

Recuperación y diferenciación de *Aeromonas* con CromoCen AE y CromoCen AGN

Recovery and differentiation of *Aeromonas* with CromoCen AE and CromoCen AGN

Diana Rosa Viera Oramas, Claudio Rodríguez Martínez, Raisa Zhurbenko

Centro Nacional de Biopreparados (BioCen). Bejucal, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN

Introducción: en la actualidad las especies del género *Aeromonas* han emergido como un problema de salud pública, son ellas los agentes etiológicos de las enfermedades diarreicas con el aumento de la atención médica por años. Los procedimientos convencionales para su diagnóstico son muy engorrosos, laboriosos y duraderos. Una nueva metodología que emplea medios de cultivo cromogénicos ha permitido la simplificación y aceleración de su diagnóstico, que ofrece resultados altamente específicos.

Objetivo: estudiar el efecto de la combinación de diferentes agentes selectivos de los microorganismos grampositivos sobre el aumento de la capacidad de recuperación, cuantificación y diferenciación de las especies de *Aeromonas*.

Métodos: se estudió el efecto inhibitorio de la combinación de agentes selectivos (desoxicolato de sodio (0,05-0,2 g·L⁻¹), sales biliares (0,65 g·L⁻¹), verde brillante (0,025-0,03 g·L⁻¹), cristal violeta (0,001-0,01 g·L⁻¹) y sulfito de sodio (0,8 g·L⁻¹) sobre los microorganismos grampositivos, así como la capacidad de recuperación, cuantificación y diferenciación de las especies de *Aeromonas*. Como base se utilizó la formulación de CromoCen AGN, sin el desoxicolato de sodio.

Resultados: los valores de las productividades de los medios CromoCen AE y CromoCen AGN a partir del inóculo $1,5 \times 10^2$ UFC·mL⁻¹ resultaron, para: *A. hydrophila* 116,8 % y 23,9 %, *A. caviae* 100,8 % y 3,95 %, *A. bestiarum* 93,6 % y 28,8 %, *A. culicicola* 85,1 % y 66,12 %, *A. veronii* 116,7 % y 59,2 %, *A. popoffi* 86,56 % y 13,2 %, *A. trota* 94,8 % y 11,25 % y para *A. eucrinophila* 103,9 % y 2,80 %. La nueva composición cromogénica logró la diferenciación de los microorganismos por sus características culturales: color, forma, superficie, bordes en las colonias y proteólisis del medio circundante.

Conclusiones: la combinación de diferentes agentes selectivos para la inhibición

de los microorganismos grampositivos coadyuvo el aumento de la capacidad de recuperación, cuantificación y diferenciación de las especies de *Aeromonas*.

Palabras clave: *Aeromonas*; recuperación; sustratos cromogénicos; desoxicolato de sodio; sulfito de sodio; CromoCen AE; CromoCen AGN.

ABSTRACT

Introduction: Species of the genus *Aeromonas* are a current public health problem, for they are the etiological agents responsible for the growing incidence of diarrheal diseases requiring medical care. Conventional procedures for their diagnosis are very complicated, laborious and time-consuming. A new methodology based on the use of chromogenic culture media allows diagnostic simplification and acceleration, yielding highly specific results.

Objective: Study the effect of combining several selective agents for gram-positive microorganisms upon an increased capacity for recovery, quantification and differentiation of *Aeromonas* species.

Methods: Assessment was conducted of the inhibiting effect of combined selective agents (sodium deoxycholate (0.05-0.2 g·L⁻¹), bile salts (0.65 g·L⁻¹), brilliant green (0.025-0.03 g·L⁻¹), crystal violet (0.001-0.01 g·L⁻¹) and sodium sulfite (0.8 g·L⁻¹)) on gram-positive microorganisms, as well as their capacity for recovery, quantification and differentiation of *Aeromonas* species. The base used was the CromoGen AGN formulation without sodium deoxycholate.

Results: Productivity values for the media CromoCen AE and CromoCen AGN based on inoculation of 1.5×10^2 CFU·mL⁻¹ were 116.8 % and 23.9 % for *A. hydrophila*, 100.8 % and 3.95 % for *A. caviae*, 93.6 % and 28.8 % for *A. bestiarium*, 85.1 % and 66.12 % for *A. culicicola*, 116.7 % and 59.2 % for *A. veronii*, 86.56 % and 13.2 % for *A. popoffi*, 94.8 % and 11.25 % for *A. trota*, and 103.9 % and 2.8 0% for *A. eucrinophila*. The new chromogenic composition enabled differentiation of microorganisms based on their cultural characteristics: color, shape, surface, colony borders and environmental proteolysis.

Conclusions: Combination of various selective agents for the inhibition of gram-positive microorganisms led to an increased capacity for recovery, quantification and differentiation of *Aeromonas* species.

Key words: *Aeromonas*; recovery; chromogenic substrates; sodium deoxycholate; sodium sulfite; CromoCen AE; CromoCen AGN.

INTRODUCCIÓN

Los géneros de la familia *Aeromonadaceae* han sido reconocidos por mucho tiempo como causantes de procesos infecciosos en peces, reptiles y anfibios.^{1,2} Las especies del género *Aeromonas* han surgido como un problema de salud para la población mundial, por el amplio espectro de expresiones clínicas que producen entre las cuales se encuentran tales como endocarditis, septicemia, bacteriemia, meningoencefalitis, neumonía, peritonitis, infección hepatobiliar, celulitis e infección gastrointestinal.^{3,4}

En Cuba, las condiciones climáticas favorecen la aparición de enfermedades diarreicas agudas (EDA). Por esta razón las EDA constituyen una de las principales causas de atención médica con más de un millón de atenciones anuales.⁵ Las bacterias que ocupan los primeros lugares como agentes etiológicos de las enfermedades diarreicas son: *Clostridium difficile*, *Escherichia coli* y diferentes especies de los géneros tales como *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Vibrio* y *Aeromonas*.³

Los miembros del género *Aeromonas* son habitantes de ecosistemas acuáticos y desempeñan un papel importante como patógenos primarios en el tracto gastrointestinal. Están constituidos por bacilos gramnegativos, oxidasa y catalasa positivos, fermentadores de glucosa y son anaerobios facultativos.⁶ Las especies más importantes de *Aeromonas* que causan infección en el hombre son *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* y *Aeromonas veronii* biotipo *sobria*.^{2,7}

El aumento de los aislamientos de estos microorganismos en los últimos años, a partir de muestras clínicas, ha conducido a la profundización en el estudio de la patogenicidad en este género. Los procedimientos convencionales para su diagnóstico son muy engorrosos y la confirmación de los resultados se demora de 7 a 10 días.⁴

Una nueva metodología que emplea medios de cultivo elaborados con sustratos cromogénicos y fluorogénicos ha permitido la simplificación y aceleración del diagnóstico de diferentes patógenos, que ofrece resultados altamente específicos.^{8,9} Estos novedosos diagnosticadores cromogénicos-fluorogénicos muestran, entre sus ventajas, la posibilidad de que ocurran varias reacciones simultáneas; además de prescindir de un medio de aislamiento primario, en la mayoría de los casos; lo que significa un ahorro de tiempo, trabajo y recursos.¹⁰

El medio cromogénico CromoCen AGN permite la identificación rápida y simultánea de *Aeromonas* y *Pseudomonas*.¹¹ Sin embargo, la recuperación de diferentes especies de *Aeromonas* se encuentra disminuida debido a la utilización de los agentes selectivos en su composición. Es por ello que el objetivo de esta investigación consistió en estudiar el efecto de la combinación de diferentes agentes selectivos de los microorganismos grampositivos sobre el aumento de la capacidad de recuperación, cuantificación y diferenciación de las especies de *Aeromonas*.

MÉTODOS

MATERIAS PRIMAS

Se utilizaron la peptona bacteriológica P, extracto de levadura S, hidrolizado enzimático de caseína y las sales biliares (BioCen, Cuba). Rojo neutro, tierra silíceo y verde brillante procedieron de *Merck* (Alemania). Los sustratos cromogénicos magenta-glc y X-gal se adquirieron por el proveedor Apollo (Alemania). A su vez, la leche descremada, desoxicolato de sodio, sulfito de sodio y el cristal violeta fueron suministrados por Applichem (Alemania).

En la firma Conda (España) se adquirió el agente gelificante, el agar. Como medios controles se utilizaron el CromoCen AGN (AGN) y agar triptona soya (ATS), ambos de BioCen (Cuba). Las cepas de los microorganismos se activaron en caldo triptona soya (CTS) (BioCen, Cuba).

MATERIAL BIOLÓGICO

Para la evaluación de la capacidad nutricional y diferencial del medio CromoCen AE (AE) (BioCen, Cuba) se emplearon ocho especies de *Aeromonas* procedentes del cepario central del Centro Nacional de Biopreparados (BioCen): 6 de ellas clasificadas según la *American Type Culture Collection* (ATCC) como *A. hydrophila* 7966, *A. caviae* 15468, *Aeromonas bestiarum* 51108, *Aeromonas culicicola* 3249, *Aeromonas veronii* 35624, *Aeromonas trota* 49657 y dos especies (*Aeromonas eucrenophila* NCIMB74 y *Aeromonas popoffi* LMG 17541), clasificadas según *National Collections of Industrial Food and Marine Bacteria* (NCIMB) y *Belgian Coordinated Collections of Microorganisms/LMG Bacteria Collection* (LMG), al respecto.

En el estudio de la capacidad inhibidora se empleó un total de 13 bacterias grampositivas, procedentes del cepario central de BioCen y clasificadas según ATCC de la siguiente forma: cinco de ellas concernientes al género de *Staphylococcus* (*Staphylococcus aureus* 25923, *Staphylococcus aureus* 6538, *Staphylococcus haemolyticus* 29770, *Staphylococcus xylosus* 29771 y *Staphylococcus saprofiticus* 15305); seis correspondientes al género de *Enterococcus* (*Enterococcus faecalis* 29212, *Enterococcus faecalis* 19433, *Enterococcus faecium* 19434, *Enterococcus casseliflavus* 700327, *Enterococcus avium* 14025 y *Enterococcus hirae* 10541) y dos representantes del género de *Streptococcus* (*Streptococcus pyogenes* 9959 y *Streptococcus agalactiae* 12136).

A partir de un cultivo puro en CTS, incubado durante 24 h a 35 ± 2 °C, se prepararon las suspensiones microbianas en solución salina estéril al 0,85 % (SSE) (p/v) (NaCl, grado analítico; Merck, Alemania). La densidad microbiana se estandarizó a $DO_{550\text{ nm}}$ a 0,125 equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹, con el uso del espectrofotómetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Inglaterra). De esta se prepararon diluciones decimales seriadas en SSE.

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD SELECTIVA DEL MEDIO CROMOCEN AE

Se realizó un diseño experimental donde se establecieron distintas concentraciones y combinaciones de los seis inhibidores para las bacterias grampositivas (tabla 1). Como base se utilizó la formulación de AGN,¹¹ sin el desoxicolato de sodio como inhibidor. A esta base se le adicionaron, en el momento de la preparación de las ocho variantes experimentales, las cantidades de los inhibidores objeto de este estudio de manera individual o en sus combinaciones (tabla 1). El resto del proceso de preparación de dichas variantes se realizó de igual manera como está establecido para el AGN.¹¹ La actividad inhibitoria de las nuevas composiciones se evaluó frente a las especies de los géneros *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*, mencionadas en el acápite "Material biológico". En todos los casos se inocularon 0,2 mL de cada una de las diluciones decimales desde 10⁻¹ ($1,5 \times 10^7$ UFC·mL⁻¹) hasta 10⁻⁵ ($1,5 \times 10^3$ UFC·mL⁻¹) en los medios AE, AGN y ATS, por duplicado. Los medios fueron incubados a 35 ± 2 °C por 24 h. Pasado el tiempo de incubación se observó el crecimiento de las bacterias grampositivas.

Tabla 1. Inhibidores de bacterias grampositivas utilizados en el estudio de la capacidad selectiva del medio CromoCen AE

Inhibidor (g · L ⁻¹)	Variante							
	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅	V ₆	V ₇	V ₈
Desoxicolato de sodio	0,05	-	0,05	-	-	0,05	0,05	0,2
Sales biliares	-	0,65	0,65	-	-	-	-	-
Verde brillante	-	-	-	0,025	-	0,003	-	-
Cristal violeta	-	-	-	-	0,01	-	0,001	-
Sulfito de sodio	-	-	-	-	-	-	-	0,8

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE RECUPERACIÓN DE LAS ESPECIES DE *AEROMONAS* DEL MEDIO CROMOCEN AE

La productividad de AE se determinó en comparación con los medios AGN y ATS. Se utilizaron tres diluciones correspondientes a $1,5 \times 10^4$ UFC·mL⁻¹, $1,5 \times 10^3$ UFC·mL⁻¹ y $1,5 \times 10^2$ UFC·mL⁻¹ para los microorganismos siguientes: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. bestiarum*, *A. culicicola*, *A. veronii*, *A. popoffi*, *A. trota* y *A. eucrenophila*. Cada dilución se inoculó con 0,2 mL por triplicado en cada uno de los tres medios de cultivo. Posterior se incubaron a 35 ± 2 °C por 24 h. Se realizaron los recuentos de los cultivos en todas las placas (UFC). Con ayuda del programa Excel se calculó la productividad ISO 11133-2 (2003)¹² relacionando los recuentos medios obtenidos en cada una de las diluciones en los medios AE y AGN con los recuentos de UFC obtenidos en el medios ATS en la dilución correspondiente. En último lugar se calculó la media entre las productividades obtenidas en cada dilución para cada medio y su desviación estándar.

DIFERENCIACIÓN DE LAS ESPECIES DE *AEROMONAS* EN EL MEDIO CROMOCEN AE

La diferenciación de las especies de *Aeromonas* se observó en la composición final del medio AE con la incorporación de los inhibidores definidos (desoxicolato de sodio – 0,2 g·L⁻¹ y el sulfito de sodio – 0,8 g·L⁻¹), inoculada con 0,2 mL de una suspensión microbiana de $1,5 \times 10^3$ UFC·mL⁻¹. Las características diferenciales de las colonias (color, forma, superficie y bordes), así como la proteólisis del medio alrededor de la colonia se observaron de manera visual, después de incubadas las placas a 35 ± 2 °C por 24 h.

RESULTADOS

El estudio de inhibidores en el AE reflejó que las concentraciones empleadas en las variantes V₁ (0,05 g·L⁻¹ de desoxicolato de sodio), V₂ (0,65 g·L⁻¹ de sales biliares) y V₄ (verde brillante 0,025 g·L⁻¹), así como las combinaciones entre los agentes inhibidores en las variantes V₆ (desoxicolato de sodio y el verde brillante: 0,05 y 0,003 g·L⁻¹), V₇ (desoxicolato de sodio y el cristal violeta 0,05 y 0,001 g·L⁻¹), empleadas en la composición del medio cromogénico, no fueron suficientes para la inhibición del crecimiento de los microorganismos grampositivos, ya que se observó el desarrollo microbiano hasta la dilución 10^{-5} ($1,5 \times 10^3$ UFC·mL⁻¹). El crecimiento

de los microorganismos diana no se vio afectado en ninguna de las variantes antes mencionadas.

En las variantes V₃ (combinación entre el desoxicolato de sodio y sales biliares 0,05 y 0,65 g·L⁻¹, al respecto) y V₅ (0,01 g·L⁻¹ de cristal violeta) se inhibió el crecimiento de las especies de *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* en la concentración de 1,5 × 10⁵ UFC·mL⁻¹, fueron estas variantes las adecuadas para la inhibición de los microorganismos no diana. Sin embargo, el desarrollo de las especies de *Aeromonas* de interés clínico se vio afectado en las mismas.

La composición confeccionada como V₈ (0,2 g·L⁻¹ de desoxicolato de sodio y 0,8 g·L⁻¹ de sulfito de sodio) fue efectiva para inhibir en la dilución 10⁻² (1,5 × 10⁵ UFC·mL⁻¹) a las bacterias grampositivas y mostró adecuadas características culturales de las colonias de las especies de *Aeromonas*.

Se puede plantear que la concentración combinada de 1 g·L⁻¹ entre los inhibidores desoxicolato de sodio y el sulfito de sodio (V₈) en el medio AE, permitió la inhibición de los microorganismos evaluados de los géneros de *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* en la dilución 10⁻² (1,5 × 10⁵ UFC·mL⁻¹).

Los valores de las productividades de los medios AE y AGN resultaron, para: *A. hydrophila* 116,8 % y 23,9 %, *A. caviae* 100,8 % y 3,95 %, *A. bestiarium* 93,6 % y 28,8 %, *A. culicicola* 85,1 % y 66,12 %, *A. veronii* 116,7 % y 59,2 %, *A. popoffi* 86,56 % y 13,2 %, *A. trota* 94,8 % y 11,25 % y para *A. eucrinophila* 103,9 % y 2,80 % (Fig.).

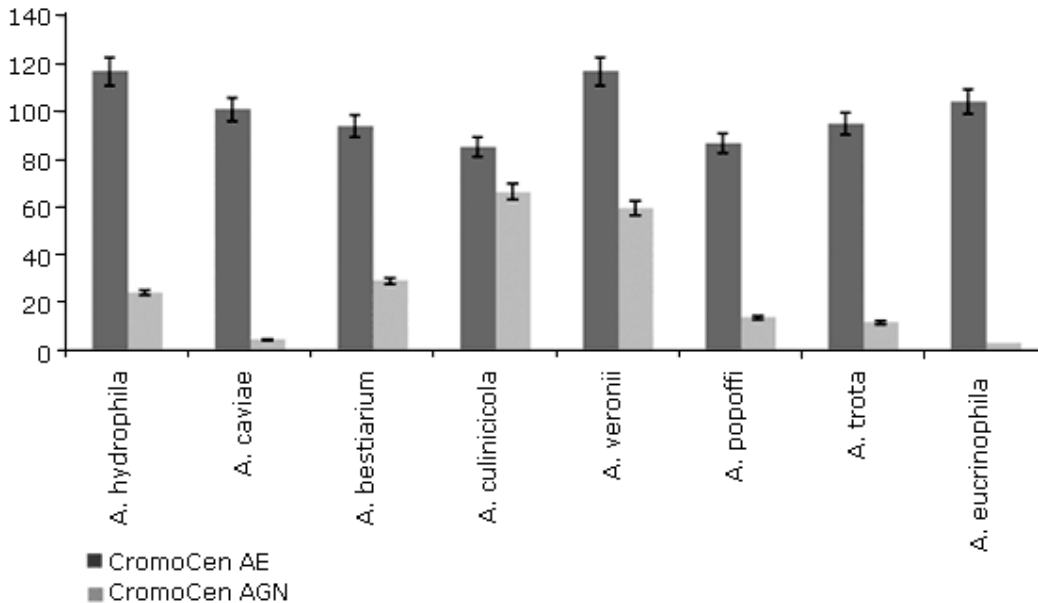


Fig. Productividad de los medios AE y AGN, Cepas de ATCC: *A. hydrophila* 7966, *A. caviae* 15468, *A. bestiarium* 51108, *A. culicicola* 3249, *A. veronii* 35624, *A. trota* 49657; de la LMG: *A. popoffi* 17541 y de la NCIMB *A. eucrinophila* NCIMB74.

La nueva composición cromogénica logró la diferenciación de los microorganismos por sus características culturales (color, forma, superficie y bordes en las colonias y proteólisis del medio circundante) (tabla 2). Se identificó *A. culicicola* por el color violeta con centro oscuro y su forma irregular de las colonias, mientras que *A. eucrinophila* desarrollo colonias redondas de color violeta. A su vez, esta

composición permitió la detección de *A. bestiarium* y *A. caviae* por el color naranja con centro verde grisáceo de las colonias. La aparición del color rosado con centro verde grisáceo de forma circular y superficie convexa, mostrado por las colonias de *A. trota*, permitió diferenciarla del resto de las especies de *Aeromonas*. Las especies de *A. hydrophila*, *A. veronii* y *A. popoffi* presentaron un color violeta claro con centro oscuro.

Tabla 2. Características culturales de las especies de *Aeromonas* en el medio CromoCen AE

Especie	Color	Características culturales			Proteólisis
		Forma	Superficie	Borde	
<i>A. bestiarium</i> ATCC 51108	color naranja o violeta claro con centro verde grisáceo	circular	plana	redondeada	+
<i>A. culicicola</i> ATCC 3249	color violeta con centro oscuro	irregular	plana	ondulado	+
<i>A. trota</i> ATCC 49657	color de rosado claro a naranja claro con centro verde grisáceo	circular	convexa	redondeada	+
<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	color violeta claro con centro más oscuro	circular	plana	redondeada	+
<i>A. caviae</i> ATCC 15468	color naranja o violeta claro con centro verde grisáceo	circular	plana	redondeada	+
<i>A. veronii</i> ATCC 35624	color violeta claro con centro más oscuro	circular	plana	redondeada	+
<i>A. eucrinophila</i> NCIMB74	color violeta	circular	plana	redondeada	-
<i>A. popoffi</i> LMG 17541	color violeta claro con centro más oscuro	circular	plana	redondeada	+

En el medio AGN todas las especies de *Aeromonas* estudiadas se tornaron de color verde azul. En los dos medios (AE y AGN), todas las especies de *Aeromonas* se caracterizaron por presentar un halo amplio y traslúcido alrededor de las colonias.

DISCUSIÓN

El hábitat más común de *Aeromonas* lo constituyen los ambientes acuáticos. Los factores ecológicos que afectan su prevalencia en el agua son de interés para los

microbiólogos y epidemiólogos, por la incidencia en los episodios de enfermedades de transmisión digestiva o situaciones de emergencia. La presencia de *Aeromonas*, en ausencia de coliformes fecales, reitera la necesidad de considerar este microorganismo dentro de los criterios microbiológicos a tener en cuenta en determinadas situaciones, en especial en aguas de consumo.¹³

La detección e identificación temprana de este género reviste gran importancia en la microbiología clínica. Existen diferentes medios de cultivo destinados al aislamiento de *Aeromonas* presentes en disímiles muestras clínicas y ambientes ecológicos, que utilizan como inhibidores de la microbiota grampositiva los antibióticos, tales como el ampicillin y la vancomicina.⁹ Sin embargo, esto atenta contra la estabilidad en el tiempo de las placas listas para el uso de estos medios de cultivo.

En Cuba, en la última década, se desarrolló un diagnosticador (CromoCen AGN) con la utilización de los sustratos cromogénicos para la detección de las especies de *Aeromonas* tanto en muestras clínicas, como en de los alimentos.¹¹ El nuevo método con la utilización de este medio de cultivo ha sido validado en agua,¹⁴ en alimentos,¹⁰ y en muestras clínicas.¹⁰ Como resultado de estos estudios surgió la necesidad de aumentar la capacidad de recuperación y cuantificación de las aeromonas, con los estudios pormenorizados de las combinaciones de diferentes agentes selectivos de la microbiota grampositiva con los nutrientes de la formulación.

Rodríguez y colaboradores en el 2000¹¹ estudiaron el uso de desoxicolato de sodio para la inhibición de los microorganismos grampositivos en concentraciones 0,1 y 1 g·L⁻¹ sin afectar la capacidad del medio de diferenciar las especies de *Aeromonas*. Los resultados obtenidos en el actual estudio con el medio AGN (utilizado como control) demostraron que altas concentraciones de este agente selectivo (1 g·L⁻¹) inhiben el desarrollo de los microorganismos diana y no diana, en comparación con los recuentos obtenidos en el medio AE. Esta inhibición está dada a que el desoxicolato de sodio actúa sobre la lisis mitocondrial de las células bacterianas, e impide su crecimiento.¹⁵ Las cantidades empleadas del desoxicolato de sodio en el medio AE entre 0,05 y 0,2 g·L⁻¹ resultaron ser adecuadas para el desarrollo de *Aeromonas*, sin embargo esas concentraciones no fueron suficiente para la inhibición de los gérmenes grampositivos.

La concentración de 0,65 g·L⁻¹ de sales biliares en el presente estudio no logró la inhibición del crecimiento de los microorganismos grampositivos, coincidiendo con los estudios realizados por varios autores los que utilizaron las concentraciones de este inhibidor enmarcadas entre 0,8 y 4 g·L⁻¹.¹⁶

La mezcla de los agentes selectivos desoxicolato de sodio (0,05 g·L⁻¹) y sales biliares (0,65 g·L⁻¹) fue efectiva para inhibir el crecimiento de los microorganismos no diana, pero impidió el crecimiento de *Aeromonas*, debido a que la combinación del ácido cólico y desoxicólico inhibe el desarrollo de los microorganismos grampositivos, pero tiene efecto tóxico sobre algunas bacterias gramnegativas, excepto los coliformes.¹⁷

Los estudios realizados por varios autores refieren que el efecto de inhibición del cristal violeta aumenta a medida que se eleva el pH del medio de 6 a 8 y se debe también a la formación de un complejo no iónico con las bacterias gramnegativas y grampositivas, incrementa la acción inhibitoria a medida que aumente el pH del medio y la carga negativa de las bacterias.^{18,19} Estos hallazgos confirman los resultados obtenidos en el presente estudio, donde se inhibió el crecimiento de las

especies de los *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Aeromonas* en concentración de 0,01 g·L⁻¹ de cristal violeta.

El colorante verde brillante se utiliza como agente selectivo en medios de cultivos por su efecto bacteriostático. El modo de acción del este compuesto (derivado del trifenilmetano) no está claro, pero se cree que interviene en los procesos de oxidación celular. La acción bacteriostática del mismo se debe a la modificación del potencial de oxido-reducción del medio, lo que inhibe el desarrollo de los microorganismos. Bloquea la conversión del ácido undecaprenil-fosfato (UDP)-acetilmurámico en UDP-acetilmuramil-péptido. En general, estos derivados son más activos contra las bacterias grampositivas y algunos hongos en concentración de 0,05 g·L⁻¹.^{20,21} A la concentración 0,025 g·L⁻¹, utilizada en esta investigación no se logró la inhibición deseada de los microorganismos grampositivos.

Se ha reportado que el sulfito de sodio puede ejercer una acción antimicrobiana sobre diversos mohos, levaduras y bacterias, al penetrar en la célula microbiana: ejerce una acción directa sobre el acetaldehído de la misma, y provoca una reacción de bisulfito de sodio con las enzimas bacterianas que contienen los enlaces disulfuro y la interferencia del bisulfito con los mecanismos de respiración de los microorganismos en los que intervienen el de nucleótido de nicotinamida.²² El sulfito de sodio (0,8 g·L⁻¹), en combinación con el desoxicolato de sodio (0,2 g·L⁻¹) proporcionó la inhibición de los microorganismos grampositivos en la concentración de $1,5 \times 10^6$ UFC·mL⁻¹ y, a su vez, proporcionó una adecuada recuperación y cuantificación de las especies de *Aeromonas*.

Los mayores valores de productividad obtenidos en el medio AE corresponden a las especies de *A. hydrophila*, *A. veronii* y *A. caviae*, aisladas de forma predominante en los estudios de muestras clínicas. En Cuba los cuadros diarreicos tienen una elevada incidencia. Por otra parte, los estudios realizados por *Cabrera y colaboradores* en el 2007, demostraron que la mayor cantidad de los bacilos gramnegativos, oxidasa positivos, aislados de las muestras extraintestinales (hemocultivos, exudados óticos, pus de heridas, exudados conjuntivales, entre otras), pertenecieron al género *Aeromonas*.⁴ Los estudios relacionados con la caracterización de los de aislamientos del agua del embalse "Niña bonita" reflejaron que 78 % de los mismos correspondieron al género *Aeromonas*.²³

Bravo y colaboradores en el año 2012,⁵ reportaron que de 166 aislamientos clínicos relacionados con EDA analizados 34,3 % correspondieron a *A. caviae*, 30,7 % a *A. hydrophila* y 21,6 % a *A. veronii* bt sobria.

La recuperación de las especies de *Aeromonas* en el medio AE se debe a la combinación de bases nutritivas de varios orígenes, con los aportes de nitrógeno en diferentes fracciones proteicas, vitaminas, macro y microelementos, disponibles para el metabolismo bacteriano, en especial de *Aeromonas*.²⁴⁻²⁶

La diferencia en el porcentaje de recuperación entre los medios AE y AGN se debe a la disminución de la concentración de desoxicolato de sodio de 1 g·L⁻¹ en el AGN hasta 0,2 g·L⁻¹ en el medio AE.

La diferenciación de las especies de *Aeromonas* entre sí se logró debido a que la nueva composición AE promueve el crecimiento profuso de las mismas por poseer las sustancias nutritivas necesarias para el metabolismo de las mismas. Por otra parte la combinación del sustrato cromogénico para la detección de actividad β-galactosidasa, presente en *Aeromonas*, con un sustrato (de origen proteico) para la detección de actividad proteolítica, hizo posible la diferenciación entre ellas. La presencia de proteínas lácteas en el medio y fuentes de carbono, así como de una

sustancia inerte contrastante, posibilita la detección de la actividad proteolítica que permite la aparición de halos transparentes alrededor de la colonia.^{8,10,27}

Se ha demostrado que los sustratos cromogénicos son una herramienta potente en la identificación de microorganismos, debido a la detección de enzimas específicas producidas por los microorganismos en estudio.²⁸ Su incorporación en un medio selectivo, pueda eliminar la necesidad del subcultivo y la realización de numerosas pruebas bioquímicas, economiza tiempo y recursos. Las interacciones entre los microorganismos y las sustancias químicas, difieren y dependen de la estructura de los cromógenos usados y de las enzimas detectadas. La sustancia generada durante la reacción enzimática, se precipita sobre las células microbianas que da características cromogénicas específicas a las colonias. Se demostró, con este estudio, que la combinación de diferentes agentes selectivos de los microorganismos grampositivos coadyuvo el aumento de la capacidad de recuperación, cuantificación y diferenciación de las especies de *Aeromonas*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Quiroga M, Lezcano MT, Martín-Talavera B. *Aeromonas* spp. Involucradas en infecciones extraintestinales diagnosticadas en centros de salud de Posadas, Misiones. Rev Cienc Tecnol; 2010. p. 12.
2. Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity and Infection. Clin Microbiol Rev. 2010;23(1):35-73.
3. Castro-Escarpulli G, Aguilera-Arreola MG, Hernández-Rodríguez CH, Arteaga-Garibay RI, Carmona-Martínez AA, Pérez-Valdespino A, et al. La identificación genética de *Aeromonas*, una realidad y una necesidad para la microbiología diagnóstica. Bioquímica. 2003;28(4):11-8.
4. Cabrera RLE, Castro EG, Ramírez AM, Llop HA, Llanes CR, Castañeda EN, et al. Aislamiento e identificación de especies pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas* procedentes de muestras extraintestinales en Cuba. Rev Chil infect. 2007;24(3):204-8.
5. Bravo L, Fernández A, Núñez F, Rivero LA, Ramírez M, Águila A, et al. *Aeromonas* spp asociada a enfermedad diarreica aguda en Cuba: estudios de casos y controles. Rev Chil infect. 2012;29(1):44-8.
6. Acosta-García J, Aguilar-García CR. Infección de tejidos blandos por *Aeromonas salmonicida*. Primer reporte de caso en México y revisión de la bibliografía. Med Int Méx. 2014;30:221-6.
7. dos Santos PA, Pereira AC, Ferreira AF, de Mattos Alves MA, Rosa AC, Freitas-Almeida AC, et al. Adhesion, invasion, intracellular survival and cytotoxic activity of strains of *Aeromonas* spp. in HEp-2, Caco-2 and T-84 cell lines. Antonie Van Leeuwenhoek. 2015;107(5):1225-36.
8. Aguilera-Arreola MG, Portillo-Muñoz MI, Rodríguez-Martínez C, Castro-Escarpulli G. Usefulness of Chromogenic CromoCen® AGN agar medium for the identification of the genus *Aeromonas*: Assessment of faecal samples. J Microbiol Meth. 2012;90:100-4.

9. Díaz-Pérez M, Zhurbenko R, Fuentes-Barcenas M, Hernández-Cortez C, Castro-Escarpulli G, Rodríguez Martínez C, et al. Evaluation of an alternative chromogenic method for the detection and enumeration of enterococci in waters. *Afr J Microbiol Res.* 2014;8(7):652-8.
10. Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C, Jesús Quezada Muñiz VJ, Tsoraeva A, Ribeiro da Silva R, Lobaina Rodríguez T, et al. Empleo de un nuevo método cromogénico para la identificación simultánea de patógenos en alimentos. En: Ponencia presentada en el Taller Internacional de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias (TNCFA). Cuba; 2012.
11. Rodríguez-Martínez C, Quesada-Muñiz VJ, Zhurbenko R. CNB, assignee. Medio de cultivo para la detección de microorganismos Gram-negativos. Patente de Brasil No. PI 0113717-4; 2014.
12. ISO/TS 11133-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs -Guidelines on preparation and production of culture media- Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media. Geneva (Switzerland): ISO; 2003.
13. González MI, Torres T, Chiroles S, Manafi M. Medios de cultivo fluorogénicos y cromogénicos y su evaluación en aguas de consumo y costeras. *Hig Sanid Ambient.* 2009;9:422-30.
14. Sánchez Millares M, Arrazcaeta Pérez OL, Carillo Salazar M, Gerónimo Otero O, Tsoraeva A, Díaz Pérez M, et al. Resultados de ensayos de dos medios CromoCen AGN y CromoCen ECCS en el análisis de aguas residuales: Laboratorio Provincial de Control y Calidad de las Aguas. Centro Nacional de Biopreparados; 2002.
15. Herzberg M, Sherman SR. Use of deoxycholate in separation of *in vivo* growing salmonella typhimurium from tissue febris. *J Bacteriol.* 1966;92(4):1270.
16. Tsoraeva A, Muñoz del Campo JL, Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C, González-Ortega M. Evaluación del medio CromoCen ECCS para la detección e identificación de bacterias enteropatógenas. *Rev Cubana Med Trop.* 2008;6(2)111-7.
17. Anexo I Medios de cultivo. México: Facultad de Química. 2005 [citado 29 Sep de 2015]. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/AnexoMEdiosdeCultivo_19095.pdf
18. Adams E. The antibacterial action of crystal violet. *J Pharm Pharmac.* 1967;19(12):821-6.
19. Stearn EW, Stearn AE. Conditions and reactions defining dye bacteriostasis. *J Bact.* 1926;11:345-57.
20. Hernández Montealegre L. Salud y Medicina. Colombia, Tolima: Universidad de Medicina; 2013 [citado 26 Sep de 2015]. Disponible en: <http://es.slideshare.net/lauram9104/agentes-qumicos-16073956>
21. Factores químicos para el control de microorganismos. México. 2007 [citado 6 Oct de 2015]. Disponible en: https://www.google.com/cu/?gws_rd=cr,ssl&ei=DIswVnYBITLeLvpuUg#q=Factores+quimicos+para+el+control+de+microorganismos&start=10

22. Ulloa JA. Frutas autoestabilizadas en el envase por la tecnología de obstáculos. México: Universidad Autónoma de Nayarit. 2007 [citado 24 Sep de 2015]. URL disponible en: <https://books.google.com.cu/books?id=d9f5Gko6V7kCC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
23. Fernández Abreu A, Bravo Fariñas L, Ramírez Álvarez M, Fernández Andreu C, Ledo Ginarte Y, Correa Martínez Y, et al. Aislamiento e identificación de Aeromonas y Plesiomonas en el embalse "Niña Bonita", Ciudad de La Habana, Cuba. Rev Cubana Med Trop. 2008;60(2):184-6.
24. Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C. Bases nutritivas para el cultivo de los microorganismos: Parte 2. Principales indicadores de calidad. Salud(i)Ciencia. 2009;16(6):645-8.
25. Safari R, Motamedzadegan A, Ovissipour M, Regenstein JM, Gilberg A, Rasco B, et al. Use of hydrolysates from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. Food Bioprocess Technol. 2012;5:73-9.
26. Fallah M, Barham S, Javadian SR. Fish peptone development using enzymatic hydrolysis of silver carp by-products as a nitrogen source in *Staphylococcus aureus* media. Food Sci Nutr. 2015;3(2):153-7.
27. Viera Oramas DR, Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R, Cabrera González AL, Lobaina Rodríguez T. Study of recovery and differentiation of *Aeromonas* spp. with different diagnosticians. En: Ponencia presentada en el XVI International Scientific Congress CNIC. Cuba; 2015.
28. Orenga S, James AL, Manafi M, Perry JD, Pincus DH. Enzymatic substrates in microbiology. J Microbiol Meth. 2009;79:139-55.

Recibido: 4 de noviembre de 2015.
Aprobado: 6 de diciembre de 2015.

Diana Rosa Viera Oramas. Centro Nacional de Biopreparados (BioCen). Mayabeque, Cuba.
Correo electrónico: diana@biocen.cu