

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Agroindustria Alimentaria
Ingeniería en Agroindustria Alimentaria



Proyecto Especial de Graduación
Implementación de los métodos Torunda de Moore Modificada y
Filtración por Membrana para el muestreo de patógenos en agua como
protocolos para el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de
Zamorano

Estudiante

Juan Diego Fajardo Ferrufino

Asesores

Mayra Márquez González, Ph.D.

Jorge Cardona, Ph.D.

Honduras, agosto 2022

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ADELA M. ACOSTA MARCHETTI

Directora Departamento de Agroindustria Alimentaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros.....	5
Índice de Figuras	6
Índice de Anexos	7
Resumen	8
Abstract.....	9
Introducción.....	10
Materiales y Métodos.....	13
Construcción de los MMS	13
Elaboración de Cartuchos y Torundas	13
Esterilización de los Cartuchos.....	15
Recolección de Muestras.....	15
Análisis de Muestras	17
Determinación de Salmonella.....	17
Determinación de E. coli y Coliformes Totales	17
Análisis Estadístico	18
Resultados y Discusión.....	19
Criterios Muestra y Premuestra.....	19
Análisis de <i>Salmonella</i>	19
Recuentos Coliformes Totales	22
Recuentos <i>E. coli</i>	24

Conclusiones	27
Recomendaciones	28
Referencias.....	29
Anexos.....	32

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Recuentos de coliformes totales mediante filtración por membrana	23
Cuadro 2. Recuentos E. coli en muestras de agua de lavado de vegetales mediante filtración por membrana	24

Índice de Figuras

Figura 1 Doblado de la estopilla para la elaboración de una torunda.....	14
Figura 2 Ensamble de Cartuchos Torunda de Moore Modificada	14
Figura 3 Flotador Torunda de Moore Modificada	15
Figura 4 Introducción de torunda dentro del cartucho	16
Figura 5 Conexión del cartucho con la bomba.....	16

Índice de Anexos

Anexo A Protocolo Construcción de Torundas de Moore Modificadas.....	32
Anexo B Protocolo Procedimiento para el muestreo de aguas mediante la filtración por membrana	38
Anexo C Fechas y horas de muestreo	42
Anexo D Análisis estadístico Recuentos E. coli total de muestras por separado	43
Anexo E Resultados 10 muestras recuentos de E. coli	44
Anexo F Cálculos para análisis de acuerdo con el FSMA	45

Resumen

La contaminación en aguas que son utilizadas para fines agrícolas (riego y lavado) o para consumo humano es una problemática, es por ello que cada vez se necesita de más métodos fiables que aseguren un correcto análisis microbiológico. Los objetivos de esta investigación fueron la construcción de las torundas de Moore, redactar procedimientos para el muestreo utilizando las torundas de Moore y el método de filtración por membrana. Se realizaron muestreos de aguas utilizadas después de lavar hortalizas para evaluar que tan eficientes son estos métodos para la detección de microorganismos. Los muestreos para la detección de *Salmonella* se realizaron con el uso de las torundas de Moore filtrando 10 litros de agua utilizando una bomba peristáltica y fueron sometidos a un análisis completo para la detección de *Salmonella*. Las 10 muestras de agua presentaron ausencia de *Salmonella*. Los muestreos para *E. coli* y coliformes totales se realizaron mediante la filtración por membrana donde se analizaron 10 muestras de agua de 100 mL cada una. Los resultados mostrados como Log UFC/100 mL presentaron medias entre 0 y 2.7 Log UFC/100 mL. Para poder obtener placas contables en muestras de lavado de frutas y vegetales se recomienda filtrar diluciones de 5:10 o de 1:10 de muestra y agua estéril para coliformes totales y de 5:10 para *E. coli*.

Palabras clave: agua uso agrícola, contaminación, *E. coli*, muestreo, *Salmonella*.

Abstract

Contamination in water used for agricultural purposes (irrigation and washing) or human consumption is a problem, which is why more and more reliable methods are needed to ensure correct microbiological analysis. The objectives of this research were to construct Moore's swabs and write up procedures for sampling using Moore's swabs and the membrane filtration method. Water used after washing vegetables was sampled to evaluate how efficient these methods are for detecting microorganisms. Sampling for *Salmonella* was performed using Moore's swabs filtering 10 liters of water using a peristaltic pump and was subjected to complete analysis for *Salmonella*. All 10 water samples were free of *Salmonella*. Sampling for *E. coli* and total coliforms was performed by membrane filtration where 10 water samples of 100 mL each were analyzed. The results shown as Log CFU/100 ml showed means between 0 and 2.7 Log CFU/100. To obtain countable plates it is recommended to perform adequate dilutions of 5:10 or 1:10 of sample and sterile water are recommended for total coliforms and 5:10 for *E. coli*.

Keywords: agricultural water, *E. coli*, sampling, *Salmonella*.

Introducción

Con el constante crecimiento de la población aumenta la demanda fuentes de agua disponibles para el consumo humano y el agua destinada a la producción de cultivos. Esta última se puede definir como el agua utilizada o destinada para el contacto con los cultivos ya sea para su riego u otras actividades adyacentes en los procesos antes de y post cosecha como el lavado y el enfriamiento de los cultivos. De igual manera, está relacionada a la preparación y el lavado de equipos utilizados para el procesamiento de vegetales (Bell et al. 2021). El acceso a estas fuentes de agua en algunos lugares es bastante limitado. Actualmente es muy común que se obtenga el agua destinada para la agricultura y sus procesos desde fuentes convencionales como lo son los pozos, ríos y/o quebradas, por otro lado tenemos las fuentes no convencionales como lo son las lagunas de oxidación y otros sistemas de trata de aguas residuales. Sin embargo, tanto las fuentes convencionales como las no convencionales pueden ser fuentes de contaminación microbiana los cuales representan un riesgo y pueden ser causantes de enfermedades gastrointestinales (Haymaker et al. 2019).

La calidad microbiológica del agua de riego y la destinada a la agricultura ha representado una gran preocupación durante los últimos años. En los últimos años se ha popularizado la implementación de sistemas de trata y recirculación de agua en granjas y en distintas empresas dedicadas a la producción de alimentos. Esto se traduce como un incremento en el riesgo de un brote ocasionado por microorganismos patógenos. De hecho, el hacer uso de aguas superficiales que no se han tratado correctamente se ha asociado en repetidas ocasiones como la causa potencial de brotes de enfermedades gastrointestinales por el consumo de alimentos, también se le asocia con distintos microorganismos patógenos encontrados en ambientes antes y después de la cosecha (Weller y Brassill et al. 2020).

En muchas ocasiones podemos asociar la contaminación de aguas superficiales con la presencia de materia fecal, la cual si representa un amplio porcentaje de contaminación en estos cuerpos de agua. Sin embargo, esto representa una problemática ya que bacterias patógenas

asociadas con brotes de enfermedades gastrointestinales como lo son *Salmonella*, *E. coli* y *L. monocytogenes* no están siempre asociadas con contaminación fecal. Puesto a que *L. monocytogenes* es un microorganismo que se puede encontrar en el suelo, y tanto *Salmonella* como *E. coli* se pueden naturalizar en ambientes sin necesidad de un huésped como en la vegetación acuática sumergida o en el propio suelo (Weller y Belias et al. 2020). La agencia europea de inocuidad de los alimentos (EFSA 2017) destaca que en Europa entre los años 2012 - 2016 fueron reportados 4,786 brotes de enfermedades gastrointestinales, incluyendo brotes por contaminación de aguas superficiales. *Salmonella* fue el agente patógeno detectado más común, seguido de otras bacterias, toxinas y virus.

El hacer muestreos para la detección de microorganismos patógenos, como lo son *Salmonella* y *E. coli*, que amenazan continuamente a los consumidores, normalmente se realizan mediante la toma de datos del alimento en sí, al tomar muestras de hojas u otro tejido vegetativo que se consuma del cultivo. Sin embargo, muchas organizaciones recomiendan a los productores el realizar un análisis primario del agua utilizada para riego en busca de microorganismos patógenos. Esto debido a que las probabilidades de detectar patógenos aumentan al hacer muestreos en el agua a emplear en el riego o tratamientos agrícolas postcosecha la cual estará en contacto con todo el cultivo (Bisha et al. 2011). Para obtener un muestreo significativo en grandes volúmenes de agua superficial en busca de bacterias patógenas se deben emplear los métodos apropiados para su detección. Dentro de la industria se encuentra bastante equipo avanzado y especializado como lo es el uso de tecnología de membranas, sin embargo, métodos de bajo costo que emplean tecnología más simple pueden ser utilizados para pequeños productores y empresas, los cuales están en busca de caracterizar la aceptabilidad de sus fuentes de agua para la producción (Sbodio et al. 2013).

Uno de los métodos de muestreo de aguas superficiales más conocido es el “Moore swab” o Torunda de Moore, el cual consiste de una gasa introducida dentro de un cartucho hecho a base de tubería, el cual se mantiene suspendido en el agua superficial. Este tiene el objetivo de tomar muestras mediante la succión por una bomba a través del dispositivo y consecuentemente el atrapar

los microorganismos en la gasa, los cuales posteriormente serán aislados y analizados (Sikorski y Levine 2020). Este método se emplea en el muestreo de agua superficial y ya ha sido usado para la detección de *Salmonella*. Sin embargo, cabe destacar que este método requiere de ardua labor y requiere el movimiento del equipo completo para la recolección de datos (Sbodio et al. 2013).

Otro método empleado en el análisis de aguas potables y no potables es el de filtración por membrana el cual consiste en tomar una muestra de agua representativa al tamaño del cuerpo a muestrear y esta es filtrada mediante el uso de una bomba de vacío hacia una membrana de 45 μm de acuerdo con lo declarado por (USAL 2020). Este método tiene una gran popularidad para los análisis realizados para los conteos de microorganismos indicadores como lo son *E. coli* y los coliformes totales de una muestra.

Este método tiene un amplio uso en el análisis de agua para consumo y para uso poscosecha, ya que de acuerdo con (FAO y WHO 2021) la calidad de agua a utilizar va a depender de cual sea la actividad poscosecha a realizar. El agua a utilizar en cosecha y poscosecha no debe de tener indicios de *E. coli* detectable (FDA 2017). Mediante este método se pueden obtener resultados en 24 horas para microorganismos indicadores como lo son las coliformes totales y *E. coli*.

La presente investigación tuvo como objetivos: La construcción de cartuchos “Modified Moore Swabs”. Redactar procedimientos para la recolección de muestras y enriquecimientos al utilizar “Modified Moore Swabs” y filtración por membrana. Aplicar y analizar datos recolectados mediante el uso de “Modified Moore Swabs” y filtración por membrana.

Materiales y Métodos

Se procedió con la construcción de cinco cartuchos para contener las torundas de Moore Modificados (MMS), estos serán contruidos dentro de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. La toma de muestras se realizó en la Planta de Postcosecha Hortofrutícola de Zamorano con el fin de obtener aguas con alta carga orgánica y por ende alta carga microbiana, las cuales posteriormente serán trasladadas al Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LMAZ).

Construcción de los MMS

Elaboración de Cartuchos y Torundas

La elaboración de los cartuchos fue realizada basada en el protocolo establecido por Delgado (2020). En primer lugar, se cortó una pieza de estopilla de grado #90 con medidas de 92 × 95 cm y se dobló horizontalmente. Luego, se enrolló para obtener un hisopo cilíndrico de aproximadamente 12 cm de largo y 4.4 cm de diámetro. Se envolvió en papel Kraft para ser sometido a esterilización por autoclave a 121 °C por 20 minutos. La elaboración de las torundas se detalla en la **Error! Reference source not found**. Luego se procedió a ensamblar las tuberías correspondientes para los cinco cartuchos. La construcción de los cartuchos consistió en el cortado del tubo PVC en secciones de 16 cm de largo, de cada sección cortada se construyó un cartucho. Después se procedió al ensamble del adaptador hembra y la unión lisa en cada extremo del tubo. El adaptador para unir la manguera de la bomba peristáltica consistió en el adaptador macho unido junto al casquillo reductor. El armado y las piezas para el cartucho se detallan en la **Error! Reference source not found**. Cada pieza del cartucho fue ensamblada junto a pegamento para tubería con el fin de evitar posibles fugas o que se desarmen los cartuchos. Estas también pueden ser utilizadas junto a un flotador como el que se detalla en la Figura 3. Las dimensiones y cantidades de las piezas se especifican en el Anexo A Protocolo Construcción de Torundas de Moore Modificadas.

Figura 1

Doblado de la estopilla para la elaboración de una torunda.



Nota. Adaptado de Delgado (2020)

Figura 2

Ensamble de Cartuchos Torunda de Moore Modificada

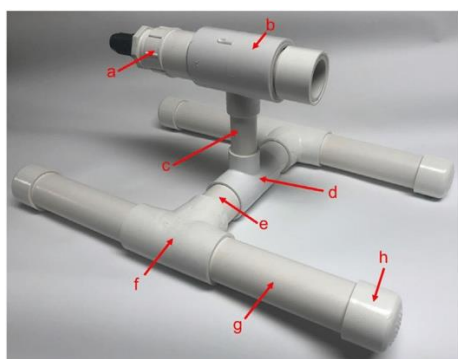
El cuerpo del cartucho comprende del **tubo liso de PVC** de 16 cm de largo con el **adaptador hembra** de un lado y la **unión lisa** del otro lado.



El **adaptador macho** y el **casquillo reductor** conforman la parte a la cual se le inserta la manguera de la bomba.

Figura 3

Flotador Torunda de Moore Modificada.



- a) Cartucho
- b) Unión T 2×2×1' pulgadas
- c) Tubo PVC 10.2 cm largo 1 pulgada diámetro
- d) Unión T 1.5×1.5×1' pulgadas
- e) 2 tubos PVC 10.2 cm largo 1.5 pulgadas diámetro
- f) 2 uniones T 1.5 pulgadas
- g) 4 tubos PVC 21.6 cm largo × 1.5 pulgadas diámetro
- h) 4 tapones PVC 1.5 pulgadas diámetro

Nota. Adaptado de Haymaker et al. (2019)

Esterilización de los Cartuchos

Después de su ensamble los cinco cartuchos fueron desinfectados al ser inmersos en una solución de cloro a 1000 ppm por treinta minutos. Se enjuagaron con agua esterilizada para eliminar posibles residuos de cloro. Después estos se dejaron secar al aire dentro de un balde previamente esterilizado y fueron introducidos dentro de bolsas estériles utilizando pinzas y guantes.

Recolección de Muestras

Las muestras de agua fueron recolectadas entre los meses de mayo a junio y se realizaron dependiendo de la disponibilidad dentro de la planta. Las muestras de agua se recolectaron al final de los lavados de lechuga Tropicana para los días 1 y 3, del lavado de lechuga romana para los días 4 y 5 y del agua del lavado de yuca para el día 2. Donde se lavaron 86 kg de lechuga Tropicana para el día 1, 58 kg de lechuga Tropicana para el día 3, 78 kg de lechuga Tropicana para los lavados del día 4 y 5 y 22.7 kg de yuca para el día 2.

Utilizando guantes estériles se introdujo una torunda dentro de cada cartucho y se procedió a conectarlos a la manguera de la bomba (

Figura

5

Conexión del cartucho con la bomba.



. Enseguida se filtraron 10 litros de agua mediante el uso de una bomba peristáltica. En cada día se tomaron dos muestreos. Después de la filtración de agua los cartuchos fueron transferidos a bolsas estériles y transportados en una hielera para su posterior análisis (Haymaker et al. 2019). Las muestras de agua tomadas para el método de filtración por membrana fueron recolectadas en bolsas Whirlpak con una pastilla de tiosulfato para eliminar los residuos de cloro. Todas las muestras fueron trasladadas dentro de una hielera para mantener la temperatura y fueron analizadas en un lapso menor a una hora después de su llegada al laboratorio.

Figura 4

Introducción de torunda dentro del cartucho.

**Figura 5**

Conexión del cartucho con la bomba.



Análisis de Muestras

Determinación de Salmonella

Se retiraron las torundas de cada cartucho y en una bolsa estéril y se agregaron 100 mL de agua peptonada buferada para el preenriquecimiento y fueron masajeadas por dos minutos. Cada

bolsa con las torundas fue incubada a 37 °C durante 24 horas. Después de la incubación, se transfirió 0.1 mL a un tubo con 10 mL de Caldo Rappaport-Vassiliadis y de igual manera se transfirió 1 mL a un tubo con 10 mL de Caldo Tetrationato. Posteriormente, fueron incubados a 35 °C por 24 horas. Para el aislamiento en agar se utilizó un haza bacteriológica estéril con que se tomaron muestras de cada uno de ellos y fueron sembrados en estría en cajas Petri en los siguientes medios selectivos: Agar XLD, Agar HE y Agar SB. Estas cajas fueron incubadas a 35 °C por 24 horas. Posterior a su incubación se observaron las cajas y se identificaron colonias sospechosas. Cada colonia sospechosa fue sometida a una prueba bioquímica donde se tomó una porción de la colonia y fue inoculada en tubos con Agar Triple Azúcar Hierro, Agar Lisina Hierro y Caldo Urea los cuales posteriormente fueron incubados a 35 °C por 24 horas. Después de su incubación se aislaron las colonias sospechosas a presencia de *Salmonella* al observar los cambios correspondientes de los medios. De los tubos sospechosos a *Salmonella* se inocularon las colonias en Agar Cuenta Estándar y fueron incubados a 35 °C por 24 horas. Para ser posteriormente sometidas a una prueba serológica la cual se realizó sobre un portaobjetos al disolver la colonia seleccionada en una gota de solución salina estéril y agregarle una gota de antisuero polivalente O. Se comparó la aglutinación presentada por el control *Salmonella* Typhimurium con las demás colonias sospechosas. La determinación de *Salmonella* se realizó según el procedimiento descrito por el protocolo establecido por el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano.

Determinación de E. coli y Coliformes Totales

El recuento de *E. coli* se realizó siguiendo el protocolo de filtración por membrana, donde 100 mL de muestra de agua fueron extraídos directamente de la fuente a analizar. Estas muestras fueron recolectadas en bolsas WhirlPak con pastillas de tiosulfato para eliminar cualquier tipo de residualidad presentada por cloro u otros desinfectantes para proceder a ser filtrados por una membrana Millipore mediante el uso de una bomba de vacío. Se ensambló el sistema de filtrado y se prepararon los demás materiales. Se utilizaron membranas de 0.45 µm con el fin de separar los microorganismos presentes del agua. Posteriormente cada membrana fue transferida a un plato Petri con el medio de cultivo

selectivo M-Colibblue24 y fueron incubados a 35 °C por 24 horas. Posterior a su incubación se realizaron los recuentos de *E. coli* y coliformes totales de cada muestra de agua. La determinación de *E. coli* y coliformes totales se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por USAL (2020), acerca del recuento de microorganismos mediante la filtración por membrana. Anexo B Protocolo Procedimiento para el muestreo de aguas mediante la filtración por membrana

Análisis Estadístico

El análisis estadístico de este proyecto se utilizó estadística descriptiva realizada mediante los comandos del programa estadístico Statistical Analysis System SAS® v 9.4 donde se realizó el procedimiento PROC MEANS con el propósito de obtener las medias reportadas y la desviación estándar de cada conteo microbiológico obtenido para las dos muestras tomadas cada día en los cinco días evaluados, dando un total de 10 muestras recolectadas a para el análisis de filtración por membrana. Posteriormente, se analizaron datos como la media y la desviación estándar para determinar qué tan preciso fue el método de filtración por membrana en los conteos de *E. coli* y coliformes totales. Mientras que para el análisis de las Torundas de Moore Modificadas se realizaron tablas que representen la cantidad de muestras procesadas y cuantas de ellas tuvieron un resultado positivo con el fin de ver que tanta sería la prevalencia de *Salmonella* en las muestras.

Resultados y Discusión

Criterios Muestra y Premuestra

Los criterios previos a los análisis de las torundas de Moore y de filtración por membrana las muestras fueron trasladadas cuidando los criterios mencionados por Barreto Saenz et al. (2009), donde recalca la importancia del manejo de las muestras para que los resultados obtenidos hayan sido más exactos. Algunos de ellos son el tiempo transcurrido de campo a laboratorio, control de temperatura antes y después de llegar a laboratorio y rotulando las muestras para su correcta identificación.

Las muestras fueron trasladadas dentro de una hielera junto a paquetes de gel refrigerantes donde todas mantuvieron o bajaron su temperatura y fueron analizadas inmediatamente al llegar al Laboratorio de Análisis Microbiológicos de Zamorano. Estos criterios cumplen con los recomendados por Mendez Novelo et al. (2010), donde mencionan que las muestras de agua para análisis deben de ser trasladadas en menos de seis horas para aguas no potables y 30 horas para aguas potables ya que transcurrido ese tiempo afecta a los recuentos para coliformes totales y *E. coli*.

Las muestras de agua recolectadas para los días 1, 3, 4 y 5 presentaron altos niveles de carga orgánica esto debido a que las lechugas que fueron lavadas esos días fueron cultivadas en época de lluvias la cual de acuerdo con la información que se maneja en planta es la época de mayor carga orgánica. Las muestras recolectadas el día 2 no presentaron mucha carga orgánica debido a que estas provenían del lavado de yuca donde antes de recibidas en planta estas reciben un enjuagado para quitar el exceso de tierra. Donde se lavaron 86 kg de lechuga Tropicana para el día 1, 58 kg de lechuga Tropicana para el día 3 y 78 kg de lechuga Tropicana para los lavados del día 4 y 5. Anexo C Fechas y horas de muestreo.

Análisis de *Salmonella*

A pesar de haber tenido crecimiento sospechoso, se obtuvieron resultados negativos para la determinación de *Salmonella* en los cinco días de muestreo.

Los perfiles bioquímicos que se presentaron no eran de *Salmonella* por lo que esto sugiere la presencia de otra enterobacteria. Uno de los perfiles bioquímicos que más se asemeja al de *Salmonella* es el de *Shigella* ya que a pesar de que esta es Lisina descarboxilasa negativa los demás perfiles para Agar TSI y para caldo urea son bastante similares a los de *Salmonella* USAL (2022).

Los resultados obtenidos para los días 1, 3, 4 y 5 en los que se tomaron muestras del lavado de lechuga se asemejan a los obtenidos por Hernandez (2008), quien analizó 71 muestras de agua destinada para riego agrícola y solo tres de estas presentaron contaminación por *Salmonella*. La mayor fuente de contaminación asociada con frutas y hortalizas frescas se atribuye a su irrigación con aguas contaminadas (FAO y WHO 2021), las fuentes de contaminación más comunes en producto fresco son a partir de suelo y agua contaminado con heces (Durán-Quirós et al. 2016). Lee et al. (2019), reportaron la incidencia de *Salmonella* en cultivos de hoja verde gracias a la salpicadura que crea el agua al momento de caer. Sin embargo, en la unidad de Horticultura Extensiva las lechugas no son regadas por aspersión sino con riego por goteo el cual de acuerdo con Pérez-Lavalle et al. (2021), es más efectivo para evitar la contaminación frente al riego por aspersión. Los resultados obtenidos en el día 2 fueron de muestras con una carga orgánica observable casi nula obtenida de agua de lavado de yuca, estos resultados eran los esperados puesto a que era agua clorada y concuerdan con los reportados por Moya et al. (2013), quienes determinaron la supervivencia de un inóculo de *Salmonella typhi* en aguas potables que contenían cantidades de cloro residual de 0.3 mg/L las cuales reportaron porcentajes de muerte de hasta el 99.8% del inóculo.

Los índices de prevalencia de *Salmonella* en agua superficial destinada para riego agrícola se ven fuertemente influenciados por los agentes que los rodean, ya que fuentes alimentadas en su mayoría por agua de lluvia presentaron prevalencias de hasta el 8.5% y fuentes de agua que se alimentaban de desagües presentaron índices de prevalencia de entre 54% hasta 100% (Levantesi et al. 2012). Sin embargo, Lee et al. (2018) reportan un índice de prevalencia de 0.06% en 507 fuentes de agua destinada para riego. Estas bajas incidencias pueden suponer otra razón por la que no se

detectó *Salmonella* en los muestreos ya que de acuerdo a los resultados reportados por Sepulveda et al. (2002), quienes realizaron inóculos de *Salmonella* y *Listeria* para su detección mediante las torundas de Moore el rango mínimo detectado para *Salmonella* fue de 0.6 UFC/500 mL y un máximo de hasta 660 UFC/500 mL de agua destilada estéril, también menciona que la flora detectada en aguas utilizadas para enjuague puede interferir el aislamiento de estas dos bacterias. Sin embargo, Liu et al. (2021), en el análisis de aguas residuales en países del medio oriente lograron rangos mínimos de detección de *Salmonella* de hasta 0.005 UFC/mL.

No se pudo descartar la presencia de *Salmonella* en el agua residual del lavado debido a que la flora asociada fue alta y esta puede interferir en el aislamiento de *Salmonella*. Esto se puede contrarrestar al utilizar medios que inhiban el crecimiento de bacterias Gram positivas y otras bacterias que no sean *Salmonella*. Por lo que el utilizar una mayor variedad de medios que favorezcan el crecimiento de *Salmonella* por sobre otras bacterias puede llegar a mejorar el índice de detección de esta (Gonzales et al. 2014). De igual manera se pueden aumentar las temperaturas de incubación en la etapa de enriquecimiento selectivo para favorecer el crecimiento de *Salmonella* la cual presenta un crecimiento óptimo en temperaturas entre 35 a 37 °C pero en caso de tener muestras con alta contaminación el FDA (2022) recomienda incubar el caldo Tetracionato a 43 °C y el caldo Rappaport-Vassiliadis a 42 °C. Se recomienda realizar purificaciones en platos Petri, este proceso consiste en sembrar cada colonia sospechosa para tener un menor riesgo de contaminación de otros microorganismos. Así como no se pudo descartar la presencia de *Salmonella* en agua, no se pudo descartar la posibilidad de que esta estuviera adherida a la hoja, de acuerdo con Kroupitski et al. (2009) la eliminación de *Salmonella* en producto fresco es muy difícil puesto a que esta bacteria presenta la creación de biopelículas para una mejor adhesión a la hoja en este caso. Oliveira Elias et al. (2019) reportaron la prevalencia de *Salmonella* en lechugas lavadas de hasta 0.057 UFC/g. Por lo que el constante monitoreo tanto de las fuentes de agua utilizadas a lo largo del procesamiento y del producto final son de vital importancia para observar puntos de mejora.

La implementación de las Torundas de Moore modificadas tiene un gran potencial para la detección de patógenos en agua, respaldado por su uso dentro de los Servicios de Salud del Departamento de California donde se utiliza este método dentro de los procedimientos estandarizados para la detección de *E. coli* O157:H7 (Bisha et al. 2011). Sin embargo, hay que tener presente que este método se ve limitado por el volumen de agua filtrada ya que muchas fuentes de no tienen una distribución homogénea lo que aumenta el riesgo de fallar al momento de identificar ciertos patógenos. Sbodio et al. (2013), mencionan que gracias al fácil y rápido uso de este método se pueden realizar muestreos diarios lo que facilitaría el poder detectar un posible patógeno.

Este método es recomendado para determinar si existe o no presencia de un patógeno específico en los lugares a muestrear y este demuestra una mayor sensibilidad y eficacia que los muestreos realizados directamente del agua (McEgan et al. 2013). Sin embargo, Weller y Brassill et al. (2020), mencionan que la alta flora asociada capturada con este método puede llegar a afectar la detección de un microorganismo. Por lo que mencionan que el uso de esta metodología puede depender del microorganismo de interés, el tiempo disponible (ya que este método requiere de la movilización de equipo y tiempo para el filtrado) o los resultados deseados (las torundas de Moore no ofrecen resultados cuantitativos de una muestra, solo demostrar presencia o ausencia). En particular Weller y Belias et al. (2020), menciona que este método facilita la detección de patógenos como lo son *E. coli* y *Salmonella* puesto a que estos se adhieren con mayor facilidad a la materia orgánica a diferencia de bacterias como *Listeria* para a cuál las Torundas de Moore Modificadas presentan una baja eficiencia de recuperación. Por lo que se pudo concluir que este método debe de ser utilizado dependiendo del microorganismo que se intente recuperar.

Recuentos Coliformes Totales

El Cuadro 1 muestra los resultados obtenidos para los conteos de los cinco días, donde se encontró presencia de Coliformes totales en todas las muestras de agua procesadas. Para los días 1, 3 y 4 se encontraron recuentos mayores a 3.60 Log UFC/100 mL.

Cuadro 1

Recuentos de coliformes totales mediante filtración por membrana.

Días De Muestreo	Medias Log UFC/100 mL
	Media $\pm$ DE
Día 1	>3.60
Día 2	0.84 $\pm$ 0.09
Día 3	>3.60
Día 4	>3.60
Día 5	2.73 $\pm$ 0.06

Estos resultados se asemejan a los reportados por Espinoza De La Cruz (2016), quien realizó una evaluación de las aguas residuales de la Planta de Hortofrutícola Poscosecha en Zamorano y en promedio los recuentos de Coliformes totales eran de 3.06 Log UFC/100 mL teniendo en cuenta las temporadas altas en carga orgánica se estima que serían un poco mayores en este experimento.

Los recuentos para los días 1, 3 y 4 resultaron muy numerosos para contar, esto se atribuye a que el lavado de las lechugas en este caso se realizó en la época donde estas presentan una mayor cantidad de materia orgánica debido a las lluvias. De acuerdo con Espinoza De La Cruz (2016), los recuentos para coliformes totales máximos presentados en la planta de postcosecha llegaron a un máximo de 3.60 Log UFC/100 mL lo que da una idea de en qué rango podrían estar los conteos muy numerosos para contar.

Los recuentos para el día 2 presentaron medias de 0.84 Log UFC/100 mL esto debido a que era agua tratada con cloro, sin embargo, a diferencia de los recuentos de *E. coli* estos si presentaron crecimiento y esto concuerda con lo reportado por Cote Coy (2006), que en sus resultados observó la presencia de coliformes que presentaban resistencia a los lavados con cloro, lo que explica la prevalencia de estos a pesar de haber estado en agua clorada.

Las colonias para coliformes totales se identificaron como colonia de color rojo ya que este caso el medio de cultivo M-ColiBlue24 reacciona a la enzima b-d-galactosidasa lo cual de acuerdo con Millipore (2019), identifica a los coliformes totales como colonias de color rojo. Los resultados para

los conteos fueron los esperados puestos a que de acuerdo con Swistock (2022), estos organismos indicadores están presentes en suelos de siembra y en agua.

Recuentos *E. coli*

El Cuadro 2 muestra los resultados obtenidos para los recuentos de *E. coli* en cinco días de lavado dentro de la planta de postcosecha los cuales presentaron una media total de 1.33 Log UFC/100 mL. Los resultados obtenidos de los días 1, 3, 4 y 5 son provenientes de agua después del lavado de lechuga donde los días 1, 3 y 4 presentaron crecimiento de *E. coli* mientras que se reportó ausencia de este en los días 2 y 5. Los recuentos y el análisis de los resultados de *E. coli* se encuentran en Anexo D y Anexo E.

Cuadro 2

Recuentos E. coli en muestras de agua de lavado de vegetales mediante filtración por membrana.

Días De Muestreo	Medias Log UFC/100 mL Media $\pm$ DE
Día 1	2.47 $\pm$ 0.01
Día 2	0 $\pm$ 0
Día 3	2.37 $\pm$ 0.06
Día 4	1.82 $\pm$ 0.12
Día 5	0 $\pm$ 0

Los recuentos para *E. coli* fueron mayores a los reportados por Espinoza De La Cruz (2016), quien reportó conteos de hasta 1.50 Log UFC/100 mL de coliformes fecales en la caracterización bacteriológica de aguas residuales de la planta de postcosecha. Sin embargo, estos recuentos estuvieron por debajo de los reportados por Dao et al. (2018), quienes analizaron el agua después del lavado postcosecha en lechugas que habían sido regadas con aguas de río y estos presentaron recuentos de 3 Log UFC/100 mL. Los resultados de los días 2 y 5 fueron obtenidos de lavados de yuca la cual había sido tratada con cloro y de lechuga la cual había sido cambiada recientemente. En estos no se encontró presencia de *E. coli*, en el lavado dos esto debido a que el agua estaba tratada con cloro y de acuerdo con lo reportado por Arboleda Valencia (1992), quien estudio la prevalencia de 30

especies de *E. coli* en concentraciones mínimas de cloro como 0.2 mg/L y observó que estas bajas concentraciones eran suficientes para eliminar 24 de las 30 especies que estudió. Mientras que los resultados del Día 5 no presentan presencia de *E. coli* ya que al momento de tomar la muestra el agua había sido previamente cambiada y la carga orgánica era muy baja.

Los resultados en los conteos realizados para *E. coli* fueron los esperados puestos a que de acuerdo con el CDC (2022), esta es una bacteria la cual se encuentra en el medio ambiente y de manera especial en alimentos y aguas que no han recibido un tratamiento previo.

Se interpretaron los datos estadísticos de los recuentos de *E. coli* de acuerdo con el Food Safety Modernization Act (FSMA) del FDA (2015) para comprobar que estos cumplieran con los requerimientos para agua de uso agrícola. Se obtuvo una media geométrica (GM) de los 10 recuentos de 1.33 Log UFC/100 mL o de 21.40 UFC/100 mL valores que están por debajo del límite establecido de 126 UFC/100 mL. También se obtuvo un Valor de Umbral Estadístico (STV) que es el valor máximo permitido y demuestra que se obtuvieron valores máximos en los recuentos de 2.82 Log UFC/100 mL o 660.70 UFC/100 mL que estuvieron por encima del valor máximo permitido de 410 UFC/100 mL y de acuerdo con el FSMA para que el STV cumpla el 90% de las muestras deben de estar debajo de este valor. Tanto la media geométrica como el valor de umbral estadístico del total de las muestras deben de cumplir con los rangos del perfil de calidad microbiana del agua establecido por el FDA. El STV estuvo por encima de lo recomendado, por lo que el FSMA recomienda realizar medidas correctivas basándose en las tasas esperadas de muerte microbiana en el campo (0,5 log/día durante un máximo de 4 días). Por lo que la FSMA recomienda realizar reducciones de 0.5 Log por día durante un máximo de 4 días hasta que el agua cumpla con los rangos permitidos. Se tendría que esperar un día para que los recuentos de las muestras tomadas estén dentro de norma. Sin embargo, el agua para uso en postcosecha no permite *E. coli* detectable en muestras de agua. Los cálculos se detallan en el Anexo F Cálculos para análisis de acuerdo con el FSMA.

Una problemática identificada con el método de filtración por membrana fue la presencia de demasiadas colonias con aspecto de coliformes y el crecimiento a lo largo del borde del filtro estos problemas también fueron observados por la USAL (2020). Como recomendación en estos casos queda el utilizar diluciones para 100 mL como las mencionadas por Hach (2000), donde se recomienda realizar diluciones de 5:10 o 1:10 de muestra y agua estéril para los conteos de coliformes totales y de 5:10 de muestra y agua estéril para los conteos de *E. coli*.

El uso de las metodologías de Torunda de Moore Modificada y filtración por membrana pueden llegar a tener un amplio uso dentro de la industria de la producción de alimentos. El determinar la calidad de agua que se vaya a utilizar para el riego o para los procesos de cosecha y postcosecha antes de que estas sean utilizadas es un proceso que se puede realizar al seguir estas metodologías y así asegurarnos que se cumplan con los estándares establecidos para la Food Safety Modernization Act (FSMA) del FDA (2015), donde indican que la calidad de agua utilizada en producto fresco es un factor determinante para la inocuidad de estos productos. Con lo que se podrían implementar tiempos para el recambio de aguas o la verificación de la calidad de agua a utilizar.

Conclusiones

La construcción de las Torundas de Moore Modificadas se realizó de manera satisfactoria.

Los métodos para la recolección de muestras fueron los correctos para mantener la calidad del agua desde su recolección y transporte hacia el laboratorio.

El método de filtración por membrana fue efectivo al mostrar que los niveles de contaminación en el agua de lavado fueron mayores a los valores recomendados por el FSMA donde sugieren ausencia de *E. coli* en el agua de lavado postcosecha durante el proceso.

Recomendaciones

Aumentar el número de medios que promuevan el crecimiento de *Salmonella* y que inhiban el crecimiento de otros microorganismos para reducir el efecto de la flora asociada en los análisis.

Se debe comprar de una bomba peristáltica portátil para el muestreo de agua superficial en campo que es para lo que este método fue diseñado.

Realizar diluciones de 5:10 o 1:10 partes de muestra en agua estéril para las muestras que presenten alto nivel de materia orgánica previo a su análisis mediante la filtración por membrana para lograr una medición más exacta.

Realizar la evaluación en distintas épocas de producción dentro de planta para definir con qué frecuencia se debería de hacer el recambio de agua.

Realizar muestreos directamente del sistema de tuberías de Zamorano para corroborar que estén dentro de norma.

Referencias

- Arboleda Valencia J. 1992. Eficiencia de la desinfección. Colombia: Acodal. https://cidta.usal.es/cursos/edar/modulos/edar/unidades/LIBROS/logo/pdf/eficacia_desinfeccion.pdf.
- Barreto Saenz P, Espinoza G, Leiva M. 2009. Procedimiento de muestreo de agua superficial. [sin lugar]: Universidad Nacional "Santiago Antunez de Mayolo". https://biorem.univie.ac.at/fileadmin/user_upload/p_biorem/education/research/protocols/PROCEDIMIENTO_DE_MUESTREO_DE_AGUA_SUPERFICIAL.pdf.
- Bell RL, Kase JA, Harrison LM, Balan KV, Babu U, Chen Y, Macarasin D, Kwon HJ, Zheng J, Stevens EL, et al. 2021. The Persistence of Bacterial Pathogens in Surface Water and Its Impact on Global Food Safety. *Pathogens*. 10(11). eng. doi:10.3390/pathogens10111391.
- Bisha B, Perez-Mendez A, Danyluk MD, Goodridge LD. 2011. Evaluation of modified moore swabs and continuous flow centrifugation for concentration of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 from large volumes of water. *J Food Prot*. 74(11):1934–1937. eng. doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-133.
- [CDC] Center for Disease Control and Prevention. 2022. Seguridad de los alimentos: La *E. coli* y la seguridad de los alimentos. [sin lugar]: Center for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/communication/ecoli-and-food-safety.html>.
- Cote Coy C. 2006. Aislamiento, identificación bioquímica y pruebas de cloro resistencia in vitro a cepas nativas de coliformes totales y *E. coli* obtenidas en la red de distribución de acueducto de Bogotá [Tesis]. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8264/tesis248.pdf?sequen>.
- Dao J, Stenchly K, Traoré O, Amoah P, Buerkert A. 2018. Effects of Water Quality and Post-Harvest Handling on Microbiological Contamination of Lettuce at Urban and Peri-Urban Locations of Ouagadougou, Burkina Faso. *Foods*. 7(12). eng. doi:10.3390/foods7120206.
- Delgado E. 2020. Modified Moore Swab Method for Microbiological Surface Waters Sampling v1. Mexico: Universidad Nacional Autonoma de Mexico. <https://www.protocols.io/view/modified-moore-swab-method-for-microbiological-sur-dm6gpwj8lzp/v1>.
- Durán-Quirós A, González-Lutz MI, Mora-Acedo D, Vargas-Hernández G. 2016. Evaluación de los riesgos de contaminación microbiológica en los sistemas hortícolas, Valle Central Costa Rica. *RAC*. 40(2). doi:10.15517/rac.v40i2.27393.
- [EFSA] European Food Safety Authority. 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J*. 15(12):e05077. eng. doi:10.2903/j.efsa.2017.5077.
- Espinoza De La Cruz E. 2016. Caracterización de aguas residuales de lavandería y de la Planta de Poscosecha de Zamorano para el riego de áreas verdes [Tesis]. Honduras: EAP Zamorano. <https://fdocuments.net/document/caracterizacion-de-aguas-residuales-de-lavanderia-y-de-trampa-de-grasa-los.html?page=1>.
- [FAO] Food and Agriculture Organization, [WHO] World Health Organization. 2021. Safety and quality of water used with fresh fruits and vegetables. Rome, Geneva: Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization; World Health Organization. 133 p. (Microbiological Risk Assessment series; vol. 37). ISBN: 978-92-4-003022-0.

- [FDA] Food and Drug Administration. 2015. Food Safety Modernization Act: FSMA. [sin lugar]: Food and Drug Administration; [actualizado 2015]. 216 p. <https://www.fda.gov/food/food-safety-modernization-act-fsma/fsma-final-rule-produce-safety>.
- [FDA] Food and Drug Administration. 2017. Standards for the Growing, Harvesting, Packing, and Holding of Produce for Human Consumption: What You Need to Know About the FDA Regulation: Guidance for Industry Small Entity Compliance Guide. Estados Unidos: Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/media/107298/download>.
- [FDA] Food and Drug Administration. 2022. Bacteriological Analytical Manual (BAM): Chapter 5: *Salmonella*. Estados Unidos: Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella>.
- Gonzales J, Pereira N, Soto Z, Hernandez E, Villareal J. 2014. Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. Salud Uninorte. 30(1):73–94. <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v30n1/v30n1a09.pdf>.
- Hach. 2000. Manual de análisis de agua: Segunda edición en español. 3ª ed. [sin lugar]: HACH Company. <https://co.hach.com/asset-get.download.jsa?id=7639984469>.
- Haymaker J, Sharma M, Parveen S, Hashem F, May EB, Handy ET, White C, East C, Bradshaw R, Micallef SA, et al. 2019. Prevalence of *Shiga*-toxigenic and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in untreated surface water and reclaimed water in the Mid-Atlantic U.S. Environ Res. 172:630–636. eng. doi:10.1016/j.envres.2019.02.019.
- Hernandez C. 2008. Detección de *Salmonella* y coliformes fecales en agua de uso agrícola para la producción de melón "Cantaloupe". Agric. Tec. Mex. 34(1). http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0568-25172008000100009&lng=es&nrm=iso.
- Kroupitski Y, Pinto R, Brandl MT, Belausov E, Sela S. 2009. Interactions of *Salmonella enterica* with lettuce leaves. J Appl Microbiol. 106(6):1876–1885. eng. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04152.x.
- Lee D, Tertuliano M, Harris C, Vellidis G, Levy K, Coolong T. 2019. *Salmonella* Survival in Soil and Transfer onto Produce via Splash Events. J Food Prot. 82(12):2023–2037. eng. doi:10.4315/0362-028X.JFP-19-066.
- Lee D, Tertuliano M, Vellidis G, Harris C, Grossman MK, Rajeev S, Levy K. 2018. Evaluation of Grower-Friendly, Science-Based Sampling Approaches for the Detection of *Salmonella* in Ponds Used for Irrigation of Fresh Produce. Foodborne Pathog Dis. 15(10):627–636. eng. doi:10.1089/fpd.2018.2441.
- Levantesi C, Bonadonna L, Briancesco R, Grohmann E, Toze S, Tandoi V. 2012. *Salmonella* in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission. Food Research International. 45(2):587–602. doi:10.1016/j.foodres.2011.06.037.
- Liu P, Ibaraki M, Kapoor R, Amin N, Das A, Miah R, Mukhopadhyay AK, Rahman M, Dutta S, Moe CL. 2021. Development of Moore Swab and Ultrafiltration Concentration and Detection Methods for *Salmonella Typhi* and *Salmonella Paratyphi A* in Wastewater and Application in Kolkata, India and Dhaka, Bangladesh. Front Microbiol. 12:684094. eng. doi:10.3389/fmicb.2021.684094.
- McEgan R, Rodrigues CAP, Sbodio A, Suslow TV, Goodridge LD, Danyluk MD. 2013. Detection of *Salmonella* spp. from large volumes of water by modified Moore swabs and tangential flow filtration. Lett Appl Microbiol. 56(2):88–94. eng. doi:10.1111/lam.12016.

- Mendez Novelo R, Cedillo L, Castillo E, Vasquez E. 2010. Modelación del tiempo de conservación de muestras biológicas de agua. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 26(4). http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992010000400007.
- Millipore. 2019. Ficha Técnica M-ColiBlue24. [sin lugar]: Millipore. https://www.merckmillipore.com/GT/es/product/m-ColiBlue24-Broth,MM_NF-M00PMCB24?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F.
- Moya R, Alvarado P, Vasquez N. 2013. Supervivencia de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* en agua potable de cuatro distritos de Trujillo (Perú). *Revista Científica de Estudiantes*. 34(1).
- Oliveira Elias S de, Noronha TB, Tondo EC. 2019. *Salmonella spp.* and *Escherichia coli O157:H7* prevalence and levels on lettuce: A systematic review and meta-analysis. *Food Microbiol*. 84:103217. eng. doi:10.1016/j.fm.2019.05.001.
- Pérez-Lavalle L, Carrasco E, Vallesquino-Laguna P, Cejudo-Gómez M, Posada-Izquierdo GD, Valero A. 2021. Internalization capacity of *Salmonella enterica* sv *Thompson* in strawberry plants via root. *Food Control*. 126(11):108080. doi:10.1016/j.foodcont.2021.108080.
- Sbodio A, Maeda S, Lopez-Velasco G, Suslow TV. 2013. Modified Moore swab optimization and validation in capturing *E. coli O157:H7* and *Salmonella enterica* in large volume field samples of irrigation water. *Food Research International*. 51(2):654–662. doi:10.1016/j.foodres.2013.01.011.
- Sepulveda A, Martinez N, Ramirez A, Raygoza M, Trujillo F. 2002. *Listeria monocytogenes* como bioindicador sanitario para el control ambiental de las aguas incorporadas a los embalses. *Revista Cubana Higiene Epidemiológica*. 40(3). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032002000300007.
- Sikorski MJ, Levine MM. 2020. Reviving the "Moore Swab": a Classic Environmental Surveillance Tool Involving Filtration of Flowing Surface Water and Sewage Water To Recover Typhoidal *Salmonella* Bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 86(13). eng. doi:10.1128/AEM.00060-20.
- Swistock B. 2022. Bacterias Coliformes. [sin lugar]: Pennsylvania State University. <https://extension.psu.edu/bacterias-coliformes>.
- [USAL] Universidad de Salamanca. 2020. Recuento de microorganismos mediante filtración de membrana. España: Universidad de Salamanca. http://coli.usal.es/web/demos/demo_fundacua/RtoFiltracion/RtoFiltracion.htm.
- [USAL] Universidad de Salamanca. 2022. Investigación de ausencia/presencia de *Shigella*. España: Universidad de Salamanca. http://coli.usal.es/web/demos/demo_fundacua/Shigella/shigella.html.
- Weller D, Belias A, Green H, Roof S, Wiedmann M. 2020. Landscape, Water Quality, and Weather Factors Associated With an Increased Likelihood of Foodborne Pathogen Contamination of New York Streams Used to Source Water for Produce Production. *Front Sustain Food Syst*. 3. eng. doi:10.3389/fsufs.2019.00124.
- Weller D, Brassill N, Rock C, Ivanek R, Mudrak E, Roof S, Ganda E, Wiedmann M. 2020. Complex Interactions Between Weather, and Microbial and Physicochemical Water Quality Impact the Likelihood of Detecting Foodborne Pathogens in Agricultural Water. *Front Microbiol*. 11:134. eng. doi:10.3389/fmicb.2020.00134.

Anexos

Anexo A

Protocolo Construcción de Torundas de Moore Modificadas



ESCUELA AGRÍCOLA PANAMERICANA
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE
ALIMENTOS

PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACIÓN DE LAS TORUNDAS DE MOORE Y MUESTREO DE AGUAS

Fecha de emisión: 03/07/2022	Elaboró: Juan Diego Fajardo Ferrufino
Revisó:	Aprobó:

1. Objetivos y alcance

Este protocolo describe el uso de las **Torundas de Moore Modificadas** para recolectar muestras de agua superficial para su análisis microbiológico.

Alcance: Aplica en cuerpos de agua como ríos, lagos, lagunas, pozos, etc.

2. Materiales y equipos

- PVC adaptador macho, inserto x MNPT, tamaño de tubería de 1-1/2" pulgadas
- Casquillo reductor de PVC (MPT x FPT) 1-1/2 x 1" pulgadas
- Adaptador hembra PVC (S x FPT) 1.5 pulgadas
- Tubo de PVC 1.5 pulgadas 16 centímetros
- Camisa Durman 1.1/2 pulgadas unión potable lisa
- Unión T PVC 2 x 2 x 1 pulgadas
- Unión T PVC 1.5 x 1.5 x 1 pulgadas
- Unión T PVC 1.5 pulgadas (x2)
- Tapas de PVC 1.5 pulgadas (x4)
- Tubo de PVC 1.5 pulgadas 21.6 centímetros
- Tubo PVC 1 pulgada 10.2 centímetros
- Estopilla grado #90
- Pegamento para PVC
- Bomba peristáltica
- Termómetro
- Hielera
- Autoclave
- Cloro

3. Procedimiento

La construcción de los Modified Moore Swabs se realizó de acuerdo a la metodología establecida por (Delgado 2020): **Modified Moore Swab Method for Microbiological Surface Waters Sampling**.

3.1. Estopilla de filtración

3.1.1. Cortar la estopilla en piezas de 92 x 95 cm² y doblarla horizontalmente y enrollarla firmemente con el fin de tener un cilindro de aproximadamente 12 a 15 cm de largo y un diámetro de 4 a 5 cm. Ilustración 1 para más información del doblado de la estopilla.

3.1.2. Envolver la estopilla previamente enrollada en papel Kraft y someter a un proceso de esterilización por medio de la autoclave a 121 °C por 15 minutos.



ESCUELA AGRÍCOLA PANAMERICANA
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE
ALIMENTOS

PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACIÓN DE LAS TORUNDAS DE MOORE Y MUESTREO DE AGUAS

Fecha de emisión: 03/07/2022	Elaboró: Juan Diego Fajardo Ferrufino
Revisó:	Aprobó:

3.2. Ensamble de los cartuchos

- 3.2.1. Cortar la tubería lisa de 1.5 pulgadas de diámetro en secciones de 16 cm.
- 3.2.2. Ensamblar el adaptador hembra en un extremo de la tubería y la unión lisa del otro extremo.
- 3.2.3. Unir la unión macho junto a el casquillo reductor, los cuales serán la unión entre la manguera de la bomba y el cartucho.
- 3.2.4. Ensamblar las partes de PVC utilizando el pegamento para tubería p para sellar las piezas.

Ilustración 2 y 3 para más información del ensamble de las piezas.

3.3. Ensamble del flotador

- 3.3.1. Ensamblar el cartucho en la unión T 2 × 2 × 1 pulgadas.
- 3.3.2. Ensamblar la unión T 2 × 2 × 1 pulgadas al tubo PVC de 1 pulgadas.
- 3.3.3. Ensamblar las secciones de tubería lisa en las uniones T.
- 3.3.4. Colocar los tapones de PVC al final de la tubería lisa de 1.5 pulgadas de diámetro y 21.6 centímetros de largo.

Ilustración 6 para más información del ensamble del flotador.



ESCUELA AGRÍCOLA PANAMERICANA
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE
ALIMENTOS

PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACIÓN DE LAS TORUNDAS DE MOORE Y MUESTREO DE AGUAS

Fecha de emisión: 03/07/2022	Elaboró: Juan Diego Fajardo Ferrufino
Revisó:	Aprobó:

3.3.5. Esterilizar los cartuchos sumergiéndolos en una solución de cloro a 1000 ppm por 30 minutos. Se recomienda realizar esta actividad dentro de un balde para asegurar que estas estén completamente sumergidas en la solución. Posterior a ello enjuagar con agua estéril para eliminar residuos de cloro.

3.3.6. Ayudarse de guantes y pinzas estériles para colocar la estopilla previamente esterilizada dentro de los cartuchos.

3.4. Toma de muestras en agua superficial

3.4.1. Utilizar guantes estériles y colocar una torunda dentro de cada cartucho **Ilustración 4**.

3.4.2. Ubicar la bomba peristáltica cerca del cuerpo de agua que se vaya a muestrear.

3.4.3. Tomar un estéril y conectarla a un extremo de las mangueras de la bomba **Ilustración 5**.

3.4.4. Sumergir el cartucho dentro del agua y ajustar la bomba peristáltica **Ilustración 7**. Bomba peristáltica para poder filtrar 10 litros de agua para asegurarse que el cartucho este completamente mojado.

3.4.5. Al terminar el filtrado apagar la bomba y retirar el cartucho del extremo de la manguera.

3.4.6. Retirar la estopilla de dentro del cartucho y trasladarla a una bolsa estéril.

3.4.7. Cerrar la bolsa y tomar su temperatura, luego colocarla dentro de la hielera junto a las bolsas refrigerantes para su traslado a laboratorio.

4. Anexos



Ilustración 1. Doblado de la estopilla para elaboración de torunda (Delgado 2020)



ESCUELA AGRÍCOLA PANAMERICANA
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE
ALIMENTOS
PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACIÓN DE LAS TORUNDAS DE MOORE Y MUESTREO DE AGUAS

Fecha de emisión: 03/07/2022	Elaboró: Juan Diego Fajardo Ferrufino
Revisó:	Aprobó:



Ilustración 2. Piezas PVC ensambladas previo a su desinfección



Ilustración 3.



ESCUELA AGRÍCOLA PANAMERICANA
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE
ALIMENTOS

PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACIÓN DE LAS TORUNDAS DE MOORE Y MUESTREO DE AGUAS

Fecha de emisión: 03/07/2022	Elaboró: Juan Diego Fajardo Ferrufino
Revisó:	Aprobó:



Ilustración 4



Ilustración 5

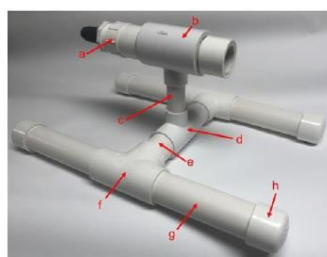


Ilustración 6 (Haymaker et al. 2019)

- a) Cartucho
- b) Unión T 2×2×1' pulgadas
- c) Tubo PVC 10.2 cm largo 1 pulgada diámetro
- d) Unión T 1.5×1.5×1' pulgadas
- e) 2 tubos PVC 10.2 cm largo 1.5 pulgadas diámetro
- f) 2 uniones T 1.5 pulgadas
- g) 4 tubos PVC 21.6 cm largo × 1.5 pulgadas diámetro
- h) 4 tapones PVC 1.5 pulgadas diámetro



Ilustración 7. Bomba peristáltica



ESCUELA AGRÍCOLA PANAMERICANA
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE
ALIMENTOS
PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACIÓN DE LAS TORUNDAS DE MOORE Y MUESTREO DE AGUAS

Fecha de emisión: 03/07/2022	Elaboró: Juan Diego Fajardo Ferrufino
Revisó:	Aprobó:

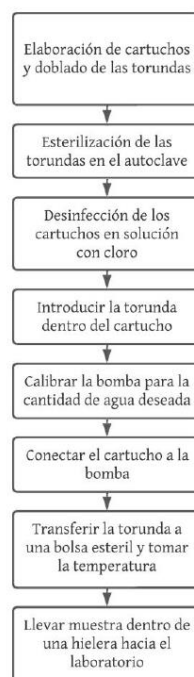


Figura 1. Diagrama de flujo elaboración y muestreo con las Torundas de Moore Modificadas

5. Referencia

Bibliografía

Delgado, Enrique (2020): Modified Moore Swab Method for Microbiological Surface Waters Sampling v1. Universidad Nacional Autonoma de Mexico. Mexico. Disponible en línea en <https://www.protocols.io/view/modified-moore-swab-method-for-microbiological-sur-dm6gpwjm8lzp/v1>.

Haymaker, Joseph; Sharma, Manan; Parveen, Salina; Hashem, Fawzy; May, Eric B.; Handy, Eric T. et al. (2019): Prevalence of Shiga-toxigenic and atypical enteropathogenic Escherichia coli in untreated surface water and reclaimed water in the Mid-Atlantic U.S. En: *Environmental research* 172, pág. 630–636. DOI: 10.1016/j.envres.2019.02.019.

6. Control de cambios

Anexo B

Protocolo Procedimiento para el muestreo de aguas mediante la filtración por membrana



ESCUELA AGRÍCOLA PANAMERICANA
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS
PROCEDIMIENTO PARA EL MUESTREO DE AGUAS SUPERFICIALES MEDIANTE LA FILTRACIÓN POR
MEMBRANA

Fecha de emisión: 03/07/2022	Elaboró: Juan Diego Fajardo Ferrufino
Revisó:	Aprobó:

1. Objetivos y alcance

Este protocolo describe el uso de **Método de Filtración por Membrana** para procesar muestras de agua potable y no potable para su análisis microbiológico.

Alcance: Aplica en cuerpos de agua no potable como ríos, lagos, lagunas, pozos, etc. y análisis de agua potable.

2. Materiales y equipos

- Bomba de vacío
- Mangueras
- Matraz Kitasato
- Sistema porta filtros
- Rampa de filtros
- Filtros estériles Millipore 45 µm
- Placas PetriPad
- Embudos estériles de un solo uso
- Termómetro
- Hielera
- Medio M-ColiBlue24
- Mechero
- Pinzas
- Etanol 95%
- Incubadora
- Guantes estériles
- Bolsas Whirlpak

3. Procedimiento

El protocolo de procesamiento mediante la filtración por membrana se realizó de acuerdo a la metodología establecida por (Universidad de Salamanca (USAL) 2020): **Recuento de microorganismos mediante filtración de membrana.**

3.1. Ensamble sistema de filtración

3.1.1. El aparato de filtración consta de una base que se incrusta a la rampa de filtración y un disco perforado el cual sostiene la membrana ambos deben ser previamente desinfectados con alcohol para evitar contaminación.

3.1.2. Colocar la manguera gruesa directamente a la rampa de filtración y al tapón de caucho del matraz Kitasato y la manguera más delgada debe ir conectada a la salida del matraz Kitasato y a la válvula que indica vacío en la bomba.

Ilustración 1 para más información del ensamble del sistema.



ESCUELA AGRÍCOLA PANAMERICANA
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS
PROCEDIMIENTO PARA EL MUESTREO DE AGUAS SUPERFICIALES MEDIANTE LA FILTRACIÓN POR MEMBRANA

Fecha de emisión: 03/07/2022	Elaboró: Juan Diego Fajardo Ferrufino
Revisó:	Aprobó:

3.2. Montaje de la membrana y el embudo

- 3.2.1. Utilizando guantes estériles, tomar las pinzas y sumergirlas en el etanol 95% y quemarlas en el mechero para esterilizarlas.
- 3.2.2. Con las pinzas estériles retirar la membrana de su empaque y colocarla sobre el disco para luego colocar el embudo estéril sobre la base.

Ilustración 2 como guía.

3.3. Preparación de los PetriPad

- 3.3.1. Utilizando guantes estériles vaciar una ampolla del medio M-ColiBlue24 sobre la almohadilla que contienen los PetriPad y cerrar hasta que se traslade la membrana.

3.4. Toma de muestras

- 3.4.1. Utilizando Bolsas Whirlpak con pastilla de tiosulfato recolectar un volumen considerable del agua tomándola en contra de la corriente en caso de ser agua no potable.
- 3.4.2. Tomar la temperatura de la muestra en campo utilizando el termómetro y trasladar la muestra a la hielera junto a ice-packs para mantener su temperatura durante el traslado.
- 3.4.3. Tomar la temperatura de la muestra previo a su filtrado.
- 3.4.4. Realizar las diluciones recomendadas en base a la cantidad de materia orgánica y/o su procedencia.

Ilustración 3 como guía.

3.5. Proceso de filtrado

- 3.5.1. Colocar 100 ml de la muestra de agua dentro del embudo.
- 3.5.2. Encender la bomba y esperar a que termine el proceso de filtrado.

3.6. Procesamiento de muestra

- 3.6.1. Esterilizar nuevamente las pinzas y retirar el embudo para poder tomar la membrana.
- 3.6.2. Colocar la membrana sobre el PetriPad previamente preparado.
- 3.6.3. Incubar a 35 °C por 24 horas.

3.7. Recuentos

- 3.7.1. Realizar recuentos tras las 24 horas de incubación e identificar colonias de E. coli (colonia de color azul) y coliformes totales (colonia de color rojo).



ESCUELA AGRÍCOLA PANAMERICANA
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS
PROCEDIMIENTO PARA EL MUESTREO DE AGUAS SUPERFICIALES MEDIANTE LA FILTRACIÓN POR MEMBRANA

Fecha de emisión: 03/07/2022	Elaboró: Juan Diego Fajardo Ferrufino
Revisó:	Aprobó:

4. Anexos

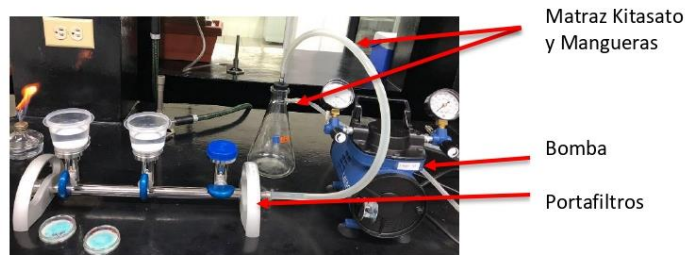


Ilustración 1. Ensamble de sistema de filtrado



Ilustración 2. Montaje de membrana y embudo sobre la rampa de filtración

Fuente de agua	Volumen a filtrar (ml)							
	100	50	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
Agua potable	X							
Piscinas	X							
Pozos, manantiales	X	X	X					
Lagos, represas	X	X	X					
Toma de suministro de agua			X	X	X			
Playas balnearias			X	X	X			
Agua de río				X	X	X	X	
Aguas cloacales cloradas				X	X	X		
Aguas cloacales sin tratar					X	X	X	X

Ilustración 3. Diluciones recomendadas para coliformes totales según (HACH 2000)



ESCUELA AGRÍCOLA PANAMERICANA
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS
**PROCEDIMIENTO PARA EL MUESTREO DE AGUAS SUPERFICIALES MEDIANTE LA FILTRACIÓN POR
MEMBRANA**

Fecha de emisión: 03/07/2022	Elaboró: Juan Diego Fajardo Ferrufino
Revisó:	Aprobó:

5. Referencias

HACH (2000): MANUAL DE ANALISIS DE AGUA. Segunda edición en español. 3 ed.

Universidad de Salamanca (USAL) (2020): Recuento de microorganismos mediante filtración de membrana. Universidad de Salamanca (USAL).

España. Disponible en línea en

http://coli.usal.es/web/demos/demo_fundacua/RtoFiltracion/RtoFiltracion.htm#c.

6. Control de cambios

Anexo C

Fechas y horas de muestreo

# Muestreo	Fecha	Hora	Lavado de:
1	15/6/2022	02:42 p. m.	Lechuga
2	15/6/2022	02:42 p. m.	Lechuga
3	16/6/2022	10:33 a. m.	Yuca
4	16/6/2022	10:34 a. m.	Yuca
5	17/6/2022	10:35 a. m.	Lechuga
6	17/6/2022	10:35 a.m.	Lechuga
7	30/6/2022	03:07 p. m.	Lechuga
8	30/6/2022	03:08 p. m.	Lechuga
9	30/6/2022	03:09 p. m.	Lechuga
10	30/6/2022	03:09 p. m.	Lechuga

Anexo D

Análisis estadístico Recuentos E. coli total de muestras por separado

Analysis Variable : UFC				
N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
10	1.3290000	1.1682794	0	2.4800000

Anexo E*Resultados 10 muestras recuentos de E. coli*

Fecha	# Lavado	Recuentos
15/6/2022	Lavado 1	2.48 Log UFC/100 ml
15/6/2022	Lavado 2	2.45 Log UFC/100 ml
16/6/2022	Lavado 3	0 Log UFC/100 ml
16/6/2022	Lavado 4	0 Log UFC/100 ml
17/6/2022	Lavado 5	2.41 Log UFC/100 ml
17/6/2022	Lavado 6	2.32 Log UFC/100 ml
30/6/2022	Lavado 7	1.90 Log UFC/100 ml
30/6/2022	Lavado 8	1.73 Log UFC/100 ml
30/6/2022	Lavado 9	0 Log UFC/100 ml
30/6/2022	Lavado 10	0 Log UFC/100 ml

Anexo F

Cálculos para análisis de acuerdo con el FSMA

Conversión de 1.33 Log UFC/100 ml a UFC/100 ml E. coli

$$UFC/100ml = 10^{1.33}$$

$$UFC/100ml = 21.40$$

$$21.40 \text{ UFC/100ml}$$

Cálculo del Valor de Umbral Estadístico (STV)

$$\text{Log}(\text{STV}) = \text{media}(\text{valores Log}) + 1.282 \times \text{dsvst}(\text{valores Log})$$

$$\text{Log}(\text{STV}) = 1.33 + 1.282 \times 1.16$$

$$\text{Log}(\text{STV}) = 2.82$$

$$\text{STV} = 2.82 \text{ Log UFC/100ml}$$

$$UFC \text{ 100ml} = 10^{2.82}$$

$$\text{STV} = 660.70 \text{ UFC/100ml}$$

Cálculo Tasa de Muerte Microbiana (en caso de que las medias o el STV estén sobre los valores recomendados)

$$\text{Log}(\text{STV}) \text{ o } \text{Log}(\text{media}) - 0.5 \text{ Log}(\text{por dia})$$

$$(\text{STV}) = 2.82 \text{ Log} - 0.5 \text{ Log}$$

$$(\text{STV}) = 2.32 \text{ Log}$$

$$(\text{STV}) = 10^{2.32}$$

$$(\text{STV}) = 208.92 \text{ UFC/100ml (valores dentro de norma)}$$