la que con más frecuencia se encontró con 133 de las 150 cepas aisladas. Es obvio que las especies están ampliamente distribuidas en la zona y pueden diseminarse con mucha facilidad en la región y en el país. Aunque los resultados no muestran diferencia significativa para los dos tiempos de exposición, sugieren que cuando la torunda se expone durante 24 h existe mayor probabilidad de lograr el aislamiento que cuando se expone 1 h.

DeCS: LISTERIA MONOCYTOGENES/aislamiento & purificación; CONTAMINACION DE LAGOS Y EMBALSES; PROTECCION AMBIENTAL; AGUAS RESIDUALES; IMPACTO AMBIENTAL; MEDICION DE RIESGO; VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA; MEXICO.

Tradicionalmente, en Latinoamérica las aguas de los embalses lacustres y represas son utilizadas para regar los sembradíos de hortalizas y otros cultivos. Sin embargo, la calidad sanitaria de estas no deja de representar un riesgo epidemiológico, porque constantemente son contaminadas con aguas residuales procedentes de las poblaciones cercanas, que transportan agentes etiológicos de múltiples enfermedades infecciosas, además de que las aguas son deficientemente procesadas en las plantas de tratamiento municipales.¹

Por otra parte, para medir los niveles de contaminación fecal, uno de los índices utilizados con mayor frecuencia es la concentración mínima aceptable de organismos coliformes que determina la disminución del riesgo epidemiológico.² No obstante, además del anterior criterio, también resulta significativo considerar la presencia de patógenos específicos, cuyo impacto en el bienestar comunitario y ambiental es de interés para la salud pública. En esta categoría, el uso de *Listeria monocytogenes* como bioindicador sanitario ha sido demostrado eficientemente en empresas de productos lácteos, así como en el monitoreo ambiental de su propio entorno.^{3,4}

Así, el propósito fundamental de la presente investigación, fue demostrar que la *Listeria monocytogenes* puede utilizarse como bioindicador sanitario para el control ambiental de las aguas incorporadas a los embalses lacustres.

Métodos

Tipo de estudio

Se realizó un ensayo epidemiológico ambiental que responde a la necesidad de contar con parámetros estrictos de vigilancia en el control de aguas residuales que son vertidas en mantos acuíferos de importancia, tanto deportiva como de trabajo y la búsqueda de herramientas que nos proporcionen resultados confiables sobre la contaminación biológica que este tipo de descargas llevan consigo antes de llegar a los embalses.

Universo de trabajo

El escenario ambiental donde se llevó a cabo la presente investigación es una laguna de importancia turística en la región sur del estado de Jalisco, ya que en él se realizan continuamente pruebas deportivas de alto nivel e importancia internacional como son la motonáutica, canotaje y carreras de lanchas. De igual forma, una gran cantidad de personas subsisten con la pesca de algunas especies que existen en el lugar, las cuales son distribuidas en ciudades y poblaciones vecinas.

Bioindicador

El bioindicador representa una especie determinada de un organismo utilizada para monitorear los efectos de su exposición ante ciertos estímulos externos representados por sustancias genotóxicas.

En la primera parte de la investigación se estudió "in vitro" la capacidad y eficiencia de la torunda de Moore empleada para el aislamiento.⁵ Se utilizaron dos cepas de *Listeria monocytogenes*: Scott A, serotipo 4b y una cepa nativa, obtenida de brócoli crudo. Como control, se utilizó una cepa de *Salmonella typhimurium*,⁶ y se comprobó plenamente la eficacia y eficiencia del método utilizado. Todas las cepas fueron inoculadas en agua destilada estéril en concentraciones conocidas de células para realizar su recuperación y aislamiento.^{7,8} El experimento consistió en muestrear agua por el método de Wells y colaboradores⁹ y hacer circular sucesivamente la misma torunda con que se muestreó por 8 frascos de agua estéril.

En la segunda parte del trabajo se estudió la capacidad de la torunda "in vivo" para recuperar y retener células de *Listeria monocytogenes*, a partir del agua de drenaje que desemboca por diversos puntos en la laguna Zapotlán.

Modelo experimental

Está representado por el sistema denominado torunda de Moore consistente en una porción de gasa de 60 × 40 cm, doblada 10 veces sobre sí misma hasta conformar una faja de aproximadamente 7 × 8 cm que se envolvió en papel dextransa y con hilo se sujetó en forma de cruz y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min. El presente modelo fue utilizado para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* en las muestras obtenidas de tres canales con aguas residuales que provenían de dos municipios aledaños al lugar.

Para el aislamiento se utilizaron dos tiempos de exposición de la torunda de 1 y 24 horas.

La variable de respuesta fue la presencia o ausencia de células de *Listeria monocytogenes* por 500 mL de agua destilada estéril.

Los factores analizados estadísticamente fueron:

- Microorganismos

a) *Listeria monocytogenes* Scott A. y brócoli

b) *Salmonella typhimurium*

- Concentración de células 1, 10 y 100

El análisis de la eficiencia de la técnica de Moore para recuperar y retener células de *L. monocytogenes* a partir de agua destilada contaminada, fue realizado mediante combinaciones de los diferentes niveles de los microorganismos e inóculos de un diseño factorial 3 x 3 con cuatro réplicas por cada tratamiento. El estudio consistió en 9 unidades experimentales por cada repetición ensayada que fueron corridas en orden aleatorio.

Los resultados "in vivo" fueron presencia o ausencia de serotipos de *Listeria* spp. en el agua de los diferentes afluentes municipales de la laguna Zapotlán, considerando los aspectos: horas de exposición (1 y 24 h) y municipio de donde provenía el agua.

Tamaño de la muestra

Se tomaron un total de 60 muestras distribuidas en los meses de septiembre de 1997 a febrero de 1998. En cada muestra fueron considerados 2 tiempos de exposición de 1 y 24 h. Las zonas de muestreo fueron tres canales (A, B y C) provenientes de los municipios de Gómez Farías y Cd. Guzmán, Jalisco.

Canal A. Agua de la planta de tratamiento ubicada en la calle Manuel Doblado s/n de Cd. Guzmán, Jalisco.

Canal B. Agua de la planta localizada en la colonia "El Triángulo" en Cd. Guzmán, Jalisco.

Canal C. Aguas residuales que provienen de la población de Gómez Farías, Jalisco, cuyo arribo a la laguna es por el lado Norte.

Procedimiento

La torunda se sujetó con hilo y fue sumergida en la corriente de agua de cada canal, a una distancia no mayor de 200 m de la laguna Zapotlán.

Las torundas, después de transcurrido cada tiempo de exposición, se colocaron en frascos con 100 mL de caldo enriquecimiento UVM para su traslado al laboratorio donde fue realizado el aislamiento para *Listeria* spp. mediante la técnica recomendada por la FDA (Food and Drug Administration) según revisión de 1992.

Resultados

En el trabajo realizado "in vitro" la cepa brócoli en función de la cantidad de células del organismo patógeno inoculado en agua destilada, se recuperó en concentraciones que oscilaron entre 0,19 y 590 ufc/mL de agua. En tanto, la cepa aislada de especímenes clínicos fue detectada en cantidades desde 0,5 hasta 560 ufc/500 mL de agua con una sensibilidad de 0,001 a 1,12 cel/mL de agua.

Las concentraciones mínima y máxima, recuperadas de células de la cepa de *Salmonella typhimurium* utilizada como control fueron de 0,6 y 660 ufc/500 mL. Esto significa que mediante el muestreo con la torunda de Moore se tiene capacidad para detectar números bajos de células en el agua destilada estéril, aunque posiblemente la flora asociada podría interferir en su aislamiento cuando la *Listeria* se encuentre presente en otros ambientes, por ejemplo aguas residuales.

Otro aspecto importante en la evaluación de la aplicabilidad de la torunda de Moore para recuperar *Listeria monocytogenes* en agua fue su capacidad para una vez que ha capturado las células del elemento patógeno, retenerlas aun después del flujo de grandes volúmenes de agua a través de ella. Mediante este procedimiento se pudo recuperar las cepas del organismo patógeno en las torundas sin enjuagar y después de 8 enjuagues. Los límites inferiores de detección de células de las cepas brócoli y Scott A después de los lavados fueron de 3 y 2 ufc/500 mL respectivamente. En esta etapa, la sensibilidad en la detección fue de 0,7 a 0,64 ufc/mL según las cepas de *Listeria* estudiadas.

Las células de *Salmonella typhimurium* empleadas también como control se recuperaron sin dificultad aun después de los 8 enjuagues. Y no se encontró evidencia de que la técnica de Moore utilizada en combinación con el procedimiento de Wells para la detección de *Listeria monocytogenes* en agua destilada, presente una recuperación diferente con respecto a *Salmonella*. En consecuencia, es posible asumir que la técnica de muestreo de la torunda, muestra igual eficiencia en la recuperación de ambos microorganismos, cuando estos se encuentran suspendidos en agua destilada estéril.

Respecto a la frecuencia de *Listeria* spp. en los tres afluentes municipales de la laguna Zapotlán se encontró lo siguiente: de 60 muestras estudiadas, 42 (70 %) fueron positivas a *Listeria* spp. y en 40 (66,6 %) fue posible recuperar *Listeria monocytogenes*.

Se observó que *L. monocytogenes* fue la que con más frecuencia se encontró (133 de las 150 cepas aisladas) *L. seeligeri* se aisló en 8 ocasiones y *L. innocua* en 7, mientras que *L. grayi* sólo se logró aislar 2 veces. Es obvio, que las especies en general están ampliamente distribuidas en la zona, lo que muestra la facilidad con que el organismo patógeno se puede distribuir en la región y en el país como consecuencia.

Cuando se realizó una comparación para saber qué influencia tenía el tiempo de exposición de la torunda en la recuperación del microorganismo se observó que el aislamiento logrado con ambos tiempos fue de 31,6 %, tanto para *Listeria* en general como para *L. monocytogenes* en particular; asimismo se observó el 5 % más de recuperación cuando se consideró el tiempo de 24 h de exposición en comparación con el de solo 1 h.

Discusión

Aunque los resultados no muestran diferencia significativa ($p \leq 0,05$) para los dos tiempos de exposición, se puede suponer que cuando la torunda se expone durante 24 h existe mayor probabilidad de lograr el aislamiento que si sólo se expone por 1h; esto tanto para *Listeria* spp. como para *L. monocytogenes*; sin perder de vista que el sitio de aislamiento es un medio altamente contaminado y además origen del organismo patógeno en estudio, lo que pudo haber influido en el resultado tan similar de los dos tiempos de exposición.

Las características fisiológicas de resistencia tan especiales que tiene este organismo patógeno lo pueden convertir en elemento de alta eficacia en el monitoreo del buen funcionamiento de las plantas de tratamiento de aguas negras o incluso para probar la eficiencia de métodos físicos y químicos usados para reducir el nivel de otros organismos patógenos.

Summary

The present study is an epidemiologic environmental trial aimed at isolating and identifying *Listeria monocytogenes* from dammed up waters. It was conducted at the lagoon of Zapotlán, which is an important tourist resort in the southern region of the state of Jalisco. It also provides neighboring cities and populations with fish. Moore's pledget was used to isolate *Listeria* spp. from the samples obtained in 3 canals with sewage coming from 2 nearby municipalities. Pledgets had 2 exposure times (1 h and 24 h). A total of 60 samples were taken from September 1997, to February 1998. The 2 exposure times were considered in each sample. Of the 60 studied samples, 42 (70 %) were positive for *Listeria* ssp. and 40 (66.6 %) for *Listeria monocytogenes*. The latter

was the most frequently found with 133 of the 150 isolated strains. It is obvious that the species are widely distributed in the zone and may disseminate themselves very easily in the region and in the country. Though the results do not show significant differences for the 2 exposure times, they suggest that when the pledget is exposed for 24 hours there is a higher probability of attaining isolation than when it is exposed during 1 hour.

Subject headings: LISTERIA MONOCYTOGENES/isolation & purification; LAKES AND IMPOUNDINGS POLLUTION; ENVIRONMENTAL PROTECTION; SEWAGE; ENVIRONMENTAL IMPACT; RISK ASSESSMENT; EPIDEMIOLOGIC SURVEILLANCE; MEXICO.

Referencias bibliográficas

1. Beuchat LR, Berrang ME, Brackett RE. "Presence and public health implications of *Listeria monocytogenes* on vegetables". In: AJ Miller, JL Smith, GA Somkuti (eds). Foodborne Listeriosis Washington, DC: Society for Industrial Microbiology; 1990.p.175-8.
2. Frazier WC, Westhoff D. Microbiología de los alimentos. Acribia Zaragoza: Acribia;1993.
3. Peraza C. *Listeria*, indicador de higiene. Acontecer Ovino-caprino. 1999;5(1):17-21.
4. Lovett J. *Listeria monocytogenes*. In: Doyle, M.P. (ed) Food borne Bacterial Pathogens. Basel Marcel Dekker, Washington, DC: Basel Marcel Dekker; 1989.p.283-310.
5. Fernández EE, Saldaña LY, Torres VR. Aplicación de la técnica de la torunda en el aislamiento de *Salmonella* a partir de algunas fuentes de agua superficiales. Resúmenes XIV Congreso Nacional de Microbiología, Chih, México;1983.
6. Sears SD, Ferreccio C, Levine MM, Cordana AM, Moreal J, Black D'ollone. The use of Moore swabs for isolation of *Salmonella typhi* from irrigation water in Santiago de Chile. J Inf Diseases 1984;149(4):640-2.
7. Curtis GD, Lee WH. Culture media and methods for the isolation of *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol 1995;26(1):1-13.
8. Cami G, Cocolin L, Cantoni C, Manzano M. A RE-PCR method to distinguish *Listeria monocytogenes* serovars. FEMS immunol Med Microbiol 1997;18(2):99-104.
9. Wells JG, Morris GK, Brachman PS. New method for isolating *Salmonella* from milk. Appl Environ Microbiol 1971;21(2):235-9.

Recibido: 28 de noviembre de 2001. Aprobado: 29 de octubre de 2002.

Adán Sepúlveda Montes. Departamento de Producción Animal y Medicina. División de Ciencias Biológicas. Centro Universitario del Sur. Universidad de Guadalajara. México.
E-mail: adans@cusur.vdg.mx

1 Departamento de Producción Animal y Medicina. División de Ciencias Biológicas. Centro Universitario del Sur, Universidad de Guadalajara.

2 Departamento de Medicina. División de Ciencias Biológicas. Centro Universitario del Sur. Universidad de Guadalajara.

3 Departamento de Farmacobiología. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara.