

DETECCIÓN DE PSEUDOMONA AUREGINOSA EN AGUA DE MESA MEDIANTE TEST RÁPIDO

Aldana A. Chesta¹, Graciela Marín¹, Marcia López²

¹ Grupo de Investigación y Desarrollo en Alimentos e Ing. Química.

² Posgrado Tecnología de los Alimentos.

FRVM de la UTN. Av. Universidad 450 – XGB5900 Villa María, Córdoba, Argentina.

achesta@frvm.utn.edu.ar

Resumen

Se presenta un estudio desarrollado en un establecimiento productor de aguas y sodas que cumplen estándares de calidad internas, acordes al CAA, comercializadas como “Agua de mesa tratada” en bidones. Éstas se elaboran en su planta industrial en Chubut, Argentina, utilizando ósmosis inversa con un tratamiento por ozonización y/o dióxido de cloro, previo al envasado.

Actualmente se liberan lotes a la venta mediante control fisicoquímico de cloro residual libre en producto por control fotométrico con DPD, asegurando además su calidad mediante control microbiológico. Dicho control se realiza, con frecuencia establecida, en el laboratorio de la Dirección de Salud Ambiental de Bromatología de Chubut.

Debido a la alta demanda y la limitada capacidad de producción disponible en fábrica, es necesario disponer de un método rápido y económicamente viable que permita aprobar o no la liberación en 24 hs de la producción diaria. Se suma a ello la falta de laboratorio microbiológico propio y personal para siembra y cultivo para detección de *Pseudomonas aeruginosa*.

Dicho patógeno es utilizado como indicador indirecto de calidad bacteriológica, su presencia produce una adherencia característica sobre las superficies inertes del envase mediante formación de biopelículas facilitando su desarrollo y reduciendo la efectividad de la cloración.

Como alternativa se evalúa la factibilidad de implementar un test de detección rápida como opción para el control de calidad que permitiría la liberación de lotes en un tiempo reducido respecto del método convencional, y con garantía de inocuidad. Esta resultaría factible y válido de aplicar a corto plazo, requiriendo mínimas necesidades de infraestructura.

Resultó ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* en las muestras evaluadas variando concentración de cloro residual, de dióxido de cloro y tiempo de almacenamiento.

Se concluye la transferencia efectiva a la empresa pues, se logra optimizar el proceso de liberación, minimizando tiempos para expedición, garantizando la calidad bacteriológica del producto.

Palabras Clave: *Pseudomonas aureginosa*, detección, aguas de mesa, test rápido.

Introducción

El agua es uno de los recursos imprescindibles para la vida, por lo cual es necesario mantener su calidad tanto físico-química como microbiológica, asegurando así que su distribución no conlleve la presencia de contaminantes patógenos que puedan generar la transmisión de enfermedades de transmisión hídrica (Cajamarca Berrezueta B. E., 2011; De La Cruz A., 2018).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en las Guías de calidad del agua de bebida define agua de consumo como “adecuada para el consumo humano y para todo uso doméstico habitual incluida la higiene personal”, por lo tanto, el agua no debe presentar ningún tipo de riesgo que pueda perjudicar la salud humana. Esta inocuidad puede lograrse seleccionando fuentes de agua de buena

calidad, tratando efectivamente el agua contaminada y preservarla para que no se contamine durante la distribución hasta llegar al usuario (OMS, 2004).

El agua que circula por las plantas de tratamiento puede contaminarse a través de: conexiones, tuberías rotas, conexiones, reservorios; y con algunos factores secundarios como nutrientes, oxígeno, temperatura pH, concentración de desinfectante se hace viable la presencia de microorganismos. Por tal motivo, el control microbiológico a través de microorganismos indicadores, es un principio indispensable en la vigilancia y evaluación de la seguridad microbiana en los sistemas de suministro de agua. Por todo lo mencionado es que se establecen criterios para determinar si el agua es apta para su uso y normar su calidad (Galarraga E., 1994).

Diversas normas establecen límites permisibles para coliformes totales y fecales; sin embargo, estos indicadores no garantizan la ausencia de contaminación microbiana, debido a que otros patógenos pueden encontrarse aún cuando no se detecten los señalados. La presencia de otros microorganismos en la red de distribución, puede deberse a una mayor capacidad de supervivencia, por factores como: mayor resistencia a las concentraciones de cloro libre residual utilizado habitualmente para desinfectar, o a una interferencia en el crecimiento de los microorganismos indicadores (Ontiveros, M., 1983).

El Código Alimentario Argentino (CAA), en su capítulo XII dedicado a aguas, establece que debe haber ausencia tanto de coniformes fecales como de *Pseudomonas aeruginosa* por 100 ml de agua para que sea apta para el consumo humano.

Pseudomonas aeruginosa es una de las especies más reportadas en aguas envasadas. Esta especie sobrevive en agua destilada y agua desionizada. Su presencia en agua potable está relacionada con la capacidad de colonizar biopelículas (Delgado Calderón S. J., 2015).

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista, responsable de gran cantidad de infecciones. Fue aislada por primera vez en 1882 por Gessard en cultivo de heridas cutáneas. Las cepas de esta especie presentan un color verde brillante característico, debido a la producción de los pigmentos piocianina (azul), y pioverdina (amarillo fluorescente), los cuales juntos le proporcionan dicha coloración. Esta bacteria es un bacilo muy versátil, es oxidasa positiva y puede crecer a temperaturas superiores a 42 °C. Es un habitante común de agua, suelos y plantas. Es intrínsecamente resistente a diversas clases de antibióticos que no guardan relación estructural entre sí, debido a la disminución de la permeabilidad de su membrana externa, a la expresión constitutiva de varias bombas de expulsión y a la producción de enzimas que inactivan a los antibióticos. Además, posee la capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia vía mutaciones (Luján Roca D. A., 2014).

Este microorganismo es capaz de sobrevivir y multiplicarse en aguas tratadas, se adhiere fácilmente a superficies inertes de diferentes materiales formando biopelículas que facilitan su establecimiento. Ésto debido a una densa capa polisacárida la cual establece una barrera no solo física sino química capaz de proteger a la bacteria de las moléculas e iones de cloro libre residual. Es decir, la biopelícula constituye una protección contra la cloración, y es por ello que se lo considera un indicador de eficiencia del tratamiento (Rodríguez, S.C. y otros, 2018; Delgado Calderón S. J., 2015; Cajamarca Berrezueta B. E., 2011; Torres, Y., 1991).

Entre los métodos de análisis más usados para detectar *P. aeruginosa* en agua potable están NMP (Número Más Probable) y filtración por membrana (FM). Actualmente en el mercado existen métodos rápidos que se ofrecen en "kits" y por mecanismos de detección más rápidos y de mayor costo. Pseudalert es un dispositivo que detecta la presencia de *P. aeruginosa* en muestras de agua embotellada, de piscinas o balnearios. Otro método que permite la detección rápida de *P. aeruginosa* es el inmunoensayo visual 3M™ Tecra™, que es una prueba rápida de ELISA que detecta la presencia de *Pseudomonas spp.* en aguas, productos alimenticios y cosméticos (IDEXX 2013, TECRA2013). Éste último detecta *Pseudomonas spp.* en sólo 2 horas después del enriquecimiento.

El presente estudio es desarrollado en un establecimiento productor de aguas y sodas que cumplen estándares de calidad internas, acordes al CAA, comercializadas como “Agua de mesa tratada” en bidones. Su elaboración, en su planta industrial en la provincia de Chubut, Argentina, se realiza por ósmosis inversa con un tratamiento por ozonización y/o dióxido de cloro, previo al envasado.

La fuente de agua empleada, es agua potable de red, la cual es sometida a diversos tratamientos de acondicionamiento. Primeramente, se somete a sucesivas filtraciones a los efectos de retener impurezas tales como: polvos, finos, partículas en suspensión en general e incluso microorganismos. El nivel de retención de cada etapa será progresivo, hasta llegar al filtrado nominal de 1µm. Las sucesivas etapas se cumplen con el uso de rellenos filtrantes (grava-arena, garnet, etc.), mallas filtrantes de acero inoxidable y cartuchos descartables en las instancias más exigentes. Previo a la desmineralización, se incorpora al proceso un filtro de carbón activado para descartar la presencia de oxidantes en línea (cloro, ozono, etc.) u otros elementos. Se controla la efectividad de la carga de carbón midiendo la concentración de oxidantes antes y después de la unidad. La retención debe ser completa.

En el caso que la calidad química del suministro se encuentre fuera de especificación según Art. 983 de CAA debe acondicionarse la carga de minerales disueltos del mismo. Para ello se cuenta con un equipamiento de desmineralización por: Osmosis Inversa. El proceso consta de una etapa de desmineralización del suministro para luego adicionar a la corriente agua cruda hasta los niveles de mineralización adecuados. La unidad deberá contar con medición en línea de conductividad del agua tratada con alarmas de máximo y mínimo nivel de mineralización. El tratamiento microbiológico constituye el último paso del proceso previo al envasado, mediante el proceso de Dióxido de Cloro.

En la actualidad, los lotes son liberados a la venta mediante control fisicoquímico de cloro residual libre en el producto por control fotométrico con DPD, asegurando además su calidad mediante control microbiológico con frecuencia establecida, en el laboratorio externo de la Dirección de Salud Ambiental de Bromatología de Chubut.

Debido a la alta demanda y la limitada capacidad de producción disponible en fábrica, es necesario disponer de un método rápido y económicamente viable que permita aprobar o no la liberación en 24 horas de la producción diaria. Se suma, la falta de laboratorio microbiológico propio y disponibilidad de personal para realizar siembra y cultivo para detección de *P. aeruginosa*.

Por todo lo anteriormente mencionado, es que se evalúa la factibilidad de implementar un control rápido de calidad microbiológica de Agua De Mesa Tratada, mediante el indicador *P. aeruginosa*, como parámetro de inocuidad bacteriológica, que permita la liberación de lote de producción en agua potable tratada por osmosis inversa y dióxido de cloro, para su posterior comercialización.

Materiales y métodos

La prueba Pseudalert detecta la presencia de *P. aeruginosa* en muestras de agua, utilizando tecnología de detección de enzimas bacterianas que señala dicha presencia mediante la hidrólisis de un sustrato presente en el reactivo Pseudalert.

Las células de *P. aeruginosa* crecen rápidamente y se reproducen utilizando el suministro rico en aminoácidos, vitaminas y otros nutrientes presentes en el reactivo Pseudalert. Las cepas de dicho microorganismo que crecen activamente tienen una enzima que se adhiere al sustrato del reactivo para producir la fluorescencia azul con luz ultravioleta.

A continuación, se detallan los materiales y equipamiento utilizado para desarrollar la técnica:

- Recipientes estériles de 100mL
- Estufa de cultivo, marca FAC, industria argentina.
- Lámpara UV.

Lentes protección UV
 Kit pseudoalert IDEXX
 Fotómetro MD 100 Lobivond
 Tabletas de DPD
 O-Tolidina
 Kit de alcalinidad (fenolftaleína y HCl 1N)

La secuencia del procedimiento de presencia/ausencia se describe inmediatamente:

1. Añadir el contenido de la dosis Snap adecuadamente dispersada a una muestra de 100mL en un recipiente estéril transparente, no fluorescente.
2. Tapar y agitar el recipiente
3. Incubar a 38 ± 0.5 °C durante 24-28 horas.
4. Leer los resultados de acuerdo con la tabla de interpretación del proveedor del kit (Ver Tabla 1).

Tabla 1. Interpretación de los resultados según el instructivo del kit

Interpretación de resultados	
Apariencia	Resultado
Sin fluorescencia azul	Muestra negativa para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Con fluorescencia azul *	Muestra positiva para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
*Intensidad de la fluorescencia azul superior a la de la fluorescencia del control negativo.	



Fig. 1. Interpretación de los resultados mediante imagen según el instructivo del kit.

La validación del kit se realiza haciendo un negativo o blanco y un positivo.

Control negativo: Se toma como referencia una muestra de agua de un tanque de acopio de la empresa, verificado en laboratorio externo la ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

Control positivo: Se mantuvo una muestra de agua de red durante 4 meses para asegurar el crecimiento de *P. aeruginosa*. Se verificó su presencia con análisis en laboratorio externo.

El muestreo se realizó a lo largo de 2 meses, de la siguiente manera:

- 2 muestras de control de positivo y negativo para validación del kit.
- 3 muestras de agua posterior al último filtro del proceso previo al tratamiento bacteriológico.
- 11 muestras de agua variando la concentración de hipoclorito de sodio en agua de lavado y de dióxido de cloro en agua filtrada.
- 4 muestras de agua de botellones a los 2 y 3 meses de su fecha de envasado.

Cada muestra se trató según las indicaciones del proveedor del kit.

VARIABLES DE PROCESO ESTUDIADAS:

- Concentración de hipoclorito de sodio en agua de lavado.
- Concentración de dióxido de cloro (cloro residual) en etapa de tratamiento bacteriológico.
- Control presencia/ausencia de *P. aeruginosa*.

VARIABLES DEL PROCESO QUE SE MANTUVIERON SIN MODIFICACIÓN DURANTE EL ENSAYO:

- Valor de 5 ppm de cloración inicial del agua de red previo a almacenamiento.

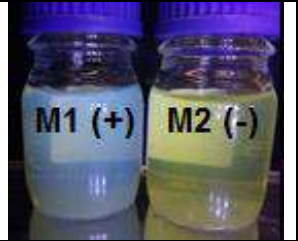
- Dosificación de limpiador alcalino en agua de lavado de botellones.
- Concentración de ácido peracético en agua de lavado.
- Temperatura, tiempo y ciclos de lavado.

Resultados y discusión

Del análisis de 20 muestras se obtienen que 19 han arrojado resultados negativos de fluorescencia, correspondientes a AUSENCIA de *P. aeruginosa*. En las Tablas 2 a 6 se exponen los resultados obtenidos. Los ensayos arrojaron resultados en 24 hs.

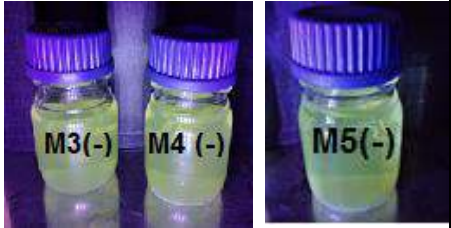
La única muestra que arrojó resultado positivo fue aquella definida como “patrón para control de prueba”, validado con análisis externo (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados del kit de control negativo y positivo.

Muestra	Punto de Muestreo	Hipoclorito de sodio	Dióxido de cloro	Resultado Kit rápido
M-01	CERO- NEGATIVO	no aplica	no aplica	
M-02	CERO-POSITIVO	no aplica	no aplica	



Se analizaron 3 muestras en un punto posterior al filtro previo al tratamiento de desinfección. Los resultados fueron negativos en fluorescencia, es decir AUSENCIA de *P. aeruginosa*, indicado en Tabla 3.

Tabla 3. Resultados de punto de muestreo posterior a último filtro previo a tratamiento bacteriológico.

Muestra	Punto de Muestreo	Hipoclorito de sodio	Dióxido de cloro	Resultado Kit rápido
M-03	Post filtro 1 micra	no aplica	no aplica	
M-04	Post filtro 1 micra	no aplica	no aplica	
M-05	Post filtro 1 micra	no aplica	no aplica	

Se evidencia que aun reduciendo a 5 ppm el valor de cloro residual en el agua de lavado de bidones retornables y reduciendo por debajo de 0,15 ppm el dióxido de cloro en el agua de mesa tratada, los resultados arrojan AUSENCIA de *P. aeruginosa* (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados en producto terminado con variaciones en Dióxido de cloro manteniendo mínima concentración de Hipoclorito en lavadora.

Muestra	Punto de Muestreo	Hipoclorito de sodio	Dióxido de cloro	Resultado Kit rápido
M-06	Producto terminado	5 ppm	0,15 mg/L	
M-07	Producto terminado	5 ppm	0,15 mg/L	
M-08	Producto terminado	5 ppm	0,10 mg/L	
M-09	Producto terminado	5 ppm	0,10 mg/L	

Las muestras de agua de proceso, previo al envasado y tratamiento bacteriológico también arrojan resultados negativos (Tabla 5 y Tabla 6).

Tabla 5. Resultados en producto terminado con variaciones de Hipoclorito de sodio y de Dióxido de cloro.

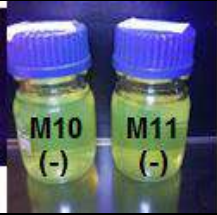
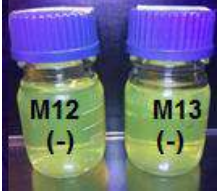
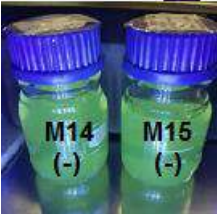


Muestra	Punto de Muestreo	Hipoclorito de sodio	Dióxido de cloro	Resultado Kit rápido
M-10	Producto terminado	20 ppm	0,15 mg/L	
M-11	Producto terminado	20 ppm	0,15 mg/L	
M-12	Producto terminado	5 ppm	0,30 mg/L	
M-13	Producto terminado	5 ppm	0,30 mg/L	
M-14	Producto terminado	20 ppm	0,30 mg/L	
M-15	Producto terminado	20 ppm	0,30 mg/L	
M-16	Producto terminado	5 ppm	0,00 mg/L	

Tabla 6. Resultados de producto terminado luego de 2 y 3 meses de envasado.

Muestra	Punto de Muestreo	Hipoclorito de sodio	Dióxido de cloro	Resultado Kit rápido
M-17	Producto terminado (2 meses de envasado)	5 ppm	0,15 mg/L	
M-18	Producto terminado (2 meses de envasado)	5 ppm	0,15 mg/L	
M-19	Producto terminado (3 meses de envasado)	5 ppm	0,15 mg/L	
M-20	Producto terminado (3 meses de envasado)	5 ppm	0,15 mg/L	

Conclusiones

Como conclusión se establece que es factible y recomendable la implementación, de un método rápido, tal como el kit Pseudoalert, en el proceso de control de proceso y liberación de lotes de agua de mesa tratada envasada para consumo, permitiendo la liberación en 24 hs - 28 hs, incluyendo un indicador de calidad bacteriológica del lote, manteniendo las concentraciones mínimas definidas por la empresa para el desinfectante en el lavado de bidones (cloro residual en 5 ppm), bactericida en 0,15 ppm como dióxido de cloro en agua de mesa tratada.

Debido a que ninguna muestra arrojó valores positivos, excepto el cero de control, no puede evaluarse la efectividad de reducir la concentración de hipoclorito de sodio en aguas de lavado de botellones retornables, como así tampoco la reducción del bactericida en el agua tratada.

Así mismo se sugiere evaluar la posibilidad de incluir indicadores complementarios y extender la prueba con mayor número de muestras, ya que el estudio se vio limitado por la cantidad de ampollas Pseudoalert disponibles, y por el costo asociado.

Se indica, además, la transferencia efectiva de resultados a la empresa ya que, se logra optimizar el proceso de liberación, minimizando los tiempos de almacenaje para expedición, garantizando la calidad bacteriológica del producto.

Referencias

Cajamarca Berzuela B. E., Contreras Álvarez L. A. (2011) *Control microbiológico del agua potable de uno de los sistemas del Cantón Cuenca, a través de microorganismos indicadores*. Universidad de Cuenca.

Comisión del Codex Alimentarius. (1997) *Informe de la 21ª Reunión del Comité del Codex sobre métodos de análisis y toma de muestras*. Ginebra.

De La Cruz A. y Murcia D. (2018) *Eliminación de E. coli y Pseudomona aeruginosa de agua potable usando sistema de desinfección con luz ultravioleta y óxido de titanio*. Revista científica CENTROS Vol. 8 No. 1. ISSN: 2304-604X pp 87-100.

Delgado Calderón S. J., Morales Torres F. A. (2015) *Detección de pseudomona aeruginosa y bacterias heterótrofas de aguas envasadas en botellas y bolsas destinadas al consumo humano*. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.

Galarraga, E. (1994). *Algunos aspectos relacionados con microorganismos en agua potable*. p. 135-143.

Ley 18.284 CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO. *Capítulo XII*. Disponible: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat_cca_capitulo_xii_aguas_actualiz_2021-08.pdf

Ley de la provincia de Chubut I- No 189 (Antes Ley 4291) *Marco regulatorio del servicio público de agua potable y desagües cloacales*.

Luján Roca D. A. (2014) *Pseudomonas aeruginosa: un adversario peligroso*. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana; 48 (4): 465-74.

Ontiveros, M. (1983) *Pseudomonas aeruginosa como indicador de la calidad bacteriológica del agua para su uso recreacional*. Secretaría de Agricultura y Recursos Hídricos, México.

Ordenanza municipal, *Norma de calidad para agua potable*. Comodoro Rivadavia Chubut 0617-12.

Organización Mundial de la Salud (2004). *Guías para la calidad del agua de potable*. Tercera Edición. Ginebra. Volumen 1. p. 13-14.

Organización Mundial de la Salud. (2008). *La red de planes de seguridad del agua de Latinoamérica y el Caribe*.

https://www.paho.org/per/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=853&Itemid=631

Rodríguez, S.C.; Asmundis, C.L.; Ayala, M.T.; Arzú, O.R. (2018) *Presencia de indicadores microbiológicos en agua para consumo humano en San Cosme, Corrientes, Argentina*. Revista veterinaria 29: 1, 9-12.

Torres, Y. (1991) *Resistencia de Pseudomonas aeruginosa al cloro libre residual*. Revista AINSA. 11(1). pp. 21-25.