



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO



FACULTAD DE
**CIENCIAS
AGRARIAS**

***EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO
CROMOGÉNICOS PARA EL RECuento
Y DETECCIÓN DE BACTERIAS
COLIFORMES TOTALES Y
Escherichia coli EN AGUA MINERAL***

Tesista: Testa Rizzato, Ana Paula.

**Tesis para optar al grado de
LICENCIADA EN BROMATOLOGÍA**

Facultad de Ciencias Agrarias – Universidad Nacional de Cuyo



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO



FACULTAD DE
**CIENCIAS
AGRARIAS**

***EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO
CROMOGÉNICOS PARA EL RECUENTO
Y DETECCIÓN DE BACTERIAS
COLIFORMES TOTALES Y
Escherichia coli EN AGUA MINERAL***

Tesista

Testa Rizzato, Ana Paula

E-mail

anatestarizzato@gmail.com

Directora

Esp. Lic. Brom. Analía Marcela Bernardi

Codirectora:

MSc. Lic. Brom. María Laura Sánchez

Comité evaluador:

Presidente: Ing. Agr. Cora Dediol

Vocales: Dra. Lic. Brom. María Laura Mercado

MSc. Ing. Agr. Daniela Cónsoli

Suplente: Lic. Brom. Analía Valdés

RESUMEN

En la empresa embotelladora de agua mineral Nestlé Waters se lleva a cabo el análisis de rutina de bacterias Coliformes Totales (CT) y *Escherichia coli* (*E. coli*). La empresa adopta la utilización de la norma interna Laboratory Instructions (LI)-10.113 “*Coliform and E. coli Enumeration*” basada, entre otras, en la norma ISO-9308-1: 2000 “*Water quality – Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria*”. La técnica LI se basa en un método de filtración por membrana para el recuento de CT y *E. coli* en agua y especifica el uso de agar Tergitol como medio de cultivo para el crecimiento de los microorganismos mencionados e indica las siguientes pruebas de confirmación: crecimiento en Agar Kligler hierro, prueba de indol, prueba de hidróxido de potasio 3%, prueba oxidasa y tinción de Gram. Ante la posibilidad de ahorro en cuanto al tiempo de detección de microorganismos y al costo que implica, se propone evaluar una nueva metodología para la detección y recuento de bacterias CT y *E. coli*: se trata de la actualización de la norma ISO-9308-1:2014 “*Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria*” que define la utilización del Agar Chromocult (CCA) como medio de cultivo para el crecimiento y desarrollo de las bacterias. Este método permite la detección y enumeración de CT y *E. coli* en 24h, con sólo sembrar en el mencionado agar y utilizar la prueba oxidasa para la confirmación de CT, sin necesidad de confirmar *E. coli*. La hipótesis plantea que la metodología propuesta por la norma ISO-9308-1:2014 para la detección y enumeración de bacterias CT y *E. coli* es más eficiente en cuanto al costo y tiempo de obtención de resultados e igual de eficaz en cuanto al crecimiento y confirmación de los microorganismos en estudio en comparación con la norma interna LI-10.113. El objetivo fue comprobar que los medios de cultivo cromogénicos indicados en la norma ISO-9308-1:2014 permiten la detección de bacterias CT y *E. coli* en menor tiempo y con menor costo que el propuesto por la norma interna LI. Para llevar a cabo esta investigación se trabajó con 121 cepas de CT, y 102 de *E. coli*, las cuales fueron suministradas por el laboratorio central de la empresa, el cual cuenta con un banco de microorganismos, que son identificados en su género y especie, mediante técnica interna. Entre las cepas utilizadas se encuentran *Citrobacter koseri*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* y *Enterobacter cloacae*. También se utilizaron 4 cepas sospechosas de CT provenientes de muestras de agua analizadas en el laboratorio. Como control negativo de *E. coli* se utilizó una cepa de *Enterococcus faecalis*, también proveniente del banco de microorganismos del laboratorio. Se evaluó la eficacia y eficiencia en cuanto a la identificación de cepas de CT y *E. coli* usando el agar CCA mencionado en la Norma ISO 9308 1:2014 y se confirmó mediante las pruebas descritas en la norma interna LI. Finalmente, se confirmó que la metodología propuesta por la norma ISO-9308-1:2014 para la detección y enumeración de bacterias CT y *E. coli* es más eficiente en cuanto al costo y tiempo de obtención de resultados e igual de eficaz en cuanto al crecimiento y confirmación de los microorganismos en estudio en comparación con la norma interna.

Palabras clave: Coliformes Totales, *Escherichia coli*, Agar Chromocult, agua mineral

AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo a Dios, por haberme dado la vida y permitirme haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mis padres, José y Graciela, por su amor, confianza, esfuerzo y trabajo. Por darme el apoyo suficiente para no decaer cuando todo parecía complicado e imposible y por brindarme la posibilidad de estudiar y convertirme en una profesional.

A mi familia, Iván, Abril y Josefina; quienes me acompañaron y creyeron en mi incondicionalmente en este último tramo de mi carrera.

A mis hermanos y sobrinos, por estar siempre presentes, apoyando y aconsejándome cuando los necesite.

A mis nonos, Elsa y Luis, quienes creyeron en mi desde un principio. Sé que desde donde estén, me siguen apoyando y acompañando.

Al personal de la Facultad de Ciencias Agrarias, quienes me otorgaron las herramientas necesarias para que hoy pueda ser quien soy a nivel profesional.

A mis compañeros de trabajo, por escucharme, ayudarme y apoyarme en este proceso.

A mis amigos de toda la vida y a los que aparecieron en mi camino durante la etapa universitaria que fue mucho más amena gracias a ustedes.

Por último, agradezco profundamente a mi Directora, Marcela Bernardi y Co-directora Laura Sanchez, por ser mis guías en este proceso, por brindarme su ayuda y consejos para hoy poder culminar con este trabajo.

ÍNDICE

I- INTRODUCCIÓN	1
1. La importancia del Agua.....	1
2. Agua mineral según Código Alimentario Argentino.....	1
3. Microorganismos indicadores de la calidad del agua.....	3
4. Definición de Coliformes Totales y <i>Escherichia coli</i>	4
5. Norma interna Laboratory Instructions (LI)-10.113.....	5
6. Norma ISO- 9308-1:2014	6
II- OBJETIVOS E HIPÓTESIS	9
1. Objetivo principal	9
2. Objetivos específicos.....	9
3. Hipótesis.....	9
III- MATERIALES Y MÉTODOS	10
1. Esquemas de análisis	10
2. Filtración por membrana	12
3. Aislamiento y purificación de las colonias	15
4. Confirmación de las colonias sospechosas	15
a) Siembra en Agar Kligler hierro	15
b) Siembra en caldo triptófano para prueba de indol	17
c) Prueba oxidasa	18
d) Prueba KOH 3%.....	19
e) Tinción de Gram.....	19
5. Tratamiento de resultados.....	20
6. Análisis de costos y tiempo.....	20
IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
1. Interpretación de resultados.....	21
1.1. Prueba en Agar Kligler hierro	21
1.2. Prueba en caldo triptófano para prueba indol	22
1.3. Prueba oxidasa.....	22
1.4. Prueba KOH 3%.....	23
2. Resultados obtenidos de cepas liofilizadas de CT y sospechosas CT.	24
3. Resultados obtenidos en cepas liofilizadas de <i>E. coli</i>	30

4. Resultados obtenidos en cepa liofilizada de <i>Enterococcus faecalis</i> (control negativo)	35
5. Análisis de frecuencias de resultados obtenidos.....	35
6. Análisis de costos y tiempos.....	37
7. Discusión.....	38
V-CONCLUSIÓN.....	39
VII – BIBLIOGRAFÍA	40

I- INTRODUCCIÓN

1. La importancia del Agua

Bermúdez, et al (2006) definen que el agua es uno de los principales componentes y nutrientes del organismo. El ser humano puede vivir varios días sin comer, pero tan solo 5 a 10 días sin agua; una pérdida del 20% de la misma en él es incompatible con la vida. Ocupa el segundo lugar, después del oxígeno, en cuanto a importancia para el mantenimiento de la vida. Comprende del 50 al 80% del peso total del organismo, dependiendo del contenido total de grasa. El 90% de la sangre y el 97% de la orina es agua. Realiza una serie variada de funciones y todas las reacciones químicas se realizan en presencia de agua. Actúa como solvente para los productos en la digestión y como regulador de la temperatura corporal debido a su elevada capacidad de evaporación.

El agua es el medio por el cual se comunican las células de nuestros órganos y por el que se transporta el oxígeno y los nutrientes a nuestros tejidos. Además, es la encargada de retirar de nuestro cuerpo los residuos y productos de desecho del metabolismo celular.

Con el objetivo de mejorar la calidad de vida y gracias al mayor alcance de información sobre la importancia del agua en el cuerpo, en los últimos años, las personas se han preocupado más por sus hábitos alimenticios y se ha presentado un cambio de mentalidad, ya que se ha visto un mayor interés por mantener un buen estado físico, llevando a un incremento del consumo de alimentos saludables y agua mineral. La percepción cultural se ha visto influenciada por la globalización y los avances tecnológicos, cambiando la concepción del mundo y mostrando nuevos hábitos e ideales distintos en la vida cotidiana de las personas. Es así como las tendencias alimenticias en nuestra sociedad han evolucionado hacia patrones de consumo de alimentos saludables en donde se reconoce un mayor valor agregado al producto que tenga características naturales (Orrego Diaz. 2004).

En un análisis de la cadena alimentaria realizado para Alimentos Argentinos de la Subsecretaría de Alimentos y Bebidas del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, el Lic. Diego Grillo Trubba (2005), describe que el “mercado de agua embotellada en general, y de agua mineral en particular”, se ha mantenido en crecimiento en los últimos años, aumentado a un ritmo anual del 12%. Dentro de América Latina, el mayor consumidor de agua mineral –calculando siempre en base a litros por habitante-, es Brasil (26 litros por año), seguido de Argentina (18 litros). El mercado mundial del agua embotellada representa un volumen anual de 89.000 millones de litros. De este total, un 41% es agua mineral o de manantial. Los motivos que llevan al consumo del agua embotellada son diversos. Entre ellos cabe resaltar que para los consumidores el agua embotellada posee mejor sabor que la de canilla, y la percibe como más segura y de mejor calidad. Al mismo tiempo, y gracias a reiteradas campañas publicitarias, el consumo de agua mineral es considerado hoy, como más saludable que el del resto de las bebidas. En ese sentido, el consumo de agua mineral tiende a representar, en el imaginario del consumidor, un estilo de vida sano y natural. Sin embargo, este nuevo consumo de agua mineral no sólo se relaciona con un posible bienestar económico que permita el cuidado de la salud o determine el consumo a partir de un ideal de cuidado de la salud, sino también con la inexistencia de redes de agua para la población, razón por la cual se termina por inclinarse por el agua embotellada” (Grillo Trubba, 2005).

2. Agua mineral según Código Alimentario Argentino

El Código Alimentario Argentino (CAA), en su capítulo XXIII artículo N°985, define e indica las características y requisitos que el agua mineral debe cumplir:

1) Definición: Se entiende por agua mineral natural un agua apta para la bebida, de origen subterráneo, procedente de un yacimiento o estrato acuífero no sujeto a influencia de aguas

superficiales y proveniente de una fuente explotada mediante una o varias captaciones en los puntos de surgencias naturales o producidas por perforación.

2) Características: El agua mineral natural debe diferenciarse claramente del agua potabilizada o agua común para beber debido a:

a) su naturaleza caracterizada por su tenor en minerales y sus respectivas proporciones relativas, oligo-elementos y/u otros constituyentes;

b) su pureza microbiológica original;

c) la constancia de su composición y temperatura en la captación las que deberán permanecer estables en el marco de las fluctuaciones naturales, en particular ante eventuales variaciones de caudal, aceptándose una variación de sus componentes mayoritarios de hasta el 20% respecto de los valores registrados en su aprobación, en tanto no superen los valores máximos admitidos.

3) Criterios microbiológicos en la captación y durante su comercialización: Las aguas minerales deberían ser de una calidad microbiológica tal que no represente un riesgo para la salud del consumidor, en particular con respecto a los microorganismos patógenos, incluidos los parásitos y deberán cumplir con los siguientes criterios microbiológicos (ver tabla N°1):

Tabla 1: especificación microbiológica de patógenos en agua mineral, definido por CAA:

Parámetro	Criterio de aceptación	Metodología de Referencia⁽¹⁾
<i>Escherichia coli</i> / 250 ml	n=5, c=0, Ausencia	ISO 9308-1 APHA ⁽²⁾ 9222 J APHA 9222 K APHA 9222 H APHA 9222 I APHA 9223 B
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / 250 ml	n=5, c=0, Ausencia	ISO 16266 ISO 16266-2 APHA 9213 E
Estreptococos Fecales (Enterococos) / 250 ml	n=5, c=0, Ausencia	ISO 7899-2 APHA 9230C
Esporas de microorganismos anaerobios sulfito reductores / 50 ml	n=5, c=0, Ausencia	ISO 6461- 2 o 1

(1) Su versión más actualizada. Pueden emplearse otros métodos que ofrezcan una sensibilidad, reproducibilidad y fiabilidad equivalentes si éstos han sido debidamente validados (por ejemplo basándose en ISO 13843 o ISO 16140)

(2) APHA: Standard Methods for the Examination of water and Wastewater, American Public Health Association”

A su vez, en el artículo N°986 del CAA, se definen los diferentes tipos de agua mineral:

1. De acuerdo con el grado de mineralización determinado por el residuo seco soluble a 180° C:

a) Mineralización muy débil: residuo hasta 50 mg/l.

b) Oligominerales: residuo: entre 50 y 100 mg/l.

c) De mineralización débil: residuo entre 101 y 500.

d) De mineralización media: residuo entre 501 y 1500.

e) De mineralización fuerte: residuo entre 1501 y 2000.

2. De acuerdo con su composición:

a) Alcalina o bicarbonatada: contiene más de 600 mg/l de ión bicarbonato.

b) Acidulada o carbogaseosa: contiene más de 250 mg/l de dióxido de carbono libre.

- c) Clorurada: contiene más de 500 mg/l de cloruro (expresado en cloruro de sodio).
- d) Cálcica: contiene más de 150 mg/l de calcio. • Magnésica: contiene más de 50 mg/l de magnesio.
- e) Fluorada: contiene más de 1 mg/l de flúor.
- f) Ferruginosa: contiene más de 2 mg/l de hierro.
- g) Iodadas: contiene más de 1 mg/l de yodo.
- h) Sulfatadas: contiene más de 200 mg/l de ión sulfato.
- i) Sódicas: contiene más de 200 mg/l de ión sodio.
- j) Bajas en sodio: contiene menos de 20 mg/l de ión sodio.

3. De acuerdo con la temperatura del agua en la surgencia o extracción:

- a) Atermales: 0° a 20° C.
- b) Hipotermiales: 21° a 30° C.
- c) Mesotermiales: 31° a 40° C.
- d) Hipertermiales: más de 40° C.

4. De acuerdo con el contenido gaseoso:

- a) Naturalmente gaseosa: agua mineral natural cuyo tenor en gas carbónico proveniente de la fuente, luego de una eventual decantación y del embotellado, resulte igual al que se presentaba en la captación. Es permitida la reincorporación de gas proveniente de la misma fuente, en cantidad equivalente a la del gas liberado en esas operaciones con las tolerancias técnicas habituales.
- b) Gasificada o con gas: agua mineral natural que ha sido carbonatada en el lugar de origen con gas carbónico procedente o no de la fuente y que después de embotellada contiene una presión de gas no menor de 1,5 atmósferas a 21° C. En el caso de que el gas carbónico no provenga de la fuente deberá ser de grado alimentario.
- c) No gasificada: agua mineral natural que no contiene gas carbónico”.

Así como el agua es una de las principales fuentes de vida de nuestra tierra, al mismo tiempo puede tratarse de una fuente de enfermedades y epidemias si se llegara a realizar su consumo en mal estado, ya que este primordial recurso natural puede favorecer la diseminación de diversos microorganismos causantes de diferentes enfermedades (Madigan, et al 2009).

Los análisis bacteriológicos del agua tienen por objeto poner de manifiesto la presencia de bacterias que modifican la aptitud del agua para una utilización dada. Estas modificaciones son frecuentemente complejas y las variaciones de actitudes pueden ser simultáneamente favorables o desfavorables, según la utilización pretendida (Rodier 1990).

3. Microorganismos indicadores de la calidad del agua

Varios organismos patógenos de transmisión fecal-oral pueden estar presentes en el agua cruda (agua natural que no ha sido sometida a proceso de tratamiento para su potabilización), entre ellos bacterias como *Salmonella sp*; *Shigella sp*; Coliformes totales y fecales, las cuales han sido encontradas en abastecimientos de aguas (Carrillo y Lozano 2008).

El control y la detección de microorganismos indicadores y patógenos constituyen una parte importante de la microbiología sanitaria. Las bacterias del tracto intestinal no suelen sobrevivir en el medio acuático, están sometidas a un estrés fisiológico y pierden la capacidad para formar colonias en medios diferenciales y selectivos. Aunque muchos de estos agentes patógenos pueden detectarse directamente, se emplean microorganismos indicadores como un marcador de contaminación posible del agua por agentes patógenos humanos. Un microorganismo indicador se caracteriza por:

- ser adecuado para el análisis de todos los tipos de agua;
- estar presente siempre que existan agentes patógenos entéricos;
- sobrevivir más que el agente patógeno entérico más fuerte;
- ser inocuo para las personas
- no se multiplica en el agua contaminada, pues producirá un valor más alto que el real;
- el método de ensayo para la bacteria indicadora debe tener una gran especificidad y tener alta sensibilidad, es decir detectar niveles bajos del indicador.

Las bacterias Coliformes Totales (CT) y *Escherichia coli* (*E. coli*) son analizados en aguas para consumo debido a que son considerados indicadores de contaminación (Prescott et al, 2002).

4. Definición de Coliformes Totales y *Escherichia coli*

El grupo de CT se define como todas las bacterias Gram-negativas en forma bacilar que fermentan la lactosa a temperaturas de 35 a 37°C, produciendo ácido y gas en un plazo de 24 a 48 horas, son aerobias o anaerobias facultativas, son oxidasa negativa, no forman esporas y presentan actividad enzimática de la β -galactosidasa. Estas bacterias son el principal indicador de la adecuación del agua para usos domésticos industriales o de otro tipo. La experiencia ha demostrado que el contenido del grupo de los CT en aguas es un indicador del grado de contaminación reciente, por tanto, de la calidad sanitaria de la misma (Madigan et al, 2009).

Los géneros pertenecientes a este grupo son *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella*. De estos microorganismos, solo *E. coli* tiene un origen específicamente fecal, pues está siempre presente en grandes cantidades en las heces humanas, de los animales y pájaros y rara vez se encuentran en el agua o el suelo que no hayan sufrido algún tipo de contaminación fecal (Carrillo y Lozano, 2008).

Ocasio y López (2004), reconocen que desde hace tiempo los microorganismos del grupo CT son adecuados indicadores microbianos de la calidad del agua, debido principalmente a que son fáciles de detectar y enumerar, y su presencia en muestras de agua indica la existencia de fallas en la eficacia de sus tratamientos de potabilización, en la integridad en el sistema de distribución y por lo tanto evidencia contaminación de diferentes orígenes.

Según Carrillo y Lozano (2008) *E. coli* fue aislada por primera vez en 1885 a partir de heces de niños, son bacilos estrechos, se encuentran solos o en parejas, Gram-negativos, móviles por flagelos peritricos o inmóviles, anoxigénicos facultativos, poseen metabolismo respiratorio y fermentativo. Son bacterias CT que poseen la enzima β -galactosidasa, que reacciona positivamente en el ensayo del rojo de metilo y pueden decarboxilar el ácido L-glutámico, pero no son capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono o de crecer en un medio con cianuro de potasio.

E. coli es la única especie dentro de las Enterobacterias que presenta la enzima β -D-Glucuronidasa, que degrada el sustrato 4-metilumbeliferil- β -D-Glucurónico (MUG), formando 4-metilumbeliferona, este producto tiene la propiedad de emitir fluorescencia azul/verde cuando se ilumina con luz ultravioleta. *E. coli* presenta reacción positiva al indol, el cual es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano dando como productos el indol, ácido pirúvico y amoniaco. La prueba de indol está basada en la formación de un complejo rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído. En la tabla 2 se presenta un resumen de las características y diferencias entre CT y *E. coli*. (Carrillo y Lozano, 2008)

Tabla 2: Resumen de características de Coliformes totales y *E. coli*

Coliformes totales	<i>Escherichia coli</i>
Bacterias Gram-negativas	Bacterias Gram-negativas
No esporulados	No esporulados
Anaerobio facultativo	Anaerobios facultativos
Fermentadores de la lactosa con producción de ácido y gas a 36+/-1°C en 24-48horas	Fermentadores de la lactosa con producción de ácido y gas a 36+/-°C en 24-48 horas y a 44.5+/-0.2°C en 24 horas
β-D-galactosidasa positiva	β-D-galactosidasa y β-D-Glucuronidasa positiva
Presente en tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente (bacterias entéricas) son comunes en otros ambientes (suelos, vegetales, agua)	Presente en heces de animales homeotermos

5. Norma interna Laboratory Instructions (LI)-10.113

En la empresa embotelladora de agua mineral Nestlé Waters se llevan a cabo análisis de rutina del producto y en él se realiza el monitoreo de bacterias CT y *E. coli*. La empresa adopta la utilización de la norma interna LI-10.113 “*Coliform and E. coli Enumeration*” basada, entre otras, en la norma ISO-9308-1:2000 “*Water quality – Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria*” (Nestle Waters, 2000). La aplicación de esta norma es mandatorio de la firma y es implementada por todos los laboratorios pertenecientes a dicha marca.

Esta LI describe un método de filtración por membrana para el recuento de CT y *E. coli* en agua. Esta técnica es altamente reproducible y proporciona resultados numéricos, es una manera rápida y simple de estimar las poblaciones bacterianas en el agua, y especialmente útil al evaluar grandes volúmenes o al realizar diariamente muchas pruebas de Coliformes. Se deben utilizar filtros de membrana con un diámetro de poro que permita una completa retención de las bacterias. Este método se basa en la filtración de un volumen definido de agua a través de una membrana e incubación de la misma en un medio selectivo, seguida de la caracterización bioquímica de las colonias capaces de fermentar la lactosa a ácido láctico, cambiando el color del indicador de verde a amarillo en el medio, lo que permite el recuento de bacterias CT y *E. coli*. (Norma LI-10.113 de Nestle Waters 2000)

La norma interna corresponde a la norma ISO 9308-1: 2000 con una pequeña modificación en el paso de confirmación mediante la adición de la prueba de hidróxido de potasio (KOH) y siembra en agar Kligler hierro. Es aplicable a todas las aguas siempre que la materia en suspensión no interfiera con la filtración, el cultivo y el recuento. Es especialmente adecuado para analizar el agua destinada al consumo humano, entre ellas el agua embotellada.

Esta norma, define el uso de los siguientes medios de cultivo:

a) Medio de cultivo para el crecimiento de los microorganismos

- Agar Tergitol

Este medio de cultivo se utiliza para la incubación de la membrana post-filtración, permitiendo el crecimiento de colonias de CT y *E. coli*. El principio del medio se basa en la capacidad de los coliformes para fermentar la lactosa en ácido láctico, cambiando el color del indicador (azul de bromotimol) de verde a amarillo en el medio.

Las colonias típicas son de color amarillo con un centro anaranjado, a veces de color beige rosado o marrón, posiblemente con una apariencia ligeramente metálica. Son redondas,

planas, granuladas y a veces muy mucosas. Las colonias que fermentan la lactosa tienen un halo amarillo en el centro que a veces es transparente debajo de la membrana.

b) Medios de cultivo y reactivos para la confirmación de colonias sospechosas

- Crecimiento en Agar Kligler hierro

Es un medio de cultivo utilizado en la industria alimenticia para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de hidratos de carbono y a la producción de ácido sulfhídrico.

- Caldo triptófano para prueba de indol

Según su ficha técnica, el Caldo Triptófano permite el cultivo de microorganismos que no presentan requisitos especiales de crecimiento. Este medio se utiliza principalmente en los análisis de aguas para la identificación de *E. coli* mediante la producción de indol (Bioser, 2021).

- Hidróxido de potasio 3%

El test bioquímico del hidróxido de potasio (KOH) definido en la norma interna LI-00.700-2, puede usarse como una alternativa a la técnica de tinción de Gram. Este test se basa en la reacción entre el KOH y los lipolisacáridos presentes en la pared de las células de bacterias Gram-negativas ya que dicho compuesto reacciona con los lipolisacáridos de la pared celular de las bacterias formando filamentos, permitiendo así diferenciar bacterias Gram - positivas de Gram-negativas (Nestle Waters, 2000).

- Prueba oxidasa

La prueba de oxidasa es un método diagnóstico que evidencia la presencia del complejo enzimático denominado citocromo oxidasa c utilizando una tira reactiva. El sistema citocromo oxidasa c está presente en algunas bacterias aerobias, ciertas anaerobias facultativas, escasas microaerófilas y ninguna anaerobia estricta.

- Reactivos de tinción de Gram

La tinción de Gram permite clasificar a las bacterias en Gram-positivas y Gram-negativas, de acuerdo con la composición de la pared celular. Con esta técnica también es posible observar la forma que tienen los microorganismos, es decir, si son cocos, bacilos, cocobacilos, pleomórficos, filamentosos, entre otros. Así como también su distribución en el espacio: en racimo, en cadena, aislados, en pares, en tétradas, etc (Lifeder, 2021).

El análisis de CT y *E. coli* utilizando la norma interna LI-10.113 (Nestle Waters, 2000), tiene la desventaja de ser costoso en cuanto al material utilizado para su realización, ya que requiere de mayor cantidad de medios de cultivo e insumos para el análisis de una muestra y prolongado en el tiempo, debido a que para una confirmación de colonias sospechosas se requieren de aproximadamente 5 días.

6. Norma ISO- 9308-1:2014

Esta norma específica, para el recuento de *E. coli* y bacterias CT, el uso de medios de cultivo cromogénicos no contemplados en la norma interna utilizada por la empresa. La norma ISO 9308-1: 2014 es especialmente adecuada para aguas con un bajo número de bacterias. Estas pueden ser agua potable, agua de piscina desinfectada o agua tratada de plantas de tratamiento de agua potable.

Algunas cepas de *E. coli* que son negativas para la β -D-glucuronidasa, como *Escherichia coli* O157, no serán detectadas como *E. coli*, pero como son β -D-galactosidasa positivas, aparecerán como bacterias CT en este agar cromogénico.

El recuento está basado en la filtración de una porción de la muestra a través de un filtro de membrana, que retiene los microorganismos, colocación de este en una placa de medio CCA e incubación a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ durante $21 \pm 3\text{h}$. Esta norma define a las colonias positivas para β -D-galactosidasa (rosadas a rojas) como presuntas bacterias CT que no son *E. coli*. Por otro lado, las colonias positivas para β -D-glucuronidasa (azul oscuro a violeta) son consideradas como *E. coli*. Las bacterias CT son la suma de las colonias oxidasa negativas de color rosa a rojo y todas las de color azul oscuro a violetas (ISO-9308-1:2014).

El recuento de coliformes se basa en la capacidad de la β -D-galactosidasa, una enzima que es característica de las bacterias coliformes, para escindir el sustrato Salmon-GAL. La reacción produce colonias de coliformes de color rojo asalmonado como se aprecia en la figura 1.



Figura 1: *Citrobacter freundii* ATCC8090

Fuente: *Citrobacter freundii* [fotografía] por Merck millipore, 2014 (file:///D:/backup/descargas/ds4485es00-chromocult-coliform-6-25--mk.pdf)

El recuento de *E. coli* se basa en la escisión de los sustratos X-glucurónido por la β -D-glucuronidasa y Salmon-GAL por la β -D-galactosidasa, una combinación enzimática que es característica de *E. coli*. Cuando hay *E. coli* presente se escinden los dos sustratos, lo que da lugar a colonias que adquieren un color entre azul oscuro y violeta en oposición al rojo asalmonado de otras colonias de bacterias coliformes, como se presenta en la figura 2. Las bacterias no coliformes aparecen como colonias incoloras o, con baja frecuencia, de color turquesa.



Figura 2: *Escherichia coli* ATCC 11775

Fuente: *Escherichia coli* [fotografía] por Merck millipore, 2014 (file:///D:/backup/descargas/ds4485es00-chromocult-coliform-6-25--mk.pdf)

Para evitar resultados falsos positivos, causados por bacterias oxidasa positivas, por ejemplo, *Aeromonas spp*, las presuntas colonias se confirmarán mediante una reacción oxidasa negativa.

La norma ISO-9308-1:2014 define el uso de los siguientes medios de cultivo:

a) Medio de cultivo para el crecimiento de los microorganismos

- Agar Chromocult Coliform (CCA):

Este medio se utiliza para la incubación de la membrana de filtración, el mismo permite el crecimiento de bacterias CT y *E. coli* tal como se define anteriormente.

Es un agar selectivo que permite el crecimiento de CT y *E. coli* en muestras de aguas y alimentos en 24 horas (*Merck millipore, 2014*).

b) Reactivos para la confirmación de colonias sospechosas:

- Prueba oxidasa: ídem Li-10.113

Teniendo en cuenta lo expresado y ante la posibilidad de implementar ahorro en cuanto al tiempo de detección de microorganismos y al costo que implica, se propone evaluar una nueva metodología para la detección y recuento de bacterias CT y *E. coli*. Se trata de la actualización de la norma ISO-9308-1:2014 "*Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria*" la que define la utilización del Agar Chromocult (CCA) como medio de cultivo para el crecimiento y desarrollo de las bacterias. Este método permite la detección y enumeración de CT y *E. coli* en 24h, con sólo sembrar en el mencionado agar y utilizando la prueba oxidasa para la confirmación de CT, sin necesidad de confirmar *E. coli*.

II- OBJETIVOS E HIPÓTESIS

1. Objetivo principal

Comprobar que los medios de cultivo cromogénicos indicados en la norma ISO-9308-1:2014 permiten la detección de bacterias Coliformes Totales y *Escherichia coli* en menor tiempo, con menor costo e igual eficacia que el propuesto por la norma interna LI-10.113.

2. Objetivos específicos

- Confirmar que todas las colonias rojas-rosadas obtenidas en Agar Chromocult (CCA) son Coliformes Totales mediante el uso de pruebas de confirmación descritas en la norma LI-10.113.
- Confirmar que todas las colonias violetas-azuladas obtenidas en Agar Chromocult (CCA) son *Escherichia coli* mediante el uso de pruebas de confirmación descritas en la norma LI-10.113.

3. Hipótesis

La metodología propuesta por la norma ISO-9308-1:2014 para la detección y enumeración de bacterias Coliformes Totales y *Escherichia coli* es más eficiente en cuanto al costo y tiempo de obtención de resultados e igual de eficaz en cuanto al crecimiento y confirmación de los microorganismos en estudio en comparación con la norma interna LI-10.113.

III- MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo esta investigación se trabajó con bacterias suministradas de forma liofilizada por el laboratorio central de la empresa Nestlé Waters, el cual cuenta con un banco de microorganismos, utilizando 121 cepas de CT, codificadas como CT 1 a CT121 y 102 de *E. coli* codificadas como EC1 a EC102. También se utilizaron 4 cepas sospechosas de CT provenientes de muestras de agua analizadas en el laboratorio, codificadas como RCT1 a RCT4.

Se utilizó como control negativo de *E. coli* una cepa de referencia de *Enterococcus faecalis* codificada como EF.

Se evaluó la eficacia comparando la capacidad de crecimiento e identificación de cepas de CT y *E. coli* usando el agar CCA mencionado en la Norma ISO 9308 1:201 y confirmando mediante las pruebas descritas en la norma interna LI-10.113 (Nestle Waters, 2000):

- Siembra en agar Kligler hierro, para fermentación de azúcares glucosa y lactosa
- Tinción de Gram
- Prueba de indol
- Prueba oxidasa
- Prueba de hidróxido de potasio al 3 %

Así mismo, se evaluó la eficiencia analizando los costos de medios de cultivo, insumos y reactivos necesarios según cada protocolo.

1. Esquemas de análisis

Para realizar los análisis tanto de las cepas de CT y EC como de las muestras sospechosas o de rutina se siguieron los esquemas que se presentan en la figura 3 y 4 respectivamente.

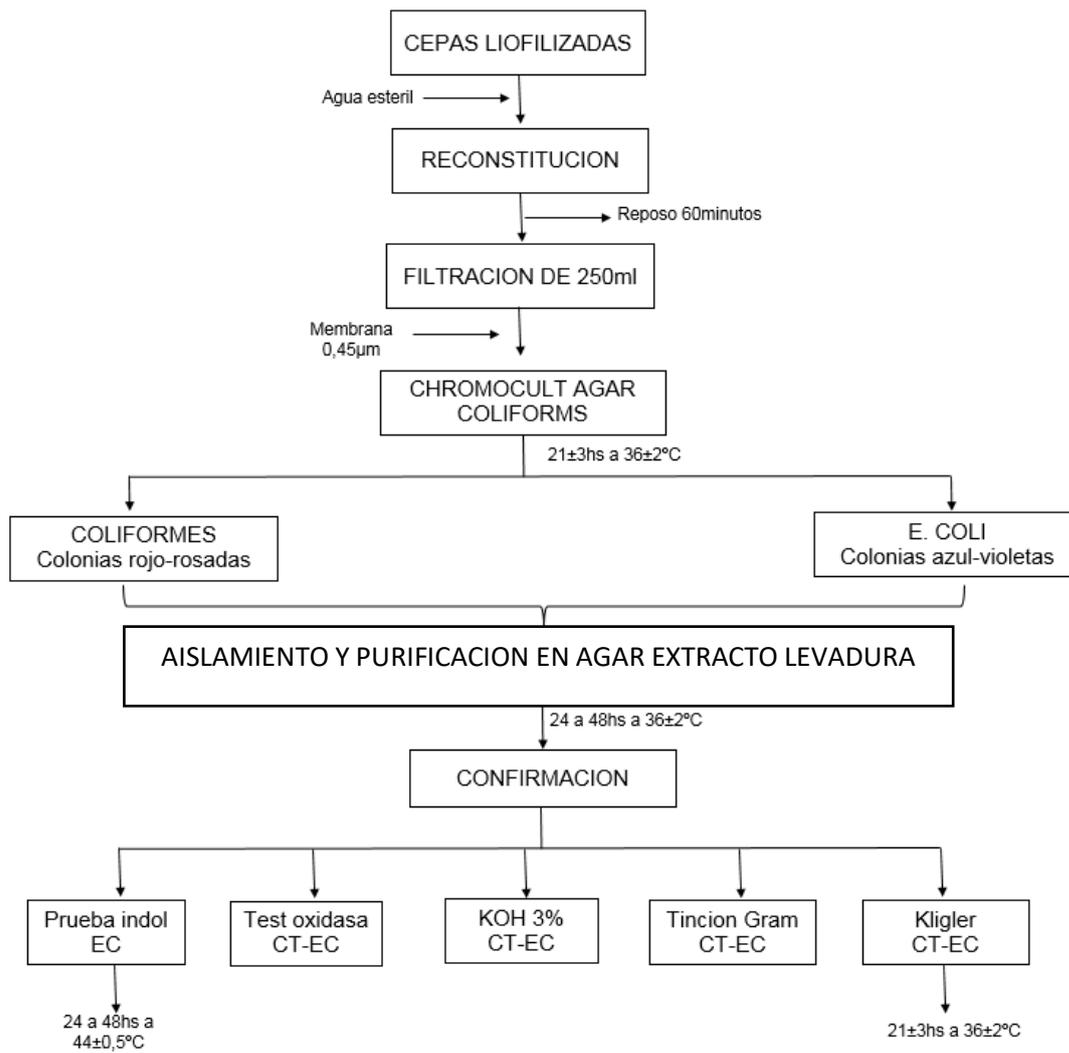


Figura 3: Proceso de análisis de cepas de referencia de CT y E.coli liofilizadas.
Fuente: propia

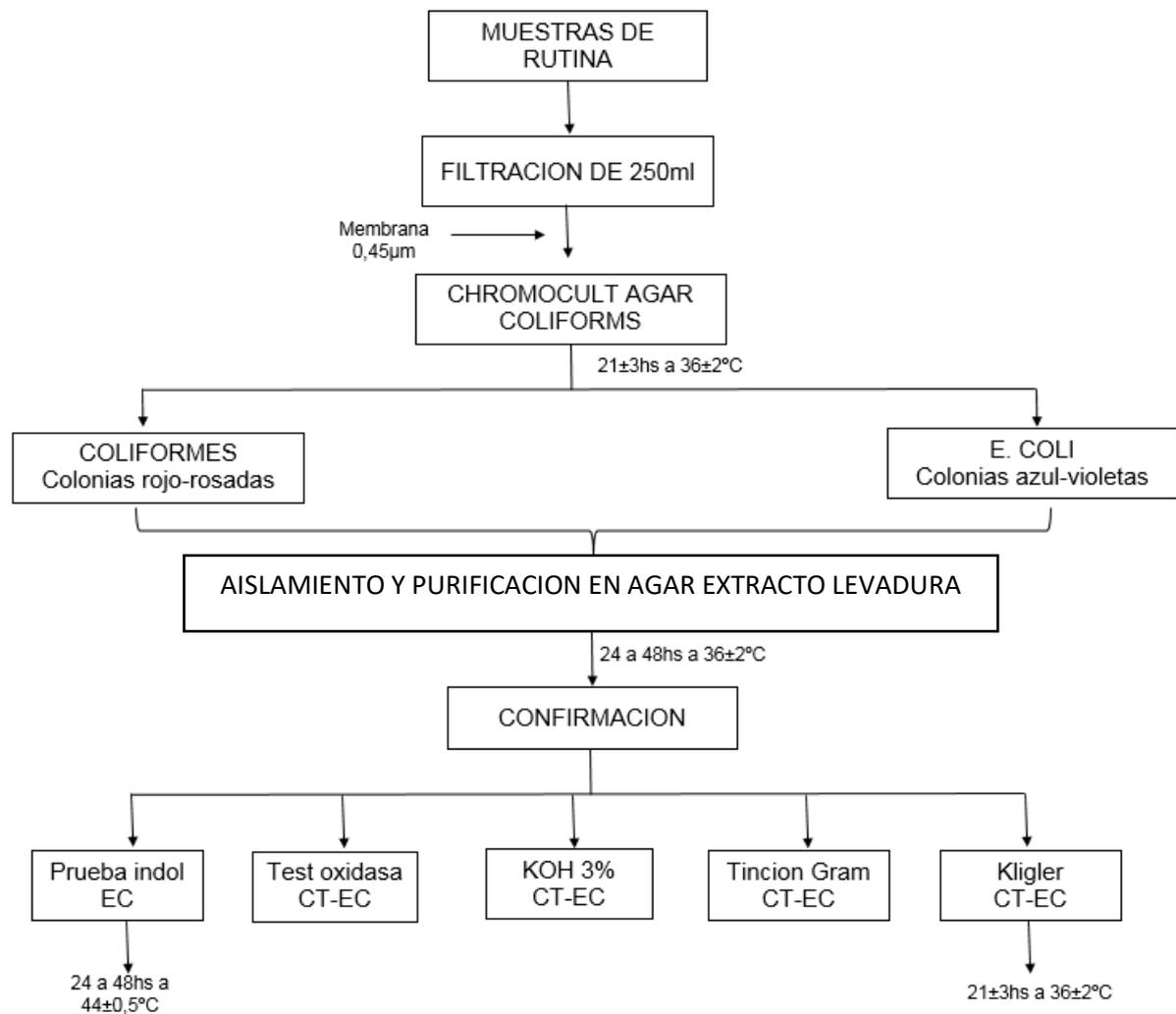


Figura 4: Proceso de análisis de CT y E.coli de muestras de rutina o sospechosas
Fuente: propia

Cada una de las cepas liofilizadas fue reconstituida mediante la utilización de 1 litro de agua estéril, la que fue esterilizada 3 veces para asegurar ausencia de contaminantes. Para este proceso, se tomaron 10 ml de esta agua estéril y se agregaron a los viales correspondientes de las cepas. Se agitó y se colocó nuevamente en los 990ml restantes de agua estéril. Para finalizar, se dejaron reposar durante 60 minutos y luego se agitó para homogeneizar.

2. Filtración por membrana

Para la detección de CT y *E. coli* las cepas de referencia reconstituidas fueron filtradas al igual que las muestras de rutina, a través de membrana estéril blanca de 0,45 µm las cuales fueron colocadas en placas de Petri con agar CCA.

Para preparar el Agar CCA, marca Merck, se usó agua destilada libre de sustancias inhibitoras. Para esto, se pesó el polvo en un recipiente previamente tarado, se agregó agua y se agitó permitiendo que el polvo se hidrate, luego se llevó a volumen. Se calentó para favorecer la disolución, teniendo la precaución de no generar sobrecalentamiento en esta etapa del proceso.

Componentes del medio de cultivo (g/l)

- Peptona 3.0;
- cloruro de sodio 5.0;
- dihidrogenofosfato sódico 2.2;
- fosfato de hidrógeno disódico 2,7;
- sodio piruvato 1.0;
- triptófano 1,0;
- agar-agar 10.0;
- Sorbitol 1.0;
- Tergitol® 7 0,15; 6-cloro-3-indoxil-beta-Dgalactopiranósido 0.2;
- Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-D-glucurónico 0,1;
- isopropil-beta-ditiogalactopiranósido 0.1.

Una vez que se completó la disolución, según indicaciones del proveedor, se esterilizó en baño maría a 95°C durante 35 minutos. Se midió el pH, el cual fue de 6,89 y teniendo en cuenta que debe mantenerse en $6,8\pm 0,2$, no fue necesario ajustarlo. Por último, el medio listo se agregó en placas según el siguiente protocolo:

- El medio de cultivo en estado líquido se llevó a 44-47°C.
- Para la preparación de placas de cultivo, se vertió 8 – 10 ml por placa de 6 cm.
- Se dejó enfriar en una superficie fría y plana para permitir la solidificación.

En la técnica de filtración por membrana se utilizó el mecanismo de filtrado que se presenta en la figura 5. Se colocó un filtro de membrana de tamaño de poro de $0.45\mu\text{m}$ sobre el soporte para membrana (Figura 6-a) con la ayuda de una bomba eléctrica que ejerció una presión diferencial haciendo que el agua pase por una membrana de tamaño de poro de $0.45\mu\text{m}$, (Figura 6-b) provocando que las bacterias de mayor tamaño quedaran retenidas en la superficie de la membrana (Apha, Awwa, WPCF- Métodos normalizados 1992).

Finalizada la filtración, se utilizó una pinza de metal estéril, se retiró la membrana del soporte (Figura 6-c) y se traspasó a una placa de 60mm con medio CCA (Figura 6-d) cuidando de no dejar burbujas y se incubó durante 21 ± 3 h a $36\pm 2^\circ\text{C}$.



Figura 5: Equipo de filtración.

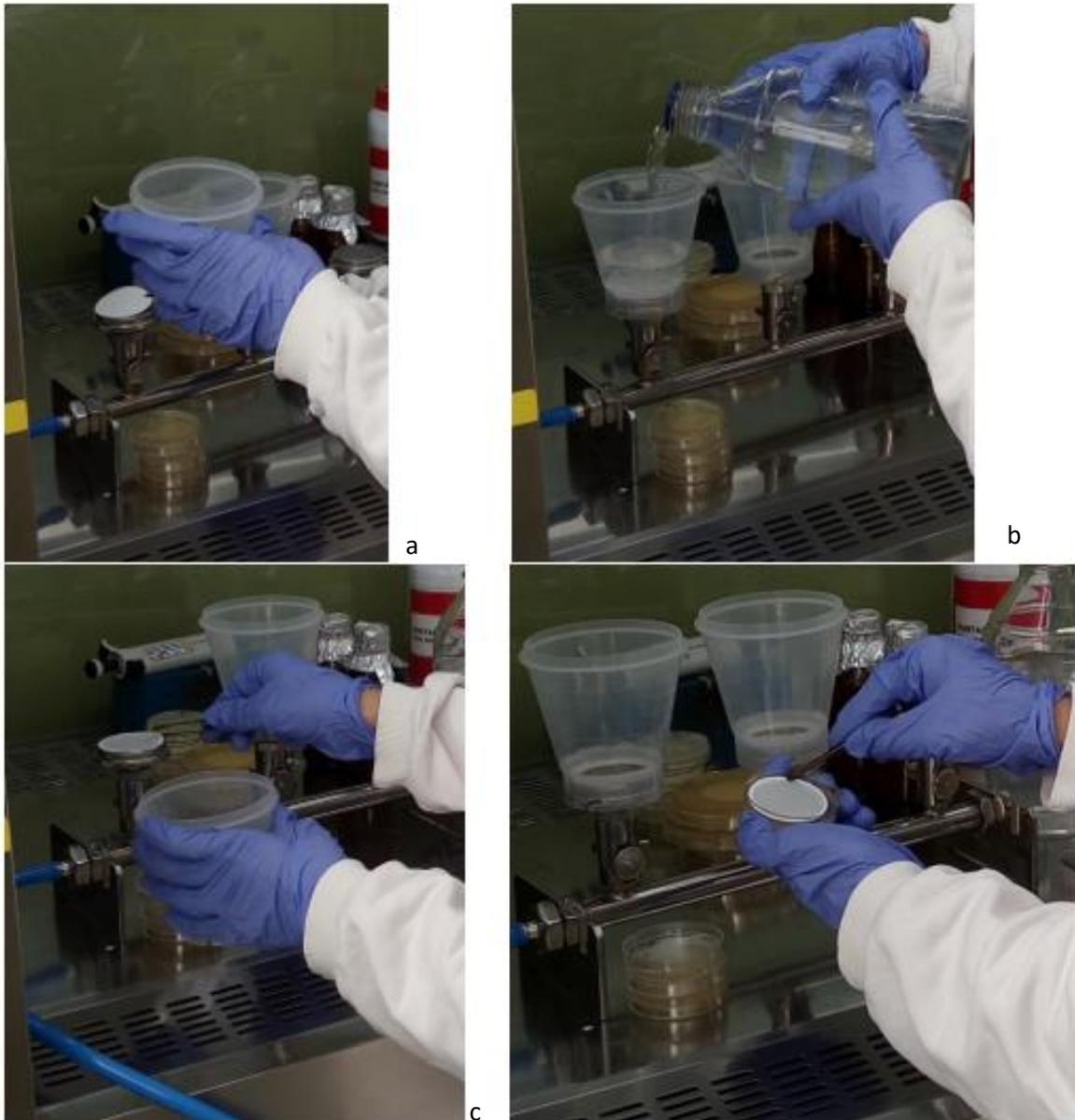


Figura 6: Proceso de filtración.

Referencias: a: colocación de membrana sobre soporte de embudo; b: agregado del volumen de agua a filtrar. c: retiro de membrana con bacterias retenidas d: traspaso de membrana en placa con medio de cultivo correspondiente.

Luego del tiempo de incubación las colonias sospechosas se visualizaron como se observa en la figura 7.

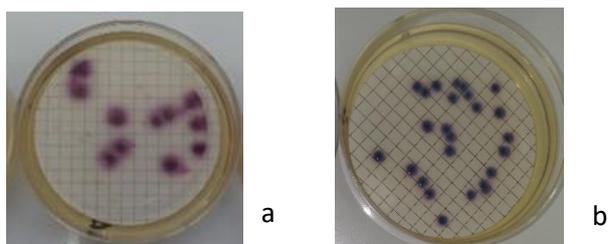


Figura 7: colonias sospechosas de Coliformes totales (a) y E. coli (b)

3. Aislamiento y purificación de las colonias

Para el aislamiento y purificación de las colonias se preparó medio de cultivo Agar Extracto Levadura:

- Triptona (Peptona de caseína pancreática) 6,0 g
- Extracto de levadura 3,0 g
- Agar-agar 15,0 g
- Agua destilada o desionizada 1000 ml

Este medio, marca Merck, se presenta listo para ser preparado, para esto se pesó la cantidad que define el proveedor, luego se agregó el agua correspondiente, se disolvió totalmente, se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos y fue plaqueado en placas de Petri de 90mm.

Para la obtención de un cultivo puro, a partir de la colonia sospechosa, y para realizar la investigación bioquímica y/o serológica de la misma, se realizó el aislamiento de las colonias sospechosas de CT y *E. coli*, en placas de Petri que contenían el medio de cultivo no selectivo Agar extracto Levadura.

El aislamiento, y purificación cuando fuera necesaria, se llevó a cabo mediante el uso de un ansa bacteriológica estéril, con la cual se tomó una colonia del medio y se estirió en la superficie del agar extracto levadura (figura 8). Luego se incubó a 36°C durante 24 horas.

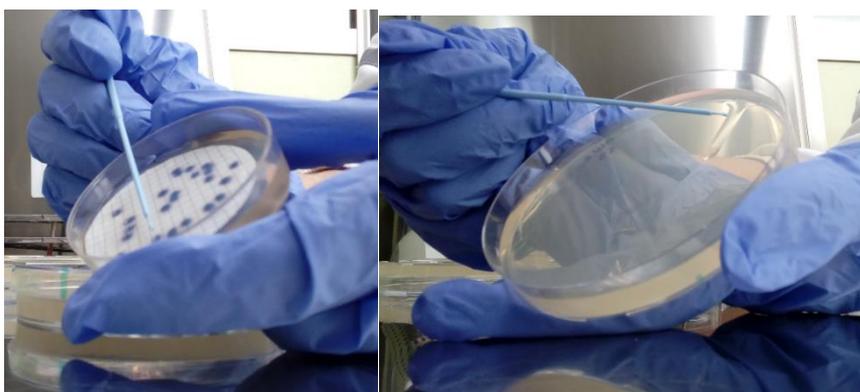


Figura 8: proceso de aislamiento de colonias de CT y *E. coli*

A partir de este cultivo puro, se llevaron a cabo los pasos de confirmación, según norma interna LI-10.113 (Nestle Waters, 2000).

4. Confirmación de las colonias sospechosas

A continuación, se describen los medios de cultivo utilizados para identificar las colonias sospechosas. (Nestle Waters, LI-10.113)

a) Siembra en Agar Kligler hierro

Componentes

- Peptona de carne 13g
- Cloruro de sodio 5g
- Lactosa 10g
- Tripteína 10g
- Glucosa 1g
- Citrato de hierro y amonio 0.5g
- Tiosulfato de sodio 0.3g

- Rojo de fenol 0.025g
- Agar 15g
- Agua destilada 1L

Para la preparación de este medio marca Merck, fue importante tener en cuenta que, luego de pesar el medio ya formulado y agregar el agua correspondiente, se asegurara la disolución total del polvo. Posteriormente, se distribuyó en tubos y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Luego, se colocaron los tubos con el medio todavía líquido y caliente en una superficie inclinada y fría, de manera que se formara dentro del tubo una larga superficie inclinada de agar y un pequeño fondo de no más de 3 cm.

Para la siembra, se tomó una colonia bien aislada y se inoculó en pico de flauta de agar Kligler hierro utilizando un ansa en punta, la misma se introdujo paralelo a las paredes del tubo, hasta 1 cm antes de tocar el fondo y luego se estrió hacia la superficie inclinada (figura 9). Después de la inoculación se incubaron los tubos a 36°C durante 24 horas.



Figura 9: siembra de colonia en pico de flauta Kligler hierro

En este medio, la peptona de carne y la tripteína, aportan los nutrientes adecuados para el crecimiento bacteriano. La lactosa y la glucosa son los hidratos de carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el citrato de hierro y el amonio, son la fuente de iones Fe^{+3} , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. El rojo de fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el ambiente osmótico.

Por fermentación de azúcares se producen ácidos que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira a color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro (*Laboratorio Britania, 2021*).

Al observar el color del medio de cultivo y la producción de gas, se puede determinar (*figura 10*):

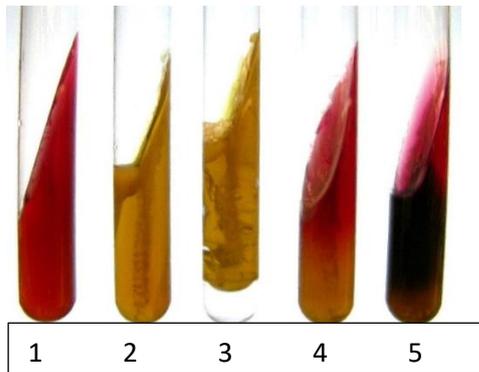


Figura 10: codificación de resultados en agar Kligler hierro.

Referencias:

- 1-Superficie alcalina/profundidad alcalina (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo no fermenta azúcares
- 2-Superficie ácida/profundidad ácida (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta la glucosa y lactosa.
- 3-La presencia de burbujas o la ruptura del medio de cultivo indican que el microorganismo produce gas.
- 4-Superficie alcalina/profundidad ácida (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa.
- 5-El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

b) Siembra en Caldo Triptófano para prueba de indol

Se preparó el medio marca Merck, mediante el pesaje del mismo y agregado de agua, luego de su disolución completa se colocó en tubos de ensayo los que se esterilizaron tapados en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Una vez esterilizados se retiraron del autoclave y se dejaron enfriar.

Componentes

- | | |
|---------------------------------|--------|
| • Triptosa de caseína digestiva | 10,0 g |
| • L-Triptófano | 1,0 g |
| • Cloruro de sodio | 5,0 g |
| • Agua destilada o desionizada | 1l |

Las colonias de CT y *E. coli* se inocularon en un tubo con caldo triptófano y fueron incubadas en estufa a 44°C durante 24-48 horas (figura 11). Una vez cumplidas las 24-48h de incubación en caldo triptófano, se agregó a cada tubo inoculado 0.5ml de reactivo indol, se agito y dejó reposar para observar el resultado.



Figura 11: inoculación de colonia sospechosa en caldo triptófano

c) Prueba oxidasa

Esta prueba pone en evidencia la presencia de actividad enzimática de la oxidasa. Las bacterias CT y *E. coli* son oxidasa negativo.

Para llevar a cabo esta prueba se utilizó el reactivo disponible comercialmente, en este caso comercializado por MERCK, el cual se presenta en forma de tiras reactivas.

La prueba oxidasa es un método diagnóstico que evidencia la presencia del complejo enzimático denominado citocromo oxidasa c. Este sistema induce la transformación del citocromo reducido a oxidado, ya que capta el oxígeno para generar energía a través de la respiración aeróbica y este a su vez actúa como último aceptor de electrones (H⁺) en la cadena respiratoria.

Existen distintas variedades de citocromos (citocromos a1, a2, a3 y 0). Algunas bacterias pueden producir una sola, pero otras hasta dos o tres a la vez. En este sentido, la presencia del citocromo a y a3 se conoce como citocromo – oxidasa c. Este es el tipo de citocromo que detecta la prueba oxidasa.

El sistema citocromo oxidasa c actúa de la siguiente manera: los microorganismos oxidasa positivos utilizan el oxígeno para generar energía a través de la respiración aeróbica. Este sistema funciona gracias al transporte de electrones a partir de sustancias donadoras como el NADH⁺ hacia sustancias receptoras, en este caso el oxígeno. Esto da como resultado que se produzca energía (ATP) y agua o peróxido de hidrógeno, dependiendo del sistema de citocromo oxidasa que posea el microorganismo. Es por ello que la mayoría de las bacterias oxidasa positivas también son catalasas positivas, condición necesaria para eliminar el peróxido de hidrógeno producido, ya que esta sustancia es tóxica para las bacterias.

Una reacción positiva generará una coloración lavanda o azul –púrpura, en cambio, si la última sustancia aceptoras de electrones en la cadena respiratoria es diferente al oxígeno, la prueba de oxidasa dará negativa (no hay producción de color); este es el caso de los microorganismos anaerobios. Así mismo, si el citocromo utilizado por el microorganismo es diferente al citocromo oxidasa c, también dará la prueba negativa, tal es el caso de CT y *E. coli*. (Gil, 2019) (Figura 12).

Para realizar esta prueba, las colonias se tomaron con un ansa estéril de plástico (no se utilizó ansa metálica porque puede interferir en el resultado) y se colocó sobre la zona reactiva de la tira de oxidasa, luego se esperaron 30 segundos aproximadamente y se verificó el resultado:

- Oxidasa negativo: la tira reactiva no presenta cambios de color.
- Oxidasa positivo: la tira reactiva se torna de color violeta- azulado

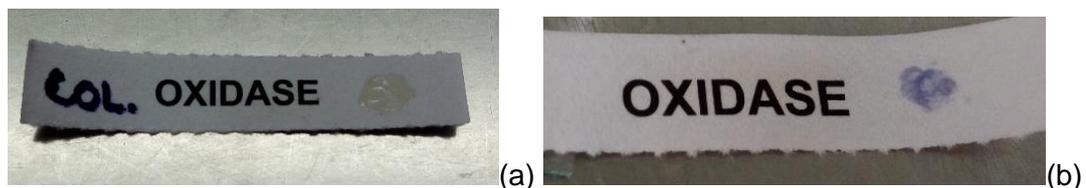


Figura 12: resultado de prueba Oxidasa: a: oxidasa negativa; b: oxidasa positiva

d) Prueba KOH 3%

Para llevar a cabo esta prueba, se utilizó una solución de hidróxido de potasio al 3%. Se colocó una pequeña gota de esta solución en un portaobjeto limpio. Partiendo de un cultivo puro y por medio de un ansa estéril se repicó una colonia bien aislada y se emulsionó durante 1 minuto en la gota de KOH. Luego se levantó el ansa suavemente y se observó el resultado:

- KOH positivo: se observa formación de hilo mucoso al elevar el ansa, (Figura 13).



Figura 13: resultado positivo de prueba de KOH

- KOH negativo: no se observa formación de hilo mucoso

e) Tinción de Gram

La norma LI-00.700-2, de Nestle Waters, describe que en esta coloración se forma un complejo cristal violeta yodo en el interior de la pared de las células, las bacterias Gram - negativas contienen una membrana externa rica en lipopolisacáridos que forma parte de su pared celular. Por el contacto con el alcohol la membrana externa se desestabiliza, siendo liberado el cristal violeta. Al ser aplicado el contracolorante safranina la célula es contrateñida tomando el color rosado. En el caso de las bacterias Gram-positivas, resisten la acción del alcohol porque el decolorante actúa cerrando los poros, lo que impide que el complejo cristal violeta/yodo pueda salirse. Por tanto, se mantiene estable la coloración con el cristal violeta, y no hay posibilidad de ingreso de la safranina. Por esto estas bacterias se tiñen de azul intenso o morado.

Para esta prueba, se utilizaron los reactivos comercializados por el laboratorio Merck, los cuales ya se encuentran listos para ser utilizados y se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- Se tomó la colonia a inspeccionar con un ansa y se aplicó sobre un portaobjeto exento de grasa. Luego se mezcló directamente con 1 o 2 gotas de solución fisiológica y se extendió. Una vez secada al aire se procedió a la fijación por calor (frotis), para lo que se pasó 3 veces, lentamente, el lado inferior del portaobjeto por sobre la llama de un mechero Bunsen. Se dejó enfriar.
- Se cubrió el frotis al calor con solución de Cristal violeta y se dejó actuar durante 1 minuto.
- Se vertió la solución de Cristal violeta y se lavó con solución de Lugol (yodo yodurado).
- Se cubrió la extensión con Lugol y se la dejó actuar durante 1 minuto.
- Se lavó con agua destilada durante 5 segundos.
- Se agitó el portaobjetos durante 30 segundos en solución decolorante, hasta que no se desprendieron más nubosidades de color y la extensión apareció azul grisáceo.
- Se enjuagó cuidadosamente con agua destilada durante 5 segundos.
- Se tiñó durante 30 segundos con solución de Safranina
- Se lavó con agua y se dejó secar
- Finalmente se realizó la observación al microscopio con objetivo de inmersión

5. Tratamiento de resultados

Para el análisis de los resultados obtenidos, se completó una tabla en la cual se detalló cada una de las técnicas realizadas para cada una de las cepas sospechosas confirmadas. En la misma, se colocó la reacción correspondiente presentada por las colonias: CT+, EC+ ó CT- , EC-. Con estos resultados, se llevó a cabo un análisis de frecuencias, a partir del cual se realizó un gráfico en el que se pudieron visibilizar de mejor manera. Para ello se trabajó con hojas de cálculo Excel.

Para evaluar los medios de cultivo y confirmar que no arrojasen datos erróneos, se confirmó su esterilidad mediante el uso de blancos. Estos fueron llevados a estufa a la temperatura y tiempo correspondientes, según lo define la técnica para cada uno. Pasado el tiempo de incubación, la ausencia de crecimiento, aseguró que el proceso de esterilización de los mismos fue el adecuado.

6. Análisis de costos y tiempo

Para realizar esta evaluación, se llevó a cabo un análisis de costos y tiempos que se requieren para analizar un total de 50 muestras. Se tuvieron en cuenta los medios de cultivo utilizados, tanto los de incubación y aislación como los de confirmación, los reactivos de confirmación, tubos de ensayo y las placas utilizadas. Los costos fueron obtenidos a partir de las paginas proveedoras de los insumos en el momento del análisis.

IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Interpretación de resultados

Las cepas liofilizadas, las cepas sospechosas provenientes de las muestras de rutina y el control negativo, fueron procesadas, crecidas en el medio CCA y aisladas para la obtención de un cultivo puro, al cual se le aplicaron las pruebas de confirmación.

Luego de aplicadas cada una de las pruebas de confirmación según LI-10.113, se procedió a interpretar los resultados de las mismas, para definir por último si correspondían a cepas de CT o EC. La interpretación de cada una fue:

1.1. Prueba Agar Kligler hierro

Una vez inoculada la cepa sospechosa y transcurrido el tiempo de incubación, los resultados para cepas de CT y EC, son:

En la base:

La totalidad de las cepas CT fermentaron la glucosa con producción de ácido, color amarillo en el fondo del medio (Figura 14), esta fermentación, en algunos casos fue acompañada por la producción de gas que se observó por burbujas que separan el medio de las paredes del tubo.



Figura 14: resultado de CT en Kligler hierro

En el pico:

El 100% de las cepas EC analizadas demostraron fermentación ácida de la lactosa, cambiando el color de la superficie del medio a amarillo (figura 15).



Figura 15: resultado de CT- *E. coli*

Cepas RCT y EF no produjeron fermentación ácida de la glucosa, con lo cual son negativas a esta prueba.

1.2. Prueba caldo triptófano para prueba indol

Posterior al agregado del reactivo indol, se observa un color rojo oscuro en la superficie de contacto del medio y el reactivo, lo cual es indicador de la producción de indol. Las bacterias que producen reacción positiva al indol se consideran *E. coli* positivas, todas las cepas EC analizadas presentaron formación del anillo, mientras que las cepas CT, RCT y EF no lo hicieron (figura 16).

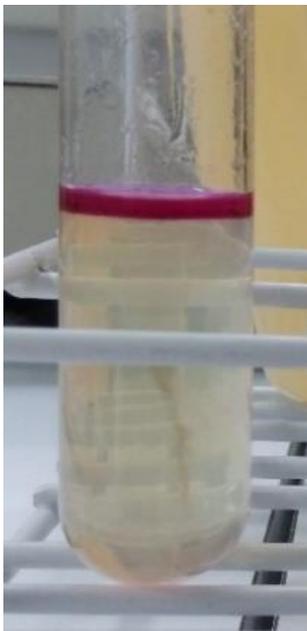


Figura 16: prueba de indol positiva

1.3. Prueba oxidasa

Luego de que se tomaron las colonias con un ansa estéril de plástico y se colocaron sobre la zona reactiva de la tira de oxidasa, se esperaron 30 segundos aproximadamente y todas aquellas colonias que no presentaron cambios de color, es decir, ausencia de reacción se

consideraron “oxidasa negativo” y por lo tanto CT y EC. (Figura 17). Por el contrario, las cepas RCT y EF resultaron positivas a la prueba oxidasa.

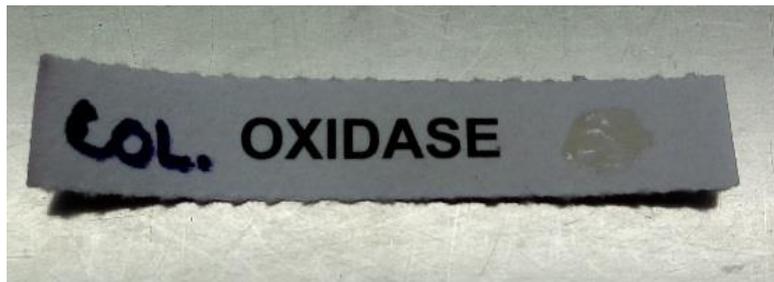


Figura 17: Prueba oxidasa negativa

1.4. Prueba KOH

Una vez emulsionada la colonia en la solución de KOH 3% se verificó, mediante la elevación del ansa la formación de hilo mucoso, las cepas CT y EC formaron dicho hilo (Figura 18), mientras que las cepas RCT y EF no lo formaron.



Figura 18: resultado de prueba de KOH

1.5 Tinción de Gram

Todas las cepas de CT y EC resultaron ser bacilos cortos y Gram-negativas, como se observa en la figura 19. Las cepas RCT fueron cocos y Gram-positivas.

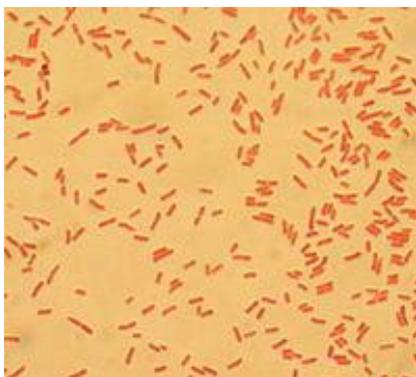


Figura 19: Bacterias Gram-negativas

2. Resultados obtenidos de cepas liofilizadas de CT y sospechosas CT.

En la Tabla 3, se presentan los resultados obtenidos en cada prueba realizada a las 121 cepas de referencia de CT, codificadas como CT 1 a CT121 y las 4 cepas sospechosas de CT provenientes de muestras de agua analizadas en el laboratorio, codificadas como RCT1 a RCT4.

Tabla 3: Resultados obtenidos de cepas liofilizadas de CT y sospechosas CT

Cepa liofilizada CT	Colonia en CCA	indol	Kligler hierro	Prueba oxidasa	KOH 3%	Tinción Gram	Resultado
CT1	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT2	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT3	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT4	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT5	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT6	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT7	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT8	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT9	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT10	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT11	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT12	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT13	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT14	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT15	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT16	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +

Tabla 3, continúa en la página siguiente.

Cepa liofilizada CT	Colonia en CCA	indol	Kligler hierro	Prueba oxidasa	KOH 3%	Tinción Gram	Resultado
CT17	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT18	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT19	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT20	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT21	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT22	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT23	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT24	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT25	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT26	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT27	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT28	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT29	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT30	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT31	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT32	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT33	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT34	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT35	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT36	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +

Tabla 3, continúa en la página siguiente

Cepa liofilizada CT	Colonia en CCA	indol	Kligler hierro	Prueba oxidasa	KOH 3%	Tinción Gram	Resultado
CT37	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT38	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT39	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT40	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT41	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT42	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT43	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT44	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT45	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT46	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT47	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT48	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT49	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT50	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT51	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT52	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT53	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT54	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT55	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT56	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT57	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +

Tabla 3, continúa en la página siguiente

Cepa liofilizada CT	Colonia en CCA	indol	Kligler hierro	Prueba oxidasa	KOH 3%	Tinción Gram	Resultado
CT58	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT59	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT60	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT61	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT62	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT63	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT64	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT65	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT66	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT67	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT68	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT69	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT70	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT71	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT72	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT73	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT74	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT75	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT76	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT77	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT78	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +

Tabla 3, continúa en la página siguiente

Cepa liofilizada CT	Colonia en CCA	indol	Kligler hierro	Prueba oxidasa	KOH 3%	Tinción Gram	Resultado
CT79	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT80	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT81	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT82	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT83	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT84	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT85	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT86	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT87	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT88	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT89	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT90	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT91	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT92	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT93	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT94	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT95	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT96	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT97	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT98	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT99	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +

Tabla 3, continúa en la página siguiente

Cepa liofilizada CT	Colonia en CCA	indol	Kligler hierro	Prueba oxidasa	KOH 3%	Tinción Gram	Resultado
CT100	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT101	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT102	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT103	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT104	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT105	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT106	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT107	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT108	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT109	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT110	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT111	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT112	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT113	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT114	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT115	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT116	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT117	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT118	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT119	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
CT120	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +

Tabla 3, continúa en la página siguiente

Cepa liofilizada CT	Colonia en CCA	indol	Kligler hierro	Prueba oxidasa	KOH 3%	Tinción Gram	Resultado
CT121	Rosa-rojiza	-	+	-	+	Gram negativo	CT +
RCT1	Rosa-rojiza	-	-	+	-	Gram positivo	CT -
RCT2	Rosa-rojiza	-	-	+	-	Gram positivo	CT -
RCT3	Rosa-rojiza	-	-	+	-	Gram positivo	CT -
RCT4	Rosa-rojiza	-	-	+	-	Gram positivo	CT -

3. Resultados obtenidos en cepas liofilizadas de *E. coli*

Se presentan en la tabla 4 los resultados obtenidos en cepas liofilizadas de *E. coli*, codificadas como EC1 a EC102 donde se comparan resultados en CCA con pruebas confirmatorias correspondientes a técnica interna LI-10.113 (Nestle Waters, 2000).

Tabla 4: Resultados obtenidos de cepas liofilizadas de *E. coli*

Cepa liofilizada <i>E. coli</i> (EC)	Colonia en CCA	indol	Kligler hierro	Prueba oxidasa	KOH 3%	Tinción Gram	Resultado
EC1	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC2	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC3	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC4	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC5	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC6	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC7	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC8	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC9	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC10	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC11	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +

Tabla 4, continúa en la página siguiente.

Cepa liofilizada <i>E. coli</i> (EC)	Colonia en CCA	indol	Kligler hierro	Prueba oxidasa	KOH 3%	Tinción Gram	Resultado
EC12	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC13	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC14	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC15	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC16	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC17	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC18	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC19	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC20	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC21	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC22	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC23	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC24	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC25	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC26	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC27	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC28	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC29	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC30	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC31	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +

Tabla 4, continúa en la página siguiente.

Cepa liofilizada <i>E. coli</i> (EC)	Colonia en CCA	indol	Kligler hierro	Prueba oxidasa	KOH 3%	Tinción Gram	Resultado
EC32	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC33	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC34	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC35	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC36	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC37	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC38	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC39	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC40	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC41	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC42	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC43	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC44	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC45	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC46	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC47	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC48	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC49	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC50	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC51	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC52	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +

Tabla 4, continúa en la página siguiente.

Cepa liofilizada <i>E. coli</i> (EC)	Colonia en CCA	indol	Kligler hierro	Prueba oxidasa	KOH 3%	Tinción Gram	Resultado
EC53	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC54	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC55	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC56	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC57	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC58	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC59	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC60	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC61	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC62	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC63	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC64	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC65	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC66	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC67	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC68	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC69	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC70	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC71	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC72	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC73	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +

Tabla 4, continúa en la página siguiente.

Cepa liofilizada <i>E. coli</i> (EC)	Colonia en CCA	indol	Kligler hierro	Prueba oxidasa	KOH 3%	Tinción Gram	Resultado
EC74	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC75	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC76	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC77	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC78	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC79	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC80	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC81	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC82	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC83	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC84	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC85	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC86	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC87	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC88	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC89	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC90	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC91	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC92	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC93	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC94	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +

Tabla 4, continúa en la página siguiente.

Cepa liofilizada <i>E. coli</i> (EC)	Colonia en CCA	indol	Kligler hierro	Prueba oxidasa	KOH 3%	Tinción Gram	Resultado
EC95	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC96	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC97	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC98	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC99	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC100	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC101	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +
EC102	violeta-azulada	+	+	-	+	Gram negativo	EC +

4. Resultados obtenidos en cepa liofilizada de *Enterococcus faecalis* (control negativo)

Se presentan en tabla 5 los resultados obtenidos en cepa testigo de *Enterococcus faecalis*, codificada como EF, donde se comparan resultados en CCA con pruebas confirmatorias correspondientes a técnica interna LI-10.113 (Nestle Waters, 2000).

Tabla 5: Resultados obtenidos de cepa liofilizada de *Enterococcus faecalis*

Cepa liofilizada <i>Enterococcus faecalis</i> (EF)	Colonia en CCA	indol	Kligler hierro	Prueba oxidasa	KOH 3%	Tinción Gram	Resultado
EF	Blanca-pequeña	-	-	+	-	Gram positivo	CT/EC -

5. Análisis de frecuencias de resultados obtenidos

Para analizar los resultados de CT, se realiza un análisis de frecuencias teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las tablas anteriores (tabla 6, figura 20).

Tabla 6: Análisis de frecuencias para bacterias CT

Modalidades	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)	Frecuencia absoluta acumulada	Frecuencia relativa acumulada (%)
CT+	121	96,8	121	96,8
RCT-	4	3,2	125	100
Totales	125	100		

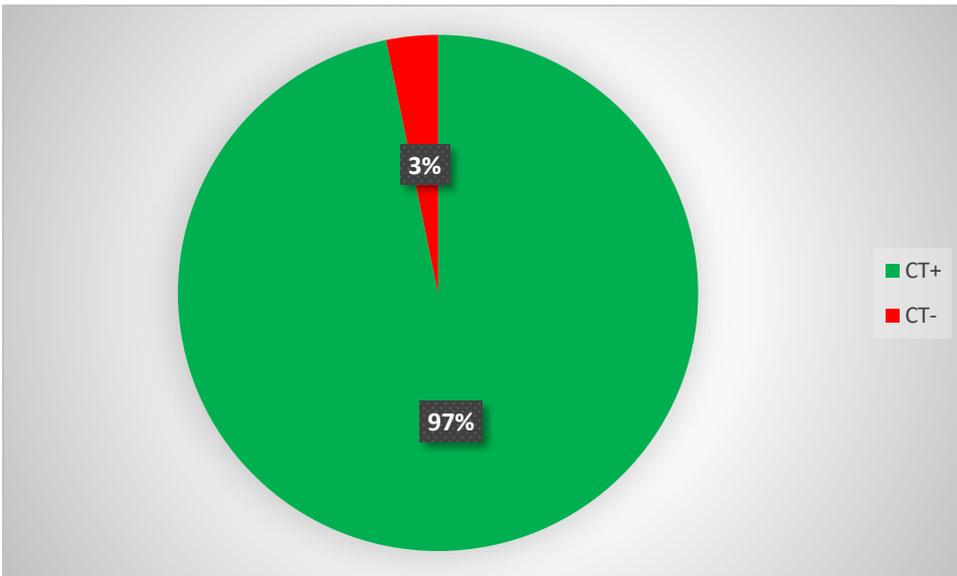


Figura 20: frecuencia relativa CT

Para analizar los resultados de EC, se realiza un análisis de frecuencias teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las tablas anteriores (tabla 7, figura 21).

Tabla 7: Análisis de frecuencias para bacterias *E. coli*

Modalidades	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)	Frecuencia absoluta acumulada	Frecuencia relativa acumulada (%)
EC+	102	100	102	100
EC-	0	0	102	100
Totales	102	100		

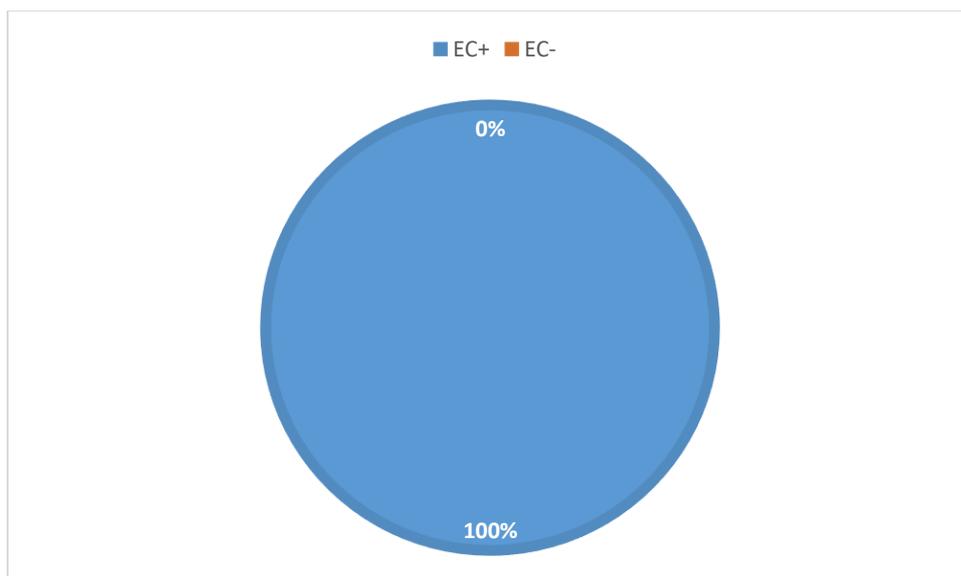


Figura 21: frecuencia relativa EC

6. Análisis de costos y tiempos.

En la tabla 8, se pueden observar el tiempo y los costos en materiales más representativos utilizados, que incluye los medios de cultivo y cajas de Petri utilizadas según la norma interna norma LI-10.113 (Nestle Waters, 2000) y la norma ISO-9308-1:2014, al igual que el tiempo empleado según cada protocolo para realizar 50 determinaciones.

Tabla 8: insumos utilizados en 50 determinaciones de CT y EC, según las dos normas estudiadas y tiempo empleado en cada etapa

Norma	Costo de medios de cultivo e insumos(U\$D)	Tiempo estimado (horas)	
LI-10,113	Agar lactosa TTC con Tergitol- Merck	8,94	48
	Agar extracto de levadura- Merck	8,93	24
	Agar Kligler hierro- Merck	9,49	24
	Caldo Triptona- Merck	11,97	24
	Reactivo de indol según Kovacs 100 ml- Merck	47,6	0,5
	Kit tinción de Gram- Merck	228	0,5
	Hidróxido de potasio 1 ampolla- Industria y Medicina	47	0,5
	Bactident oxidasa 50 tiras- Merck	36,7	0,5
	Cajas de Petri - Microclar	12,50	-
	Tubos de ensayo- Pyrex	12	-
	Membranas 0.45µ- Microclar	42,5	-
	SUMA TOTAL	465,15	122
ISO-9308-1:2014	Chromocult coliform agar- Merck	30,14	24
	Bactident oxidasa 50 tiras- Merck	36,7	0,5
	Cajas de Petri- Microclar	6,25	-
	Membranas 0.45µ- Microclar	42,5	-
	SUMA TOTAL	115.59	24,5

Mediante el uso de pruebas confirmatorias de la norma interna LI-10.113 (Nestle Waters, 2000), se confirmó que el 96.8% de las cepas rojas-rosadas obtenidas en CCA son CT, mientras que el 3.2% de las mismas resultaron negativas a estas pruebas, por lo tanto, así como define la norma ISO-9308-1:2014 es necesario que todas las colonias rojas-rosadas que crecen en medio CCA sean confirmadas mediante la prueba oxidasa, para evitar falsos positivos, esta prueba es importante ya que es simple de realizar, fácil de interpretar y el resultado se obtiene de forma inmediata. Si fuera necesario, como control interno de laboratorio se complementa con una tinción Gram.

Es importante rescatar que las cepas confirmadas como CT coinciden con la totalidad de cepas CT enviadas por el laboratorio, mientras que el 3.2% de cepas rojas-rosadas que resultaron ser CT negativas correspondieron a colonias que provenían de muestras de rutina y crecieron como sospechosas en el medio CCA.

Mediante el uso de pruebas confirmatorias de la norma interna LI-10.113 (Nestle Waters, 2000), se confirmó que el 100% de las cepas violetas-azuladas obtenidas en CCA fueron *E. coli*. Por lo tanto se pudo considerar, que todas las colonias violetas-azuladas que crecen en medio CCA se pueden confirmar como EC, sin necesidad de realizar pruebas confirmatorias de las mismas.

Mediante el análisis de costos, se demuestra que para realizar 50 determinaciones mediante la técnica LI-10.113 (Nestle Waters, 2000) se requiere de un total de \$USD 465,15; mientras que para la realización de la técnica ISO-9308-1:2014 solo se requieren \$USD 115,59. En cuanto a tiempos, la técnica LI necesita de un total de 122 horas para confirmar colonias sospechosas, tanto EC como CT, mientras que la norma ISO necesita solo 24,5 horas para el caso de CT y 24 horas para el caso de EC, las cuales no es necesario que sean confirmadas. A partir de esto, se considera que la norma ISO es un 73% más económica y un 79% más rápida que la LI.

7. Discusión

Diversos investigadores (Lange, et al 2013, Finney, et al, 2003; Byamukama, et al. 2000; Geissler 2000) coinciden en la importancia sanitaria de detectar *E. coli* y CT en 24 horas, ya sea en muestras de agua de diversos orígenes o en muestras de materia fecal.

Al igual que en este trabajo, distintos autores coinciden en la importancia de realizar la prueba oxidasa para confirmar CT y evitar así falsos positivos por presencia de otros géneros, como por ejemplo *Aeromonas*. (Lange et al, 2013), *Pseudomonas* (Finney et al, 2003) o *Vibrio* (Geissler et al, 2000)

Algunos autores (Lange, et al, 2013, Gessler, et al, 2000) proponen además el uso de sistema de identificación API 20E en las colonias rojo-rosadas y oxidasa. Esto no fue utilizado en este trabajo, podría proponerse como control en futuras investigaciones.

Al igual que Lange et al. 2013, se sugiere realizar una tinción de Gram cuando el analista lo desee, sin ser esta prueba obligatoria para la confirmación.

En este trabajo se analizaron 4 muestras de agua mineral extraída de la planta, las mismas demostraron ausencia de CT y *E. coli*. Se propone continuar evaluando los resultados con otras muestras reales que se analizan a diario en el laboratorio.

V-CONCLUSIÓN

- Todas las colonias violetas-azuladas que crecen en medio CCA pueden ser consideradas *E. coli* positivas, sin necesidad de realizar pruebas confirmatorias.
- Todas las colonias rojas-rosadas que crecen en medio CCA deberían ser confirmadas mediante la prueba oxidasa y si se desea complementadas con una tinción de Gram para ser consideradas CT. Es importante tener en cuenta que realizar la tinción de Gram aumentaría el costo en un 66% para 50 determinaciones.
- El uso de la prueba oxidasa para confirmar que los microorganismos analizados son CT, no aumenta el tiempo de análisis ya que se realiza en minutos, con resultados fáciles de interpretar.
- La metodología propuesta por la norma ISO-9308-1:2014 para la detección y enumeración de bacterias Coliformes totales y *Escherichia coli* es más eficiente en cuanto al costo y tiempo de obtención de resultados e igual de eficaz en cuanto al crecimiento y confirmación de los microorganismos en estudio en comparación con la norma interna LI-10.113. Con estos resultados, en el laboratorio de análisis microbiológico de la empresa embotelladora de agua mineral Nestlé Waters se decidió reemplazar el protocolo de la norma interna LI-10.113 por el protocolo de la norma ISO-9308-1:2014.
- La aplicación de la metodología propuesta nos permite tener la certeza de ausencia/presencia de *E. coli* y CT en circuitos y productos terminados en 24 h, lo que permitirá a la empresa accionar de manera rápida para corregir la situación o liberar el producto para el consumo.

VII – BIBLIOGRAFÍA

1. Referencias bibliográficas

- APHA, AWWA y WPCF (1992). *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. Ed. Díaz de Santos. Madrid. España.
- Bermúdez, L; Fernández, T; García, B; Esquitino, B; Roche, MJ; Monzón, A. (2006). *El agua y su relación en el cuerpo humano. Requerimientos y tipos de agua de bebida. Anales de la escuela universitaria de ciencias de la salud de Zaragoza*. Disponible en: <https://cmapspublic3.ihmc.us/rid=1NK1FMQGQ-TFQT871FRJ/El%20agua%20y%20nuestro%20cerebro.pdf#page=7>
- Byamukama, Dennis; Kansime, Frank; Mach, Robert L.; Farnleitner, Andreas H. (2000) *Determination of Escherichia coli Contamination with Chromocult Coliform Agar Showed a High Level of Discrimination Efficiency for Differing Fecal Pollution Levels in Tropical Waters of Kampala, Uganda*. Applied and Environmental Microbiology Volume 66, Issue 2. Disponible en <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/AEM.66.2.864-868.2000>
- Carrillo, E.; Lozano, A. (2008) *Validación del método de detección de Coliformes totales y fecales en agua potable utilizando Agar Chromocult* (tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá.
- Código Alimentario Argentino. ANMAT. *Cap. XII. Art. 985*. Recuperado el 13 de Agosto de 2021 de: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2018/05/capitulo_xii_aguas_actualiz_2021-08.pdf
- Finney, M. Smullen, H. Foster, A. Brokx, S. Storey, M. (2003) *Evaluation of Chromocult Coliform agar for the detection and Enumeration of Enterobacteriaceae from fecal samples from healthy subject*. *Journal of Microbiological Methods* 54.
- Geissler, K; Manafi, M; Amoros, I; Alonso, J.L. (2008). Quantitative determination of total coliforms and *Escherichia coli* in marine waters with chromogenic and fluorogenic media, 1Hygiene Institute, University of Vienna, Wien, Austria and 2Instituto de Hidrología y Medio Natural, Universidad Politécnica, Valencia, Spain. *Applied Microbiology* 2000, p. 88, 280–285. Disponible en: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-2672.2000.00970.x>
- Gil M. (4 de abril de 2019). Prueba de oxidasa: fundamento, procedimiento y usos. Lifeder. Disponible en: <https://www.lifeder.com/prueba-de-oxidasa/>.
- Grillo Trubba, D. “*Aguas embotelladas*”. Subsecretaría de Alimentos y bebidas. Disponible en: <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Publicaciones/revistas/nota.php?id=460>
- International Organization for Standardization (2014). *ISO-9308-1:2014. “Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria”* (3° Ed.). Suiza. ISO.
- International Organization for Standardization (2000). *ISO-9308-1:2000 “Water quality Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria* (2° Ed.) Suiza. ISO.
- Laboratorio Britania, *Kligler Hierro Agar*. Fecha consulta: 2021 Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60706c3393e51.pdf

- Laboratorio Bioser, *Tryptophan Broth*. Fecha consulta: 2021 Disponible en: www.bioser.com/productos/tryptophan-broth-143p/
- Lange, B; Strathman, M; Obmer, R. (2013). *Performance validation of chromogenic coliform agar for the enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria*. Germany. Letters in Applied Microbiology ISSN 0266-8254. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23952651/#:~:text=The%20performance%20of%20chromogenic%20coliform,for%20the%20detection%20of%20E.>
- Madigan M.T, Martinko J.M., Stahl D and Clark D.P. (2009). *Brock, Biología de los microorganismos* (12° ed.). Madrid, España. Pearson Educación S. A.
- MERCK Millipore, (2014). *Chromocult Coliform agar*. Disponible en: http://www.merckmillipore.com/AR/es/product/Chromocult-Coliform-Agar,MM_NF-C164546
- Nestle Waters (2000a). LI-10.113 "*Coliform and E. coli Enumeration*". Nestlé Waters.
- Nestle Waters (2000b). LI-00.702 "*Microbiological Techniques*". Nestle Waters
- Ocasio N y Lopez, M (2004). El uso del cloro en la desinfección del agua. Disponible en: <http://www.edustatipr.com/proyectos/inv97-11-3.pdf>
- Orrego Díaz, C. I. 2004. "*Embotelladora de agua mineral*". Facultad de Ingeniería industrial. Disponible en: <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/20897/u245939.pdf?sequence=1>
- Prescott L.M., Harley J.P. and Klein G.A. (2002), *Microbiología*, 5a edición. Ed. McGRAW-HILL-INTERAMERICANA DE ESPAÑA. España
- Rodier, J. (1990). *Análisis de agua*. OMEGA S.A. Barcelona, España.

2. Bibliografía (antecedentes de lectura)

- Arias, Fidias. (2017) *Efectividad y eficiencia de la investigación tecnológica en la universidad*. Revista RECITIUTM Revista Electrónica de Ciencia y Tecnología del Instituto Universitario de Tecnología de Maracaibo ISSN: 2443-4426. Vol. 3 N° 1. Disponible en: <http://recitiutm.iutm.edu.ve/index.php/recitiutm/article/view/92/pdf>
- Apella, M.C.; Araujo, P.Z. (2005) *Microbiología de agua. Conceptos básicos. Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua*. Buenos Aires: UNSAM. Blesa MA, Blanco-Gálvez J, editores. Disponible en: www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/documents/libro/02_Capitulo_02.pdf
- Bolaños Carmona, M. Jorge. (2005) *Estadística descriptiva de una variable*. CognoSfera. Disponible en: <https://www.ugr.es/local/rruizb/cognosfera>.
- HACH (2000). *Manual de Análisis de Agua* (2° ed.). Loveland, Colorado; EEUU. HACH COMPANY.
- Miralles, M.; Giuliano, G. (2008). *Biónica: eficacia versus eficiencia en la tecnología natural y artificial*. Scientiae Studia, vol.6 N°3. Disponible en https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-31662008000300005
- Patiño López, A. (29 de julio 2014). *Microlab industrial. Análisis microbiológico tradicional vs PCR y SGD*. [Mensaje en un blog]. Recuperado el 13 de Agosto de 2021 de: <http://www.microlabindustrial.com/blog/analisis-microbiologico-tradicional-vs-pcr-y-gds>

- Prácticas de microbiología, *Producción de indol*. Disponible en: [Prácticas de Microbiología - Producción de indol \(google.com\)](#)
- Pulles, M. (2014). *Microorganismos indicadores de la calidad de agua*. *Revista CENIC Ciencias biológicas*, Vol 45, N°1. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181230079005.pdf>
- Rheinheimer, G. (1987). *Microbiología de las aguas*. Ed. Acribia S.A. Zaragoza.
- Sánchez, C. (24 de enero de 2020). *Citas APA*. Normas APA (7ma edición). <https://normas-apa.org/citas/>