

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Comparación entre Métodos Rápido y Clásico
para la Evaluación de la Calidad Microbiológica
de Moluscos Bivalvos**

Daniela María Luisa Gutiérrez Jorquera

Mestrado em Aquacultura e Pescas
Área de especialização Aquacultura

2011

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Comparación entre Métodos Rápido y Clásico
para la Evaluación de la Calidad Microbiológica
de Moluscos Bivalvos**

Daniela María Luisa Gutiérrez Jorquera

Mestrado em Aquacultura e Pescas
Área de especialização Aquacultura

Orientador externo: Doutora Florbela Soares
Co-orientador: Doutora Lídia Dionísio

2011

AGRADECIMIENTOS

A mis queridos padres, hermanas y hermano por aceptar siempre cada aventura que he decidido emprender, por su fiel apoyo y por ser mi refugio en este país lejano...

A mis amigos y amigas en Chile, por compartir sus vidas y sus días como si la distancia física y las diferencias horarias no existieran...

A mi tierra hermosa, tan verde rodeada de volcanes y lagos, mi sur austral, de inviernos implacables y veranos efímeros, que en esta lejanía renació en mí como una raíz profunda añorando la lluvia...

Finalmente quiero agradecer al equipo humano de los laboratorios de microbiología tanto de IPIMAR de Olhão, como del laboratorio de química de la Universidad de Algarve, donde además de profesionales encontré muy buenas personas... agradecer también a mis orientadoras de tesis, y en forma muy particular a mi coordinador de maestrado Dr. Karim por su paciencia infinita...

RESUMO

O consumo de moluscos bivalves crus tem estado estreitamente relacionado a focos de doenças de origem entérica. Estes organismos foram por isto, considerados por longo tempo como vectores de agentes infecciosos convertendo-se num risco para a saúde pública. A qualidade sanitária dos moluscos bivalves é influenciada em parte pela qualidade da água em que se encontram.

Para a determinação da qualidade microbiológica da água ou dos moluscos bivalves, empregam-se organismos indicadores, que atuam como um marcador de contaminação possível da água por agentes patogénicos. O grupo coliforme que inclui espécies como *Escherichia coli*, que pertence à família *Enterobacteriaceae*, e constituem aproximadamente 10% dos microrganismos que constituem a microbiota intestinal dos seres humanos, foram selecionados como indicadores de contaminação fecal devido à sua relação com o grupo tifoide-paratifoide e a sua alta concentração em diferentes tipos de amostras. *E. coli* é frequentemente usada como organismo indicador de contaminação fecal em alimentos e em água. Esta espécie é principalmente inócua, mas com algumas estirpes altamente patogénicas para os humanos. Reside no tracto intestinal de humanos e outros animais de sangue quente, e são excretadas em grandes quantidades.

As análises microbiológicas convencionais requerem desde 24 a 72hrs para estarem completas. O tempo necessário para obter informação útil que possa proteger a saúde pública é demasiado grande. Tendo em conta a importância da detecção e quantificação bacteriológica precoce, levaram-se a cabo análises microbiológicas com duas espécies de moluscos bivalves *Mytilus spp* e *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) utilizando dois métodos, um método clássico e um método rápido.

O método clássico utilizado foi a técnica de fermentação em tubos múltiplos (FTM), método mais utilizado para a quantificação de coliformes em moluscos bivalves vivos. Esta técnica consta de duas etapas. A primeira etapa ou prova presuntiva, correspondeu à inoculação das amostras de moluscos bivalves em tubos preparados com as diferentes concentrações do meio de cultivo caldo glutamato modificado com minerais (MMGB-CM0607 OXOID), e posterior incubação a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

A partir dos resultados obtidos levou-se a cabo a segunda etapa, conhecida também como prova confirmatória, onde aqueles tubos que deram resultado positivo na primeira etapa (viragem da cor lilás do meio para amarelo) foram examinados para determinar a presença de *E. coli*, mediante a repicagem para um meio de cultura agar cromogénico triptona biliar X- β -D-glucuronídeo (TBX-CM0945 OXOID), e incubação a $44\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

O método rápido utilizado foi a prova de Autoanálises Colilert® (Colilert-18), usada para a detecção e quantificação simultânea de coliformes totais e *E. coli* em amostras de água e águas residuais. A prova Colilert-18 foi aplicada neste estudo para amostras de moluscos bivalves. Esta prova incorpora dois substratos hidrolisáveis que se baseiam na capacidade dos coliformes de produzir a enzima β -galactosidase que se hidrolisa e se une ao substrato específico O-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) libertando O-nitrofenol, o qual produz uma cor amarela, e na enzima β -glucuronidasa

produzida por *E. coli* que forma uma substância fluorescente quando hidrolisa a 4-metil-umbeliferil- β -D-glucuronido (MUG) libertando 4-metil-umbeliferona.

Estas combinações de substratos ONPG e MUG são a principal fonte de carbono, e permitem a detecção de coliformes totais e *E. coli* dentro de 24 horas.

O principal objectivo deste trabalho foi comparar o método rápido Colilert® (Colilert-18), adaptado neste estudo para amostras de moluscos bivalves, com o método clássico de fermentação em tubos múltiplos (FTM), usado atualmente pelo laboratório de microbiologia do IPIMAR (Olhão) e através do qual se regulam as zonas de produção de moluscos bivalves na costa Algarvia.

Assim, os resultados obtidos sugerem a existência de uma correlação positiva entre os métodos, particularmente para amostras de *Mytilus spp* a qual não evidenciou diferenças significativas na quantificação de coliformes totais ou de *E. coli* ($p > 0,05$). Contudo, a espécie *R. decussatus* revelou a existência de diferenças significativas na quantificação de *E. Coli* ($p < 0,05$). Este resultado sugere a ocorrência de falsos positivos pelo método rápido nesta espécie devido características fisiológicas ou a fatores relacionados com a adaptação à prova.

Os resultados deste estudo permitiram avaliar a possibilidade do uso de um método rápido em espécies de moluscos bivalves e verificar que a quantificação microbiológica de coliformes totais bem como de *E. coli*, fosse comparável com resultados obtidos pelo método clássico. Os resultados obtidos permitem concluir que as espécies de *Mytilus* se adaptaram melhor à prova Colilert-18 que a espécie *R. Decussatus*.

Desta forma, a pesar de não existir um completo ajuste deste método rápido às amostras de moluscos bivalves, sugere-se o seu uso como um complemento ao método clássico, particularmente em situações de emergência que requeiram resultados com maior rapidez, gerando um alerta preventivo dentro das primeiras 24 horas, que posteriormente seria confirmado ou retirado após obtenção de resultados definitivos através do método clássico.

Sugere-se para estudos posteriores identificar e caracterizar os microrganismos mais comuns presentes nas amostras, realizando subculturas daquelas análises que resultem suspeitas de serem falso-positivas bem como daquelas análises que não apresentarem nenhum tipo de resposta, para descartar falso-negativos. Para diminuir os fatores que pudessem contribuir para o número de falso-positivos ou negativos, se sugere manter um período de incubação de 20 a 24hrs.

Palavras chaves: *Mytilus spp*, *R. decussatus*, Colilert®, *E. coli*, coliformes totais, fermentação em tubos múltiplos FTM, método clássico, método rápido.

RESUMEN

Los moluscos bivalvos han sido implicados como vectores en la transmisión de enfermedades bacteriológicas de origen entérico por muchas décadas.

Los análisis microbiológicos convencionales requieren desde 24 a 72hrs para estar completos. El tiempo transcurrido todavía es demasiado grande antes de entregar información útil que pudiera proteger la salud pública.

Teniendo en cuenta la importancia de la detección y cuantificación bacteriológica temprana, se llevaron a cabo análisis microbiológicos con dos especies de moluscos bivalvos *Mytilus spp* y *Ruditapes decussatus* a través de dos métodos, clásico y rápido.

El objetivo principal de este trabajo fue comparar el método rápido de nombre comercial Colilert®, creado para análisis microbiológico de muestras de agua y adaptado en este estudio para muestras de moluscos bivalvos, con el método clásico de fermentación en tubos múltiples (FTM), usado actualmente por el laboratorio de microbiología de IPIMAR y a través del cual se regulan las zonas de producción de moluscos bivalvos en la costa Algarvia. Este método rápido (prueba Colilert-18), no es un método creado para analizar muestras de moluscos bivalvos, por lo tanto se verificó que los resultados obtenidos fueran consistentes con los resultados entregados por el método clásico.

Los resultados obtenidos sugieren la existencia de una correlación positiva entre ambos métodos, con ambas especies, particularmente con *Mytilus spp* la cual no evidenció diferencias significativas en la cuantificación de coliformes totales y de *Escherichia coli* ($p > 0,05$). Sin embargo, la especie *R. decussatus* reveló la existencia de diferencias significativas solamente en la cuantificación de *E. coli* ($p < 0,05$) lo que podría estar sugiriendo la ocurrencia de falsos negativos por el método rápido.

Palabras claves: *Mytilus spp*, *R. decussatus*, Colilert®, *E. coli*, coliformes totales, fermentación en tubos múltiples FTM, método clásico, método rápido.

ABSTRACT

Bivalve molluscs have been implicated as vectors in the transmission of enteric bacterial diseases for many decades. The conventional microbiological analyses required 24 to 72hrs to complete. The elapsed time is still too great to provide useful information that could protect public health.

Given the importance of early bacterial detection and quantification microbiological analyses with two species of bivalve molluscs *Mytilus spp* and *Ruditapes decussatus* through classic and rapid methods were performed.

The main objective of this study was to compare the rapid method Colilert-18, developed for microbiological analysis of water and wastewater, adapted in this study for bivalve molluscs samples, with the classic method of multiple tube fermentation (MTF) currently used by the microbiology laboratory IPIMAR and through which regulates the production areas of bivalve molluscs in the Algarve coast.

This rapid method (Colilert-18) is not a method developed to analyze bivalve molluscs samples, therefore was verified that the results were consistent with the results given by the conventional classic method.

The results suggested the existence of a positive correlation between both methods with both species, particularly with *Mytilus spp* those who didn't show significant differences ($p > 0.05$) in the quantification of total coliforms and *Escherichia coli*.

However the species *R. decussatus* revealed significant differences in the quantification of *E. coli* ($p < 0.05$) it might be suggesting the occurrence of false negatives given by the rapid method.

Keywords: *Mytilus spp*, *R. decussatus*, Colilert®, *E. coli*, total coliform, multiple tube fermentation MTF, classic method, rapid method.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS

RESUMO

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN.....	11
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos.....	16
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
2.2. Análisis microbiológicos.....	18
2.2.1. Tratamiento inicial de las muestras.....	18
2.2.2. Proceso de homogeneizado y preparación de la solución madre.....	19
2.3. Método clásico: Técnica de fermentación de tubos múltiples.....	20
2.3.1 Prueba presuntiva en caldo de glutamato modificado con minerales (MMGB).....	21
2.3.2. Prueba confirmatoria en medio cromogénico (TBX).....	24
2.4. Método rápido: Prueba de autoanálisis Colilert®.....	25
2.5. Manejo de la información.....	28
2.6. Tratamiento estadístico.....	28
3. RESULTADOS.....	29
3.1. Análisis de los resultados obtenidos con las muestras de <i>Mytilus spp</i>	29
3.2. Análisis de los resultados obtenidos con las muestras de <i>R. decussatus</i>	32
3.3. Comparación de los periodos de incubación.....	36
3.3.1 Coliformes totales y <i>E. coli</i> cuantificados en las muestras de <i>Mytilus spp</i>	37
3.3.2. Coliformes totales y <i>E. coli</i> cuantificados en las muestras de <i>R. decussatus</i> ...	39
4. DISCUSIÓN.....	43
5. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	52
6. BIBLIOGRAFÍA.....	53

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

- Tabla 1. Prueba de Shapiro-Wilks para los datos de *Mytilus spp* (n=26) obtenidos por ambos métodos (Colilert-18 y FTM), para coliformes totales y *E. coli*. 29
- Tabla 2. Análisis de correlación paramétrica y no paramétrica entre ambos métodos (Colilert-18 y FTM) para coliformes totales y *E. coli*. 30
- Tabla 3. Prueba de Shapiro-Wilks para los datos de *R. decussatus* (n=40) obtenidos por ambos métodos (Colilert-18 y FTM), para coliformes totales y *E. coli*. Nivel de confianza 95%. 33
- Tabla 4. Análisis de correlación paramétrica y no paramétrica entre ambos métodos (Colilert-18 y FTM) para coliformes totales y *E. coli*. 33
- Tabla 5. Promedios obtenidos de la cuantificación de coliformes totales y de *E. coli* durante ambos tiempos de incubación, en ambas especies con el método de análisis Colilert-18 (promedio \pm desviación estándar). 36
- Tabla 6. Clasificación de las muestras según Reg. (CE) N° 854/2004 para *E. coli*. Se presenta el número de muestras para cada método y además el número de coincidencias entre ambos métodos, para la misma categoría. 42
- Tabla 7. Regulación (CE) N°854/2004 para las áreas de producción de moluscos bivalvos. 42

Figuras

- Figura 1. Especies analizadas: **a)** *R. decussatus*; **b)** *Mytillus spp*. 17
- Figura 2. a) Ejemplo de lavado individual de *Mytilus spp* usando una escobilla; b) Ejemplo de extracción del tejido y líquido intravalvar bajo condiciones de asepsia. 18
- Figura 3. a) Equipos utilizados, Stomacher® y balanza analítica, frascos Schott conteniendo la solución triptona-sal autoclavada. b) Ejemplo de muestra obtenida de *Mytilus spp* desde la cual se deben pesar un mínimo 80gr para iniciar el proceso de homogeneizado del tejido. 20
- Figura 4. a) Muestra de *Mytilus spp* en su primera homogeneización; b) Bolsa de homogeneización estéril donde se puede apreciar el filtro interior; c) Homogeneizado final de *Mytilus spp* que corresponde a la solución madre (dilución 10^{-1}). 20
- Figura 5. Ejemplo de gradilla preparada para la inoculación de la muestra de homogeneizado de muestra de molusco bivalvo (solución madre de dilución 10^{-1}). Cada una de estas series contiene 5 réplicas. 23
- Figura 6. a) Incubación de las series a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas; b) Después de la incubación es visible el viraje de color desde el lila oscuro característico del medio de cultivo hacia amarillo que identifica los tubos positivos que finalmente indican la presencia de coliformes. 23

Figura 7. a) Repique de los tubos positivos y sospechosos de ser positivos a placas con medio de cultivo TBX. b) Placas de cultivo después del tiempo de incubación, pueden distinguirse las colonias de *E. coli* β -glucuronidasa positivas que aparecen de color azul-verdoso. 24

Figura 8. a) Reactivo de Colilert-18 en polvo; b) Recipiente estéril que se utiliza para mezclar la muestra a analizar con el sustrato en polvo; c) Bandeja en que es vertida la muestra, y en la cual se realiza la incubación, pueden distinguirse los dos grupos de celdas de diferente tamaño, además de un pozo en la parte superior que sirve para coleccionar el excedente. 26

Figura 9. Recipiente estéril Colilert® de 100ml conteniendo la muestra y el reactivo en polvo, paso previo al llenado de las bandejas. Puede apreciarse una leve diferencia de color entre las especies utilizadas. 26

Figura 10. Máquina selladora e inserto de goma, que permite distribuir el líquido en cada celda y sellar al vacío cada bandeja. 26

Figura 11. a) Lectura de las bandejas transcurrido el tiempo de incubación, pueden apreciarse las celdas de color amarillo que indican la presencia de coliformes; b) Mediante una lámpara de UV es posible ver y contar las celdas que emiten fluorescencia, que identifican y confirman la presencia de *E. coli* en las muestras. 27

Figura 12. Regresión lineal simple entre ambos métodos rápido y clásico, para coliformes totales y *E. coli* cuantificados en *Mytilus spp*. En cada gráfica está presente la línea de tendencia, la ecuación de regresión y el coeficiente de determinación. 31

Figura 13. Regresión lineal simple entre ambos métodos rápido y clásico, para coliformes totales y *E. coli* cuantificados en *R. decussatus*. En cada gráfica está presente la línea de tendencia, la ecuación de regresión y el coeficiente de determinación. 35

Figura 14. Pruebas de autoanálisis Colilert-18 para muestra de a) *Mytilus spp* b) *R. decussatus*. Dos ejemplos para observar las diferencias producidas por ambos tiempos de incubación. 37

Figura 15. Coliformes totales presentes en las muestras de *Mytilus spp* y sus diferentes zonas de producción. Comparación de resultados de ambos métodos, rápido Colilert-18 y clásico FTM. Se destaca la incubación de 48hrs que fue una condición sólo del método rápido. 38

Figura 16. *E. coli* presentes en las muestras de *Mytilus spp* y sus diferentes zonas de producción. Comparación de resultados de ambos métodos, rápido Colilert-18 y clásico FTM. Se destaca la incubación de 48hrs que fue una condición sólo del método rápido. 39

Figura 17. Coliformes totales presentes en las muestras de *R. decussatus* y sus diferentes zonas de producción. Comparación de resultados de ambos métodos, rápido Colilert-18 y clásico FTM. Se destaca la incubación de 48hrs que fue una condición sólo del método rápido. 40

Figura 18. *E. coli* presentes en las muestras de *R. decussatus* y sus diferentes zonas de producción. Comparación de resultados de ambos métodos, rápido Colilert-18 y clásico FTM. Se destaca la incubación de 48hrs que fue una condición sólo del método rápido. 41

1. INTRODUCCIÓN

Los moluscos bivalvos son considerados una fuente de alimento de alto consumo a nivel mundial y debido a su importancia económica existe una amplia variedad de investigaciones relacionadas a las enfermedades o microorganismos patógenos que los afectan. Debido a la preferencia de la población por consumir moluscos bivalvos crudos se ha generado una particular preocupación por el nivel de contaminación y las enfermedades asociadas que estos organismos pudieran transmitir. Por esta razón se han impuesto reglamentaciones concernientes tanto a las zonas de producción, así como directamente a las especies, con la única finalidad de asegurar la inocuidad de su consumo.

Los moluscos bivalvos habitan comúnmente las zonas costeras y estuariales, donde la concentración de nutrientes es mucho más elevada que en el océano abierto y donde la alta intensidad de la luz permite el desarrollo las comunidades planctónicas, así como de bacterias heterotróficas que son esenciales para la degradación de la materia orgánica disponible (Varnam & Evans, 2000; Gosling, 2003).

Estas áreas pueden recibir aportes significativos de aguas residuales de origen doméstico, aguas de escorrentía y aguas residuales provenientes de plantas de tratamiento, en algunos casos incluso desechos como lodos o biosólidos son depositados en áreas costeras de poca profundidad. Estas aguas residuales son consideradas una potencial fuente de un amplio rango de patógenos de origen humano (Varnam & Evans, 2000; Hammer & Hammer, 2004).

Los moluscos bivalvos se alimentan por filtración, ingiriendo tanto el fitoplancton como el material particulado presente en la columna de agua, algunos bivalvos pueden incluso alimentarse de materia orgánica y detritus fino resuspendido en la columna de agua (Gosling, 2003). Los bivalvos bombean agua desde el ambiente a través de las branquias, cavidad del manto y palpos labiales. Las partículas son atrapadas en una capa de mucus, que mediante acción ciliar son llevadas hacia los palpos labiales, donde ocurre una clasificación del material ingerido en partículas aceptadas y rechazadas. Las partículas que son rechazadas son desviadas como pseudofecas, y aquellas que permanecen son ingeridas dentro del intestino (Larkyn & Hunt, 1982; Jørgenssen, 1996).

Cuando microorganismos patógenos contaminan lugares de cultivo o de asentamientos naturales de estas especies, debido a su forma de vida sésil y a la alta eficiencia en el mecanismo de filtración, filtrarán también estos agentes patógenos a través de sus branquias y serán concentrados tanto en el hepatopáncreas como en el tracto digestivo en general (Power & Collins, 1990; Šolić *et al.*, 1999), actuando finalmente como portadores pasivos de microorganismos patógenos (Burkhardt & Calci, 2000; Gosling, 2003).

El nivel de patógenos alcanzado está directamente relacionado al nivel de patógenos presentes en el agua y al volumen de agua filtrada por el molusco (Šolić *et al.*, 1999). Si el tiempo de exposición incrementa, el número de animales conteniendo el agente infeccioso también incrementará. Son necesarias cerca de 4 a 6 horas para que una población de moluscos bivalvos logre el nivel equivalente de contaminación presente en el agua (Larkyn & Hunt, 1982).

El problema de la contaminación fecal de las aguas costeras es el efecto negativo en la calidad sanitaria de los moluscos que habitan estas áreas. Los residuos fecales humanos se consideran fuente de una amplia variedad de enfermedades bacterianas, víricas y protozoarias, a las que se encuentran expuestos estos organismos que al ser sésiles no pueden evitar estas situaciones de estrés moviéndose hacia otras zonas (Hammer & Hammer, 2004).

El consumo de moluscos bivalvos crudos ha estado estrechamente relacionado a brotes de enfermedades de origen entérico y han sido por esto, considerados por largo tiempo como vectores de agentes infecciosos convirtiéndose en un riesgo para la salud pública (Rippey, 1994; Wittman & Flick, 1995; Graczyk & Schwab, 2000; Potasman *et al.*, 2002).

Entre los moluscos bivalvos comestibles que presentan mayor preocupación para los organismos encargados de la salud pública, se encuentran la familia *Ostreidae* que es preferentemente ingerida cruda, mientras que las familias *Mytilidae*, *Veneridae*, y *Pectinidae* revisten menor preocupación debido a que son ingeridos mayormente cocidos y en el caso de los *Pectinidae* sólo es ingerido el músculo aductor (Rippey, 1994).

Como la calidad sanitaria de los moluscos bivalvos está determinada en parte por la calidad del agua en que se encuentran, en microbiología, la determinación de la calidad sanitaria del agua o de los moluscos bivalvos, se emplean *organismos*

indicadores, estos actúan como un marcador de contaminación posible del agua por agentes patógenos (Prescott *et al.*, 2004).

Cuando los organismos patógenos están presentes, usualmente estarán en un número más bajo que los organismos indicadores, por esto, cuando el organismo indicador está ausente o en muy bajo número el agua es considerada segura (Larkyn & Hunt, 1982).

El grupo coliforme que incluye especies como *Escherichia coli*, que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, y que constituyen aproximadamente el 10% de los microorganismos que habitan la microbiota intestinal de los seres humanos, se han seleccionado como indicadores de contaminación bacteriana, en parte por su relación con el grupo tifoide-paratifoide y por su alta concentración en diferentes tipos de muestras (Prescott *et al.*, 2004). El grupo coliforme se define como bacterias anaerobias facultativas, Gram negativas, no esporuladas con forma de bacilos, que fermentan la lactosa con formación de gas en 48 horas a 35°C (Prescott *et al.*, 2004).

E. coli es frecuentemente usada como organismo indicador de contaminación fecal en alimentos y en agua. Esta especie es principalmente inocua pero con algunas cepas altamente patogénicas para los humanos. Reside en el tracto intestinal de humanos y otros animales de sangre caliente, y son excretadas en grandes cantidades en las heces en un promedio de 50 millones de coliformes por gramo (Hammer & Hammer, 2004).

Algunos géneros bacterianos del grupo coliforme pueden encontrarse en el agua o suelo, sin ser de origen fecal, crecen y se reproducen sobre materia orgánica, fuera de los intestinos de humanos o de otros animales de sangre caliente. Estos coliformes no indican ni la presencia de contaminación fecal, ni la posible presencia de patógenos. El término coliformes totales se refiere entonces, a todas las bacterias del grupo coliforme provenientes desde heces, suelo o cualquier otro origen (Hammer & Hammer, 2004).

Mientras que el término coliformes fecales se refiere a las bacterias coliformes originadas exclusivamente desde las heces humanas o de otros animales de sangre caliente. Los coliformes fecales son organismos termo-tolerantes, es decir que tienen la capacidad de soportar altas temperaturas y se diferencian de los coliformes totales por su capacidad de crecer y fermentar la lactosa a $44\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (Prescott *et al.*, 2004).

Existen varios métodos estandarizados, para la enumeración de coliformes totales en agua o en alimentos. La técnica de fermentación en tubos múltiples (FTM)

considerado un método clásico, es una técnica que provee el número más probable (NMP) después de analizar el crecimiento bacteriano en un medio líquido. Otra técnica es la filtración por membrana (FM), que enumera los microorganismos presentes en la superficie del agar como unidades formadoras de colonias, UFC/100ml (Edberg *et al.*, 1988). Ambos métodos se utilizan sólo para cuantificar al grupo coliformes, sin diferenciar al organismo indicador *E. coli*. Para ello es requerida una siguiente prueba de identificación bacteriana específica (Edberg *et al.*, 1988).

La técnica FTM es el método estándar más utilizado para el recuento de coliformes en moluscos bivalvos vivos. Esta técnica utiliza entre tres a cinco réplicas, y varias diluciones, además consta de dos etapas. La primera etapa o prueba presuntiva, corresponde a la inoculación de las muestras de moluscos bivalvos en tubos preparados en diferentes concentraciones, con un medio de cultivo que puede ser caldo de glutamato modificado con minerales (MMGB) e incubación a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. A partir de los resultados obtenidos se lleva a cabo la segunda etapa, conocida también como prueba confirmatoria, donde aquellos tubos que dan resultado positivo en la primera etapa son examinados para determinar la presencia de *E. coli*, mediante el repique a placas preparadas con un medio de cultivo cromogénico específico que identifica la presencia de *E. coli* (Donovan *et al.*, 1998). Como por ejemplo el medio de cultivo cromogénico Triptona Bilis X- β -D-glucuronido Agar (TBX) que está basado en la detección de la actividad enzimática β -D-glucuronidasa, y que gracias al uso de sales biliares y a la alta temperatura de incubación, logra que la microbiota Gram positiva acompañante quede inhibida. Por lo que al finalizar la incubación, sólo las colonias de *E. coli* β -glucuronidasa positivas aparecen de color azul-verdoso (Atlas, 2006). Esta prueba confirmatoria o de verificación requiere de un tiempo adicional de 24 horas antes de entregar resultados finales (Edberg *et al.*, 1988).

Este método estandarizado, que se basa en métodos de cultivo clásicos, es utilizado por muchos laboratorios, especialmente por las agencias reguladoras de la calidad sanitaria de los alimentos, son métodos armonizados, de libre acceso tanto a la técnica como a la composición de los medios de cultivos y son descritos muy detalladamente con la finalidad de poder ser reproducibles en cualquier laboratorio. Por otro parte presentan desventajas importantes, como ser laboriosos de ejecutar, demandar grandes volúmenes de medios líquidos, sólidos y reactivos, además del consumo de

tiempo tanto en el proceso de ejecución de los análisis, así como en la obtención de los resultados finales (Jasson *et al.*, 2010).

En respuesta a estas limitaciones, durante las últimas dos décadas se han desarrollado métodos de análisis más rápidos basados en estos métodos estandarizados clásicos. Un “método rápido” puede ser definido como cualquier método o sistema que reduce el tiempo que toma la obtención de resultados en una prueba microbiológica (Fung, 1994). El término rápido puede ser interpretado como corto tiempo de detección, pero también puede referirse a un mejor flujo en la manipulación de múltiples muestras y por lo tanto referirse a conveniencia y automatización en el trabajo de laboratorio. De esta forma la denominación “método rápido” podría ser mejor reemplazada por “métodos alternativos” (Jasson *et al.*, 2010).

Numerosos y diversos métodos alternativos de análisis microbiológicos están actualmente disponibles en el mercado. La regla general es que las entidades reguladoras acepten el uso de estos métodos alternativos siempre que hayan sido validados por un método estandarizado (Jasson *et al.*, 2010).

Una de las pruebas microbiológicas consideradas como método rápido o alternativo, es la prueba de Autoanálisis Colilert®, que es usada para la detección y enumeración simultánea de coliformes totales y *E. coli* en muestras de agua y aguas residuales, basado en el principio del cálculo de NMP (Edberg *et al.*, 1988; Jasson *et al.*, 2010).

Esta prueba fue desarrollada por Edberg *et al.* (1988) basándose originalmente en tecnologías diseñadas para la identificación de microbios mediante el análisis de sus enzimas constitutivas. Este método usa un sustrato hidrolizable, como un sustrato definido único para un microbio objetivo, solamente aquel que se requiere enumerar. La tecnología está diseñada como autoanálisis porque el cambio de color es producido sólo por el microbio objetivo, sin necesidad de una prueba confirmatoria.

Por lo tanto la prueba de Autoanálisis Colilert® consiste en la capacidad de los coliformes para producir la enzima β -galactosidasa que hidroliza y se une al sustrato específico O-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) liberando O-nitrofenol, el cual produce un color amarillo (Covert *et al.*, 1989). Mientras que la enzima β -glucuronidasa producida por *E. coli* forma una sustancia fluorescente cuando hidroliza a 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronido (MUG). Esta combinación de sustratos ONPG y MUG son la principal fuente de carbono, y permiten la detección tanto de coliformes totales y *E. coli* dentro de 24 horas (Covert *et al.*, 1989).

Existe por lo tanto, una reducción significativa del tiempo de obtención de resultados, cuando comparamos entre, el método clásico (FTM) que necesita 24 horas de incubación en la prueba presuntiva, más 24 horas de incubación para la prueba confirmatoria, sin considerar el tiempo requerido en la ejecución de los análisis. Es decir, requerirá un mínimo de 48 horas antes de obtener resultados, mientras que a través de un método rápido o alternativo (Colilert®), se podría obtener los mismos resultados en las primeras 24 horas.

En el caso de los análisis microbiológicos en moluscos bivalvos mientras más temprano se determine su calidad sanitaria, menor riesgo se producirá para la salud pública y más rápido podrán darse las alertas o advertencias sanitarias necesarias.

Estos métodos rápidos o alternativos, son aplicados con éxito en análisis microbiológico de muestras de agua pero en el caso de los análisis microbiológicos para muestras de moluscos bivalvos aún se continúa utilizando el método clásico.

Es por esta razón, y por la posibilidad de llevar a cabo ambos métodos, que surge el objetivo de la presente tesis. Experimentar adaptando un método rápido, como Colilert®, exclusivo para análisis de muestras de aguas, a muestras de moluscos bivalvos vivos, las cuales son regularmente analizadas mediante el método clásico en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Investigación de Pescas y del Mar (IPIMAR), con el fin de comparar ambos métodos y determinar la factibilidad de su uso a futuro de un método alternativo.

Objetivo general:

Comparación entre el método clásico de análisis microbiológico de moluscos bivalvos vivos y un método rápido de análisis microbiológico utilizado para muestras de aguas, prueba de Autoanálisis Colilert® para la evaluación de su aplicabilidad en análisis microbiológicos de rutina.

Objetivos específicos:

Adaptación de la prueba de Autoanálisis Colilert® y optimización para muestras de moluscos bivalvos.

Determinar un tiempo óptimo de incubación de la prueba de Autoanálisis Colilert® usando muestras de moluscos bivalvos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención de las muestras

Las muestras analizadas correspondieron a moluscos bivalvos colectados para el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Investigación de Pescas y del Mar (IPIMAR) de la ciudad de Olhão, Portugal.

Los muestreos para este laboratorio fueron realizados mensualmente y las muestras se colectaron durante las mareas bajas. Las zonas de muestreo se encuentran en la costa Algarvia, y corresponden a las áreas de producción de moluscos bivalvos que son clasificadas según Despacho nº 14515/2010.

Según esta disponibilidad de muestras, las especies analizadas fueron las siguientes: *R. decussatus* y *Mytilus spp* (ver Fig. 1).

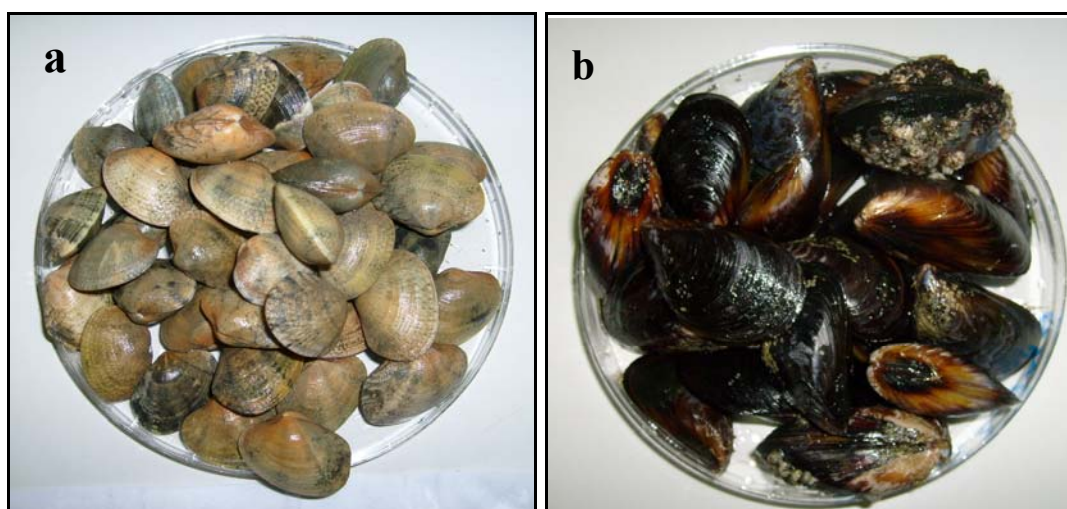


Fig. 1. Especies analizadas: **a)** *Ruditapes decussatus*; **b)** *Mytilus spp*.

2.2. Análisis microbiológicos

Se realizó la determinación de coliformes totales y *E. coli* mediante el método clásico, técnica de fermentación de tubos múltiples (FTM), y a través de un método rápido, prueba de autoanálisis Colilert® desarrollada para la determinación microbiológica de muestras de agua, que fue adaptada para muestras de moluscos bivalvos vivos. Los resultados fueron expresados como Número Más Probable (NMP) de bacterias por 100ml de muestra.

2.2.1. Tratamiento inicial de las muestras

Antes de realizar las pruebas microbiológicas, todas muestras de moluscos debieron pasar por un tratamiento previo de limpieza. Cada muestra fue muy bien lavada utilizando agua corriente y un cepillo, con el fin de quitar el exceso de fango, arena o epibiontes que pudieran contener sobre sus valvas; y en el caso de los mitílidos además fue retirado el biso (ver Fig. 2a).

Una vez limpios los moluscos, fueron secados con papel absorbente para retirar el exceso de agua. Usando material de disección esterilizado, guantes quirúrgicos y un mechero de Bunsen activo, se procedió a abrir las valvas para extraer todo el tejido blando del animal y también el líquido intravalvar (ver Fig. 2b), este material fue colectado en un recipiente estéril para ser posteriormente homogeneizado.

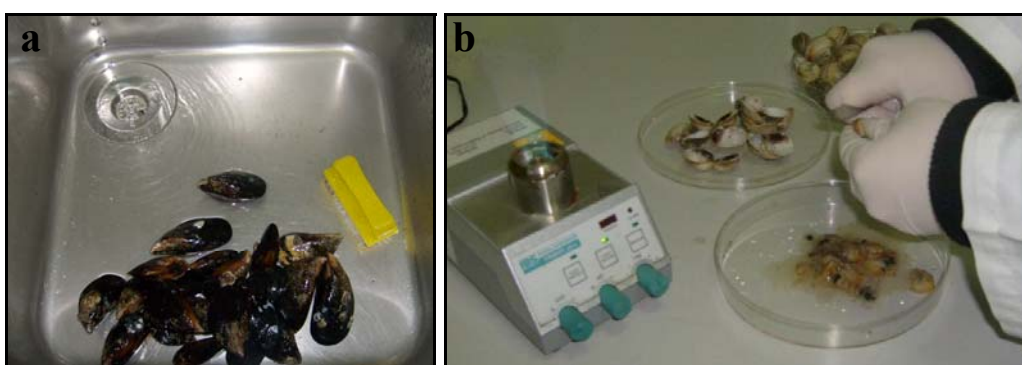


Fig. 2. a) Ejemplo de lavado individual de *Mytilus spp* usando una escobilla; b) Ejemplo de extracción del tejido y líquido intravalvar bajo condiciones de asepsia.

Una cantidad de entre 15 a 50 ejemplares, dependiendo del tamaño de la especie, fueron requeridos por cada muestra. Siendo elegidos sólo aquellos organismos que no presentaran roturas en sus valvas.

2.2.2. Proceso de homogeneizado y preparación de la solución madre.

Este proceso se realizó según la norma portuguesa, NP-1829 de “Microbiologia alimentar. Preparação da amostra para análise microbiológica” (NP, 1982).

Para iniciar el proceso de homogeneizado se necesitó tener preparada una solución diluyente de enzima digerida de caseína conocida comúnmente como triptona, más cloruro de sodio (NaCl), que finalmente constituyeron la solución diluyente llamada triptona-sal.

- *Preparación de la Solución triptona-sal:* se pesaron 3gr de triptona y 25,5gr de NaCl, que fueron disueltos en 3 litros de agua destilada. Esta solución fue puesta sobre un agitador magnético para disolver completamente los ingredientes. Luego fue repartida en volúmenes de 100ml, los cuales fueron autoclavados a 121°C por 15 minutos.

Una vez obtenida suficiente muestra de los moluscos bivalvos sacrificados, se procedió a pesar un mínimo de 80grs. Este volumen fue puesto dentro de una bolsa de homogeneización estéril, para ser procesado en un homogeneizador de paleta Stomacher® durante 2 minutos a 230rpm (ver Fig. 3a y b).

De este proceso se obtuvo un primer homogeneizado (ver Fig. 4a) desde el cual se extrajeron 40gr, a una nueva bolsa de homogeneización estéril conteniendo un filtro en su interior (ver Fig. 4b). A estos 40gr se les agregó 100ml de la solución diluyente triptona-sal y fue puesta a procesar nuevamente en el Stomacher® por un período de 2 minutos a 230rpm. Finalizado este proceso se adicionó 260ml de solución triptona-sal y fue puesto a homogeneizar por última vez, con la finalidad de obtener una solución de 40grs de muestra de molusco diluida hasta 400ml con solución triptona-sal (ver Fig. 4c).

De esta forma se obtuvo una solución madre (dilución 10^{-1}) de homogeneizado de molusco bivalvo crudo, que fue posteriormente utilizada en los análisis microbiológicos de ambos métodos durante un mismo día.

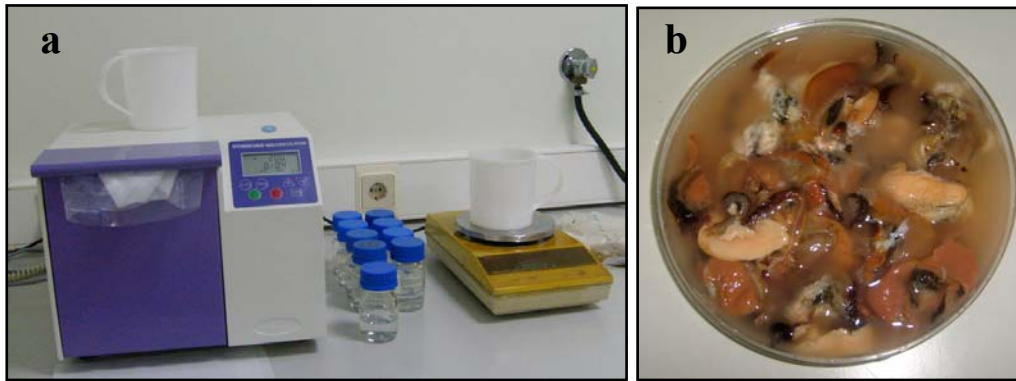


Fig. 3. a) Equipos utilizados, Stomacher® y balanza analítica, frascos Schott conteniendo la solución triptona-sal estéril. b) Ejemplo de muestra obtenida de *Mytilus spp* desde la cual se deben pesar un mínimo 80gr para iniciar el proceso de homogeneizado del tejido.



Fig. 4. a) Muestra de *Mytilus spp* en su primera homogeneización; b) Bolsa de homogeneización estéril donde se puede apreciar el filtro interior; c) Homogeneizado final de *Mytilus spp* que corresponde a la solución madre (dilución 10^{-1}).

2.3. Método clásico: Técnica de fermentación de tubos múltiples

Este método clásico está basado en Donovan *et al.* 1998, y corresponde al procedimiento analítico de muestras de moluscos bivalvos utilizado por el Laboratorio de Microbiología de IPIMAR.

Esta técnica se realiza a través de dos fases o etapas, la fase presuntiva y la fase confirmatoria. Los resultados del estudio de los tubos y diluciones replicadas se informaron en términos de Número Más Probable (NMP) de microorganismos existentes.

2.3.1 Prueba presuntiva en caldo de glutamato modificado con minerales (MMGB)

Para la realización de esta técnica fue necesario tener preparados los tubos conteniendo el caldo de glutamato modificado con minerales (MMGB, CM0607-OXOID), en sus diferentes concentraciones y esterilizados.

▪ *Preparación MMGB concentración doble:* fueron pesados 5gr de cloruro de amonio y disueltos en 1 litro de agua destilada. Esta solución fue preparada sobre un agitador magnético, una vez diluido el cloruro de amonio, se agregaron 12,7gr de glutamato de sodio y 22,7gr de medio básico mineral modificado de glutamato que le dio el color característico lila oscuro al medio de cultivo. Una vez disueltos todos los ingredientes de la solución, fue repartida en los tubos de dilución en los volúmenes correspondientes a las series de trabajo de concentración doble. Estos tubos fueron autoclavados a 116°C por 10 minutos, y posteriormente fueron mantenidos en refrigeración a 4°C.

▪ *Preparación MMGB concentración simple:* para la preparación de las concentraciones simples, se realizó el mismo proceso anterior, pero esta vez utilizando la mitad de las cantidades disueltas en 1 litro de agua destilada.

Usando la solución madre obtenida del homogeneizado de molusco bivalvo crudo, se realizó la inoculación en las series de tubos previamente preparadas. Estas incluyeron concentraciones dobles y simples de MMGB. Todo el proceso de inoculación se realizó bajo estrictas condiciones de asepsia, utilizando pipetas estériles y trabajando bajo campana de flujo laminar, cuya superficie había sido previamente esterilizada con luz ultravioleta.

A continuación son descritas las inoculaciones realizadas por serie y en la Fig. 5 puede verse el ejemplo de una gradilla y la forma en que fueron dispuestas las series:

- Se inocularon una primera serie de 5 tubos que contenían 10ml de caldo MMGB en concentración doble, con 10ml de la solución madre (10^{-1}).
- La segunda serie correspondió a 5 tubos conteniendo 9ml de caldo MMGB en concentración simple, con 1ml de la solución madre (10^{-1}).

- Para la tercera serie se realizó una dilución de la solución madre, para lograr una dilución 10^{-2} . Se tomó 1ml de solución madre 10^{-1} y fue puesto en un tubo conteniendo 9ml de solución triptona-sal. De esta forma, la tercera serie correspondió a 5 tubos conteniendo 9ml de caldo MMGB en concentración simple, más 1ml de solución diluida a 10^{-2} .
- A partir de esta solución diluida a 10^{-2} se realizó una siguiente dilución. Se tomó 1ml de la dilución 10^{-2} y fue puesta en un tubo conteniendo 9ml de solución triptona-sal, con el fin de obtener una dilución 10^{-3} . La cuarta serie correspondió entonces a, 5 tubos conteniendo 9ml de caldo MMGB en concentración simple, más 1ml de solución diluida a 10^{-3} .

En el caso de las muestras obtenidas en días de alta pluviosidad, se recomendó hacer una siguiente serie de diluciones a 10^{-4} ya que el número de diluciones debe considerar que los tubos sembrados con la última dilución puedan entregar algún resultado negativo.

Una vez inoculadas todas las series, cada tubo fue agitado usando un vortex de manera que quedaran bien mezclados, para finalmente ser llevados a incubar a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24h.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la lectura e interpretación de las series, registrándose como positivos aquellos tubos que mostraron presencia de ácido, que se reconoció por el cambio desde el color lila característico del caldo MMGB a amarillo.

Luego los tubos positivos y aquellos considerados sospechosos de serlo, pasaron a la siguiente etapa que correspondió a la prueba confirmatoria.

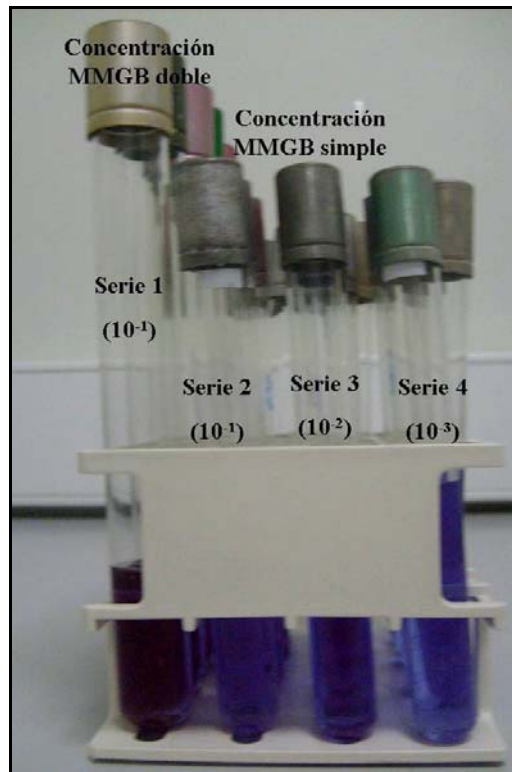


Fig. 5. Ejemplo de gradilla preparada para la inoculación de la muestra de homogeneizado de muestra de molusco bivalvo (solución madre de dilución 10^{-1}). Cada una de estas series contiene 5 réplicas.



Fig. 6. a) Incubación de las series a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas; b) Después de la incubación es visible el viraje de color desde el lila oscuro característico del medio de cultivo hacia amarillo que identifica los tubos positivos que finalmente indican la presencia de coliformes.

2.3.2. Prueba confirmatoria en medio cromogénico (TBX)

La prueba confirmatoria consistió en resembrar aquellos tubos con formación de ácido (cambio de color amarillo), en placas Petri previamente preparadas con un medio de cultivo cromogénico, triptona bilis X-β-D-glucurónico Agar (TBX, CM0945 OXOID).

Trabajando bajo campana de flujo laminar, cada placa fue seccionada en un máximo de 3 partes y usando un asa de repique de 10μl, fueron sembradas aquellas series de los tubos de MMGB que resultaron positivas en la prueba presuntiva (Fig. 7a).

Posteriormente, las placas fueron llevadas a incubación a 44±0,5°C durante 24h. Transcurrido el tiempo de incubación, aquellas placas que presentaron colonias verde-azuladas confirmaron la presencia de *E. coli*. Todas las secciones positivas de las placas fueron registradas en los tubos positivos de la prueba presuntiva en MMGB, para los cuales se confirmó la presencia de *E. coli* (Fig. 7b).

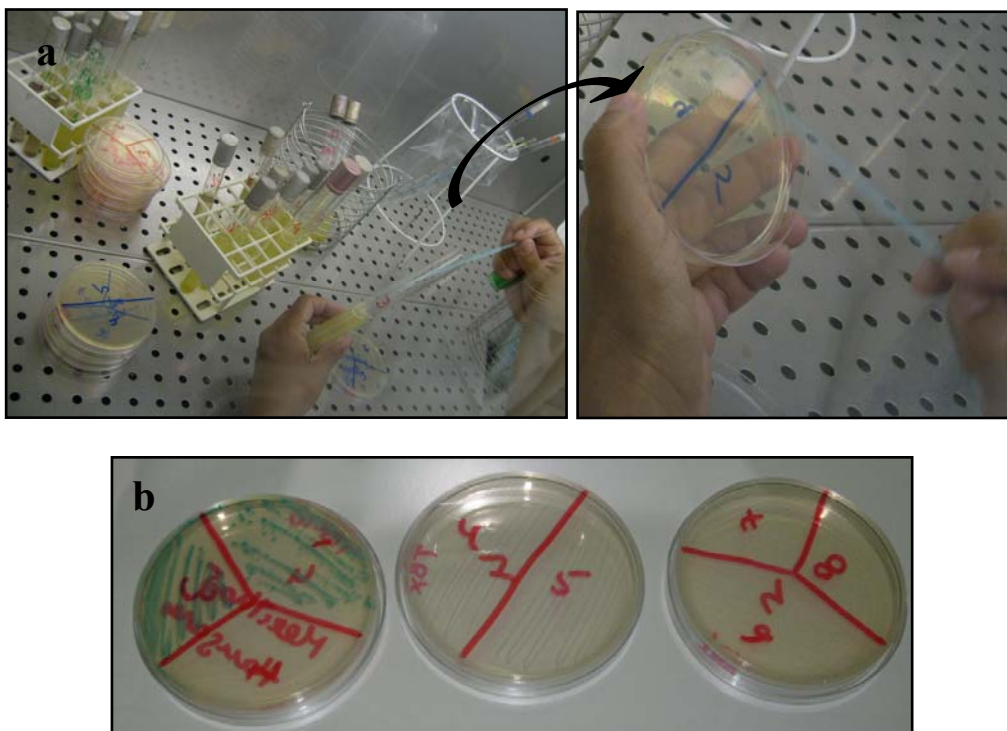


Fig. 7. a) Repique de los tubos positivos y sospechosos de ser positivos a placas con medio de cultivo TBX. b) Placas de cultivo después del tiempo de incubación; pueden distinguirse las colonias de *E. coli* β-glucuronidasa positivas que aparecen de color azul-verdoso.

2.4. Método rápido: Prueba de autoanálisis Colilert®

La prueba de autoanálisis Colilert® desarrollada por Edberg *et al.* en el año 1988, es una técnica que se emplea para análisis microbiológicos de muestras de agua y que en esta investigación ha sido utilizada como método rápido de análisis microbiológico en muestras de moluscos bivalvos vivos.

Esta prueba de nombre comercial Colilert-18 está disponible en los Laboratorios IDEXX Inc. (2011, IDEXX). Consiste en un sustrato en polvo, llamado reactivo de Colilert-18 (Fig. 8a) que se mezcla con la muestra de agua en un frasco estéril que marca el nivel de 100ml (Fig. 8b), que corresponde al volumen máximo que puede contener una bandeja. Las bandejas llamadas Quanti-Tray®-2000, tienen un número determinado de celdas de diferente tamaño ubicadas en dos grupos, uno de celdas pequeñas y uno de celdas más grandes (Fig. 8c), esto permite contar aquellas celdas que entregan resultado positivo en ambos grupos y comparar los resultados con las tablas de NMP proporcionadas por los laboratorios IDEXX. Las bandejas preparadas con las muestras son puestas en un inserto de goma y selladas al vacío por calor, mediante una máquina llamada sellador Quanti-Tray quedando listas para su incubación.

El sustrato en polvo contiene los siguientes ingredientes por litro: 5gr de $(\text{NH}_2)_4\text{SO}_4$; 0,5 μg de $\text{Mn}(\text{SO}_4)_2$; 0,5 μg de ZnSO_4 ; 100mg de MgSO_4 ; 10gr de NaCl ; 50mg de CaCl_2 ; 900mg de KH_2PO_4 ; 6,2mg de NaHPO_4 ; 40mg de Na_2SO_3 ; 1mg de anfotericina B; 500mg de orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG); 75mg de 4-metilumberiferil- β -D-glucorónido (MUG) y 50mg de Solanium (extracto de la planta *Solanum* que actúa como emulsificante) (Edberg *et al.*, 1988).

El procedimiento para la utilización del homogeneizado preparado de muestras de moluscos bivalvos se realizó de la siguiente manera:

Debido a que este método está diseñado para analizar 100ml de muestras de agua, en el caso del homogeneizado de molusco, que fue preparado como una solución madre de 40gr de molusco (carne más líquido intravalvar triturado) diluido hasta 400ml con solución triptona-sal, se realizó una dilución utilizando 10ml de la solución madre (10^{-1}) que se completó hasta 100ml con agua destilada autoclavada, dentro del recipiente estéril de 100ml. A esta nueva dilución se le agregó el reactivo de Colilert-18 en polvo, que fue agitado hasta ser disuelto por completo (ver Fig. 9).



Fig. 8. a) Reactivo de Colilert-18 en polvo; b) Recipiente estéril que se utiliza para mezclar la muestra a analizar con el sustrato en polvo; c) Bandeja en que es vertida la muestra, y en la cual se realiza la incubación, pueden distinguirse los dos grupos de celdas de diferente tamaño, además de un pozo en la parte superior que sirve para coleccionar el excedente.

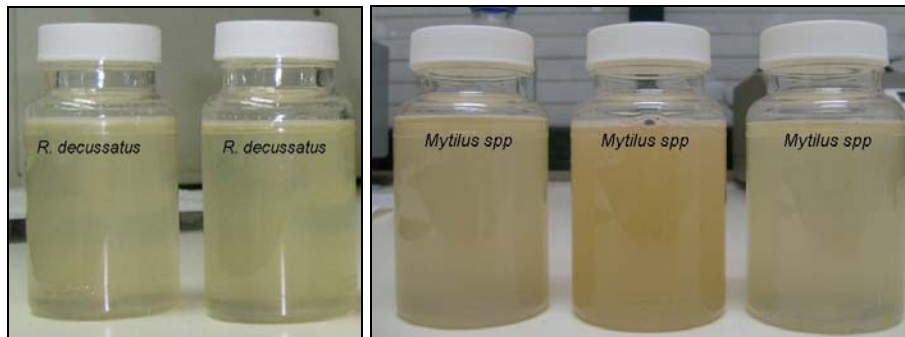


Fig. 9. Recipiente estéril Colilert® de 100ml conteniendo la muestra y el reactivo en polvo, paso previo al llenado de las bandejas. Puede apreciarse una leve diferencia de color entre las especies utilizadas.

Posteriormente, esta preparación fue vaciada dentro de una bandeja Quanti-Tray 2000, cuidando que fueran eliminadas todas las burbujas que pudieran haberse formado dentro de las celdas, con especial atención en el grupo de celdas más pequeñas, luego la bandeja fue puesta en el inserto de goma y sellada por calor (Fig. 10). Una vez sellada, la bandeja fue puesta a incubar a $36\pm 1^\circ\text{C}$.



Fig. 10. Máquina selladora e inserto de goma, que permite distribuir el líquido en cada celda y sellar al vacío cada bandeja.

Para las muestras de agua, este método está diseñado para entregar resultados en 18hrs. En el caso de las muestras de homogeneizado de molusco bivalvo, para la determinación del periodo más adecuado de incubación fueron realizadas dos lecturas, una primera lectura entre las 18 y 24hrs de incubación (\approx 20hrs) y luego la segunda a las 48 horas.

La lectura del resultado de las bandejas se interpretó de la siguiente manera:

- *Resultados positivos*: celdas de coloración amarilla que correspondieron a coliformes totales (Fig. 11a) y utilizando la lámpara de luz UV (365nm), aquellas celdas amarillas que emitieron fluorescencia correspondieron a *E. coli* (Fig.11b).
- *Resultados negativos*: celdas sin producción de color, ni fluorescencia.

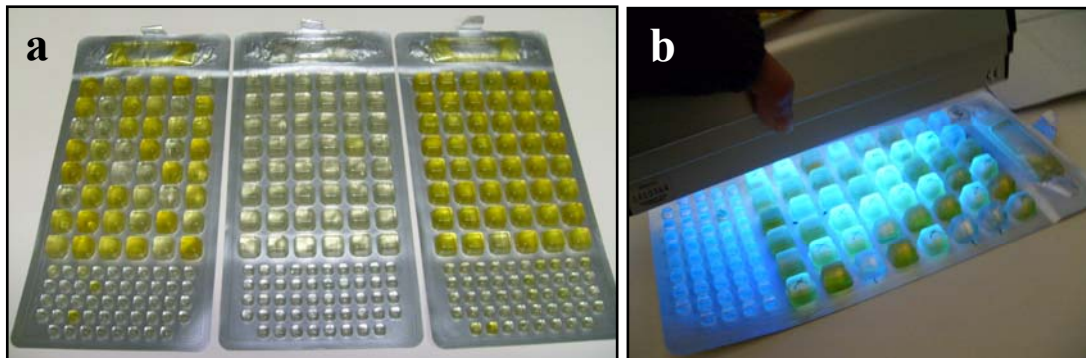


Fig. 11. a) Lectura de las bandejas transcurrido el tiempo de incubación, pueden apreciarse las celdas de color amarillo que indican la presencia de coliformes; b) Mediante una lámpara de UV es posible ver y contar las celdas que emiten fluorescencia, que identifican y confirman la presencia de *Escherichia coli* en las muestras.

2.5. Manejo de la información

Fueron registradas por fotografía digital todas las bandejas Quanti-Tray 2000 realizadas, al momento de sellado, en la primera lectura de incubación (≈ 20 hrs) y en la segunda lectura (48 horas), con la finalidad de mantener un registro gráfico y poder realizar comparaciones visuales posteriores entre una lectura y la siguiente.

2.6. Tratamiento estadístico

Para determinar el tipo de distribución de los datos, se realizaron pruebas de Normalidad. Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilks recomendada para muestras de hasta 50 datos ($n < 50$).

Para evaluar la relación entre las variables, se realizaron correlaciones paramétricas y no paramétricas con los datos sin transformación, se estimaron los coeficientes de correlación de Pearson (r) y de Spearman (ρ).

Para observar el comportamiento gráfico de las variables se realizó una regresión lineal simple, además se estimó nuevamente el coeficiente de correlación (r) pero esta vez para los datos normalizados mediante la transformación a logaritmo en base 10 (Log_{10}).

Para determinar si la relación entre los métodos se realizó la prueba de Wilcoxon suma de rangos para variables numéricas relacionadas, sin normalidad.

Los programas estadísticos utilizados en los análisis fueron SPSS Statistics 17.0 y Statgraphics Centurion XV.

Para efectos de análisis y gráficos, aquellos valores de NMP obtenidos desde las tablas de NMP, de la forma “<100” fueron considerados como valores absolutos.

3. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la cuantificación de bacterias coliformes y *E. coli* a través de la aplicación de los dos métodos de análisis microbiológico, método clásico y rápido, fueron tratados estadísticamente inicialmente para determinar el tipo de distribución que presentaban y posteriormente para la realizar la comparación entre las cuantificaciones de coliformes totales y *E. coli* obtenidas por en los dos métodos de recuento bacteriológico.

Los análisis se encuentran ordenados según la especie y se presentan a continuación:

3.1. Análisis de los resultados obtenidos con las muestras de *Mytilus spp*

Para determinar el tipo de distribución de los datos obtenidos fue realizada la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks. Esta prueba fue realizada en los datos obtenidos por ambos métodos, clásico (Fermentación en Tubos Múltiples, FTM) y rápido (Colilert-18), tanto en coliformes totales como en *E. coli* y los resultados se encuentran en la Tabla 1.

El estadístico “W” de Shapiro-Wilks mide la fuerza del ajuste con una recta de normalidad, mientras mayor es este valor, mayor desacuerdo existe con la recta de normalidad. Los valores estimados para el estadístico “W” fluctuaron entre 0,58 a 0,65 que comparados con el valor de tabla, $W_{\text{tabla}}=0,92$, para un $n=26$ y nivel de significancia 0,05, fueron siempre menores indicándonos la falta de ajuste a una distribución normal.

También el valor-p obtenido fue siempre menor a 0,05 y nos permitió finalmente rechazar la hipótesis de que los datos provenían de una distribución normal con un 95% de confianza.

Tabla 1. Prueba de Shapiro-Wilks para los datos de *Mytilus spp* ($n=26$) obtenidos por ambos métodos (Colilert-18 y FTM), para coliformes totales y *Escherichia coli*.

		Estadístico “W” de Shapiro-Wilks	Valor-p
Método rápido (Colilert-18)	Coliformes totales	0,58	1,69 E-8
	<i>E. coli</i>	0,62	9,27 E-8
Método clásico (FTM)	Coliformes totales	0,59	3,07 E-8
	<i>E. coli</i>	0,65	2,12 E-7

Para evaluar la relación entre los métodos y teniendo en cuenta la distribución de los datos, fueron realizadas correlaciones paramétricas y no paramétricas, se determinaron los coeficientes correspondientes y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

El análisis de correlación para coliformes totales, señaló la correlación no paramétrica como significativa ($\rho=0,653$), mientras que en *E. coli* ambos coeficientes fueron indicados como significativos ($p < 0,01$). El coeficiente de Pearson en este análisis ha sido obtenido usando los datos sin previa normalización. Hay que recordar que el coeficiente de correlación es sólo una medida del grado de asociación lineal entre ambos métodos.

Tabla 2. Análisis de correlación paramétrica y no paramétrica entre ambos métodos (Colilert-18 y FTM) para coliformes totales y *Escherichia coli*.

	Correlación	Coficiente	FTM – Colilert-18
Coliformes totales	Paramétrica	Pearson (r)	0,347
	No paramétrica	Spearman (rho)	0,653**
<i>E. coli</i>	Paramétrica	Pearson (r)	0,819**
	No paramétrica	Spearman (rho)	0,616**

** Correlación significativa al nivel $p < 0,01$

Para visualizar el comportamiento gráfico de esta relación se realizó una regresión lineal simple entre ambos métodos con los datos normalizados de la cuantificación de coliformes totales y *E. coli* (ver Fig. 12):

- Los coliformes totales señalaron una correlación positiva entre ambos métodos cuando fueron analizados con los datos normalizados. El coeficiente de determinación (R^2) nos indicó que un 45,38% de esta correlación estaría explicada por el método clásico (FTM).

En cuanto al valor estimado del coeficiente de correlación normalizado, $r=0,673$, estuvo de acuerdo con el valor obtenido en la correlación no paramétrica antes mencionada ($\rho=0,653$).

- Para la cuantificación de *E. coli*, también se evidenció una correlación positiva entre ambos métodos. El coeficiente de determinación (R^2) fue de 41,16% y el coeficiente de

correlación normalizado ($r=0,642$) también estuvo de acuerdo con el valor de su homólogo no paramétrico ($\rho=0,616$).

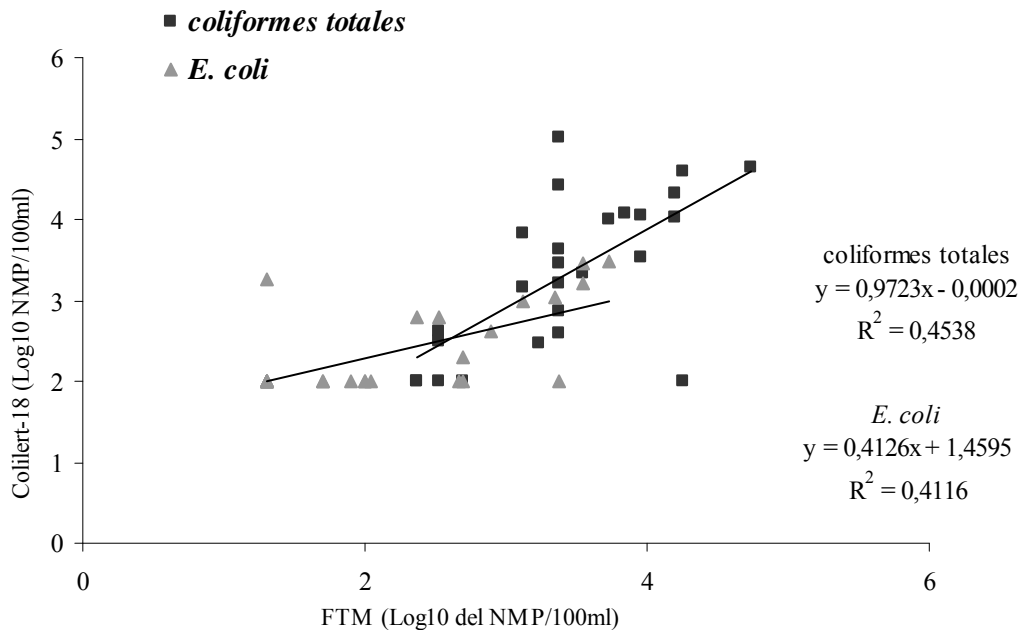


Fig.12. Regresión lineal simple entre ambos métodos rápido y clásico, para coliformes totales y *Escherichia coli* cuantificados en *Mytilus spp.* En cada gráfica está presente la línea de tendencia, la ecuación de regresión y el coeficiente de determinación.

Además, con estos coeficientes de correlación normalizados se verificó la significación del coeficiente mediante la ley de Student:

- En coliformes totales para un $r=0,674$ el valor calculado de la distribución “t” para un $\alpha=0,05$ con N-2 grados de libertad fue de $t_{(0,05;24)}=4,464$ que comparado con el valor crítico de tabla igual a 2,064, nos permitió rechazar la idea de una correlación igual a cero. Por lo tanto se corroboró que para los coliformes totales la correlación entre ambos métodos fue positiva y distinta de cero.

- Para *E. coli* con un $r=0,642$ el valor de “t” calculado fue de $t_{(0,05;24)}=4,097$, al igual que coliformes totales fue mayor que el valor crítico de tabla (2,064) por lo que también se verificó la existencia de una relación positiva, distinta de cero con un 95% de confianza.

Para determinar si la relación entre las variables fue significativa, se realizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon para variables numéricas relacionadas (dependientes), sin normalidad.

- En coliformes totales, la suma de rangos estimados fueron:

$$T^+ = 162 \text{ (14 muestras)} \text{ y } T^- = 189 \text{ (12 muestras)}$$

La suma de rangos, con menor valor, fue comparada con el índice de significación “T” de la tabla de Wilcoxon, con un nivel de significancia de 0,05 para un número de muestras $n \leq 40$.

De esta forma $T^+ = 162$ se encontró dentro del intervalo de tabla $T_{(26; 0,05)} = [98-253]$, indicándonos que no existirían diferencias significativas entre los métodos.

En cuanto a los estadísticos de contraste, el valor-P estimado ($p = 0,732$) fue mayor que 0,05 por lo tanto se mantuvo la hipótesis de que no existirían diferencias significativas.

- En *E. coli* la suma de rangos estimados fueron:

$$T^+ = 183 \text{ (11 muestras)} \text{ y } T^- = 117 \text{ (13 muestras)}$$

El menor valor fue $T^- = 117$ y se comparó con el intervalo de tabla, $T_{(24; 0,05)} = [81-216]$, encontrándose también dentro del intervalo, e indicando que no existirían diferencias significativas entre los métodos.

En el valor de P estimado ($p = 0,344$) también fue mayor que 0,05 por lo que nuevamente se mantuvo la idea de que no existirían diferencias significativas entre los métodos.

3.2. Análisis de los resultados obtenidos con las muestras de *R. decussatus*

Se analizó también el tipo de distribución de los datos, para ello se utilizó la prueba de Shapiro-Wilks, recomendada para muestras de hasta 50 datos ($n < 50$).

Los resultados obtenidos en la prueba de normalidad Shapiro-Wilks se encuentran en la Tabla 3. Se observó que los valores para el estadístico “W” fluctuaron desde 0,50 a 0,64 siendo todos valores menores que el de la tabla Shapiro-Wilks, $W_{(40; 0,05)} = 0,94$

(para un $n=40$ y nivel de significancia 0,05) indicándonos la falta de ajuste a una distribución normal. También los valores-p estimados fueron menores a 0,05 lo que nos permitió finalmente rechazar la hipótesis de que los datos provenían de una distribución normal con un 95% de confianza.

Tabla 3. Prueba de Shapiro-Wilks para los datos de *Ruditapes decussatus* ($n=40$) obtenidos por ambos métodos (Colilert-18 y FTM), para coliformes totales y *Escherichia coli*. Nivel de confianza 95%.

		Estadístico “W” de Shapiro-Wilks	Valor-p
Método rápido (Colilert-18)	Coliformes totales	0,64	4,22 E-11
	<i>E. coli</i>	0,50	2,46 E-14
Método clásico (FTM)	Coliformes totales	0,58	1,58 E-12
	<i>E. coli</i>	0,63	1,47 E-11

Para evaluar la relación entre los métodos se realizaron correlaciones paramétricas y no paramétricas, se determinaron los coeficientes correspondientes de correlación de Pearson (r) y de Spearman (ρ) y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

El análisis de correlación nos permitió observar a todos los coeficientes estimados como significativos en algún nivel (0,01 o 0,05).

Tabla 4. Análisis de correlación paramétrica y no paramétrica entre ambos métodos (Colilert-18 y FTM) para coliformes totales y *Escherichia coli*.

		Correlación	Coefficiente	FTM – Colilert-18
Coliformes totales	Paramétrica		Pearson (r)	0,347*
	No paramétrica		Spearman (ρ)	0,681**
<i>E. coli</i>	Paramétrica		Pearson (r)	0,597**
	No paramétrica		Spearman (ρ)	0,563**

* Correlación significativa al nivel $p < 0,05$

** Correlación significativa al nivel $p < 0,01$

Si comparamos los coeficientes para coliformes totales, el valor de correlación más alto se observó en la prueba no paramétrica ($\rho=0,681$). Mientras que en *E. coli* los valores tienen más semejanza, pero siendo el coeficiente paramétrico más alto ($r=0,597$).

Para visualizar el comportamiento gráfico de esta relación se realizó una regresión lineal simple con los datos normalizados (ver Fig. 13):

- Los coliformes totales evidenciaron una correlación positiva, entre ambos métodos cuando fueron analizados con los datos normalizados. El coeficiente de determinación (R^2) nos indicó que el 41,22% de esta correlación estaría explicada por el método clásico (FTM).

En cuanto al valor estimado del coeficiente de correlación normalizado ($r=0,644$), estuvo de acuerdo con el valor obtenido en la correlación no paramétrica antes mencionada ($\rho=0,681$).

- En el caso de *E. coli*, también se visualizó una relación positiva. El coeficiente de determinación (R^2) fue de 37,61% y el coeficiente de correlación normalizado estimado por la regresión ($r=0,614$) fue mayor que el valor de su homólogo no paramétrico ($\rho=0,563$).

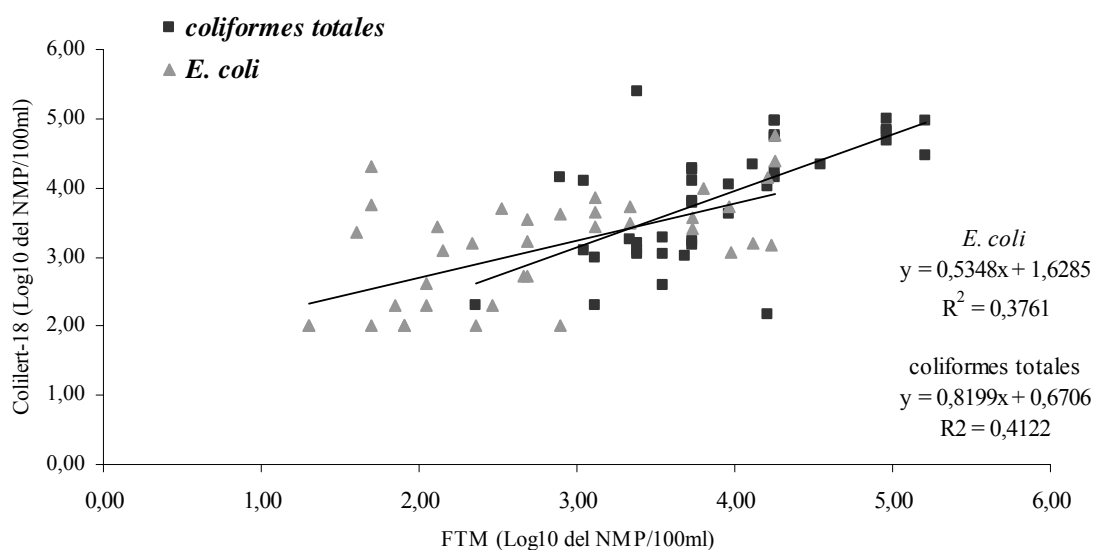


Fig.13. Regresión lineal simple entre ambos métodos rápido y clásico, para coliformes totales y *Escherichia coli* cuantificados en *Ruditapes decussatus*. En cada gráfica está presente la línea de tendencia, la ecuación de regresión y el coeficiente de determinación.

Con los coeficientes de correlación normalizados se verificó la significación del coeficiente mediante la ley de Student:

- En coliformes totales para un $r=0,644$ el valor calculado de la distribución “t” para un $\alpha=0,05$ con $(N-2)$ grados de libertad fue de $t_{(0,05;38)}=5,185$. Que comparado con el valor crítico de tabla 2,025 nos permitió rechazar la idea de una correlación igual a cero.

Por lo que se verificó que para coliformes totales la correlación entre ambos métodos fue distinta de cero.

- Para *E. coli* con un $r=0,614$ el valor de “t” calculado fue de $t_{(0,05;38)}= 4,789$. Que al igual que en coliformes totales fue mayor que el valor crítico de tabla (2,025), por lo que también se verificó una correlación distinta de cero entre ambos métodos.

Para determinar si la relación entre los métodos fue significativa, se realizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon para variables numéricas relacionadas (dependientes), sin normalidad:

- Para los coliformes totales, las sumas de rangos estimados fueron:

$T+ =437$ (24 muestras) y $T- =383$ (16 muestras)

La suma de rangos con menor valor fue comparada con el índice de significación “T” de tabla, $T_{(40; 0,05)}= [264-556]$. Con un nivel de significancia de 0,05 para un número de muestras $n \leq 40$. De esta forma $T- =383$ se encontró dentro del intervalo de tabla, y nos indicaría que no existirían diferencias significativas entre los métodos.

En cuanto a los estadísticos de contraste, el valor-p estimado ($p= 0,717$) fue mayor que 0,05 por lo tanto se mantuvo la hipótesis de que no existirían diferencias significativas entre los métodos.

- En *E. coli* la suma de rangos estimados fueron:

$T+ =249$ (10 muestras) y $T- =571$ (30 muestras).

El valor de $T+ =249$ fue comparado con $T_{(40;0,05)}= [264-556]$, encontrándose fuera del intervalo, indicando por lo tanto, que para la estimación de *E. coli* existirían diferencias significativas entre los métodos. En el valor-p estimado ($p=0,030$) fue menor

que 0,05 por lo que se confirmó la idea de que existirían diferencias significativas entre métodos con una probabilidad de error de 0,030.

3.3. Comparación de los periodos de incubación

El tiempo de incubación mínimo recomendado para un análisis Colilert-18 es de 18hrs. Este método rápido está diseñado para entregar resultados dentro de este periodo.

En el caso de las muestras de moluscos (solución homogeneizada) se experimentó una incubación con un mínimo de 18hrs hasta 24hrs ($\approx 20hr$), para el primer recuento de resultados, posteriormente las muestras continuaron mantenidas en incubación hasta cumplir el periodo final de 48hrs donde realizó la segunda lectura de resultados.

En la tabla 5 se encuentran los valores promedios estimados de la cuantificación de coliformes totales y *E. coli* en ambos periodos de incubación, en ambas especies.

Tabla 5. Promedios obtenidos de la cuantificación de coliformes totales y de *Escherichia coli* durante ambos tiempos de incubación, en ambas especies con el método de análisis Colilert-18 (promedio \pm desviación estándar).

Especie	Coliformes totales		<i>E. coli</i>	
	20hrs	48hrs	20hrs	48hrs
<i>R. decussatus</i> n=17	8690,59 \pm 11795,81	10072,35 \pm 13788,13	2055,88 \pm 4054,79	4269,41 \pm 8114,33
<i>Mytilus spp</i> n=20	13116,50 \pm 24694,00	16271,50 \pm 24715,80	574,00 \pm 969,20	687,50 \pm 1184,30

En la figura 14 pueden observarse los resultados de dos bandejas (Quanti-tray 2000) de la prueba Colilert-18 en ambos tiempos de incubación aproximadamente a las 20hrs y luego a las 48hrs. En ambas especies la respuesta positiva a coliformes totales (color amarillo en las celdas) no fue completamente exacta en todas las celdas, presentándose mayor dificultad de lectura a las 48hrs, donde el número de celdas positivas pudieron mantenerse, en algunos casos aumentar o incluso perder la coloración amarilla.

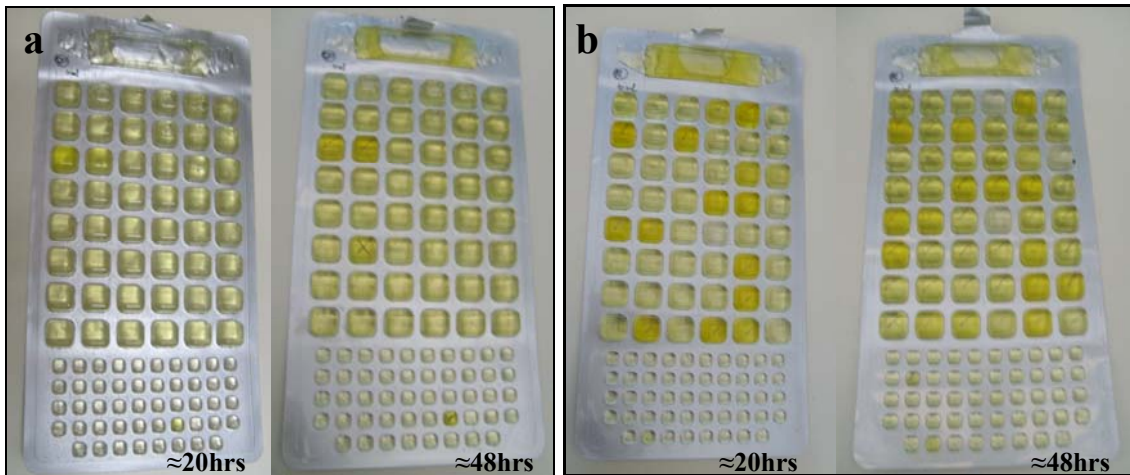


Fig.14. Pruebas de autoanálisis Colilert-18 para muestra de a) *Mytilus spp* b) *Ruditapes decussatus*. Dos ejemplos para observar las diferencias producidas por ambos tiempos de incubación.

También, fueron graficadas todas las cuantificaciones obtenidas con ambos métodos, tanto para coliformes totales como para *E. coli*. Fueron graficados ambos métodos, rápido Colilert-18 y clásico FTM, en una línea continua que correspondió a las zonas de producción desde donde fueron obtenidas todas las muestras durante el transcurso de la investigación. En cada gráfico fueron representados los resultados de la primera lectura del método rápido (Colilert-18), los resultados finales obtenidos por el método clásico (FTM), y además los resultados de la segunda lectura del método rápido (incubación 48hrs) que correspondieron sólo a las muestras realizadas en este estudio.

3.3.1 Coliformes totales y *E. coli* cuantificados en las muestras de *Mytilus spp*:

En la gráfica de la Fig.15 puede observarse, que los resultados obtenidos en la cuantificación de coliformes totales fueron muy variables, ya fuere con el método rápido o clásico. El método rápido señaló algunas muestras con valores muy altos, mayores al método clásico, mientras que en otras muestras pareció ser menos sensible que el método clásico. De la misma forma el tiempo de incubación de 48hrs tampoco señaló alguna concordancia con el método el método clásico. En términos generales, las mayores cuantificaciones estarían siendo señaladas por el método rápido (Colilert-18).

La Fig.16, correspondió a los resultados de la cuantificación de *E. coli*, donde fue el método clásico quien señaló las mayores cuantificaciones, mientras que el método rápido estuvo mayormente representado en las muestras de menores abundancias. Esto evidenció la influencia del factor de dilución en el método rápido, que no permitió cuantificar valores menores a 100NMP/100ml.

En cuanto al período de incubación de 48hrs tampoco evidenció alguna relación con el método clásico.

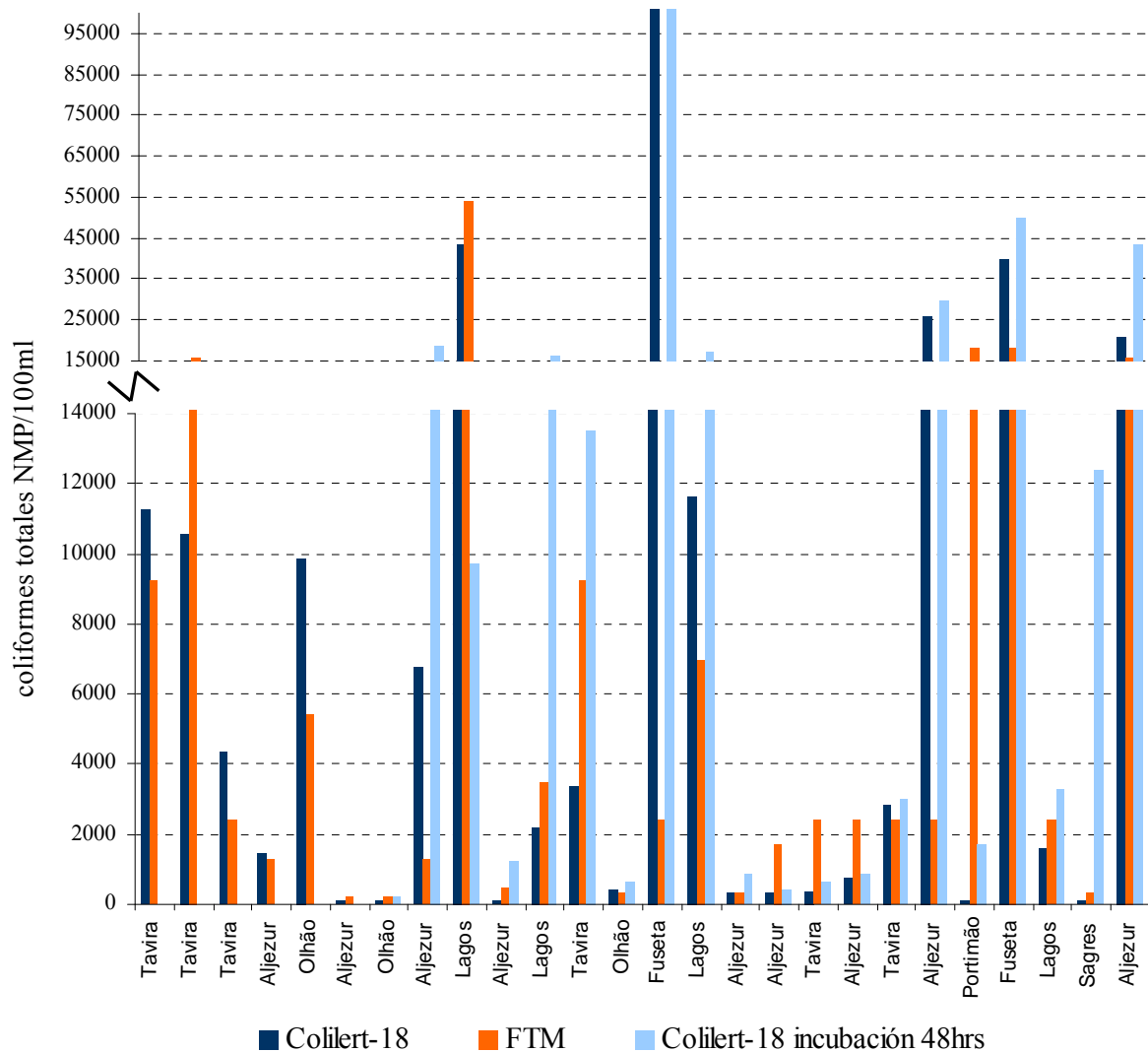


Fig.15. Coliformes totales presentes ambos métodos, rápido Colilert-18 y clásico FTM en las muestras de *Mytilus spp*, ordenados según sus diferentes zonas de producción. Se incluye la incubación de 48hrs que fue una condición sólo del método rápido.

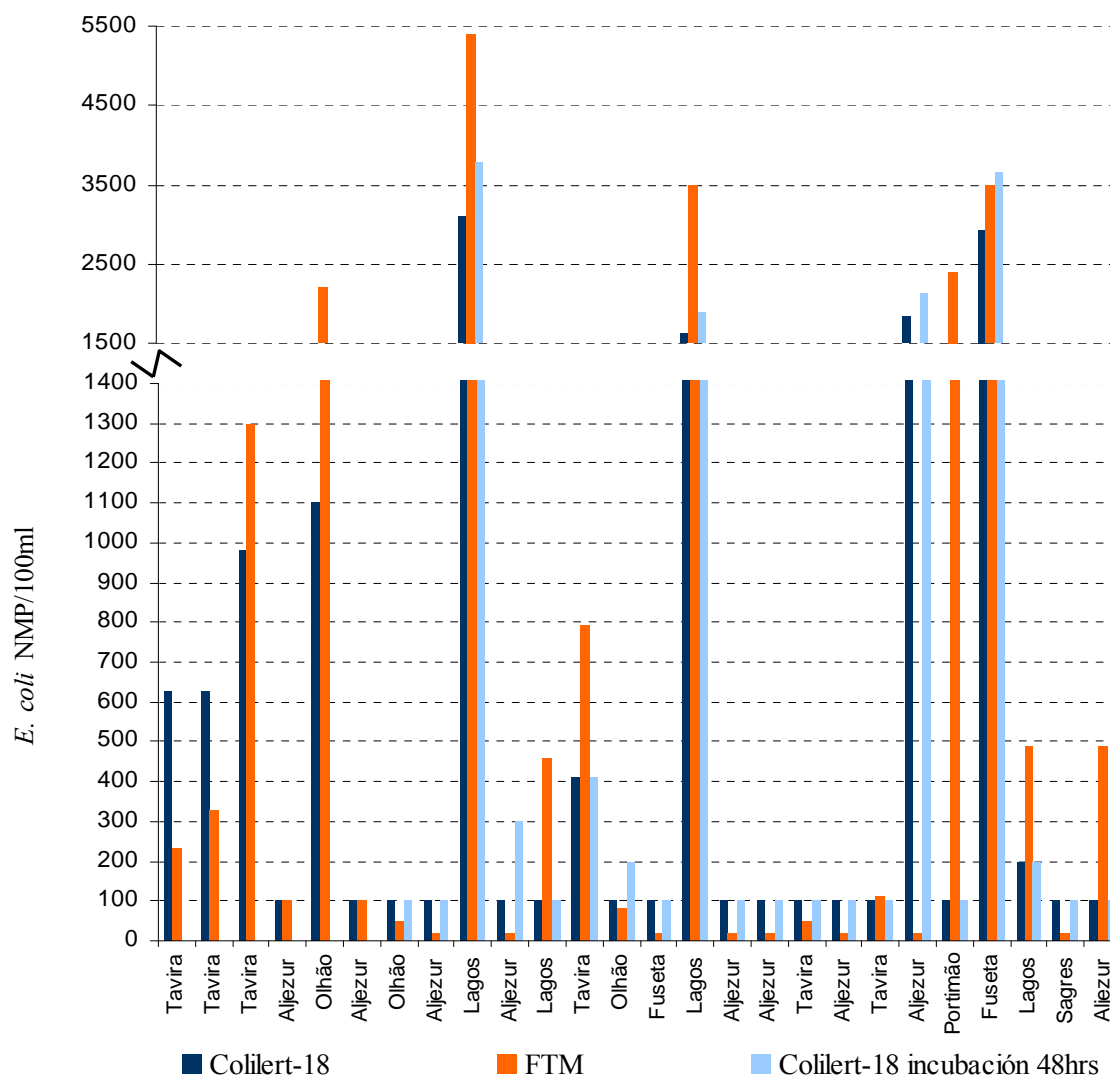


Fig.16. *Escherichia coli* presente ambos métodos, rápido Colilert-18 y clásico FIM en las muestras de *Mytilus spp*, ordenados según sus diferentes zonas de producción. Se incluye la incubación de 48hrs que fue una condición sólo del método rápido.

3.3.2. Coliformes totales y *E. coli* cuantificados en las muestras de *R. decussatus*:

En esta especie, tanto en la Fig.17 como en la Fig.18 puede observarse que los resultados obtenidos en la cuantificación de coliformes totales y de *E. coli* fueron muy variables, en ambos métodos.

En la cuantificación de coliformes totales el método rápido señaló algunas muestras que superaron con una gran diferencia al resultado obtenido por el método rápido.

En el caso de la cuantificación de *E. coli* (Fig. 18) hay que señalar que la prueba de Wilcoxon reveló la existencia de diferencias significativas entre los métodos, algo que podría estar reflejándose en esta gráfica.

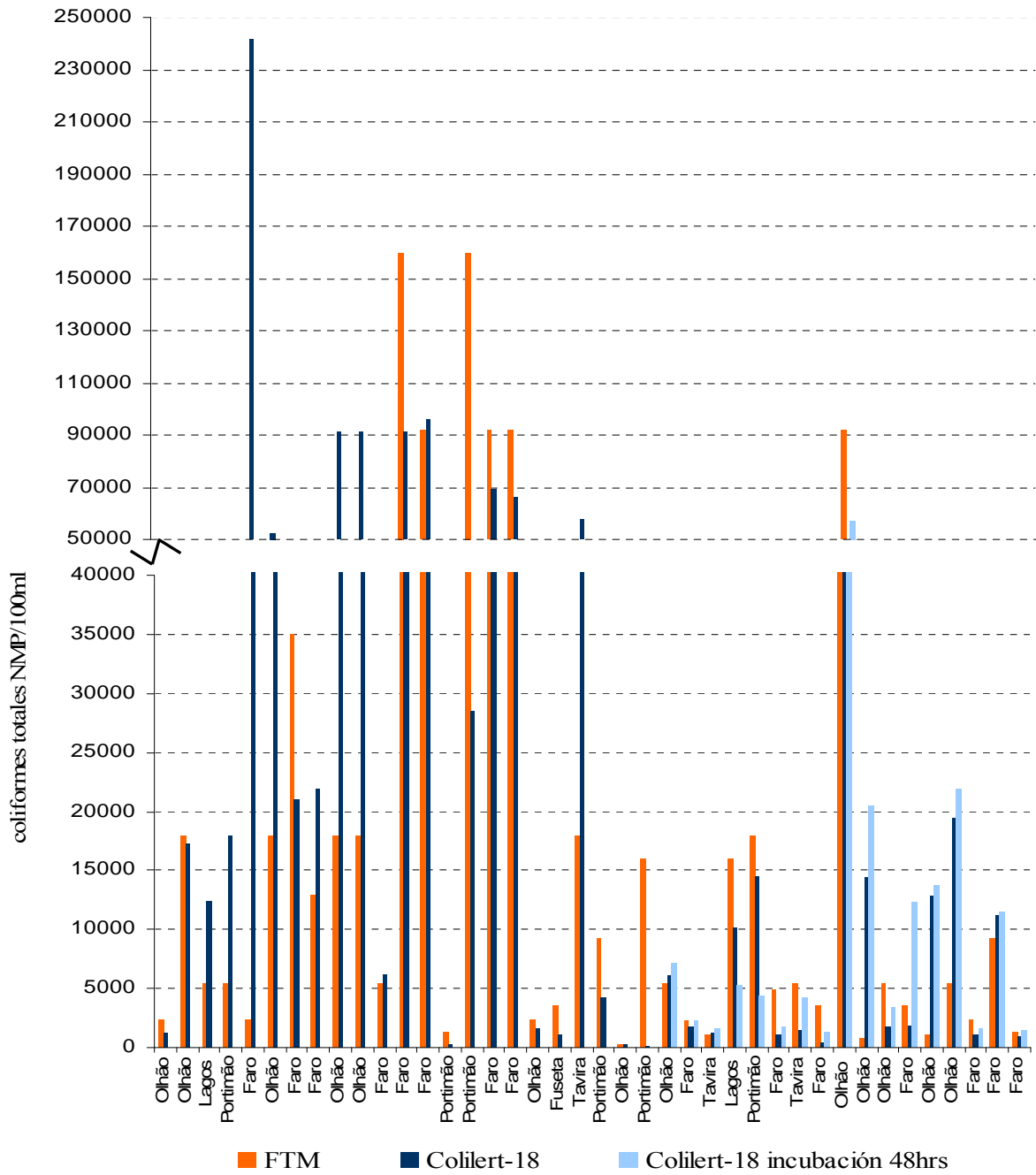


Fig.17. Coliformes totales presentes en ambos métodos, rápido Colilert-18 y clásico FTM en las muestras de *Ruditapes decussatus*, ordenados por sus diferentes zonas de producción. Se incluye la incubación de 48hrs que fue una condición sólo del método rápido.

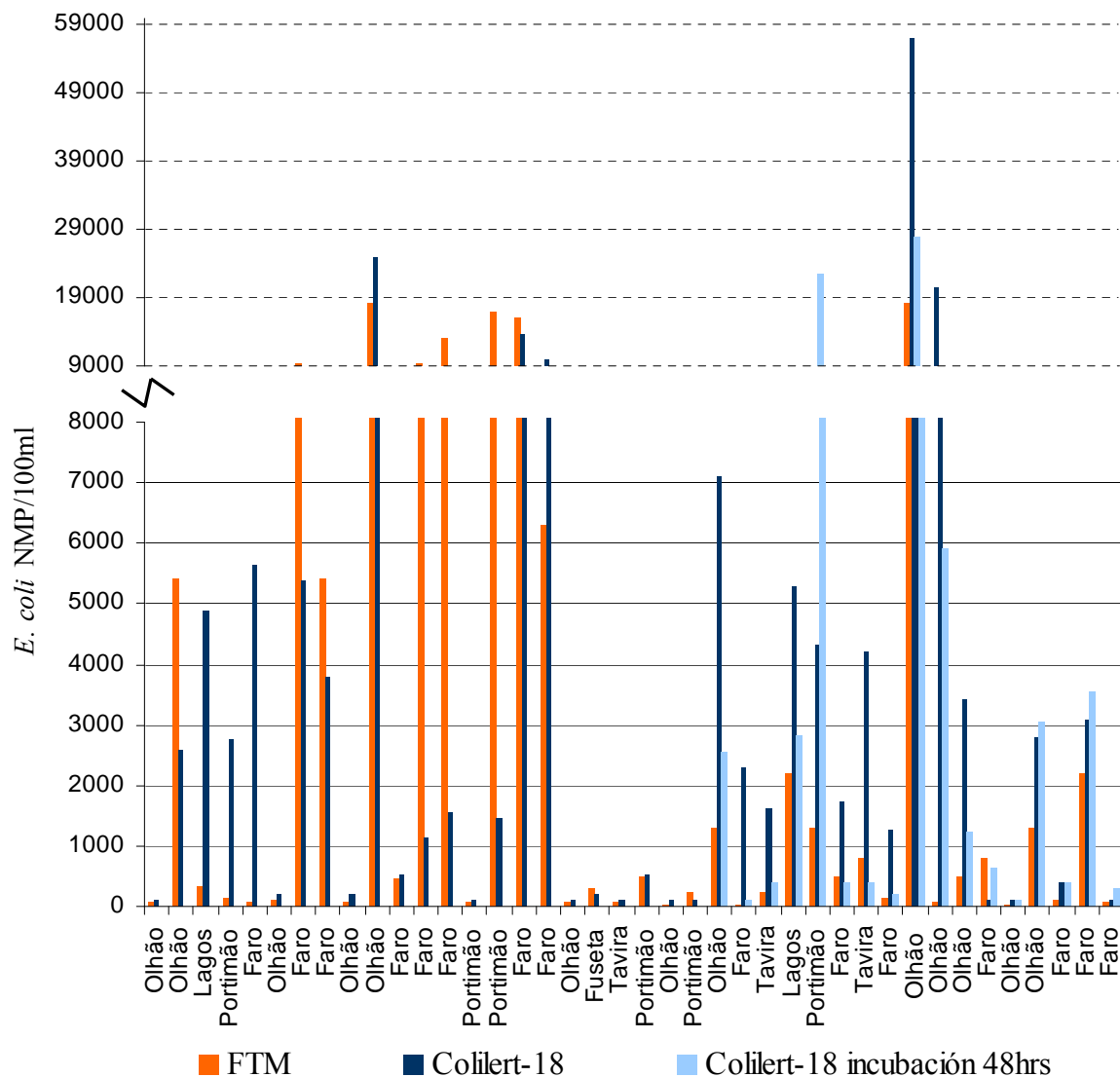


Fig.18. *Escherichia coli* presente en ambos métodos, rápido Colilert-18 y clásico FTM en las muestras de *Ruditapes decussatus*, ordenados por sus diferentes zonas de producción. Se incluye la incubación de 48hrs que fue una condición sólo del método rápido.

Finalmente, según la clasificación de los rangos permitidos de *E. coli* por la Regulación (CE) N° 854/2004, Reglamento Europeo de Higiene Alimentaria (tabla 7), los resultados obtenidos en este estudio se encuentran en la tabla 6.

Es importante notar la categoría A, que corresponde al límite permitido para el consumo humano, según esta categoría en *Mytilus spp*, el método rápido Colilert-18 estaría permitiendo más muestras para consumo (17) que el método clásico (15), algo que podría considerarse como un riesgo. Mientras que en *R. decussatus* ocurre lo

contrario, sólo 12 muestras del método rápido (Colilert-18) contra 17 muestras del método clásico (FTM). Se podría considerar acertado desde la perspectiva que es mejor restringir la salida de muestras contaminadas para el consumo humano como medida de seguridad.

Tabla 6. Clasificación de las muestras según Reg. (CE) N° 854/2004 para *Escherichia coli*. Se presenta el número de muestras para cada método y además el número de coincidencias entre ambos métodos, para la misma categoría.

		Muestras de <i>Mytilus spp</i>		
Categoría	Rango permitido <i>E. coli</i> /100g	Colilert	FTM	Muestras que coinciden en ambos métodos
A	≤ 230	17	15	13
B	230 hasta ≤ 4.600	9	10	5
C	4.600 hasta <46.000	0	1	-
Prohibida	>46.000	-	-	-
		Muestras de <i>R. decussatus</i>		
Categoría	Rango permitido <i>E. coli</i> /100g	Colilert	FTM	Muestras que coinciden en ambos métodos
A	≤ 230	12	17	10
B	230 hasta ≤ 4.600	18	13	8
C	4.600 hasta <46.000	9	10	4
Prohibida	>46.000	1	0	-

Tabla 7. Regulación (CE) N°854/2004 para las áreas de producción de moluscos bivalvos.

Categoría	Rango permitido (<i>E. coli</i> /100g)	Descripción
A	≤ 230	Permitido para consumo humano.
B	230 hasta ≤ 4.600 en el 90% de las muestras	Debe entrar a tratamientos de purificación. O ser tratado por calor en procesos de transformación industrial. *Ninguna muestra puede exceder 46000.
C	4.600 hasta <46.000	Debe ser trasladado por un largo período (mínimo dos meses) combinado o no con tratamientos de purificación. Luego de una purificación intensiva puede entrar a las categorías A o B.
Prohibida	>46.000	Los moluscos bivalvos no podrán ser extraídos o colectados para ningún uso.

*Reg. (EC) N°1021/2008

4. DISCUSIÓN

Los análisis de este estudio fueron realizados de acuerdo al objetivo propuesto, de comparar dos metodologías de análisis microbiológicos. Comparar un método rápido de nombre comercial Colilert-18, creado para análisis microbiológico de muestras de agua, adaptado en este estudio para muestras de moluscos bivalvos, con el método clásico de fermentación en tubos múltiples (FTM), usado actualmente por el laboratorio de microbiología de IPIMAR y a través del cual se regulan las zonas de producción de moluscos bivalvos en la costa Algarvia.

Hay que enfatizar que este método rápido (prueba Colilert-18), no es un método creado para analizar muestras de moluscos bivalvos, por lo tanto se verificó que los resultados obtenidos fueran consistentes con los resultados entregados por el método clásico. Desde esta perspectiva, la de un método adaptado, la interpretación de los análisis realizados son las siguientes:

En términos de correlaciones obtenidas para coliformes totales, en ambas especies, *Mytilus spp* y *R. decussatus*, tanto para las correlaciones paramétricas, no paramétricas, y normalizadas, fueron siempre estimaciones positivas, distintas de cero, indicando que existiría relación entre los métodos en términos de cuantificación de coliformes totales.

En cuanto a las correlaciones estimadas en la cuantificación de *E. coli*, en *Mytilus spp*, las correlaciones paramétrica, no paramétrica y paramétrica normalizada también fueron estimaciones positivas, distintas de cero. Llamando la atención el alto valor estimado de la correlación con los datos sin normalizar ($r=0,819$), este valor podría estar subestimado debido al bajo número de muestras ($n=26$).

En la especie *R. decussatus*, ocurrió la misma respuesta en las correlaciones, fueron todas positivas, distintas de cero, por lo que podríamos inferir que en términos de cuantificación de *E. coli*, en ambas especies, ambos métodos estarían correlacionados.

Para averiguar si estas correlaciones fueron significativas, se realizó la prueba de sumas de rangos de Wilcoxon, en cada especie.

Para *Mytilus spp* la suma de rangos de Wilcoxon, tanto de los coliformes totales como de *E. coli*, no evidenciaron diferencias significativas entre los dos métodos ($p > 0,05$), pero en el caso de los coliformes totales se evidenció una alta probabilidad de error ($p = 0,732$), que podría estar respondiendo al número bajo de muestras analizadas ($n = 26$). Sin embargo, algo similar ocurrió en la cuantificación de coliformes totales de la especie *R. decussatus* ($n = 40$), la prueba de suma de rangos de Wilcoxon confirmó que no existirían diferencias significativas ($p > 0,05$) pero con una probabilidad de error también alta ($p = 0,717$).

Ambas especies pudieran estar incurriendo en el error debido a que este homogeneizado inicial, de carne de molusco triturada es diluido en una solución constituida por triptona-NaCl, que sumado a la salinidad propia del bivalvo podrían hacer que la prueba Colilert-18 reaccionara como si fueran muestras marinas. La prueba de autoanálisis Colilert-18 no recomienda la cuantificación de coliformes totales en muestras marinas ya que existe evidencia que advierte de una producción substancial de falsos-positivos citando las investigaciones de dos autores Palmer *et al.*, (1993) y Eckner (1998).

Palmer *et al.* (1993) durante la evaluación de un Colilert específico para aguas marinas (Colilert-MW), identificaron la presencia de microorganismos ONPG-positivos distintos del grupo coliformes, *Vibrio cholerae* no-01, *Kuyvera spp* y *Aeromonas hydrophila*, capaces de dar respuesta positiva al color. Durante esta evaluación, los análisis fueron también comparados con un método clásico (FTM), donde el autor señaló que las pruebas estadísticas no entregaron diferencias significativas entre los métodos, sin embargo la cuantificación de coliformes totales por Colilert-MW fue siempre más alta, advirtiendo que la abundancia relativa de estos otros microorganismos ONPG-positivos en el ambiente podrían inducir a error, elevando la cuantificación real de coliformes totales en la prueba.

Del mismo modo, Pisciotta *et al.* (2002) analizando muestras de agua marina mediante Colilert-18, señalaron diferencias en la cuantificación de coliformes totales del orden de 1 a 3 magnitudes por sobre los resultados entregados por un método clásico (filtración de membrana, FM). También señalaron la existencia de bacterias marinas capaces de causar falsos positivos. Argumentando que los niveles de salinidad podrían influenciar el desarrollo de ciertas bacterias marinas ONPG-positivas diferentes del grupo coliformes y MUG-positivas distintas de *E. coli* y por lo tanto inducir a error, específicamente microorganismos del género *Vibrio* que necesitan de un ambiente

salino para desarrollarse. El autor recomienda el uso de diluciones en las muestras de agua marina ya que estos microorganismos no serían capaces de recuperarse en agua dulce.

Nuestros resultados concuerdan con lo señalado por Palmer *et al.* (1993) y Pisciotta *et al.* (2002) en que la cuantificación de coliformes totales fue mayor con la prueba Colilert-18 que con el método clásico, en ambas especies.

En la especie *R. decussatus* los promedios obtenidos en la cuantificación de coliformes totales y de *E. coli* fueron mayores con el método rápido (Colilert-18) 28461,1 NMP/100ml y 4879,75 NMP/100ml respectivamente, frente al método clásico que tuvo como cuantificación promedio 24130,5 NMP/100ml y 3292,25 NMP/100ml para coliformes totales y *E. coli* respectivamente.

En *Mytilus spp* la cuantificación promedio de coliformes totales fue también mayor en el método rápido (11537,2 NMP/100ml) que en el método clásico (6897,69 NMP/100ml). Mientras que el promedio de cuantificación de *E. coli* fue menor con Colilert-18 (577,692 NMP/100ml) y mayor con el método clásico (836,154 NMP/100ml).

Enfocándonos solamente en la cuantificación de *E. coli*, notamos que en la especie *Mytilus spp* no existirían diferencias significativas entre los métodos mientras que la prueba de suma de rangos de Wilcoxon para la especie *R. decussatus* reveló la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) con una probabilidad de error muy baja ($p = 0,03$).

Con esta información y basándonos también en el comportamiento observado de cada una de estas especies frente a la prueba Colilert-18, donde fueron observadas algunas diferencias entre ambas, podría pensarse, que tal vez este método rápido se ajusta mejor a una especie que a la otra.

Las muestras de *Mytilus* correspondieron a dos especies diferentes, que no fueron identificadas, y que durante algunos análisis fueron usadas mezcladas.

Este género se caracterizó por ser más preciso en la respuesta al color, generalmente las celdas positivas coloreaban de un amarillo intenso y se correspondían con aquellas celdas que presentaban fluorescencia. Otra característica, menos habitual fue la pérdida del color al llegar a las 48hrs de incubación, es decir aquellas celdas que habían dado positivas para el grupo coliformes en el primer periodo de incubación (cerca de las 20hrs) fueron proclives a perder el color al cumplirse las 48hrs.

R. decussatus sin embargo, ha sido menos homogénea en la respuesta al color, generalmente presentó varias intensidades en la misma bandeja, celdas de amarillo oscuro muy intenso y otras de amarillo más tenues. En general, aquellas celdas de coloración más tenue correspondían con aquellas celdas que presentaron fluorescencia. En cuanto a la pérdida del color a las 48hrs de incubación, fue una respuesta más común en esta especie. Finalmente, el fenómeno menos común observado, y que sólo estuvo presente en esta especie, correspondió a celdas transparentes, es decir negativas para el grupo coliforme, que a las 48hrs presentaban cierto grado de fluorescencia.

Todos estos fenómenos han sido descritos, en mayor o menor medida, en análisis de muestras de agua con la prueba Colilert®. Por ejemplo, en términos de intensidad y color, la empresa de Laboratorios IDEXX Inc. atendiendo a esta problemática de los matices en la intensidad de respuesta, ha creado y comercializa “comparadores” que tienen un tiempo de duración de aproximadamente un año y que permiten interpretar los resultados con un mayor consenso.

En cuanto a los fenómenos que se explican por un prolongado período de incubación, en este presente estudio fueron realizadas dos lecturas de resultados, la primera entre las 18 y 24hrs y la segunda a las 48hrs de incubación, con el objetivo de visualizar algún cambio en las respuestas al mantener una incubación más prolongada. Los promedios en ambas especies, tanto para coliformes totales como para *E. coli*, fueron mayores a las 48hrs, indicando que en la segunda lectura, el número de celdas positivas aumentaron.

El desvanecimiento del color a las 48hrs, podría deberse a componentes de la muestra que entran en proceso de degradación, ya que el homogeneizado es preparado con todo el bivalvo (carne y líquido intravalvar), por lo que existirán otros componentes no microbianos presentes en la muestra, que participarán en la degradación de las células del tejido.

Teniendo en cuenta el fenómeno de desvanecimiento del color, además de aquellas celdas negativas a las primeras 20hrs, que a las 48hrs siguientes fueron capaces de emitir algún grado de fluorescencia, no sería recomendable utilizar un segundo periodo de incubación tan prolongado ya que podría inducir a generar falsos positivos.

En estas muestras de moluscos bivalvos, aun cuando la prueba Colilert-18 señala un periodo de incubación de 18hrs, la mayoría de las muestras analizadas entregó

resultados sólo a partir de las 20hrs, por lo que un periodo de entre 20~24hrs sería el más adecuado.

Finalmente, celdas positivas que se vuelven transparentes en una incubación prolongada, no han sido reportadas por algún autor utilizando Colilert® en muestras de agua.

Edberg *et al.* (1988) y Covert *et al.* (1989) durante las primeras evaluaciones hechas con estos sustratos ONPG y MUG, evaluaron microorganismos diferentes al grupo coliformes que eventualmente pudieran producir falsos positivos. Específicamente *A. hydrophila* y *Pseudomonas spp*, los cuales al prolongarse el tiempo de incubación más allá de 28hrs eran capaces de producir ONPG-positivos (*A. hydrophila*) y MUG-positivos (*Pseudomonas spp*). Ambos autores sugieren, que ante la presencia de estos microorganismos no sería recomendable un periodo de incubación mayor a 24hrs.

Un falso-positivo en la detección de coliformes totales corresponde a aquellas muestras que producen color amarillo sin estar presentes el grupo coliformes y un falso-negativo a aquellas que conteniendo coliformes no producen color y permanecen transparentes. De la misma forma, un falso-positivo en la detección de *E. coli*, corresponderá a aquellos microorganismos distintos de *E. coli* capaces de producir fluorescencia y un falso-negativo corresponderá a muestras que conteniendo *E. coli* no producen fluorescencia (Palmer *et al.*, 1993). Para poder identificar este fenómeno es necesario verificar los resultados obtenidos por las muestras, realizando subcultivos de las celdas que causan sospecha.

En términos de falsos positivos o falsos negativos que *R. decussatus* pudiera estar produciendo, sin tener en cuenta el prolongado tiempo de incubación e intuyendo a partir de su comportamiento en la prueba Colilert® que esta especie fuera más proclive a generarlos, existe evidencia en análisis de aguas marinas de la presencia de microorganismos capaces de producirlos.

Tanto Palmer *et al.* (1993) como Pisciotta *et al.* (2002) señalan a especies del género *Vibrio*, capaces de producir tanto ONPG como MUG positivos, pero que estarían condicionados a la abundancia en el ambiente y a la salinidad de la muestra.

En relación a MUG-positivos, ONPG-negativos, microorganismos capaces de hidrolizar el sustrato MUG y producir fluorescencia, Palmer *et al.* (1993) identificaron, usando Colilert-MW, a *Serratia liquefaciens* y *Klebsiella pneumoniae*, y mediante un método clásico, cuya prueba confirmatoria fue realizada con el sustrato específico para *E. coli* (EC-MUG) se identificó nuevamente a *Serratia spp* y *Escherichia fergusonii*.

En cuanto a falsos MUG-negativos, es decir celdas que conteniendo *E. coli* no fluorescen, análisis genéticos realizados en algunas cepas humanas y cepas naturales aisladas del ambiente sugieren la presencia de un gen (*uidA*) que aunque está presente no se expresaría causando esta característica (Palmer *et al.*, 1993; Fricker & Fricker, 1994).

Falsos-negativos de *E. coli* no fueron registrados en Colilert-MW en muestras de agua marina (Palmer *et al.*, 1993), mientras que en aguas tropicales se ha reportado que entre el 10 y 20% de las cepas de *E. coli* obtenidas son MUG-negativas (Shadix & Rice, 1991; Chao, 2006).

De esta forma *R. decussatus* podría haber estado conteniendo algún otro microorganismo que la prueba detectó como coliformes totales o como *E. coli*.

Maheux *et al.* (2008) en una investigación realizada para comparar cuatro métodos comerciales basados en la determinación de la actividad enzimática de β -galactosidasa y β -glucuronidasa (Colilert®, ReadyCult®, Chromocult® y MI agar) los cuales son usados para detectar, dentro de 24hrs, la presencia de coliformes totales y *E. coli* en muestras de agua, señalaron a Colilert® como el método más débil detectando β -glucuronidasa. Colilert, sistemáticamente evidenció los niveles más bajos de detección, tanto en cepas de *E. coli* aisladas del ambiente, como frente a cepas puras.

Maheux *et al.* (2008) en este análisis también revelaron que estos cuatro métodos serían más eficientes detectando cepas de *E. coli* aisladas desde el ambiente natural, es decir serían más precisas detectando poblaciones de bacterias más heterogéneas que cepas puras.

Desde esta perspectiva, la prueba Colilert-18 podría estar ajustándose más a las especies de *Mytilus*, debido a que fueron dos especies con las que se realizaron los análisis y en los que a veces el homogeneizado fue preparado con una mezcla de ambas, por lo que de alguna manera, también se estaría contribuyendo con la heterogeneidad de las cepas y disminuyendo el eventual efecto que pudiera tener alguna cepa indetectable por el método.

Botero (2002) determinó la presencia de la enzima β -glucuronidasa en el hepatopáncreas de *Tapes pullastra*, *Ruditapes phillipinarum*, *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea edulis* y *Pecten maximus*. El mayor nivel observado de esta enzima fue en *T. pullastra*, mientras que los menores niveles correspondieron a *M. galloprovincialis* y *P. maximus*.

Estos niveles de enzima presentes en menor o mayor cantidad en las distintas especies, podrían explicar que las respuestas en la prueba Colilert-18 fueran más precisas con las muestras de *Mytilus spp*, por una menor interferencia en la detección de *E. coli* y por el contrario en *R. decussatus* explicar la presencia de falsos MUG-positivos a causa de la enzima presente y no por otros microorganismos, o bien complementando la influencia de microorganismos diferentes de *E. coli* capaces de fluorescer y favoreciendo por lo tanto la formación de un falso positivo.

También hay que señalar que las muestras de *Mytilus spp* contenían regularmente un pequeño crustáceo braquiuro del género *Pinnotheres*. Algunas especies de este género han sido identificadas conviviendo con *Mytilus edulis* (Bierbaum & Shumway, 1988; Heines *et al.*, 1994) y *M. galloprovincialis* (Sun *et al.*, 2006).

La relación de convivencia del molusco bivalvo con este crustáceo presenta características que podrían tener cierta relevancia. Existe evidencia que este crustáceo sería capaz de disminuir significativamente el índice de condición del bivalvo (Sun *et al.*, 2006), así como interferir en el consumo de oxígeno y en la tasa de crecimiento (Bierbaum & Ferson, 1986; Bierbaum & Shumway, 1988) cuando está ejerciendo esta relación de convivencia. Algunos autores señalan esta convivencia como amensalismo, particularmente por parte de los machos, ya que su pequeño tamaño y movilidad les permitiría cambiarse a diferentes bivalvos, y por lo tanto ser menos invasivos (Heines *et al.*, 1994). Mientras que las hembras al llegar al estado adulto, a consecuencia de su mayor tamaño, se mantendrían dentro de un mismo bivalvo, generando una relación más dependiente y convirtiéndose en un parásito (Bierbaum & Ferson, 1986).

Estos crustáceos se ubican en la cavidad del manto, sobre las branquias del bivalvo y se alimentan recogiendo las hebras mucosas con partículas que el bivalvo produce durante la filtración para su propia alimentación (Bierbaum & Ferson, 1986).

Desde esta perspectiva, estos crustáceos podrían estar enmascarando la cantidad de microorganismos que el bivalvo filtra desde el ambiente, si consideramos que el

bivalvo es un organismo filtrador-suspensívoro que está compartiendo su alimento con este parásito, entonces existiría un porcentaje de microorganismos que son ingeridos por el parásito y que disminuirían de alguna manera la carga microbiana presente en el bivalvo al momento de analizarlo. Sería interesante comparar la cuantificación microbiológica de bivalvos con y sin parásito para determinar algún grado de influencia que éste pudiera estar ejerciendo.

En términos de poder relacionar ambos métodos, rápido y clásico, con las zonas de producción, los resultados obtenidos de las cuantificaciones tanto de coliformes totales como de *E. coli*, en ambas especies, fueron muy irregulares como para señalar una zona de producción en que ambos métodos fueran coincidentes, para ello sería necesario llevar a cabo cuantificaciones paralelas de muestras de agua y caracterizar microbiológicamente cada zona.

Pero atendiendo a los máximos verificados gráficamente, en términos de sensibilidad del método rápido, en ambas especies, la prueba Colilert-18 pareciera poder detectar mejor aquellas muestras que presentaron una mayor cantidad de microorganismos, es decir que la prueba sería capaz de procesar muestras con abundancias relativamente altas, y sin embargo, debido al factor de dilución no sería capaz de detectar muestras con muy baja cantidad de microorganismos.

Finalmente, desde el punto de vista del control sanitario de los alimentos, la Regulación (CE) N°854/2004, permite para consumo humano inocuo, aquellas muestras que contengan ≤ 230 *E. coli*/100gr.

Según este criterio, para *Mytilus spp*, el método rápido (Colilert-18) estaría permitiendo 17 muestras contra 15 muestras del método clásico (FTM), es decir que el método rápido estaría permitiendo para consumo humano muestras que están contaminadas, algo que evidentemente sería peligroso para la salud pública.

Mientras que para *R. decussatus*, el método rápido (Colilert-18) permitiría solamente 12 muestras, contra 17 del método clásico (FTM).

Aunque en *R. decussatus* el método rápido estaría permitiendo menos muestras que el método clásico, que podría considerarse positivo porque no está incluyendo muestras contaminadas, sí podría tener un impacto económico negativo sobre la producción, ya que estaría condicionando zonas de producción en las que los moluscos

bivalvos tendrían que entrar a procesos de depuración, que según el método clásico, no lo necesitarían y que podrían ser comercializados.

Por lo tanto el uso y la eficiencia de estos métodos rápidos o alternativos deben ser evaluados desde varias perspectivas.

Es claro que entregan muchas ventajas como mejorar la eficiencia de trabajo cuando se analiza un número alto de muestras, o de entregar resultados en un corto periodo de tiempo, algo que es esencial términos de protección a la salud pública.

De esta forma, aunque no se lograra un completo ajuste de este método rápido a las muestras de moluscos bivalvos, sí podría sugerirse su uso como un complemento al método clásico, particularmente en situaciones de emergencia que necesitaran resultados con mayor rapidez, generando una alerta preventiva que posteriormente fuera confirmada o retirada según los resultados definitivos del método clásico.

5. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

Los resultados de este estudio permitieron evaluar el uso de un método rápido en dos especies de moluscos bivalvos y verificar, que la cuantificación microbiológica de coliformes totales así como de *E. coli*, fuera consistente al compararla con resultados obtenidos con un método estandarizado clásico.

Los análisis revelaron que existe una correlación positiva entre los métodos, rápido y clásico, pero identificó diferencias significativas en la especie *R. decussatus*.

A pesar de todos los factores que interfieren en los análisis de muestras marinas, cuando se utiliza la prueba de autoanálisis Colilert-18, y siendo la primera vez que se usa para muestras de moluscos bivalvos en este laboratorio, podemos concluir que las especies de *Mytilus* se adaptan mejor a la prueba Colilert-18.

Mientras que para la especie *R. decussatus* sería necesario implementar alteraciones en el desarrollo de la técnica, que permitieran disminuir los factores que pudieran estar contribuyendo con la formación de falsos-positivos o negativos, como por ejemplo mantener un periodo de incubación de 20 a 24hrs y trabajar con diluciones mayores a la usada en este estudio.

Se sugiere para estudios posteriores identificar y caracterizar los microorganismos más comunes presentes en las muestras analizadas por el método rápido, realizando subcultivos de aquellos análisis que resulten sospechosos de ser falsos-positivos así como de aquellos análisis que no muestren ningún tipo de respuesta, para descartar falsos-negativos.

En relación a las zonas de extracción de las muestras, hacer análisis de identificación microbiológica, para tener un paralelo de lo que está presente en el ambiente, que pudiera estar interfiriendo en el análisis microbiológico del bivalvo. Caracterizar el comportamiento estacional de estos microorganismos y determinar el período del año en que realizar este método rápido tuviera más validez por un menor efecto tanto de parámetros ambientales o biológicos.

Finalmente, diseñar un “comparador digital” mediante fotografías que permita interpretar las respuestas entregadas por la prueba con un nivel de objetividad mayor.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Bierbaum, R. & Ferson, S. 1986. Do symbiotic pea crabs decrease growth rate in mussels?. *Biol. Bull.* 170: 51-61.
- Bierbaum, R. & Shumway, S. 1988. Filtration and Oxygen Consumption in Mussels, *Mytilus edulis*, with and without Pea Crabs, *Pinnotheres maculatus*. *Estuaries*. 11(4): 264-271.
- Burkhardt, W. & Calci, K. 2000. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(4): 1375-1378.
- Botero, M. 2002. *Actividad de la enzima β -glucuronidasa como indicador de mecanismos de desintoxicación de moluscos bivalvos*. Tesis de doctorado, Universidad de Santiago de Compostela. España.
- Covert, T. C., Shadix, L. C., Rice, E. W., Haines, J. R. & Freyberg, R. W. 1989. Evaluation of the Autoanalysis Colilert Test for Detection and Enumeration of Total Coliforms. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(10): 2443-2447.
- Chao, W.L. 2006. Evaluation of Colilert-18 for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in tropical fresh water. *Lett. Appl. Microbiol.* 42: 115-120.
- Despacho nº 14515/2010 del Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I. P. Ministério da agricultura, do desenvolvimento Rural e das Pescas. Portugal. Diário da República, 2.ª série. Nº 182-17 de Setembro de 2010.
- Donovan, T., Gallacher, S., Andrews, N., Greenwood, M., Graham, J., Russell, R., Roberts, D. & Lee, R. 1998. Modification of the standard method used in the United Kingdom for counting *Escherichia coli* in live bivalve molluscs. *Communicable Disease and Public Health.* 1(3): 188-196.

- Eckner, K. 1998. Comparison of Membrane Filtration and Multiple-Tube Fermentation by the Colilert and Enterolert Methods for Detection of Waterborne Coliform Bacteria, *Escherichia coli* and *Enterococci* Used in Drinking and Bathing Water Quality Monitoring in Southern Sweden. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3079-3083.
- Edberg, S., Allen, M., Smith, B. & The National Collaborative Study. 1988. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: Comparison with the standard multiple tube fermentation method. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1595.
- Fricker, E. & Fricker, C. 1994. Application of the polymerase chain reaction to the identification of *Escherichia coli* and coliforms in water. *Lett. Appl. Microbiol.* 19: 44-46.
- Fung, D. Y. 1994. Rapid methods and automation in food microbiology: A review. *Food Rev. Int.* 10(3): 357-375.
- Gosling, E. M. 2003. Morphology of bivalves & How bivalves feed. In: Bivalve molluscs: biology, ecology and culture. Fishing News Books, Blackwell Science. Oxford. Pp 7-39; 87-123.
- Graczyk, T. & Schwab, K. 2000. Foodborne Infections Vectored by Molluscan Shellfish. *Current Gastroenterology Reports.* 2: 305–309.
- Hammer, M. J & Hammer, M. Jr. 2004. Biology. In: Water and Wastewater Technology. Pearson, Prentice Hall. 5th Ed. New Jersey. Pp 49-85.
- Haines, C., Edmunds, M. & Pewsey, A. 1994. The pea crab, *Pinnotheres pisum* (Linnaeus, 1767), and its association with the common mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758), in the solent (UK). *Journal of Shellfish Research.* 13(1): 5-10.

IDEXX Laboratories, Inc. 2011. Water Microbiology. Disponible en el sitio web:
http://www.idexx.com/view/xhtml/en_us/water/water-microbiology.jsf.

Ultimo acceso 6 de junio de 2011.

Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A. & Uyttendaele, M. 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology*. 27: 710-730.

Jørgensen, C. B. 1996. Bivalve filter feeding revisited. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 142: 287-302.

Larkin, E. & Hunt, D. 1982. Bivalve Mollusk: Control of microbiological contaminants. *BioScience*. 32(3): 193-197.

NP1829 :1982. Microbiologia alimentar. Preparação da amostra para análise microbiológica. Instituto Português da Qualidade, Ministerio da Economía e Inovação. 1ª Edição. Lisboa.

Palmer, C., Yu-Li Tsai., Lang, A. & Sangermano, L. 1993. Evaluation of Colilert-Marine Water for Detection of Total Coliforms and *Escherichia coli* in the Marine Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 786-790.

Pisciotta, J., Rath, D., Stanek, P., Flanery, D. & Harwood, V. 2002. Marine bacteria cause False-Positive results in the Colilert-18 Rapid identification test for *Escherichia coli* in Florida Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2): 539-544.

Postasman, I., Paz, A. & Odeh, M. 2002. Infectious Outbreaks Associated with Bivalve Shellfish Consumption: A Worldwide Perspective. *Clinical Infectious Diseases*. 35: 921-928.

Power, U. F. & Collins, J. K. 1990. Tissue distribution of a Coliphage and *Escherichia coli* in mussels after contamination and depuration. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(3): 803-807.

- Prescott, L., Harley, J. & Klein, D. 2004. Microorganismos en ambientes acuáticos en: Microbiología. Ed. McGraw Hill. 5ª Ed. Madrid. Pp 683-713.
- Reglamento (CE) N° 854/2004 del Parlamento Europeo y del consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano.
- Reglamento (CE) N° 1021/2008 de la Comisión de 17 de octubre de 2008 que modifica los anexos I, II y III del Reglamento (CE) N° 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano.
- Rippey, S. 1994. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 419-425.
- Shadix, L. & Rice, E. 1991. Evaluation of β -glucuronidase assay for the detection of *Escherichia coli* from environmental waters. *Canadian Journal of Microbiology*, 37: 908-911.
- Šolić, M., Krstulović, N., Jozić, S. & Curać, D. 1999. The rate of concentration of faecal coliforms in shellfish under different environmental conditions. *Environmental International*. 25(8): 991-1000.
- Suna, W., Suna, S., Yuqia, W., Baowena, Y. & Weiboa, S. 2006. The prevalence of the pea crab, *Pinnotheres sinensis*, and its impact on the condition of the cultured mussel, *Mytilus galloprovincialis*, in Jiaonan waters (Shandong Province, China). *Aquaculture*. 253:57– 63.
- Varnam, A. H. & Evans, M. G. 2000. Aquatic Environments. In: Environmental Microbiology. Manson Publishing. London. Pp 29-84.

Wittman, R. J. & Flick, G. J. 1995. Microbial contamination of shellfish: Prevalence, Risk to Human Health, and Control Strategies. *Annu. Rev. Public Health*. 16: 123-140.