

VIABILIDAD DE *Escherichia coli* EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONTAMINANTES

Antonio Rivera T¹, Edith Chávez B¹, Gisela Rendón A², Silvia Giono C³.

RESUMEN

La contaminación en ríos condiciona la presencia de microorganismos adaptados al ecosistema entre ellos a patógenos de importancia en salud pública. **Objetivo:** Determinar la viabilidad de *Escherichia coli* en presencia de nitrato de plata, carbonato de amonio, fenol y formaldehído. **Materiales y métodos:** Se tomaron muestras de agua del río Alseseca, que luego se sembró en medios de cultivo selectivos para enterobacterias, seleccionándose las colonias del género *Escherichia*, las cuales fueron sembradas en el medio de orientación CHROMagar ECC. Las muestras de *E. coli* se evaluaron en presencia de nitrato de plata, carbonato de amonio, fenol y formaldehído. **Resultados:** El grupo experimental presentó viabilidad en presencia de los cuatro compuestos, el grupo control positivo presentó nula viabilidad, la comparación entre los grupos mostró diferencia significativa ($p < 0,05$). **Conclusión:** Los aislamientos de *E. coli* mostraron viabilidad, implicando riesgos para el ecosistemas y la salud, ya que el río Alseseca atraviesa por el municipio de Puebla donde existen núcleos poblacionales importantes.

Palabras clave: Contaminantes industriales, Aguas residuales, Contaminación de ríos, Biodegradación, *Escherichia coli*, Salud ambiental (fuente: DeCS BIREME).

ABSTRACT

River contamination conditions the presence of microorganisms adapted to different ecosystems, particularly for pathogens important from public health's point of view. **Objective:** To determine *Escherichia coli* viability in the presence of silver nitrate, ammonium carbonate, phenol and formaldehyde. **Materials and methods:** Water samples from Alseseca river were taken, which later were placed in selective culture media for enterobacteriaceae, and *Escherichia* colonies were selected, which, were then placed in orienting CHROMagar ECC medium. *E. coli* samples were assessed in the presence of silver nitrate, ammonium carbonate, and formaldehyde. **Results:** The experimental group showed viability in presence of the four compounds tested, control group showed null viability, and the comparison between the two groups showed a statistically significant difference ($p < 0,05$). **Conclusion:** *E. coli* isolates showed viability under the conditions tested, which implies risks for the ecosystem and for health, since Alseseca river goes through Puebla town, where there are important population nuclei.

Key words: Industrial pollutants, Sewage, River pollution, Biodegradation, *Escherichia coli*, Environmental health (source: DeCS BIREME).

INTRODUCCIÓN

La exposición continua del medio ambiente a la contaminación va originando mayores riesgos para la salud, generalmente estos riesgos son considerables en países en vías de desarrollo, en los cuales, la pobreza, la nula inversión en tecnología y la escasa legislación sobre protección al medio ambiente, han dado como resultado altos niveles de contaminación¹.

Con relación a lo expuesto, durante los últimos años el papel del medio ambiente y la influencia de este en diferentes enfermedades, ha sido objeto de estudio de biólogos, ecologistas, epidemiólogos y médicos, creándose un mayor interés sobre la estrecha relación entre el medio ambiente y la salud. Recientemente se ha documentado que en lo referente a salud pública la resistencia a los antibióticos, metales pesados y sustancias tóxicas tienen relación con las descargas, sin previo

¹ Centro de Investigaciones Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México.

² Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México.

³ Laboratorio de Bacteriología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Distrito Federal, México.

tratamiento, hacia cuerpos receptores de agua como es el caso de los ríos, principalmente².

En la naturaleza, el agua adquiere una variedad de constituyentes mediante el contacto con la atmósfera (gases), contacto con la tierra (minerales) y por el contacto con ambientes contaminados por el hombre (sustancias orgánicas e inorgánicas). La contaminación orgánica consiste en una acumulación exagerada de moléculas originadas por los organismos, compatibles con la vida y, generalmente, degradables. La contaminación inorgánica resulta de sustancias poco frecuentes en estado natural o sustancias nuevas, a las cuales la "vida" no ha tenido ocasión de adaptarse, y que pueden penetrar en las células para bloquear determinados mecanismos fisiológicos fundamentales. Su mecanismo de acción explica que basten concentraciones mínimas para producir efectos negativos en los seres vivos³.

Un problema grave, y característico del mundo moderno, es la saturación en la capacidad del medio ambiente para bioacumular o biodegradar los desechos asociados con las actividades antropogénicas⁴. Algunos de estos residuos son el nitrato de plata que es utilizado en la industria textil, joyería, fotografía, odontología y como cicatrizante, el cual es un compuesto químico que causa quemaduras ya que es un oxidante fuerte⁵.

El formaldehído se utiliza en la elaboración de cosméticos, plásticos dentales, desinfectantes, para materiales de limpieza en seco, fertilizantes, pinturas, productos para la tinción de pieles, en la fabricación de papel, como fijadores en patología y en trabajos de fotografía, este compuesto causa daños irreversibles si se ingiere o se inhala⁶.

El carbonato de amonio es un compuesto que se utiliza en la industria panificadora, como acidulante, alcalinizante y regulador, el cual daña ojos y piel si se pone en contacto, siendo considerado de riesgo para la salud⁷.

Por su parte, el fenol se utiliza en la industria de abrasivos, aditivos de aceites lubricantes, en la elaboración de resinas para barnices, en cosmetología, en la preparación de losetas plásticas para la aplicación de pisos, en conservadores para madera y colorantes para el papel, representando un riesgo en la salud ya que al igual que el nitrato tiene la característica de poder ser absorbido rápidamente y con facilidad por la piel, siendo riesgoso si se inhala, ingiere o absorbe ya que afecta hígado, riñones y piel⁸.

Uno de los contaminantes más comunes es el fenol, el cual a concentraciones de 80-100 partes por millón (ppm) sirve como nutriente para ciertas bacterias, pero a concentraciones mayores a 200 ppm se comporta como un bactericida⁹.

Al obtener información relacionada sobre los microorganismos presentes en los distintos cuerpos de agua, principalmente ríos, se puede promover el tratamiento de las descargas que se vierten a lo largo de sus cauces, considerando cual es la fuente emisora. El objetivo del presente trabajo es determinar la viabilidad de *Escherichia coli* a diferentes concentraciones de nitrato de plata, carbonato de amonio, fenol y formaldehído.

MATERIALES Y MÉTODOS

El río Alseseca representa un cuerpo de agua importante en la ciudad de Puebla, ya que atraviesa la zona urbana, lo cual condiciona que sea un receptor de descargas industriales, domésticas y urbanas, principalmente con presencia de materia orgánica y residuos industriales.

Las muestras de agua se colectaron en el punto que corresponde a la descarga del bulevar las torres del río Alseseca, estado y municipio de Puebla (18° 59' 48'' latitud norte, 98° 11' 24'' longitud oeste), siendo este punto geográfico donde el trayecto del río ya ha recibido la mayoría de las descargas con aguas contaminadas. Durante el año de 2003 se realizaron 240 muestreos, y se colectó 250 mL de agua entre las 10 y 12 horas, que fueron transportadas enseguida al laboratorio a temperatura ambiente.

Se colocó, en una serie de diez tubos de ensayo, por triplicado, 1000 µl del agua colectada en el tubo uno, de los tubos dos al diez se colocaron 900 µL de caldo nutritivo. A partir del tubo uno se realizó diluciones decimales, luego se incubó a 37 °C durante dos horas. Enseguida se sembraron por estría cruzada 5 µL de cada uno de los diez tubos en medio Mc Conkey, que luego se llevó a incubar a 37 °C durante 24 horas.

A partir del total de las placas sembradas (medio Mc Conkey) se seleccionaron las colonias representativas del género *Escherichia*, de acuerdo con sus características morfológicas y metabólicas, transfiriéndose cada una por picadura al medio de orientación CHROMagar ECC, se incubó a 37 °C durante 24 horas. Si las colonias teñían de color azul indicaba que las bacterias correspondían a *E. coli*, y si las muestras teñían de rojo indicaba otras enterobacterias.

Tabla 1. Concentraciones en las cuales los aislamientos de *E. coli* presentaron viabilidad.

Compuesto	Concentración (%)	Dilución*
Nitrato de plata	80	1 ⁻¹
Carbonato de amonio	80	1 ⁻⁴
Fenol	20	1 ⁻⁵
Formaldehído	5	1 ⁻³

*Las diferentes diluciones representan el punto donde se cuantificaron las UFC en un intervalo de 10 a 1000.

De los aislamientos de *Escherichia coli* se realizaron inóculos en caldo LB con una concentración entre 1×10^5 y 1×10^6 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). A partir de estos inóculos se realizaron diluciones decimales en caldo LB a diferentes concentraciones de nitrato de plata (20 a 80%). Para carbonato de amonio y fenol se aplicó el mismo esquema. Con formaldehído se realizó el mismo esquema de trabajo, excepto las concentraciones que fueron de 5 a 20%. Una vez determinadas las concentraciones de los compuestos evaluados y a las cuales los aislamientos obtenidos de *Escherichia coli* mostraron viabilidad, se realizaron ensayos de diluciones decimales para cuantificar con un intervalo de 10 a 1000 UFC (grupo experimental).

Para el grupo control positivo se incluyeron ensayos con la cepa de referencia *E. coli* K12, y como grupo control se incluyeron ensayos que no involucraban los compuestos a evaluar. Para determinar si existía diferencia en la viabilidad de los aislamientos de *Escherichia coli* en presencia de los diferentes compuestos estudiados y entre los grupos se utilizó la prueba estadística Kruskal Wallis (Programa INSTAT 2.0).

RESULTADOS

Las concentraciones de cada uno de los compuestos evaluados para estudiar la viabilidad de *Escherichia coli* aislada del cauce del río Alseseca se presentan en la tabla 1.

Los ensayos de viabilidad de *Escherichia coli* en presencia de nitrato de plata (80%), carbonato de amonio (80%), fenol (20%) y formaldehído (5%) mostraron que en los grupos experimental y control positivo (cepa de referencia *E. coli* K12) se ve disminuida su viabilidad respecto al grupo control.

Los cuatro tratamientos evaluados mostraron que *E. coli* en los grupos experimentales fue viable de forma considerable respecto al grupo control positivo y control (Tabla 2). El análisis estadístico mostró que no hubo diferencia significativa $p > 0,05$ al comparar la acción de cada uno de los compuestos evaluados. Pero al comparar la viabilidad entre los aislamientos obtenidos del río Alseseca (grupo experimental), la cepa de referencia (grupo control positivo) y el grupo control, sí se presentó diferencia significativa $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

La viabilidad que presentaron los aislamientos de *E. coli* a partir de muestras tomadas del río Alseseca, se atribuye a la capacidad que presenta este microorganismo para crecer en medios con altas concentraciones de mercurio, ácido fórmico, fenol y formaldehído¹⁰. Estos resultados son similares al estudio que demostró que *E. coli* aislada de ríos y lagos utiliza a los contaminantes presentes para estimular su crecimiento, al mismo tiempo que los van biodegradando, tal como sucede con el tricloroetileno y el fenol que presentan una reducción de 60 hasta 90%, a través de promotores de inanición que presenta esta bacteria¹¹.

Otros trabajos realizados con enterobacterias aisladas de aguas contaminadas, han demostrado que dichos microorganismos adquieren tolerancia al cobre, la plata, el cobalto, el cromo, el cadmio, el mercurio, el plomo, el estaño y el zinc, identificándose en dichos aislamientos un mismo plásmido (>20 kb), siendo este un posible factor que les confiera la viabilidad en medios hostiles¹². También se ha establecido que cepas de *E. coli* resistentes al arsénico, aisladas de diferentes ríos contaminados, presentan los genes *arsA*, *arsB* y *arsC*,

Tabla 2. Viabilidad de *E. coli* en los diferentes tratamientos*.

Grupo	Nitrato de plata	Carbonato de amonio	Fenol	Formaldehído
Experimental	722	737	1021	480
Control positivo	3	0	0	70
Control	> 4000	> 4000	> 4000	> 4000

* Los datos se reportan en UFC, la comparación de la viabilidad entre grupos mostró diferencia significativa ($p < 0,05$).

considerándose a estos como los responsables de su resistencia al arsénico y sus derivados¹³.

Por su parte, el complejo proteínico CzcABC, el cual se encarga de mediar la resistencia a cobalto, zinc y cadmio en *Alcaligenes eutrophus* mediante flujo de cationes, ha sido investigado en *E. coli* usando vesículas de membrana, dando como resultado en las mutantes de *E. coli* EC351, una alta resistencia a cobalto y cadmio, ya que en un principio estos dos metales son acumulados y después eliminados a través del flujo de cationes tal como lo realiza *Alcaligenes eutrophus*, y mostrando, las mutantes, un complejo proteínico Czc-dependiente, pero con una pequeña diferencia, ya que este complejo CzcABC en *E. coli* es un antiportador de protones de zinc¹⁴.

El grupo control positivo (*E. coli* K12) mostró nula viabilidad en presencia de los compuestos evaluados, lo cual se condiciona a que proviene de un cepario y el no haber estado en contacto con diversos contaminantes, sin embargo, se ha demostrado, por estudios bioquímicos y genéticos, que esta bacteria presenta tolerancia hacia iones metálicos y niveles altos de resistencia contra antibióticos¹⁵.

Con relación a los resultados obtenidos, la viabilidad que presentó *E. coli* en presencia de los compuestos evaluados permite plantear que su biodegradación o la bioacumulación puede condicionar la proliferación de *E. coli* y otros microorganismos potencialmente patógenos, además de la posibilidad de adquirir resistencia a antibióticos.

En conclusión, los aislamientos de *E. coli* en el río Alseseca mostraron viabilidad en presencia de los compuestos evaluados, implicando riesgos en el propio ecosistema y para la salud, ya que el río Alseseca atraviesa por el municipio de Puebla donde existen núcleos poblacionales importantes. Por lo anterior, el estudio de los efectos producidos por los desechos industriales en la viabilidad de los microorganismos presentes en aguas de cauces de ríos contaminados es parte importante para el saneamiento, recuperación y mantenimiento de estos cuerpos de agua, además de considerar que el agua cumple un papel importante desde el punto de vista biológico, doméstico e industrial, sin olvidar que los cuerpos de agua contaminados pueden condicionar efectos en la salud de la población. Por tanto, planteamos realizar trabajos relacionados con factores de virulencia que puedan presentar los aislamientos reportados en el presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Briggs D.** Environmental pollution and global burden of diseases. *Br Med Bull* 2003; 68(1): 1-24.
2. **Rivera-Tapia JA.** Environment and health. *An Med Asoc Med Hosp ABC* 2003; 48(4): 223-27.
3. **Margalef R.** Ecología. Barcelona: Ed. Omega; 1977.
4. **Riveros RG.** Consumo de petróleo y contaminación ambiental. *Rev Calidad Ambiental* 1994; 1(1):7-12.
5. **Kross BC, Hallberg GR, Bruner DR, Cherryholmes K, Johnson JK.** The nitrate contamination of private well water in Iowa. *Am J Public Health* 1993; 83(2): 270-72.
6. **Hodgson AT, Beal D, McIlvaine JE.** Sources of formaldehyde, other aldehydes and terpenes in a new manufactured house. *Indoor Air* 2002; 12(4): 235-42.
7. **English JS, Dawe RS, Ferguson J.** Environmental effects and skin disease. *Br Med Bull* 2003; 68(1): 129-42.
8. **Kahru A, Maloverjan A, Sillak H, Pollumaa L.** The toxicity and fate of phenolic pollutants in the contaminated soils associated with the oil-shale industry. *Environ Sci Pollut Res Int Spect* 2002; 1: 27-33.
9. **Prudent BB, Le H.** Wet air oxidation of soluble components in waste water. *Can J Chem Eng* 1976; 54: 319-25.
10. **De J, Ramaiah N, Mesquita A, Verlekar XN.** Tolerance to various toxicants by marine bacteria highly to mercury. *Mar Biotechnol (NY)* 2003; 5(2): 185-93.
11. **Matin A, Little CD, Fraley CD, Keyhan M.** Use of starvation promoters to limit growth and selectively enrich expression of trichloroethylene and phenol transforming activity in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61(11): 3323-28.
12. **Shakoori AR, Muneer B.** Copper-resistant bacteria from industrial effluents and their role in remediation of heavy metals in wastewater. *Folia Microbiol (Praha)* 2002; 47(1): 43-50.
13. **Saltikov WC, Olson HB.** Homology of *Escherichia coli* R773 *arsA*, *arsB* and *arsC* genes in arsenic-resistant bacteria isolated from raw sewage and arsenic-enriched creek water. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(1): 280-88.
14. **Nies DH.** The cobalt, zinc and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1995; 177(10): 2707-12.
15. **Nakajima H, Kobayashi K, Kobayashi M, Asako H, Aono R.** Over expression of the *robA* gene increases organic solvent tolerance and multiple antibiotic and heavy metal ion resistance in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61(6): 2302-7.

Correspondencia: José Antonio Rivera Tapia. Centro de Investigaciones Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
Dirección: Edificio 76 Complejo de Ciencias. Ciudad Universitaria C.P. 72570, Puebla, México.
Teléfono: (011 52) 222 2 33 20 10
Correo electrónico: jart70@yahoo.com