

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL
MEDI NATURAL**



***Escherichia coli* en aguas de riego: optimización del aislamiento
mediante cultivo y detección por PCR**

TRABAJO FIN DE GRADO EN:
Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Alumno: **David Castillo Navarro**

Directora Académica/Tutora: **Dra. Salut Botella Grau**
Directora Experimental: **Dña. Aya Boukharouba**

Curso Académico: **2017-2018**

Valencia, julio de **2018**

***Escherichia coli* en aguas de riego: optimización del aislamiento mediante cultivo y detección por PCR**

Resumen

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la presencia de *Escherichia coli* en aguas de riego, utilizando técnicas de cultivo basadas en métodos normalizados, y la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para optimizar las condiciones de ambas en el aislamiento, identificación y detección de este microorganismo.

Las muestras de aguas de riego utilizadas en este trabajo provienen de canales agrícolas de Vera y Alboraya.

El estudio de la presencia de *Escherichia coli* por técnicas de cultivo se ha valorado con recuentos microbiológicos en medios selectivos y análisis de presencia/ausencia del microorganismo basado en diferentes métodos normalizados con el fin de elaborar un protocolo específico para aislar el microorganismo a partir de aguas con las cuatro etapas de preenriquecimiento, enriquecimiento, aislamiento e identificación.

La detección molecular de *Escherichia coli* se ha llevado a cabo por la técnica de PCR a partir del medio de enriquecimiento del microorganismo, por amplificación de secuencias específicas tras la extracción del DNA de las muestras, optimizando el nivel de detección a una única célula.

Se han analizado un total de 15 muestras de agua de riego a partir de las cuales se aislaron cepas de *E. coli* en 10 muestras (66,67 % de las muestras). Con las técnicas moleculares, se detectó la presencia de *Escherichia coli* en el 100 % de las muestras.

La utilización de la técnica PCR facilita y reduce el tiempo empleado para la detección de estos microorganismos. Además, ha resultado ser más sensible que el cultivo, detectando la presencia de *E. coli* en muestras en las que no se aislaron por métodos culturales.

Palabras clave: *Escherichia coli*, aguas, métodos culturales, PCR, límites de detección.

Alumno: D. David Castillo Navarro

Directora Académica: Dra. Salut Botella Grau

Directora Experimental: Dña. Aya Boukharouba

Valencia, julio 2018

***Escherichia coli* in irrigation waters: optimization of isolation by culture and PCR detection**

Abstract

The objective of this work was to study the presence of *Escherichia coli* in irrigation waters, using culture techniques based on standardized methods, and the technique of the polymerase chain reaction (PCR), to optimize the conditions of both in the isolation, identification and detection of this microorganism.

The samples of irrigation water used in this work come from agricultural channels of Vera and Alboraya.

The study of the presence of *Escherichia coli* by culture techniques has been evaluated with microbiological counts in selective media and presence/absence analysis of the microorganism based on different standardized methods, in order to elaborate a specific protocol to isolate the microorganism from waters with the four stages of pre-enrichment, enrichment, isolation and identification.

The molecular detection of *Escherichia coli* has been carried out by the PCR technique from the enrichment media of the microorganism, by amplification of specific sequences after DNA extraction from the samples, optimizing the level of detection to a single cell.

A total of 15 irrigation water samples were analyzed, from which *E. coli* strains were isolated in 10 samples (66,67 % of the samples). With the molecular techniques, the presence of *Escherichia coli* was detected in 100 % of samples.

The use of the PCR technique facilitates and reduces the time used for the detection of these microorganisms. In addition, it has been found to be more sensitive than the culture, detecting the presence of *E. coli* in samples in which they were not isolated by cultural methods.

Key words: *Escherichia coli*, water, cultural methods, PCR, detection limits.

Author: D. David Castillo Navarro

Academic director: Dra. Salut Botella Grau

Experimental director: Dña. Aya Boukharouba

Valencia, July 2018

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Salut por ofrecerme esta oportunidad, ayudarme en este aprendizaje y la confianza depositada en mí. Agradecer de la misma manera a Aya, por su paciencia y ayuda continua en el laboratorio.

A mi familia, en especial a mi hermano y mis padres por ser los principales responsables de que haya llegado hasta aquí, estando siempre a mi lado, ayudándome en todo lo posible y preocupándose de mi educación. No me olvido de todos aquellos que ya no están entre nosotros, quienes seguro están también orgullosos de lo que he logrado.

Por último, a todos mis amigos, con mención especial a esa pequeña familia de J. M. que hemos conseguido formar durante estos 4 años inolvidables, así como a Alberto, con quien comencé y terminé esta etapa de mi vida.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS	1
2. CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS	1
2.1. Agua: calidad microbiológica	2
3. ENTEROBACTERIAS EN LOS ALIMENTOS	3
3.1. Clasificación actual del género <i>Escherichia</i>	4
3.2. <i>Escherichia coli</i> : El organismo y sus características	4
3.2.1. Poder patógeno	4
4. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN POR MÉTODOS NORMALIZADOS	6
II. OBJETIVOS	8
III. MATERIAL Y MÉTODOS	9
1. MUESTRAS	9
2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS DE RIEGO POR MÉTODOS CULTURALES	9
2.1. Preparación de muestras	9
2.2. Recuento de enterobacterias	9
2.3. Aislamiento e identificación de <i>Escherichia coli</i> por métodos culturales	9
3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> EN AGUAS DE RIEGO POR MÉTODOS MOLECULARES: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	12
3.1. Cepa de referencia	12
3.2. Extracción de DNA	12
3.3. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	12
3.4. Límite de detección de la PCR para <i>Escherichia coli</i>	14
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
1. RECUENTO DE ENTEROBACTERIAS	15
2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> POR MÉTODOS CULTURALES	15

3.	DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> POR (PCR)	18
3.1.	Extracción de DNA	18
3.2.	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	19
3.3.	Límite de detección de la PCR para <i>Escherichia coli</i>	19
4.	VALORACIÓN CONJUNTA DE LOS MÉTODOS DE DETECCIÓN	20
V.	CONCLUSIONES.	22
VI.	BIBLIOGRAFÍA	23

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las cepas patógenas de <i>Escherichia coli</i> según los síndromes clínicos que producen	5
Tabla 2. Condiciones de amplificación para <i>Escherichia coli</i>	13
Tabla 3. Reactivos empleados para la PCR simple de <i>Escherichia coli</i>	13
Tabla 4. Reactivos empleados en la electroforesis.....	14
Tabla 5. Resultados del recuento de enterobacterias.....	15
Tabla 6. Resultados del aislamiento de <i>Escherichia coli</i> en medios selectivos.....	16
Tabla 7: Cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas e identificadas en las muestras de agua de riego estudiadas.....	18
Tabla 8: Valoración conjunta de técnicas culturales y moleculares en la detección de <i>Escherichia coli</i>	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales factores de riesgo con respecto a patógenos microbianos en frutas y hortalizas frescas identificados por la EFSA	2
Figura 2. Lectura de las pruebas bioquímicas IMViC para <i>Escherichia coli</i>	17
Figura 3. Identificación de <i>Escherichia coli</i> mediante tira API20E	17
Figura 4. Gradiente de temperaturas de acoplamiento para la PCR de <i>Escherichia coli</i>	19
Figura 5. Detección de <i>Escherichia coli</i> en las diferentes muestras de agua por PCR (I)	19
Figura 6. Detección de <i>Escherichia coli</i> en las diferentes muestras de agua por PCR (II)	20
Figura 7. Límite de detección de la PCR de <i>Escherichia coli</i>	20

ABREVIATURAS

a_w Actividad del agua

AEAS Asociación Española de Abastecimientos de Agua y Saneamiento

API Analytical Profile Index

APT Agua de peptona tamponada

BES Boletín Epidemiológico Semanal

CECT Colección Española de Cultivos Tipo

CVB Caldo de bilis verde brillante

DAEC2 *Escherichia coli* adherente difusa

DNA Deoxyribonucleic acid

DOUE Diario Oficial de la Unión Europea

EAEC *Escherichia coli* enteroagregativa

EFSA European Food Safety Authority

EHEC *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC *Escherichia coli* enteroinvasiva

EPEC *Escherichia coli* enteropatogénica

ETEC *Escherichia coli* enterotoxigénica

FAO Food and Agriculture Organization

FDA Food and Drug Administration

IMViC Indol, Rojo de metilo, Voges-Proskauer, Citrato de Simmons

ISO International Organization for Standardization

LPSN List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature

MNEC Meningitis asociada con *Escherichia coli*

MR-VP Rojo de metilo según Voges-Proskauer

mPCR Reacción en Cadena de la Polimerasa Múltiple

OMS Organización Mundial de la Salud

pb Pares de bases

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

RD Real Decreto

STEC *Escherichia coli* productora de toxina shiga

SUH Síndrome urémico hemolítico

TAE Tris, acetato, EDTA

TBX Triptona-Bilis-X-glucurónido

TE Tris, EDTA

UFC Unidad formadora de colonias

UPEC *Escherichia coli* uropatogénica

UV Ultravioleta

VRBD Violeta cristal-Rojo neutro-Bilis-Glucosa

I. INTRODUCCIÓN

1. INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS

En la actualidad, uno de los mayores objetivos a nivel mundial es conseguir la inocuidad de los alimentos, ya que el acceso a alimentos inocuos y nutritivos en cantidad suficiente es fundamental para mantener la vida y fomentar la buena salud.

Las enfermedades transmitidas por agua y alimentos contaminados suponen un importante peligro para la salud. Cada año millones de personas enferman y muchas mueren por consumir alimentos insalubres. Más concretamente, se estima que cada año enferman en el mundo por ingerir alimentos contaminados unos 600 millones de personas, lo que viene a ser casi 1 de cada 10 personas, y que 420 000 mueren por esta misma causa (OMS, 2017).

Las aguas y alimentos insalubres que contienen bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas nocivas causan más de 200 enfermedades, que van desde la diarrea hasta el cáncer, siendo las infecciones diarreicas las más frecuentes. Las enfermedades transmitidas por los alimentos son generalmente de carácter infeccioso o tóxico y son causadas por bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas que penetran en el organismo a través del agua o los alimentos contaminados. Respecto a las bacterias más comunes que provocan enfermedades vía alimentos contaminados, destacan *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli enterohemorrágica*, *Listeria* y *Vibrio cholerae*.

Los peligros que afectan al consumidor de los alimentos pueden aparecer en cualquier etapa de la cadena alimentaria. Por lo tanto, un control adecuado a lo largo de la cadena alimentaria es esencial. La Seguridad Alimentaria se garantiza a través de los esfuerzos combinados de todas las partes en la elaboración, almacenamiento y comercialización de los alimentos. Así pues, la Seguridad Alimentaria trata de la prevención, eliminación y control de los peligros transmitidos por los alimentos, desde el lugar de producción hasta el punto de consumo.

La nueva ISO 22000:2018 de Gestión de la Seguridad Alimentaria es una norma internacional que define los requisitos que debe cumplir un sistema de gestión de seguridad alimentaria para garantizar la inocuidad de los alimentos a lo largo de toda la cadena alimentaria desde la "granja hasta el tenedor".

La aceptabilidad final de un alimento viene determinada por el cumplimiento de determinados criterios.

2. CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS

En la Unión Europea y, por tanto, en España, los criterios microbiológicos existentes para un alimento se rigen por el Reglamento (CE) 2073/2005 y sus posibles modificaciones.

En este Reglamento se describe criterio microbiológico como aquel criterio que define la aceptabilidad de un producto, un lote de productos alimenticios o un proceso, basándose en la ausencia, presencia o número de microorganismos, y/o en la cantidad de sus toxinas/metabolitos, por unidad de masa, volumen, superficie o lote.

Estos criterios microbiológicos se dividen en dos clases: los criterios de seguridad alimentaria y los criterios de higiene de proceso. Los criterios de seguridad alimentaria definen la aceptabilidad de un producto o lote para poder ser comercializados. Los microorganismos y toxinas que se deben controlar son: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, enterotoxinas estafilocócicas, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* o histamina.

En cuanto a los criterios de higiene del proceso, estos indican si el funcionamiento del proceso de producción es aceptable. En este caso, se tiene en cuenta principalmente el análisis de: *Salmonella*, *Escherichia coli* y el recuento tanto de enterobacterias como de colonias aerobias.

2.1. Aguas: calidad microbiológica

La Unión Europea, a partir de la EFSA, destaca 5 factores de riesgo en los cultivos agrícolas que pueden dar lugar a posibles contaminaciones microbiológicas (**Figura 1**). Uno de estos factores es el uso de agua contaminada durante las prácticas agrícolas. Principalmente, la contaminación del agua es causada por el hombre, alterando la calidad y propiedades de esta, hasta tal punto de convertirla en inadecuada para usos agrícolas, así como para el consumo humano. De este modo, cuando el agua entra en contacto con los cultivos (frutas y hortalizas), la posibilidad de contaminación de estos productos por microorganismos patógenos depende de la calidad de la misma y, si los microorganismos sobreviven en dichos alimentos, pueden causar enfermedades en el consumidor (FDA, 1998).



Figura 1. Principales factores de riesgo con respecto a patógenos microbianos en frutas y hortalizas frescas identificados por la EFSA.

Los patógenos asociados principalmente con la transmisión a través de agua de baja calidad son bacterias como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Shigella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* y virus, como por ejemplo norovirus (FDA, 1998; DOUE 2017/C 163/01). *E. coli* se utiliza habitualmente como indicador biológico de la contaminación fecal y como indicador bacteriano tradicional para propósitos de monitoreo en el tratamiento del agua ya que unos niveles elevados de *E. coli* pueden ser indicativos de una mayor probabilidad de presencia de patógenos (Alcalde-Sanz y Gawlik, 2017; DOUE 2017/C 163/01).

En España, entre el año 1999 y 2006, se declararon 433 brotes con mecanismo de transmisión hídrico, con un total de 24.610 casos, 213 hospitalizados y 2 defunciones (BES,

2008). Asimismo, según los últimos datos ofrecidos por el Instituto Nacional de Epidemiología, en 2015 se notificaron un total de 21 aislamientos de *Escherichia coli* verotoxigénica. En este mismo año, se identificaron 46 casos confirmados de infección de *E. coli* productora de toxina shiga (STEC) procedente de alimentos y aguas. Por último, se notificaron tres brotes producidos por *E. coli*, dos de ellos por el serotipo O157: H7 y el otro por el serotipo O126: H27 (BES, 2015).

Así pues, debido a la posible contaminación del agua y posterior transmisión de enfermedades, existe la necesidad de establecer unos criterios y parámetros microbiológicos en esta. En cuanto al agua de consumo humano, los parámetros microbiológicos que se necesitan controlar como criterios de higiene del proceso y/o seguridad alimentaria son el recuento de aerobios mesófilos, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, enterococos, *Pseudomonas aeruginosa* y estreptococos (RD 1798/2010; RD 140/2003).

Sin embargo, por lo que respecta al agua de riego, existe mayor incertidumbre en los criterios microbiológicos. El agua de riego puede provenir de aguas de superficie, reservas de agua subterránea, agua de lluvia, aguas residuales y reutilizadas, aguas desinfectadas y aguas de la red de suministro municipal (DOUE 2017/C 163/01). Además, según el tipo de cultivo en el que se vaya a emplear el agua, los criterios difieren unos de otros. Por tanto, no encontramos una normativa microbiológica que englobe de forma general el agua de riego. La FAO en su guía 'Water quality for agriculture', únicamente hace mención al recuento de coliformes como parámetro microbiológico de calidad del agua de riego (Ayers y Westcot, 1985). En los últimos años, ante la escasez mundial de agua potable, las aguas tratadas y reutilizadas están sirviendo de ayuda para cubrir la demanda hídrica necesaria. En 2016, el 41 % del agua depurada en España se destinó a la agricultura (AEAS, 2016). Por este motivo, gran parte de la normativa microbiológica y guías existentes para el agua de riego hace referencia a este tipo de aguas reutilizadas y depuradas. A nivel nacional, para el uso agrícola de agua reutilizada depurada, el único parámetro microbiológico que se necesita controlar es el recuento de *Escherichia coli* y, en ciertas ocasiones, el recuento de *Legionella* spp. (RD 1620/2007).

3. ENTEROBACTERIAS EN LOS ALIMENTOS

El recuento total de enterobacterias constituye uno de los parámetros a analizar más importantes de seguridad alimentaria e inocuidad de los alimentos. Este se utiliza como indicador de contaminación fecal y como indicador de buenas prácticas de fabricación.

La familia *Enterobacteriaceae* constituye un grupo heterogéneo y grande de bacterias Gram negativas. Su nombre se debe por su hábitat habitual en el tubo digestivo, pudiéndose encontrar también en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la microbiota intestinal de animales y humanos.

Respecto a las enfermedades de transmisión alimentaria, dentro de esta familia encontramos diversos microorganismos que pueden llegar a ser patógenos para el ser humano. Algunos de los más relevantes son *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Klebsiella* o *Citrobacter*.

Las enterobacterias tienen gran importancia en el ámbito hospitalario, donde pueden causar infecciones respiratorias, urinarias, de heridas y del sistema nervioso central. La infección por estas bacterias es frecuente en el tubo digestivo, en la orofaringe, el aparato genitourinario y la piel (Puertas y Mateo, 2010).

3.1. Clasificación actual del género *Escherichia*

Dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, encontramos el género *Escherichia*. En la actualidad el género *Escherichia* agrupa 8 especies según 'List of prokaryotic names with standing in nomenclature' (LPSN, 2018):

- *Escherichia adecarboxylata*
- *Escherichia albertii*
- *Escherichia blattae*
- *Escherichia coli*
- *Escherichia fergusonii*
- *Escherichia hermannii*
- *Escherichia marmotae*
- *Escherichia vulneris*

3.2. *Escherichia coli*: el organismo y sus características

Escherichia coli es un microorganismo no esporulado, baciliforme, es decir, con forma de bastón, por lo general de 1-3 μm de largo y 0,5 μm de diámetro. Aunque pueden ser inmóviles, la mayoría de estos microorganismos son móviles por flagelos peritricos que rodean a la célula.

Estas bacterias, además de ser anaerobias facultativas, también son catalasa positiva y oxidasa negativa, siendo la mayoría capaces de fermentar la lactosa y la glucosa y producir indol a partir de triptófano.

Se trata de un organismo mesófilo que puede crecer a temperaturas que oscilan entre 7 °C y 50 °C, con una temperatura óptima de 37 °C. Algunas pueden proliferar en alimentos ácidos, hasta a un pH de 4,4 y en alimentos con una actividad de agua (a_w) mínima de 0,95 (OMS, 2018).

3.2.1. Poder patógeno

La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas. Sin embargo, algunas de ellas pueden causar graves enfermedades de transmisión alimentaria (OMS, 2018). Las *E. coli* patógenas se distinguen de otras *E. coli* por su capacidad de provocar graves enfermedades como resultado de su información genética para la producción de toxinas, capacidad de adhesión e invasión de células huéspedes, interferencia con el metabolismo celular y destrucción de tejidos (FAO, 2017).

La bacteria *Escherichia coli* se transmite al hombre principalmente por el consumo de agua y alimentos contaminados, como productos de carne elaborada y cocida de manera insuficiente, productos lácteos y jugos no pasteurizados, frutas y hortalizas crudas contaminadas, además de un manejo y almacenamiento insalubre de los alimentos preparados; siendo la fuente de contaminación del agua y de los alimentos las heces humanas y de animales (FAO, 2017; OMS, 2018).

Las cepas patógenas de *E. coli* se clasifican según su mecanismo de patogenicidad y síndromes clínicos (Rodríguez-Ángeles, 2002; Molina y Eslava, 2015). Esta clasificación se recoge en la **Tabla 1**, siendo las diarreicas las cepas patógenas más comunes.

Tabla 1. Clasificación de las cepas patógenas de *E. coli* según sus síndromes clínicos.

Síndromes clínicos	<i>Escherichia coli</i> patógenas
Enteritis/enfermedad diarreica	<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC) <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC) <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC) <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC) <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC) <i>E. coli</i> adherente difusa (DAEC2)
Infecciones del tracto urinario	<i>E. coli</i> uropatógena (UPEC)
Sepsis/meningitis	<i>E. coli</i> MNEC

***E. coli* enteropatógena (EPEC)**

Las cepas de *E. coli* del grupo EPEC presentan la capacidad de adherirse a células HEP-2 (línea celular de carcinoma faríngeo humana) formando microcolonias. Después de formar las microcolonias, comienza una segunda fase de adherencia, con la destrucción de las microvellosidades intestinales.

El cuadro clínico que produce EPEC se manifiesta con diarrea aguda, la cual puede ser leve o grave, con vómito, fiebre baja y mala absorción. Puede causar la muerte en el transcurso de días si no se trata adecuadamente, puesto que puede dar lugar a diarrea secretora persistente, deshidratación y muerte.

Es considerada una de las principales etiologías de diarrea infantil en países en desarrollo, afectando principalmente a niños menores de 6 meses y menores de 2 años.

***E. coli* enterohemorrágica (EHEC)**

El serotipo O157:H7 es considerado el prototipo del grupo EHEC, el cual incluye cepas de diferentes serotipos que presentan las mismas características clínicas, epidemiológicas y patógenas que del O157:H7. Las cepas de este grupo tienen la capacidad de elaborar una o más citotoxinas, conociéndose como *E. coli* productora de toxina Shiga, por su semejanza con las toxinas producidas por *Shigella dysenteriae*.

La capacidad toxigénica de las cepas da lugar a colitis hemorrágica y diarrea con sangre, donde un 10 % de los infectados puede desarrollar el síndrome urémico hemolítico (SUH), con una tasa de letalidad de 3-5 %.

El EHEC se relaciona con brotes causados por alimentos en países desarrollados, siendo el SHU la causa más común de insuficiencia renal aguda en los niños de corta edad.

***E. coli* enterotoxigénica (ETEC)**

Las cepas de ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias, sintetizando enterotoxinas termolábiles (LT) o termoestables (ST) como principal mecanismo de patogenicidad.

Los síntomas de este grupo se caracterizan por diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco y sin pus. En ocasiones, el cuadro clínico de estas bacterias es similar al que se observa en el caso del cólera.

Las cepas ETEC son una causa importante de diarrea en niños lactantes menores de cinco años en países en desarrollo y una de las causas más frecuente de diarrea en individuos de países industrializados que viajan a zonas menos desarrolladas del mundo.

E. coli enteroagregativa (EAEC)

En esta categoría, las cepas se adhieren a la mucosa intestinal por medio de fimbrias, seguido de la producción de moco y, finalmente, liberación de citocinas, exfoliación celular, secreción intestinal e inducción de la inflamación de la mucosa.

Las características clínicas de este tipo de infección, es una diarrea secretora acuosa con moco y sangre, y febrícula. Además, un gran porcentaje de pacientes presentan lactoferrina fecal detectable, siendo este un indicador sensitivo de leucocitos fecales.

El EAEC se trata de un causante frecuente de diarrea acuosa en turistas que viajan a países en desarrollo y de niños y adultos infectados con VIH.

E. coli enteroinvasiva (EIEC)

El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon mediante la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa, posterior entrada por endocitosis a la célula, donde se reproducen hasta destruir las células epiteliales.

Las manifestaciones clínicas asociadas con esta infección es diarrea acompañada de moco y sangre, dolor abdominal tipo cólico y fiebre. En algunos casos, los síntomas son indiferenciables de los que produce ETEC.

A menudo, las cepas de este grupo están más asociadas con brotes que con casos aislados, produciéndose la transmisión a partir de persona a persona o ingestión de alimentos y agua contaminada, llegando a ser un patógeno importante en niños mayores de seis meses.

E. coli adherente difusa (DAEC2)

Se sabe poco del mecanismo de patogenicidad de las cepas DAEC2, pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, la cual está involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. Además, tienen la capacidad formar estructuras protuberantes que les confieren protección.

Los principales síntomas que se presenta este tipo de infección es diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos. Suele ser típica en niños de entre 4 y 5 años de edad.

4. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN POR MÉTODOS NORMALIZADOS

En la Unión Europea y, por tanto, en España, los criterios microbiológicos existentes para alimentos se rigen por el Reglamento (CE) 2073/2005 y sus modificaciones. De acuerdo con el artículo 2 del citado Reglamento, el criterio microbiológico es el criterio que define la aceptabilidad de un producto, un lote de productos alimenticios o un proceso, basándose en la ausencia, presencia o número de microorganismos y/o en la cantidad de toxinas/metabolitos por unidad de masa, volumen, superficie o lote. Esta legislación establece dos clases: Criterios de seguridad alimentaria y Criterios de higiene del proceso. A su vez, de cada criterio la legislación establece: Categoría de Alimento para el que rige, Microorganismos o sus toxinas o metabolitos, Plan de toma de muestras, Límites microbiológicos, Método analítico de referencia, y Fase del proceso de fabricación o comercialización en la que se aplica el criterio. Además, este Reglamento incluye las Normas para la toma de muestras y preparación de estas para las pruebas y pautas para la interpretación de resultados.

Para analizar cada parámetro con el método analítico de referencia, se utilizan técnicas de recuentos microbiológicos y análisis de presencia/ausencia con los cuatro pasos fundamentales de preenriquecimiento, enriquecimiento, aislamiento e identificación.

Debido a la escasa resistencia de algunas bacterias a condiciones ambientales hostiles, o a los tratamientos de elaboración y conservación de los alimentos, la tasa de aislamiento está muy influenciada por la técnica empleada, la naturaleza de la muestra, el número de microorganismos presentes en la misma y el estado fisiológico en que se encuentren. Por este motivo, las muestras se someten a una etapa de preenriquecimiento en un medio líquido no selectivo para lograr la revivificación de los microorganismos lesionados, adquirir condiciones fisiológicas adecuadas e incrementar la vitalidad y número de microorganismos. A continuación, con la etapa de enriquecimiento en medio líquido selectivo se estimula y favorece el crecimiento del microorganismo deseado y se restringe la proliferación de otros. El aislamiento se realiza mediante triple estría en medios sólidos selectivos, con el fin de restringir todavía más el crecimiento de otros microorganismos y proliferar el crecimiento del deseado. Además, la composición de los medios selectivos permite el crecimiento de colonias con aspecto característico. Tras obtener las colonias del patógeno, se siembran en un medio de mantenimiento para conseguir un cultivo en masa. Posteriormente se realizarán los ensayos bioquímicos para su identificación.

Si todo este protocolo de aislamiento e identificación es útil para la detección de microorganismos en los alimentos, también será adecuado para la investigación de la presencia de estos microorganismos en las aguas utilizadas para la elaboración de estos alimentos, desde las aguas de riego para vegetales, hasta las aguas utilizadas en limpieza y preparación de determinados alimentos.

Los métodos culturales suponen un proceso demasiado largo (5 días) para la identificación de microorganismos en alimentos, lo que constituye un riesgo para el consumidor. Recientemente, se están desarrollando técnicas moleculares normalizadas, más rápidas y específicas, para la detección e identificación de microorganismos. Estas técnicas se basan en el estudio del DNA genómico bacteriano y surgieron para poder detectar microorganismos de difícil crecimiento en cultivos (Palomino y González, 2014).

Una de las técnicas moleculares más utilizadas es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La PCR es un método enzimático que permite copiar de forma exponencial una zona concreta de un genoma pudiéndose obtener millones de copias de ella (Dasí y Ledesma, 1994).

II. OBJETIVOS

Las enfermedades transmitidas por agua y alimentos contaminados suponen un importante peligro para la salud. Cada año millones de personas enferman y muchas mueren por consumir alimentos insalubres. Más concretamente, se estima que cada año enferman en el mundo por ingerir alimentos contaminados unos 600 millones de personas, lo que viene a ser casi 1 de cada 10 personas, y que 420 000 mueren por esta misma causa (OMS, 2017).

Una de las bacterias más comunes que provocar enfermedades vía alimentos o aguas contaminadas son las cepas patógenas de *Escherichia coli*. Por este motivo, el **objetivo principal** de este trabajo es **determinar la presencia de cepas de *Escherichia coli* en muestras de aguas de riego de diferentes canales agrícolas de la provincia de Valencia.**

Para la detección e identificación de *E. coli* se han utilizado **técnicas culturales y técnicas moleculares** a partir de métodos normalizados o basados en métodos normalizados.

La necesidad de disponer de técnicas lo suficientemente rápidas y específicas aplicadas al diagnóstico de la presencia de estos microorganismos en aguas de riego, nos ha conducido a plantearnos los siguientes objetivos:

1. Realizar un muestreo en diferentes canales agrícolas de la provincia de Valencia para valorar la carga de enterobacterias en muestras de aguas de riego.
2. Determinar la presencia o ausencia de *Escherichia coli* en las muestras de aguas de riego por métodos culturales basados en métodos normalizados.
3. Determinar la presencia o ausencia de *Escherichia coli* en las muestras de aguas de riego por métodos moleculares basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
4. Conocer el límite de detección de la técnica molecular PCR para *Escherichia coli*.
5. Valorar conjuntamente los resultados de los métodos culturales y moleculares.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MUESTRAS

Se analizaron un total de **15** muestras de agua de riego. Las muestras se tomaron en zonas de riego de la Comunidad Valenciana, más concretamente en Alboraya y Vera. Todas ellas fueron procesadas en las 24 horas posteriores a su recolección. Los análisis se realizaron entre los meses de febrero y junio.

2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS DE RIEGO POR MÉTODOS CULTURALES

2.1. Preparación de las muestras

Las muestras se procesaron siguiendo el método de filtración por membrana para aguas con bajo contenido de microbiota, basada en la norma ISO 9308-1:2014. Se filtraron 225 mL de agua en membranas de 0,45 μm (Ref. Sartoriud Stedim Biotech), las cuales se introdujeron en una bolsa estéril de Stomacher donde se añadió 225 mL de Agua de Peptona Tamponada (APT) (Ref. 02-277-500, Scharlau) y se homogenizó al Stomacher durante un minuto.

2.2. Recuento de enterobacterias

Para el recuento de enterobacterias, se siguió el método horizontal de detección y enumeración de *Enterobacteriaceae* sin preenriquecimiento, el cual viene detallado en la norma ISO 21528/2:2017.

Tras incorporar los 225 mL de APT y homogeneizar, se pipeteó 1 mL a un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril. Se procedió a realizar diluciones decimales seriadas y se sembró 1 mL de cada dilución en profundidad por duplicado en placas Petri con medio Agar VRBD (Ref. 1.10275.0500, Merck KGaA) y se llevaron a incubar durante 24-48 horas en estufas a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el recuento de Enterobacterias con ayuda de un contador de colonias.

2.3. Aislamiento e identificación de *Escherichia coli* por métodos culturales

Para el aislamiento e identificación del microorganismo *E. coli* en aguas no existe un método normalizado único o de referencia, por lo que durante nuestro trabajo se elaboró un protocolo propio y específico basado en diversas normas ISO. Se tuvo en cuenta la norma ISO 21150:2015, la cual proporciona directrices para la detección e identificación de *Escherichia coli* en productos cosméticos; la norma ISO 9308-3:1998 que especifica un método para la detección y recuento de *E. coli* en aguas superficiales y residuales; y por último la norma ISO 16654:2001 que tiene como objeto la detección de *Escherichia coli* O157.

El protocolo consta principalmente de cuatro etapas sucesivas: preenriquecimiento en medio líquido no selectivo, enriquecimiento en medio líquido selectivo, aislamiento por medios sólidos selectivos e identificación por pruebas bioquímicas.

Tras la toma de muestra, la primera etapa o preenriquecimiento consiste en la incorporación de APT a la bolsa estéril de Stomacher con las membranas de filtración, tras una homogeneización manual se incubó a 37 °C \pm 1 °C durante 24 horas.

Después del período de incubación y a partir del cultivo obtenido, se realiza el enriquecimiento en medio líquido selectivo. En esta etapa, se realiza una siembra en un tubo

de ensayo con Caldo bilis verde brillante al 2 % (Ref. 274000, Difco) o más comúnmente conocido como Caldo Verde Brillante y se incuba a $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas.

Pasado el tiempo de incubación llegamos a la tercera etapa o aislamiento por medios sólidos selectivos. Se realiza una siembra por el método de triple estría en dos medios selectivos a partir del caldo de enriquecimiento. El primer medio seleccionado en nuestro protocolo es el triptona-bilis-x-glucurónido o agar TBX (Ref. 01-619-500, Scharlau), que permite diferenciar las colonias típicas de *Escherichia coli* que crecen en este medio por su color azul. El segundo medio utilizado es el agar Endo (Ref. 01-589-500, Scharlau), en el cual las colonias típicas de *Escherichia coli* se muestran de un color verde brillante. Ambos medios se incuban a $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas.

Finalizada la incubación, se examinan las placas para identificar la presencia de colonias sospechosas y, en caso de que el resultado sea positivo, se procede a la cuarta etapa o la identificación. Para ello se seleccionan entre 5 y 6 colonias sospechosas de *Escherichia coli* de cada placa, se siembran en placas de agar nutritivo, en este caso Plate-Count-Agar (Ref. 01-161-500, Scharlau), y se incuban a $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, a partir de las cepas sospechosas se realizará la identificación mediante tinción de Gram, la prueba de la catalasa, pruebas bioquímicas IMViC y tira API sucesivamente, siempre que el resultado sea el esperado.

Tinción de Gram

Esta prueba se utiliza para diferenciar la morfología celular bacteriana, así como para una primera aproximación a la diferenciación bacteriana según sean las bacterias gram positivas o gram negativas. Las instrucciones para esta prueba vienen detalladas en la norma ISO 21148:2017. Tras realizar el proceso de tinción con los correspondientes reactivos (violeta de genciana, lugol, alcohol 70 % y fucsina), se observan los resultados en el microscopio. Las bacterias gram positivas manifiestan un color violeta, mientras que las gram negativas, como *Escherichia coli*, presentan un color rosa. Esta diferencia de color se debe a la distinta composición de la pared celular en ambos tipos de bacterias. Además, mediante esta prueba podemos distinguir las bacterias por su morfología, siendo *E. coli* un microorganismo baciliforme.

Prueba de la catalasa

La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias. Se coloca una gota de agua oxigenada o H_2O_2 sobre un portaobjetos y se suspende la bacteria en esta. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva, como es el caso de *Escherichia coli*.

Pruebas bioquímicas o IMViC

Se realiza una batería de pruebas bioquímicas a las cepas Gram negativas y catalasa positivas. Esta batería consiste en una serie de 4 pruebas bioquímicas que se emplean fundamentalmente para la identificación de enterobacterias. Las cuatro pruebas son:

Prueba de Indol:

En esta prueba se determina si la bacteria posee la enzima triptofanasa. Se realiza una suspensión de una colonia sospechosa en un tubo con 5 mL de medio DEV Caldo Triptófano (Ref. 1.10694.0500, Merck KGaA) y se incuba a $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Después de la incubación, se añade 1 mL del reactivo Kovacs. La formación de un anillo rojo superficial indica la formación de indol y, por tanto, prueba positiva; mientras que un anillo amarillo/marrón indica prueba negativa. En el caso de *E. coli* la prueba debe ser positiva.

Prueba de rojo de metilo y Voges-Proskauer:

Estas pruebas bioquímicas se utilizan para determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar la glucosa por la vía ácido mixta (producción de ácido) o por la vía butanodiólica (producción de acetoina).

En este caso, para realizarlas se utiliza el mismo medio de cultivo, el Caldo MR-VP (Ref. 1.05712.0500, Merck KGaA). Se realiza una suspensión aproximadamente del contenido de un asa de la colonia sospechosa en un tubo estéril que contiene 6 mL del medio indicado y se incuba a 37 ± 1 °C durante 24 horas. Finalizada la incubación, se divide el contenido en dos tubos de ensayo, donde se realizarán las dos pruebas por separado.

En el primer tubo realizamos la prueba del rojo de metilo, cuyo fundamento es la detección de la fermentación ácido-mixta. El rojo de metilo, que es un indicador de pH que actúa entre pH 4,2 y 6,3, determinando la formación de ácidos orgánicos. Tras añadir varias gotas de rojo de metilo, una coloración roja indica prueba positiva, como es el caso de *E. coli*.

Por otra parte, en el segundo tubo se realiza la prueba de Voges-Proskauer. Esta prueba detecta la fermentación butanodiólica, produciendo acetoina. Así pues, se añaden varias gotas de KOH y la misma cantidad de α -naftol. Una coloración roja indicará prueba positiva. Mientras que en el caso de *E. coli*, donde la prueba debe ser negativa, presentará un color amarillo/marrón.

Prueba de citrato:

La prueba del citrato es una prueba visual y se utiliza para determinar si un microorganismo es capaz de crecer teniendo citrato como única fuente de carbono y de energía. El medio utilizado es el Agar Citrato de Simmons (Ref. 01-177-500, Scharlau), el cual contiene azul de bromotimol como indicador de pH. En esta prueba se siembra en la superficie por estría y se incuba a 37 ± 1 °C durante 24 horas. Tras el tiempo de incubación se interpretan los resultados, siendo positivo si el medio ha virado a color azul y muestra turbidez debido al crecimiento bacteriano, o negativo si no ha cambiado de color, como ocurre con *E. coli*.

Tira API

Si tras realizar la batería de pruebas bioquímicas IMViC, los resultados de estas han sido (++--), procedemos a realizar la última prueba de identificación. La tira API (batería miniaturizada API 20 E, bioMérieux) es un sistema estandarizado que permite una identificación rápida de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias gram negativos no exigentes. Esta prueba en especial se compone en 21 tests bioquímicos miniaturizados que luego se compararan con una base de datos. Para llevar a cabo esta prueba, primero debemos sembrar la colonia sospechosa en 6 mL de agua destilada estéril. Tras crear una atmósfera húmeda en la galería, se rellenan los pocillos de la tira con la suspensión bacteriana con ayuda de una pipeta Pasteur y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Posteriormente, se incuba la galería a 37 ± 1 °C durante 24 h. Para leer los resultados, también se siguen las instrucciones en lo que respecta a los reactivos y, finalmente, se introducen los resultados en la base de datos del fabricante con el fin de identificar la bacteria. Cabe destacar que esta tira API presenta un 92,8 % de acierto.

Las cepas identificadas como *E.coli* y aisladas se conservaron en crioviales a -40 °C hasta su próxima utilización.

3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *E. coli* EN AGUAS DE RIEGO POR MÉTODOS MOLECULARES: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

3.1. Cepa de referencia

Durante este trabajo se utilizó *Escherichia coli* 101 como cepa de referencia procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

3.2. Extracción de DNA

Para la extracción de DNA durante el estudio se utilizaron dos kits de extracción. En una primera parte del trabajo se empleó el kit GenElute (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante para bacterias gram negativas. Y en la segunda parte se utilizó el kit Realpure Spin Food Stool Bacterias (Real), el cual no diferenciaba entre bacterias gram positivas y negativas su procedimiento.

La extracción de DNA se realizó para la cepa de referencia, las cepas aisladas en las muestras de agua de riego y de las alícuotas de enriquecimiento (Caldo Verde Brillante) tras su incubación.

3.3. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

El procedimiento utilizado en nuestro trabajo para la Reacción en cadena de la Polimerasa en la detección de *Escherichia coli* está basado en la norma ISO 22174:2005, la cual describe los requisitos generales de la técnica, así como en la norma ISO 20838:2006 donde se detallan los requisitos para la amplificación y la detección de patógenos en alimentos para los métodos cualitativos. Por otro lado, se ha utilizado la norma ISO/TS 20836:2005 para la puesta a punto del termociclador utilizado en esta técnica.

Aunque el objetivo de este trabajo era identificar y detectar una única especie (*Escherichia coli*) mediante una PCR simple, esta investigación forma parte de otro estudio el cual está centrado en optimizar las condiciones de una PCR múltiple para varias especies. Así pues, para la realización de este trabajo se revisaron diferentes citas bibliográficas sobre las condiciones empleadas por otros autores en PCR múltiples (mPCR). Finalmente, se decidió tomar como punto de partida las condiciones descritas por Kim y col. en 2006 (35 ciclos), quienes utilizaron los iniciadores diseñados por McDaniels y col. en 1996 GADA F (5'-ACCTGCGTTGCGTAAATA-3') y GADA R (5'-GGGCGGGAGAAGTTGATG-3') que amplifican un fragmento de 670 pb de DNA cromosómico, a una temperatura de acoplamiento de 55 °C. Como el acoplamiento de los iniciadores es el paso más específico de la técnica, en este trabajo preparamos un gradiente de temperaturas para aumentarla tras observar los resultados.

En este estudio, la PCR simple se llevó a cabo en un termociclador siguiendo las condiciones de temperatura, tiempo y ciclos detallados en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Condiciones de amplificación para *Escherichia coli*.

Fases	Número de ciclos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial	1	2 minutos	94 °C
Desnaturalización	35	30 segundos	94 °C
Acoplamiento		30 segundos	58 °C
Polimerización		60 segundos	72 °C
Polimerización final	1	7 minutos	72 °C

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 29 μL con las cantidades de cada reactivo que se detallan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Reactivos empleados para la PCR simple de *Escherichia coli*.

Reactivos	Cantidad
Tampón	2,9 μL
MgCl ₂	1,74 μL
dNTP's	0,232 μL
Iniciadores (GADA F/GADA R)	1 μL + 1 μL
Taq polimerasa BIOTAQ DNA Polymerase (Bioline)	0,5 μL
H ₂ O	20,628 μL
DNA	1 μL

En cada PCR se preparó un control positivo (C+) y un control negativo (C-). Para el C+ se utilizó el DNA de la cepa *Escherichia coli* 101 y como C- agua destilada estéril en lugar de DNA.

Por último, los productos de la PCR simple se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % en tampón TAE 1x y Red Safe al 5 % (**Tabla 4**). Para la electroforesis se utilizó un voltaje comprendido entre 85-90 V durante aproximadamente una hora. Transcurrido este tiempo, el gel se observó mediante un transiluminador Vilber Lourmat con luz UV.

Tabla 4. Reactivos empleados en la electroforesis.

Reactivos	Cantidad
TAE 1x	100 μ L
Agarosa	1,2 %
Red Safe	5 μ L
Marcador 100 pb	5 μ L
Producto PCR	5 μ L

3.4. Límite de detección de la PCR para *Escherichia coli*

El cálculo de los límites de detección de PCR para *Escherichia coli* se realizó a partir de diluciones decimales seriadas de un cultivo de noche de la cepa de referencia. Para ello, se siguió la norma ISO 6887-1:2017, que describe los pasos para la preparación de la suspensión inicial y diluciones decimales.

A partir de un cultivo puro de la cepa *Escherichia coli* 101, se realiza una siembra en masa en el medio Plate-Count-Agar y se lleva a incubar. Terminado el tiempo de incubación, se realiza una suspensión en el medio de enriquecimiento CVB, el cual se incubará a 37 ± 1 °C durante 24 horas. Tras este tiempo, se pipetea 1 mL del cultivo a un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril. De esta forma, se realizarán sucesivamente las diluciones decimales seriadas, hasta la dilución 10^0 UFC/mL o una única célula.

Para cada dilución, se pipetea 0,1 mL de la dilución correspondiente y se realiza una siembra en superficie con ayuda de un asa de Drigalsky en el medio selectivo Endo por duplicado. Todas las placas de llevarán a incubar a 37 ± 1 °C durante 24 horas. Posteriormente, se realizará un recuento de microorganismos con el fin de verificar que nuestro cultivo inicial presentaba una carga microbiana de 10^8 UFC/mL.

Por último, por cada dilución se pipetea 1 mL y se introduce en un Eppendorf de 2 mL, por duplicado. Estos se congelarán hasta su posterior utilización para extracción del DNA. El procedimiento a partir de aquí es el mismo que el descrito en el apartado 3.2 y 3.3 de este punto.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se han analizado un total de 15 muestras de aguas de riego de dos canales agrícolas distintos. De las 15 muestras analizadas, 9 muestras pertenecían a canales agrícolas de la zona de Alboraya, y las otras 6 a la zona de Vera.

1. RECuento DE ENTEROBACTERIAS

El recuento de enterobacterias en aguas es un gran indicador de contaminación en estas. Especialmente, el recuento de *E. coli* se utiliza como principal indicador de contaminación fecal en aguas (Alcalde-Sanz y Gawlik, 2017). Para valorar la carga de enterobacterias de las muestras de agua, se realizó un recuento en medio VRBD y siguiendo el protocolo de la norma ISO 21528/2:2017 (Método horizontal para la detección y enumeración de enterobacterias) y detallado en este trabajo en el apartado 2.2. de Material y Métodos. Los resultados del recuento se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Resultados del recuento de enterobacterias.

Origen muestras agua de riego	Recuento enterobacterias
Alboraya	$2,81 \times 10^4$ UFC/mL
Vera	$6,64 \times 10^4$ UFC/mL

Analizando los resultados del recuento de enterobacterias, observamos que las muestras de Vera poseen mayor número de bacterias, aunque la diferencia entre el recuento de ambas muestras es bastante ligera. El valor de la media de ambas es de $4,73 \times 10^4$ UCF/mL. Como se puede apreciar tanto en las muestras de Alboraya como en las de Vera, los valores del recuento superan los límites establecidos en España y a los aconsejados por la Unión Europea para las aguas de riego, siendo los valores máximos permitidos entre 100-1.000 UFC/100 mL (RD 1620/2007; Alcalde-Sanz y Gawlik, 2017). Así pues, el uso de estas aguas de riego contaminadas para el uso agrícola y/o su contacto directo con los alimentos puede suponer un gran riesgo para la salud humana si no se realiza algún tratamiento previo a su consumo.

2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli* POR MÉTODOS CULTURALES

El aislamiento e identificación de las cepas de *E. coli* a partir de las muestras de agua se ha realizado siguiendo el protocolo detallado en el apartado 2.3. de Material y Métodos basado en las normativas ISO 21150:2015, 9308-3:1998 y 16654:2001.

Tras la filtración de 225 mL de la muestra a través de membranas de $0,45 \mu\text{m}$ y en condiciones de asepsia, las membranas se llevaron a preenriquecimiento con 225 mL de APT y se incubaron a $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ durante 24 horas. Transcurrido este tiempo de incubación, se realizó la siembra en los medios selectivos agar TBX y agar Endo. Los resultados obtenidos con los medios selectivos utilizados tras $37 \pm 1 \text{ °C}$ y 24 horas de incubación, se detallan en la **Tabla 6**.

Se utilizaron dos medios de aislamiento selectivo, agar TBX y agar Endo, con el objetivo de determinar cuál de los dos era más eficaz para aislar el microorganismo. A partir del medio selectivo TBX, hemos logrado aislar e identificar *Escherichia coli* en 40 % de las muestras de agua, mientras que con el medio selectivo Endo se han aislado en el 33,33 % de las muestras. El número de aislados fue un total de 10 cepas de *Escherichia coli* en 10 de las muestras, lo que supone una detección de este microorganismo en el 66,67 % de las muestras de agua. El elevado porcentaje de aislados nos indica la presencia de contaminación fecal en el agua causada en especial por el hombre y las actividades agrícolas.

Tabla 6. Resultados del aislamiento de *Escherichia coli* en medios selectivos.

Muestra	Medio selectivo de aislamiento	
	TBX	Endo
W ₁	-	+
W ₂	-	+
W ₃	+	-
W ₄	-	-
W ₅	+	-
W ₆	-	+
W ₇	+	+
W ₈	-	+
W ₉	-	-
W ₁₀	+	-
W ₁₁	+	-
W ₁₂	-	-
W ₁₃	-	-
W ₁₄	-	-
W ₁₅	+	-
$\Sigma = 15$	$\Sigma = 6$	$\Sigma = 5$

A partir de los resultados obtenidos, observamos la **importancia de la utilización conjunta de ambos medios selectivos** (TBX y Endo), puesto que en muestras donde en un medio fueron negativos los resultados, en el otro fueron positivos y al revés, coincidiendo solamente en un aislado de *E. coli* en los dos medios.

Después de la etapa de aislamiento con medios selectivos, se llevó a cabo la fase de identificación y confirmación, detallado en el apartado 2.3. de Material y Métodos. Para la identificación de las cepas aisladas, se realizaron las pruebas bioquímicas establecidas en la ISO 21150:2015, 9308-3:1998 y 16654:2001, todas las cepas gram negativas, catalasa positivas e IMViC +++ (**Figura 2**), fueron identificadas por la batería miniaturizada API20E (**Figura 3**).



Figura 2. Lectura de las pruebas bioquímicas IMViC para *Escherichia coli*: De izquierda a derecha: Citrato -, Indol +, Rojo de metilo +, Voges-Proskauer -.



Figura 3. Identificación de *Escherichia coli* mediante tira API20E.

En la **Tabla 7** se agrupan las muestras de agua estudiadas en las que se aislaron colonias sospechosas y confirmada su identificación por las pruebas bioquímicas realizadas.

Tabla 7. Cepas de *Escherichia coli* aisladas e identificadas en las muestras de agua de riego estudiadas.

Muestras	Medio	IMViC	API 20E
W ₁	TBX	+ / + / - / -	-
	Endo	+ / + / - / -	<i>E. coli</i> biotipo 1
W ₂	TBX	+ / + / - / -	-
	Endo	+ / + / - / -	<i>E. coli</i> biotipo 1
W ₃	TBX	+ / + / - / -	<i>E. coli</i> biotipo 1
	Endo	+ / + / + / -	-
W ₄	TBX	-	-
	Endo	+ / + / + / -	-
W ₅	TBX	+ / + / - / -	<i>E. coli</i> biotipo 1
	Endo	- / + / - / +	-
W ₆	TBX	-	-
	Endo	+ / + / - / -	<i>E. coli</i> biotipo 1
W ₇	TBX	+ / + / - / -	<i>E. coli</i> biotipo 1
	Endo	+ / + / - / -	<i>E. coli</i> biotipo 1
W ₈	TBX	-	-
	Endo	+ / + / - / -	<i>E. coli</i> biotipo 1
W ₉	TBX	-	-
	Endo	-	-
W ₁₀	TBX	+ / + / - / -	<i>E. coli</i> biotipo 1
	Endo	+ / + / - / -	-
W ₁₁	TBX	+ / + / - / -	<i>E. coli</i> biotipo 1
	Endo	+ / + / - / -	-
W ₁₂	TBX	-	-
	Endo	-	-
W ₁₃	TBX	-	-
	Endo	-	-
W ₁₄	TBX	+ / + / - / +	-
	Endo	+ / + / - / +	-
W ₁₅	TBX	+ / + / - / -	<i>E. coli</i> biotipo 1
	Endo	+ / + / - / +	-

La identificación de las cepas de *E. coli* permiten confirmar el aislamiento de 11 cepas en 10 de las muestras de agua de riego estudiadas.

3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli* POR PCR

3.1. Extracción de DNA

En el transcurso de este trabajo se han realizado un total de 35 extracciones de DNA: 15 muestras de enriquecimiento procedentes de aguas de riego, 9 muestras de enriquecimiento (1 por cada dilución) para la optimización de la PCR, 10 de las cepas aisladas de *Escherichia coli* resuspendidas en 500 µL de tampón TE y 1 de la cepa de referencia *Escherichia coli* 101 resuspendida en 500 µL de tampón TE para el control positivo de la PCR.

Por otro lado, durante el desarrollo del estudio, se utilizaron dos kits diferentes de extracción. Con el kit GenElute se realizaron 22 extracciones y con el kit Realpure Spin Food Stool Bacterias las 13 restantes. Cabe destacar que no se encontraron diferencias en los resultados entre ambos kits de extracción.

3.2. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la puesta a punto de la PCR, se realizó una amplificación de las temperaturas de acoplamiento para *E. coli*. Al analizar los resultados (**Figura 4**), no se aprecian diferencias importantes con la modificación de temperatura. Finalmente, la temperatura de acoplamiento elegida para nuestro trabajo fue 58°C, superior a la utilizada por Kim y col. en su trabajo, por consiguiente, más selectiva.

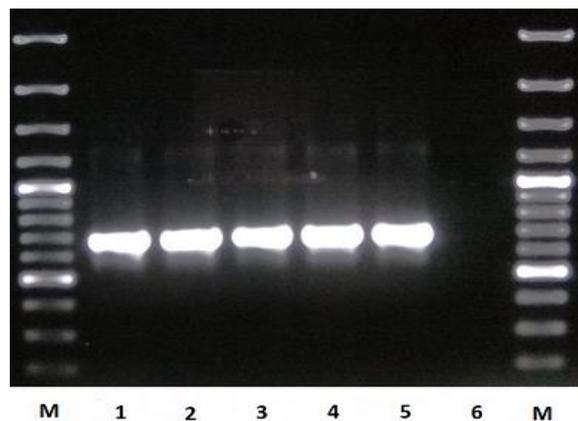


Figura 4. Gradiente de temperaturas de acoplamiento para la PCR de *Escherichia coli*: M. Marcador 100 pb; 1. 56 °C; 2. 58 °C; 3. 58,7 °C; 4. 59,3 °C; 5. 60 °C; 6. C- 56 °C; M. Marcador 100 pb.

En cuanto a la detección de *Escherichia coli* en las muestras de aguas de riego (**Figura 5** y **Figura 6**), observamos que con estas condiciones de PCR se puede detectar la presencia de *E. coli* en todas las muestras, tanto en las muestras de enriquecimiento de CVB como en las cepas aisladas.

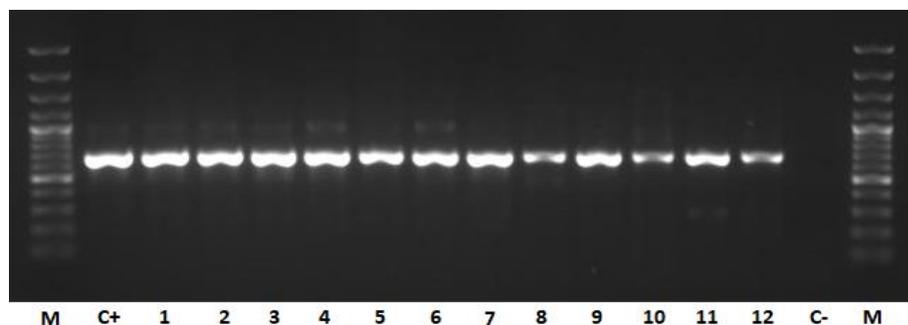


Figura 5. Detección de *Escherichia coli* en las diferentes muestras de agua por PCR (I): M. Marcador 100 pb; C+. Control positivo cepa *E. coli* 101; 1. EW₁; 2. W₁ CVB; 3. EW₂; 4. W₂ CVB; 5. EW₃; 6. W₃ CVB; 7. EW₅; 8. W₅ CVB; 9. EW₆; 10. W₆ CVB; 11. EW₇; 12. W₇ CVB; C-. Control negativo; M. Marcador 100 pb.

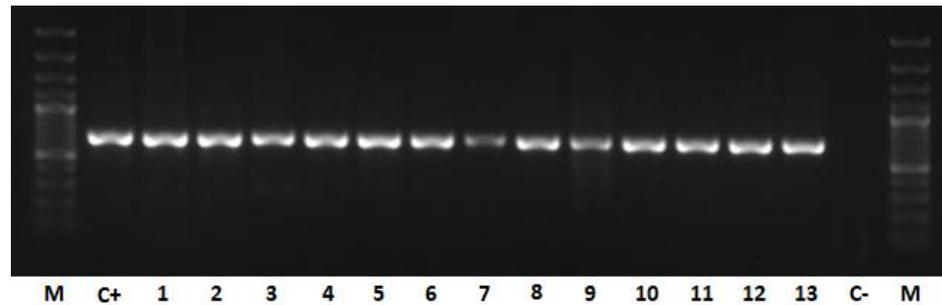


Figura 6. Detección de *Escherichia coli* en las diferentes muestras de agua por PCR (II): M. Marcador 100 pb; C+. Control positivo cepa *E. coli* 101; 1. EW₈; 2. W₈ CVB; 3. EW₁₀; 4. W₁₀ CVB; 5. EW₁₁; 6. W₁₁ CVB; 7. EW₁₅; 8. W₁₅ CVB; 9. W₄ CVB; 10. W₉ CVB; 11. W₁₂ CVB; 12. W₁₃ CVB; 13. W₁₄ CVB; C-. Control negativo; M. Marcador 100 pb.

3.3. Límite de detección de la PCR para *Escherichia coli*

El cálculo de los límites de detección de estas condiciones de PCR para *Escherichia coli* se detalla en el punto 3.4. de Material y Métodos y los resultados se pueden observar en la **Figura 7**.

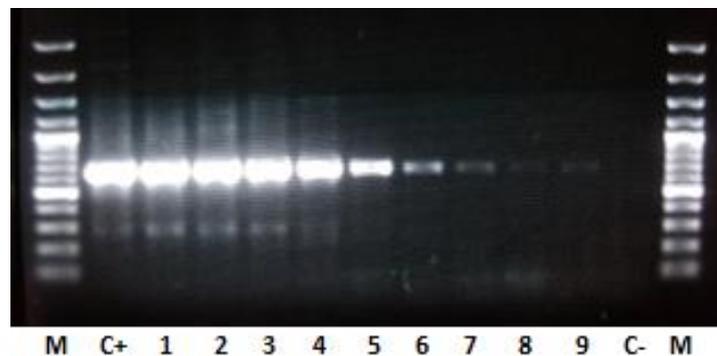


Figura 7. Límite de detección de la PCR de *Escherichia coli*: M. Marcador 100 pb; C+. Control positivo cepa *E. coli* 101; 1. Dilución 10^8 UFC/mL; 2. Dilución 10^7 UFC/mL; 3. Dilución 10^6 UFC/mL; 4. Dilución 10^5 UFC/mL; 5. Dilución 10^4 UFC/mL; 6. Dilución 10^3 UFC/mL; 7. Dilución 10^2 UFC/mL; 8. Dilución 10^1 UFC/mL; 9. 10^0 UFC/mL (1 célula); C-. Control negativo; M. Marcador 100 pb.

Como se puede observar en la **Figura 7**, mediante la técnica de PCR, hasta la dilución 10^4 se puede detectar la presencia de *E. coli* de forma muy clara. A partir de esta dilución, la intensidad de las bandas disminuye de forma gradual Sin embargo, se puede apreciar la banda incluso en la última dilución (una única célula). Estos resultados difieren a los obtenidos por Shekar y col. (2017), solamente llegaron a detectar *Escherichia coli* en la dilución 10^2 UFC/mL.

4. VALORACIÓN CONJUNTA DE LOS MÉTODOS DE DETECCIÓN

Uno de los objetivos de este trabajo era valorar y comparar la eficacia de los métodos culturales frente a los métodos moleculares, con el fin de determinar si se puede disminuir el tiempo y material utilizado.

Observando los resultados de los métodos convencionales y moleculares de forma conjunta (**Tabla 8**), vemos como mediante la técnica molecular se ha podido detectar *E. coli* en todas las muestras (100 %), mientras que, a partir de técnicas culturales, el número de muestras positivas ha sido menor, concretamente en 10 muestras (66,67 %). En muestras donde no se había detectado la presencia de *E. coli* por métodos culturales, gracias a la técnica de PCR sí se ha podido confirmar su presencia.

Tabla 8. Valoración conjunta de técnicas culturales y moleculares en la detección de *Escherichia coli*.

Muestra	Técnica	
	Cultural (aislamiento)	Molecular (PCR)
W ₁	+	+
W ₂	+	+
W ₃	+	+
W ₄	-	+
W ₅	+	+
W ₆	+	+
W ₇	+	+
W ₈	+	+
W ₉	-	+
W ₁₀	+	+
W ₁₁	+	+
W ₁₂	-	+
W ₁₃	-	+
W ₁₄	-	+
W ₁₅	+	+
$\Sigma = 15$	$\Sigma = 10$	$\Sigma = 15$

Así pues, podemos afirmar que la técnica molecular por PCR, además de ser muy sensible, es más efectiva para la identificación de *Escherichia coli* y el tiempo de detección es menor en comparación con las técnicas de cultivo. Sin embargo, cabe destacar que la técnica de PCR no diferencia entre el material genético de células vivas o muertas, por lo que se podría haber dado casos de detección de DNA de células muertas. De esta forma, una de las soluciones sería desarrollar métodos culturales más efectivos.

V. CONCLUSIONES

1. En este trabajo se han analizado un total de 15 muestras de aguas de riego de dos canales agrícolas distintos. De las 15 muestras analizadas, 9 muestras pertenecían a canales agrícolas de la zona de Alboraya y las otras 6 a la zona de Vera.
2. El valor del recuento de enterobacterias en las muestras, $4,73 \times 10^4$ UCF/mL, supera los límites establecidos en España y los aconsejados por la Unión Europea para las aguas de riego, siendo los valores máximos permitidos entre 100-1.000 UFC/100 mL. Por eso, concluimos que el uso de estas aguas de riego para el uso agrícola y/o su contacto directo con los alimentos puede suponer un gran riesgo para la salud humana.
3. A partir del medio selectivo TBX, hemos logrado aislar e identificar *Escherichia coli* en **40 %** de las muestras de agua, mientras que con el medio selectivo Endo se han aislado en el **33,33 %** de las muestras. En total se ha aislado el microorganismo en 10 de las 15 muestras estudiadas lo que supone **el 66,67 % de las muestras de agua**.
4. A partir de los resultados obtenidos en el aislamiento, se aprecia la importancia de la **utilización conjunta de ambos medios selectivos (TBX y Endo)**, puesto que en muestras donde en un medio fueron negativos los resultados, en el otro fueron positivos y al revés, coincidiendo solamente en una de las muestras (**W₇**) con el aislamiento de *E. coli* en los dos medios. Por tanto, recomendamos el uso de ambos medios selectivos para cualquier estudio de aislamiento de *E. coli*.
5. Se han realizado un total de **35** extracciones de DNA. Con el kit GenElute se realizaron 22 extracciones y con el kit Realpure Spin Food Stool Bacterias las 13 restantes. No se encontraron diferencias en los resultados entre ambos kits de extracción.
6. Tras preparar un gradiente de temperaturas de acoplamiento a los iniciadores GADA F y GADA R, se seleccionó una temperatura de acoplamiento de **58 °C**, superior a la seleccionada por otros autores, confiriendo así una mayor selectividad en la detección.
7. Se detectó por PCR la presencia de *E. coli* en **todas** las muestras de enriquecimiento de CVB, incluso en aquellas en las que, por métodos culturales, no se había podido aislar el microorganismo.
8. El límite de detección de la PCR para *Escherichia coli* ha sido el máximo: se puede detectar la presencia de este microorganismo en un medio con **una única célula** (dilución 10^0 UFC/mL).
9. Podemos concluir que las condiciones de PCR optimizadas en este trabajo permiten detectar la presencia de *E. coli* en muestras con una única célula y permiten identificarla hasta el nivel de especie y en pocas horas, comparando con las técnicas de cultivo.

VI. BIBLIOGRAFÍA

AEAS, Asociación Española de Abastecimientos de Agua y Saneamiento (2016). XIV Estudio Nacional de Suministro de Agua Potable y Saneamiento en España 2016.

ALCALDE-SANZ, L.; GAWLIK, B. M. (2017). Minimum quality requirements for water reuse in agricultural irrigation and aquifer recharge - Towards a legal instrument on water reuse at EU level. EUR 28962 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2017, ISBN 978-92-79-77175-0, doi:10.2760/804116, JRC 109291.

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. (1985). Water quality for agriculture (Vol. 29). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

BES, Boletín Epidemiológico Semanal (2008). Vigilancia epidemiológica de brotes de transmisión hídrica en España 1999-2006. *Sistema de Información Microbiológica*, 16 (3): 25-36.

BOE, Boletín Oficial del Estado (2003). Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. Núm. 45, Pág. 7228-7245.

BOE, Boletín Oficial del Estado (2007). Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. Núm. 294, Pág. 50639-50661.

BOE, Boletín Oficial del Estado (2011). Real Decreto 1798/2010, de 30 de diciembre, por el que se regula la explotación y comercialización de aguas minerales naturales y aguas de manantial envasadas para consumo humano. Disposición 971 del BOE núm. 16, Sec. I, Pág. 6111.

DASÍ, M. A.; LEDESMA, E. (1994). Reacción en cadena de la polimerasa. *Fundamentos de la PCR en microbiología*. Madrid. Unipath SA, 7-29.

DOUE, Diario Oficial de la Unión Europea (2005). REGLAMENTO (CE) nº 2073/2005 DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. L 338/1.

DOUE, Diario Oficial de la Unión Europea (2017). Nota de la Comisión sobre la Guía para combatir los riesgos microbiológicos en frutas y hortalizas frescas en la producción primaria mediante una buena higiene. 2017/C 163/01.

FAO, Food and Agriculture Organization (2017). Prevención de la *Escherichia coli* en los alimentos. <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/e-coli0/es/> (última revisión 26 julio de 2018)

FDA, U.S. Food and Drug Administration (1998). Guidance for Industry. *Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh Fruits and Vegetables*.

ISO 16654:2001 <https://www.iso.org/standard/29821.html> (última revisión 26 julio de 2018).

ISO/TS 20836:2005 <https://www.iso.org/standard/39759.html> (última revisión 26 julio de 2018).

ISO 20838:2006 <https://www.iso.org/standard/39761.html> (última revisión 26 julio de 2018).

ISO 21148:2017 <https://www.iso.org/standard/72239.html> (última revisión 26 julio de 2018).

ISO 21150:2015 <https://www.iso.org/standard/68311.html> (última revisión 26 julio de 2018).

ISO 21528/2:2017 <https://www.iso.org/standard/63504.html> (última revisión 26 julio de 2018).

- ISO 22000:2018 <https://www.iso.org/standard/65464.html> (última revisión 26 julio de 2018).
- ISO 22174:2005 <https://www.iso.org/standard/36153.html> (última revisión 26 julio de 2018).
- ISO 6887-1:2017 <https://www.iso.org/standard/63335.html> (última revisión 26 julio de 2018).
- ISO 9308-1:2014 <https://www.iso.org/standard/55832.html> (última revisión 26 julio de 2018).
- ISO 9308-3:1998 <https://www.iso.org/standard/20878.html> (última revisión 26 julio de 2018).
- KIM, J.; DEMEKE, T.; CLEAR, R.M.; PATRICK, S.K. (2006). Simultaneous detection by PCR of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in artificially inoculated wheat grain. *International Journal of Food Microbiology*, 111 (1): 21-5.
- LPSN, List of prokaryotic names with standing in nomenclature (2018). <http://www.bacterio.net/escherichia.html> (última revisión 24 julio de 2018).
- MCDANIELS, A.E.; RICE E.W.; REYES, A.L.; JOHNSON, C.H.; HAUGLAND, R.A.; STELMA JR. (1996). Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and β -Dglucuronidase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9): 3350.
- MOLINA, J.; ESLAVA, C. A. (2015). *Escherichia coli* diarrogénica. Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM.
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2017). Inocuidad de los alimentos. *Nota descriptiva*. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety> (última revisión 24 julio de 2018).
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2018). *Escherichia coli*. *Nota descriptiva*. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli> (última revisión 24 julio de 2018).
- PALOMINO, C.; GONZÁLEZ, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 31(3), 535-546.
- PASCUAL, M. R.; CALDERÓN, V. (1999). *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*. Editorial Díaz de Santos. 464 pp.
- PUERTA, A. y MATEOS, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*. 2010;10(51):3426-3431.
- RODRÍGUEZ-ANGELES, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5), 464-475.
- SHEKAR, A.; BABU, L.; RAMLAL, S.; SRIPATHY; M. H.; BATRA, H. (2017). Selective and concurrent detection of viable *Salmonella* spp., *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157: H7, and *Shigella* spp., in low moisture food products by PMA-mPCR assay with internal amplification control. *LWT-Food Science and Technology*, 86, 586-593.
- SIM, Sistema de Información Microbiológica (2017). Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. *Informe anual del Sistema de Información Microbiológica 2015*. Madrid.
- SIM, Sistema de Información Microbiológica (2017). Centro nacional de epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. *Resultados de la Vigilancia Epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual 2015*. Madrid.