

VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA CUANTIFICAR *Salmonella* spp, PRESENTE EN AGUAS TRATADAS CON FOTOFENTON

Sandra Patricia Rivera Sánchez

Liliana Flórez

Janeth Sanabria

Abstract: Advanced water disinfection processes have shown promising results when evaluated it by using the bacterial indicator *Escherichia coli* (*E. coli*). However, it has also shown that *E. coli* is less resistant to disinfection than other enteric bacteria such as *Salmonella* sp. This study proposes to evaluate the effectiveness of the plate count and NMP techniques against the gold standard DVC-FISH for the quantification of *Salmonella* sp. present in artificial water treated with the photo-fenton disinfection process. For the study, diagnostic tests were performed to calculate the sensitivity, specificity, and predictive values. The study found that the traditional plate count and NMP method, have a higher sensitivity when there is a high concentration of the bacteria. However, when the bacteria concentration is 10^{-2} dilutions, the sensitivity is 51% with the plate count technique and 100% with the NMP technique. In conclusion, the process of disinfection with Foto-fenton, the bacteria couldn't be inactivated or totally inhibited because the bacteria had reversible damages that made them viable but it cannot be cultivated in the method of plate count. It causes high false negative result with this method, but in the NMP method, it became quantifiable whith lower concentrations of the bacteria.

Keywords: *Salmonella* spp; Most Likely Number (NMP); Advanced Oxidation Process; Plate Count; DVC-FISH and Validation of methods.

Resumen: Los procesos avanzados de desinfección de aguas han arrojado resultados prometedores al ser evaluados utilizando el indicador bacteriano *Escherichia coli* (*E. coli*). Sin embargo, también se ha demostrado que *E. coli* es menos resistente a la desinfección que otras bacterias entéricas como *Salmonella* spp. Este estudio propone evaluar la efectividad de las técnicas recuento en placa y NMP frente al gold estándar DVC-FISH para la cuantificación de *Salmonella* sp., presente en aguas artificiales tratadas mediante el proceso de desinfección foto-fenton. Para el estudio, se realizaron pruebas diagnósticas donde se calculó la sensibilidad, especificidad y valores predictivos. Se observó que el método tradicional recuento en placa y NMP, tienen una mayor sensibilidad cuando hay alta concentración bacteriana. Sin embargo cuando se tiene a una dilución 10^{-2} , la sensibilidad es del 51% con la técnica recuento en placa y del 100% con la técnica NMP. En conclusión, el proceso de desinfección con Foto-fenton, las bacterias no lograron ser inactivadas o inhibidas totalmente, debido a que presentaron daños reversibles que las hacen viables no cultivables en los métodos de recuento en placa presentando altos falsos negativos, pero en medios líquido como el método NMP se hizo cuantificable al tener bajas concentraciones de la bacteria.

Palabras clave: *Salmonella* spp; Número Más Probable (NMP); proceso de oxidación avanzada; Recuento en placa; DVC-FISH y Validación de métodos.

1. INTRODUCCIÓN

El acelerado crecimiento demográfico, experimentado en los últimos 80 años ha generado un deterioro progresivo de la calidad de las fuentes naturales de agua. Los desechos descargados en estas fuentes contienen y propician el desarrollo de una gran diversidad de organismos patógenos, como virus, bacterias, protozoos, hongos y huevos de helmintos. Estas aguas contaminadas representan un riesgo especialmente para comunidades rurales donde la cobertura y calidad del servicio de potabilización es deficiente [1]. Los procesos de desinfección no siempre están presentes en estas comunidades puesto que se presentan dificultades en el acceso al agente desinfectante, en su almacenamiento, manipulación, y se carece de capacidad técnica para llevar a cabo el proceso [2]. Lo dicho anteriormente hace que se facilite el aumento de eventos de interés en salud pública de origen gastrointestinal, relacionados con el consumo del agua, [3,4] y entre estos tenemos Enfermedad Diarreica AGUDA –EDA-, Intoxicación alimentaria, Hepatitis y otras [4,5].

La Organización Mundial de la Salud notifica que la enfermedad diarreica aguda (EDA) ocasiona el 4% de todas las muertes y el 5% de pérdida de la salud por discapacidad, a nivel mundial. Asimismo constituye un problema de salud pública a nivel mundial, con una incidencia de 4 mil millones de episodios (nuevos casos) al año. Finalmente, el 80% de estas muertes acontecen en los menores de 5 años, por lo tanto factores como el agua, el hacinamiento y la malnutrición favorecen la frecuencia, diseminación y gravedad de las diarreas [4,6].

En Colombia los agentes causantes de EDA, que se vigilan a través de Salud Pública y el Instituto Nacional de Salud son: *E. coli*, O157: H7, *Shigella* spp, *Campylobacter* spp, *Vibrio cholerae* y *Salmonella* spp. La *Salmonella serovariedad* Typhimurium, ocupa el primer puesto como agente causante de EDA, desde el año 2004 INS [7]. Por esta razón son fundamentales las Pruebas Diagnósticas eficientes, es decir con una alta especificidad, sensibilidad y valores predictivos

negativos y positivos [8]. Así mismo se debe tener en cuenta que el diagnóstico del 90% de los eventos de Interés en Salud Pública se hacen por pruebas diagnóstica y el 10% se hace por clínica.

Por otro lado, existen limitaciones en las pruebas diagnósticas para determinar la inocuidad de los alimentos en cuanto a *Salmonella* spp, debido a que existen métodos de presencia-Ausencia y no de cuantificación. Así mismo existe otra limitación al evaluar la calidad del agua, cuando se emplea microorganismos coliformes a modo de indicadores de contaminación fecal, como tradicionalmente se ha venido haciendo en Colombia al reconocer el indicador estándar *Escherichia. coli* (*E.coli*). Sin embargo, se ha demostrado que la ausencia de (*E.coli*), no implica inocuidad de las aguas tratadas, puesto que se presentan marcadas diferencias en la resistencia al tratamiento y comportamiento ambiental de los diferentes patógenos, e incluso, de otros microorganismos indicadores. También se ha encontrado que no existe correlación entre *E.coli* y *Salmonella* sp. Esto indica que el hecho de que no se encuentre *E.coli* en una muestra, no implica necesariamente la ausencia de otros patógenos [9].

La cloración es el método más usado para desinfección de aguas para consumo, pero la formación de subproductos cancerígenos durante su aplicación ha motivado el estudio de procesos alternativos [10]. Los procesos de oxidación avanzada (PAOS) han arrojado resultados prometedores, al ser evaluados utilizando el indicador bacteriano *Escherichia coli* (*E. coli*) [11,12], con el método recuento en placa. Sin embargo, también se ha demostrado que *E. coli* es menos resistente a la desinfección que otras bacterias entéricas como *Shigella* y *Salmonella*, y que estos procesos generan bacterias viables no cultivables, las cuales no son detectables en medios sólidos. Dadas las anteriores consideraciones el objetivo de este trabajo consistió en validar un método de cuantificación de estas bacterias que sea rápido, económico, fácil de manipular y confiable, como es la técnica de Número Más probable NMP.

Esta investigación genera un gran impacto en el área ambiental debido a que en Colombia es la primera investigación que se realiza,

comparando métodos moleculares con métodos convencionales para cuantificar bacterias estresadas específicamente, *Salmonella* spp, después de un proceso de desinfección. Por tal motivo, los resultados obtenidos de esta validación se podrá emplear en un futuro para cuantificar *Salmonella* spp., en las diferentes plantas de tratamiento de agua del país. Aportando al desarrollo una metodología que cuantifica *Salmonella* sp, en los procesos de desinfección de aguas con métodos tradicionales o avanzados como el utilizado en esta investigación, Foto-fenton. Por otro lado, aporta evidencia para medir la magnitud de los eventos de Interés en Salud Pública, al aumentar el número de casos detectados, mejorando los protocolos de calidad del agua e identificar tempranamente los eventos de inicio brotes para un efectivo control.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de campo se desarrolló en el campus de la Universidad del Valle, en el área de Ingeniería sanitaria ambiental y el estudio microbiológico se realizó en el laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad del Valle. Este trabajo fue financiado por el proyecto BIOSOLAR- DETOX en el marco del convenio cooperación EPFL (École Polytechnique Fédérale de Laussane) de Suiza y Univalle.

En este trabajo se realizó fotocatalisis a la cepa ATCC 15490, de *Salmonella* serovariedad Typhimurium, para evaluarla por los tres métodos microbiológicos NMP, recuento en placa y Conteo directo de bacterias viables, HIBRIDACIÓN *IN-SITU* (DVC-FISH), validando así la técnica del NMP para *Salmonella* sp., cuando está estresada por Foto-Fenton. Se aclara que primero se realizó productividad y selectividad de medios, luego se estandarizó el NMP para *Salmonella*, pero estos datos ya fueron publicados en artículo, [13], por lo tanto en este capítulo de libro nos centraremos sólo en la validación del NMP, para cuantificar *Salmonella* cuando ha pasado por un proceso de desinfección (posiblemente viable no cultivable), datos obtenidos de la tesis [14].

2.1. Descripción de la validación del NMP.

Se le realizó fotocátalisis homogénea a la cepa de *Salmonella* serovariedad Typhimurium ATCC 15490. Al producto tratado se le midió en contenido bacteriano usando tres métodos: el NMP estandarizado, recuento en placa en agar nutritivo y con el método estándar de oro, para lo cual se seleccionó el método de Conteo Directo de bacterias viables por Hibridación *In-situ* (DVC-FISH)

2.2. Ensayos de fotocátalisis homogénea in vitro.

Reactores. Se emplearon reactores tipo batch fabricados en vidrio tipo Pirex[®] con una capacidad de 80 mL y un diámetro de 3.5 mL, con una tapa del mismo material.

Equipo. Para los ensayos fotocatalíticos se empleó un simulador solar SUNTEST de HANAU, que funciona con una lámpara de xenón de 1000 W de potencia, emitiendo un espectro compuesto por 0.5% de los fotones de longitud de onda de 300nm (UV- C) y alrededor del 7% entre 300 y 400 (UV- B, A). El espectro emitido entre 400 y 800 nm es comparable que al espectro solar.

Catalizador. Se empleó el oxidante peróxido de hidrógeno, el cual es usado en muchos sistemas directamente o con un catalizador, por otro lado, el catalizador usualmente más utilizado para este proceso es el denominado “Sulfato de hierro”.

2.2.1. Técnicas de recuento a emplear.

NMP. Después de tratadas, las bacterias con fotocátalisis se realizó el recuento por el NMP, que es el método que se propone para contar este tipo de bacterias. Se usó en la fase presuntiva caldo Lactosado (Difco) y en la fase confirmativa caldo Rappaport (Merck).

DVC-FISH. En este paso se combinan los métodos de DVC y FISH para enumerar bacterias del género *Salmonella*, lo primero que se hace es tomar las muestras de solución salina al 085% con *Salmonella* serovariedad Typhimurium, que han sido tratadas con Foto-Fenton

y se diluyen en agua Peptonada al 0.1% (Oxoid) en 6 diluciones; seguidamente se adicionan en un tubo con caldo lactosado (Difco) y extracto de levadura y antibiótico, esto con el objetivo de elongar las células bacterianas viables. Lo que hace el antibiótico es evitar que se multiplique la bacteria, evitando que se aumente el recuento bacteriano inicial, porque inhibe la bipartición en el septo bacteriano [15]. Asimismo, en esta fase lo que sucede es que las bacterias estresadas por el proceso de desinfección como el Foto-Fenton toman las proteínas del caldo y se reactivan, elongándose con el antibiótico. Posteriormente, se fijaron las células bacterianas con Paraformaldehído al 4% para luego hibridarse con las sondas correspondientes para poder hacer el conteo de bacterias viables. Finalmente, se contó o el número de bacterias fluorescentes en un microscopio adaptado para tales fines, con el filtro DAPI y Fluorocromo DAPI.

Recuento en placa. Después de realizada la fotocatalisis con el Foto-Fenton se realizaron 6 diluciones en agua Peptonada al 0.1% (oxoid) y se procedió a sembrar en agar nutritivo (Merck) 100 ul de muestra, por duplicado y se incubaron las cajas a 35+/-1°C por 18-24 horas. Después se hicieron los recuentos.

Por último se compararon los recuentos tanto de recuento en placa, DVC-FISH y NMP.

Sondas. Se usó la sonda, Sal 3; 5'- AATCACTTCACCTACGTG-3' (Microsynth), para hibridizar el 23S rRNA de *Salmonella* serovariedad Typhimurium, según Nordentoft y colaboradores [16].

2.2.2. Filtros para Microscopio de Fluorescencia. Filtros DAPI

Procedimiento. Lo primero que se hizo fue reactivar la cepa ATCC, que estaba preservada en glicerol al 30%, como en los anteriores procedimientos, se partió de un cultivo de 18 horas de incubación en caldo nutritivo (Oxoid), en segundo lugar se le hicieron lavados con el agua Peptonada bidestilada Milli-Q al 0.1% y se ajustó la concentración inicial a una concentración de 1.5×10^8 UFC mL⁻¹ con la escala de McFarland # 0.5, seguidamente se llevó a una concentración final

de 1.5×10^3 UFC mL⁻¹ en 600 mL de solución salina al 0.85%: una vez en este punto, se hizo la siembra en los tres métodos, recuento en placa, NMP y DVC-FISH, para medir concentración inicial.

Muestreo tiempo cero. Se toman 1 mL de muestra del erlenmeyer que contiene una concentración final de 1.5×10^3 UFC mL⁻¹ suspendidas en 600 mL de solución salina al 0.85% y se siembran en 9 mL de agua Peptonada al 0.1%, haciéndose 6 diluciones seriadas. Seguidamente se siembran 1 mL de estas diluciones en 9 mL de caldo lactosado (Difco) se incuban a 35°C x 18-24 horas, iniciándose la fase presuntiva del NMP.

Por otro lado se toman 9 mL del erlenmeyer con concentración 1.5×10^3 bacterias de *Salmonella* serovariedad Typhimurium y se le adiciona 1 mL de antibiótico ácido Nalidixico a 40ug/ mL más 1 mL del caldo Lactosado (Difco) con el extracto de levadura, se incubó por 18 horas en oscuridad a 35°C, empezando así la primera fase del DVC-FISH. En donde el fundamento del antibiótico como ya se había descrito anteriormente, es elongar las bacterias viables, pero evitando la bipartición de la bacteria es decir su multiplicación porque actúa a nivel del septo bacteriano.

Del mismo erlenmeyer con concentración bacteriana de 1.5×10^3 UFC mL⁻¹ se toman 100µl de muestra directamente y se siembran en agar nutritivo con el asa de vidrio, esto se hace por duplicado y se incuban por 24 horas a 35°C, de esta manera se mide el tiempo cero por los tres métodos de recuento.

Preparación de soluciones. Posteriormente se prepararon las soluciones para hacer la fotocatalisis con Foto-Fenton, entonces se partió de los reactivos FeSO₄·7H₂O (Merck) y H₂O₂ (olabs 30%).y se llevaron inicialmente a una concentración de 2000 pmm el H₂O₂ y a 200 pmm el ion Fe²⁺. Después, se agregaron 80 mL de solución salina al 0.85%, que contenía la cepa *Salmonella* serovariedad Typhimurium ajustada a una concentración de 1.5×10^3 UFC mL⁻¹, a los 7 reactores tipo Pirex®, luego se adicionaron los reactivos de la desinfección llevándose a una concentración final de 2 ppm de Fe²⁺ y 20 ppm de H₂O₂, dentro de los reactores. Cómo se colocaron de a 7 reactores por

experimento en el simulador solar SUNTEST de HANAU, se eligió un reactor tapado con papel, como control negativo del experimento y finalmente se inició la desinfección por 10 minutos. En segundo lugar después de la desinfección con Foto-Fenton se procedió a hacer 6 diluciones por reactor en aguas peptona al 0.1%(Oxoid) y se sembraron en los 3 métodos, recuento en placa, NMP y DVC-FISH, para evaluar los recuentos bacterianos. Y así sucesivamente se realizaron los experimentos hasta completar un total de 52 muestras tratadas con Fotofenton, según diseño planteado.

Muestreo después de los 10 minutos de desinfección. Se retiró al azar uno de los reactores de cada experimento. Siete en total. Frente al mechero, y con la mayor agilidad posible, se tomó una muestra de 1mL (con una micropipeta de volumen fijo y una punta estéril diferente para cada reactor) del centro de cada uno de los dos reactores retirados y a 1cm de profundidad (aproximadamente). Seguidamente, se depositó la muestra de cada reactor en un tubo con 9mL de agua peptonada estéril (0.1%) (Oxoid). Posteriormente se taparon los reactores y se regresaron de inmediato al simulador solar, e inmediatamente se llevaron a la oscuridad (a temperatura ambiente) para evaluar reactivación.

Como ya se mencionó anteriormente, después de los 10 minutos de desinfección, las muestras de 1 mL extraídas de cada reactor y depositadas en los tubos con 9 mL de agua Peptonada al 0.1%, se utilizan para hacer diluciones decimales seriadas. Seguidamente se siembra en superficie 100µl de las 6 diluciones por duplicado en cada medio de cultivo agar nutriente (Oxoid). Posteriormente se incuban por 24 horas a 35°C y finalmente se hace el conteo de las UFC presentes en cada caja.

Por otro lado, de las mismas diluciones se transfiere 1 mL de muestra a 9 mL de caldo lactosado (Difco) haciendo las 6 diluciones de cada reactor, se incuban a 35°C por 24 horas, empezando así la fase presuntiva del método NMP.

Finalmente los 8.8 mL de muestra sobrante de cada dilución se le agrega 1 mL de antibiótico a 40ug mL⁻¹ junto con 1 mL de caldo Lactosado

con extracto de levadura, incubando, estos tubos en oscuridad por 18 horas a 35°C. Dando inicio a la primera fase del DVC-FISH. Toda la metodología de esta fase se puede apreciar en la figura 1b.

Evaluación de la Reactivación bacteriana. Con el objetivo de ver si existe un efecto residual post-tratamiento sobre la *Salmonella* y determinar el tiempo mínimo de exposición para obtener desinfección total del agua, en este trabajo se almacenó a temperatura ambiente y en la oscuridad los reactores con el agua artificial tratada, posteriormente se realiza siembras en los tres métodos recuento en placa, NMP y DVC-FISH, a las 48 horas después, de haber terminado los tratamientos foto asistidos.

2.3. Análisis Experimental.

Tipo de estudio. Estudio Experimental

Población. Se emplearon cepas ATCC 15490 de *Salmonella* serovariedad Typhimurium, que fueron tratadas o estresadas con fotocátalisis homogénea.

Tamaño de muestra. Se planteó que la técnica DVC-FISH es el gold estándar para conteo de bacterias viables no cultivables, donde su Especificidad (E_0) es del 99% y su Sensibilidad (S_0) del 99% según Legues y Diaz [17]. Se utilizó el tamaño de muestra para estudios de validación de criterio, teniendo en cuenta que lo que se quiere medir es una proporción poblacional, donde el valor real de la proporción en la población esperada es S_0 (Sensibilidad del gold estándar), considerando un nivel α de significación y un poder $(1-\beta)$ para detectar diferencias estadísticamente significativas entre ambas proporciones S_0 y S_1 (Sensibilidad método a evaluar) [18].

Igualmente la proporción esperada de E_0 (Especificidad del gold estándar) considerando un nivel α de significación y un poder $(1-\beta)$ para detectar diferencias estadísticamente significativas entre ambas proporciones E_0 y E_1 (Especificidad método a evaluar).

Teniendo en cuenta que se definieron para la apropiada validez de las pruebas, una Especificidad (E_0) del 90% y una Sensibilidad (S_0) del 90%, valores mínimos comparables con el método gold estándar (DVC-FISH), los cuales son del 99% respectivamente [17], el tamaño de muestra se escogió bajo los siguientes parámetros:

Valor de $Z_{(1-\alpha)} = 1,64$ (Un nivel de confianza del 90%)

Valor de $Z_{(1-\beta)} = 1,04$ (Poder de la prueba del 85%)

Muestra para sensibilidad; $n = 29$ muestra

Muestra para especificidad; $n = 29$ muestras

Obteniendo finalmente un tamaño de muestra total de $n = 58$. Este tamaño de muestra se rea justó por potenciales pérdidas durante el experimento, que por recomendación de expertos en muestreo se consideró en un 10%. Así el tamaño de muestra definitivo fue de 35 para medir sensibilidad y 35 para medir especificidad.

2.4. Diseño Experimental. Pruebas Diagnósticas.

2.5. Selección capacitación y supervisión del personal del laboratorio.

Teniendo en cuenta que se necesitaba personal con un alto perfil para la ejecución del experimento, se seleccionó una estudiante de último semestre de biología para entrenarla en el método de NMP y recuento en placa, a una estudiante de maestría en microbiología para entrenarla en el método molecular DVC-FISH y se entrenó como apoyo para el conteo de recuento en placa a una estudiante de epidemiología. La capacitación se enfocó hacia el buen manejo y ejecución del protocolo correspondiente al método o prueba asignada, así como el buen registro de los datos en Excel. Todo esto coordinado y supervisado por la coordinadora del laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Universidad del Valle.

2.6 Recolección y administración de datos. La información se recolectó en Bitácoras, una para cada método o prueba, donde se registraron las acciones que se llevaron a cabo en el experimento. Dicha bitácora contiene todos los sucesos de los experimentos, las fallas que se produjeron, los cambios que se introdujeron y resultado de los mismos. Posteriormente los resultados obtenidos del conteo de las tres técnicas también se registraron en medio magnético (Excel versión 97-2003). Se contó, con el apoyo del jefe o directora del laboratorio quien custodia toda la información recolectada en medio físico y magnético.

2.7 Método de análisis estadístico. Después de realizada la fotocatalisis con Foto-Fenton a muestras de solución salina al 0.85%, (que tenían presente cepas ATCC 15490 de *Salmonella* serovariedad Typhimurium, a una concentración de 10^3 UFC mL⁻¹, que estaban dentro de los reactores de 80 mL, los cuales fueron la unidad experimental), se realizó la cuantificación bacteriana por los tres métodos NMP y recuento en placa y se compararon los resultados frente a los recuentos hechos con el estándar de oro DVC-FISH. El programa de captura para la información de los tres métodos microbiológicos se diseñó en Excel versión 97-2003; en la captura se realizó control de entrada de datos y se usó la técnica de doble digitación para garantizar la calidad de los mismos. Aquí se hizo entrega de los resultados a la estudiante de Maestría en Epidemiología para revisión y procesamiento, quién fue la misma estadística. Una vez revisada por el profesional en estadística se procedió a exportar la base de datos al programa estadístico SPSS versión 19,0.

El análisis estadístico se realizó inicialmente mediante análisis descriptivo de los conteos en los tres métodos antes y después de la desinfección por foto-Fenton, sin antes realizar una transformación a una base logarítmica base 10. Para posteriormente identificar la media \pm desviación estándar e intervalo de confianza (IC) del 95%, según el caso. Posteriormente, esta variable respuesta cuantitativa se convirtió en una variable cualitativa dicotómica ([+] si detectó bacterias viables ó [-] sino detectó bacterias viables), con el objetivo de medir la capacidad discriminatoria de las técnicas recuento en placa y NMP frente al gold estándar DVC-FISH, donde se calcularon: la

sensibilidad, especificidad, según [8,19] valor predictivo negativo y valor predictivo positivo según Fernández [8], de cada uno de los métodos. Por consiguiente se validó el NMP, mediante las Pruebas de Diagnóstico, para cuantificar bacterias patógenas (*Salmonella Typhimurium*), cuando han sido sometidas a un proceso de desinfección por Foto-Fenton. Ver en la tabla 1 y 2 las variables a tener en cuenta en los dos métodos de recuento DVC-FISH y NMP.

Tabla 8. Definición de variables

Variable	Tipo de variable	Escala	Unidad
Recuento DVC- FISH	Cuantitativa discreta	De razón	Bacteria/ mL
Recuento NMP	Cuantitativa discreta	De razón	NMP/ 100 mL
Recuento en Placa	Cuantitativa discreta	De razón	UFC/ mL

Tabla 9. Definición de variables DVC-FISH

Variable	Tipo de variable	Escala	Unidad
Recuento DVC- FISH	Cuantitativa discreta	De razón	Bacteria/ mL
Recuento NMP	Cuantitativa discreta	De razón	NMP/ 100 mL
Recuento en Placa	Cuantitativa discreta	De razón	UFC/ mL
Tipo de microorganismo	cualitativa	Nominal	Bacteria / mL con tratamiento foto catalítico

Figura 33. Diagrama de Flujo del Proceso Metodológico para la Validación de la Técnica NMP.

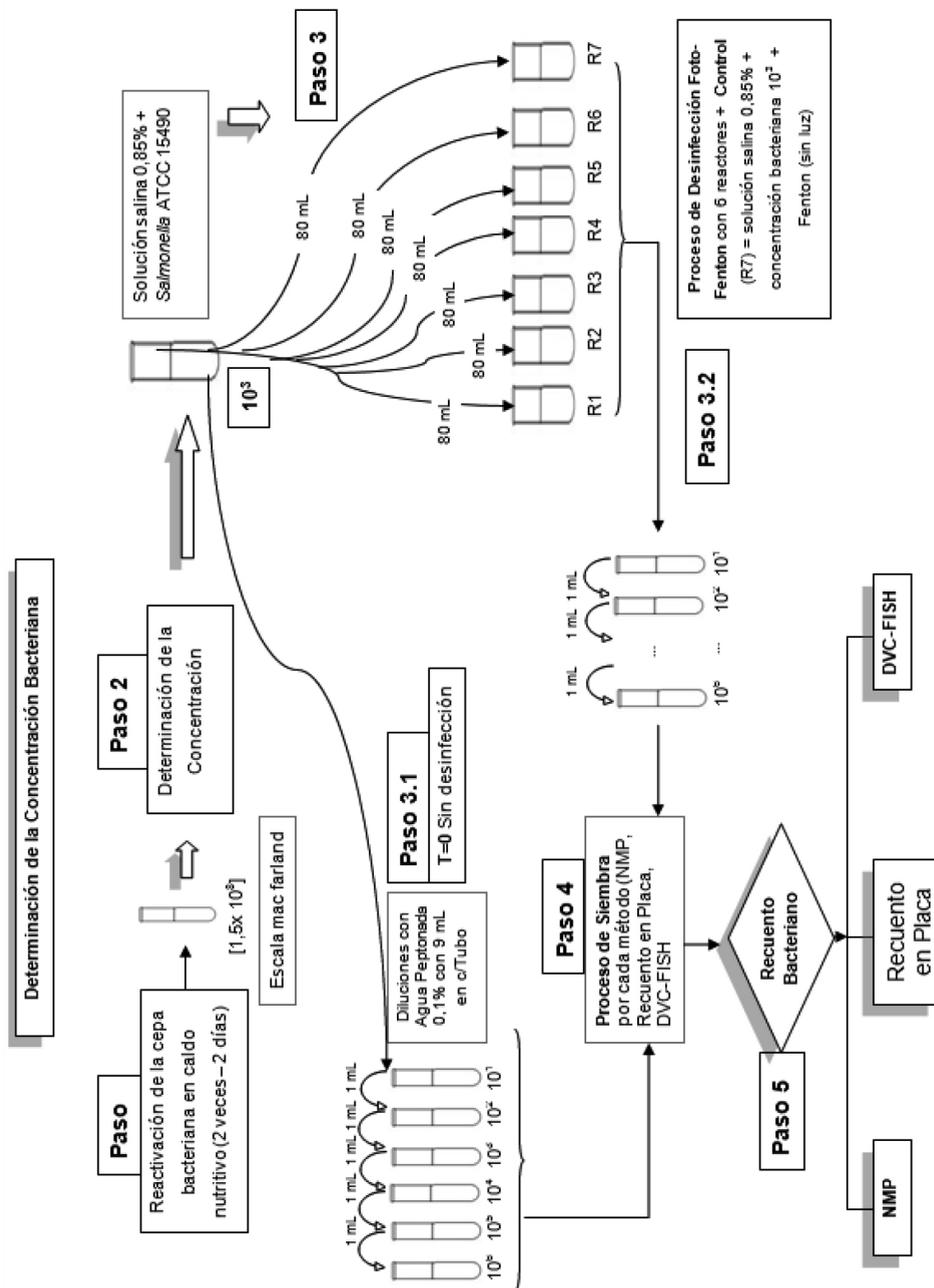
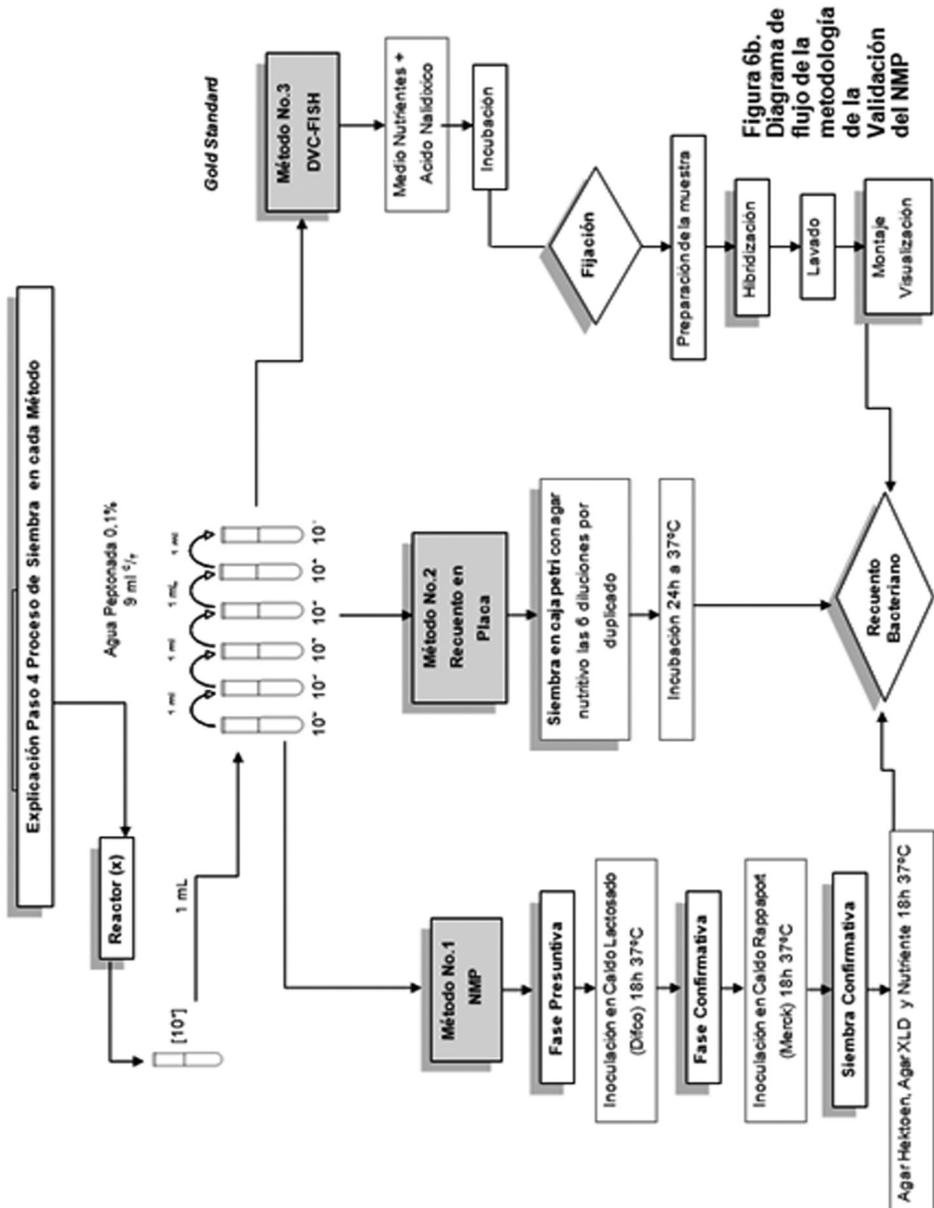


Figura 34. Diagrama de Flujo del Proceso Metodológico para la Validación de la Técnica NMP.



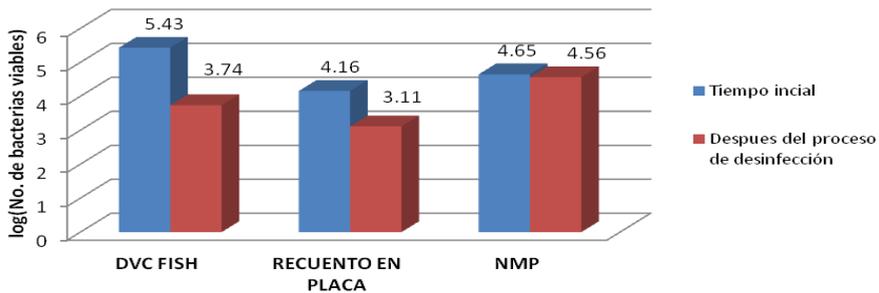
3. RESULTADOS

3.1 Cuantificación de *Salmonella* serovariedad Typhimurium, por los tres métodos, DVC-FISH, NMP y recuento en placa, en tiempo inicial y a los 10 minutos de aplicar el proceso de desinfección con Foto-fenton.

La figura 2 muestra la variación de la cuantificación de la concentración inicial bacteriana detectada por los tres métodos, encontrándose que para el recuento en placa la variación fue de 1.2 unidades logarítmicas, comparado frente al DVC-FISH que detectó 5.4 unidades logarítmicas. Asimismo, al hacer la comparación con el método del NMP, frente al DVC-FISH, se encuentra una variación de 0.8 unidades logarítmicas. Es preciso resaltar que al momento de esta medición aun las bacterias no han sido expuestas al proceso de desinfección.

Igualmente, en esta figura se puede apreciar que después de los 10 minutos de exposición al proceso de desinfección con Foto-fenton (2ppm de Fe^{2+} y 20ppm de H_2O_2), el recuento en placa disminuye notablemente al compararse con el recuento inicial, con una variación de 2 unidades logarítmicas, al igual que el método DVC-FISH, mientras que el NMP solo presentó una diferencia de 0.09 unidades logarítmicas. Observándose entre métodos que el DVC-FISH, fue el que más detectó bacterias en el conteo inicial, sin el proceso de desinfección, mientras que el NMP, fue el que detectó después de 10 minutos de desinfección. Por lo anteriormente dicho y teniendo en cuenta que el método del NMP utiliza caldos enriquecidos, se puede concluir que este factor hace que se multipliquen las bacterias y se sobre estime el recuento, cuando se lleva poco tiempo en la desinfección con Foto-fenton.

Figura 35. Cuantificación de *Salmonella* TYPHIMURIUM, por los tres métodos, DVC-FISH, NMP y recuento en placa, en tiempo inicial y a los 10 minutos de aplicar el proceso de desinfección con Foto-fenton (2ppm de Fe²⁺ y 20ppm de H₂O₂)



3.2 Evaluación de las medidas de validez, de los métodos de recuento en placa y NMP, frente al método DVC-FISH, para la cuantificación de inactivación bacteriana con Foto-fenton a los 10 minutos de exposición.

En las tablas 3 - 4 y figura 3 se resumen los resultados obtenidos en las muestras contaminadas con *Salmonella* serovariedad Typhimurium y con 10 minutos de exposición a la desinfección con Foto-fenton (2ppm de Fe²⁺ y 20ppm de H₂O₂) y evaluadas por los tres métodos, se observa que el método tradicional recuento en placa y NMP, presentan un comportamiento similar en la primera dilución, porque de 35 muestras (verdaderamente positivas con *Salmonella* serovariedad Typhimurium), estos dos métodos detectan correctamente dichas muestras. Entonces se observa que las dos técnicas evaluadas tienen una mayor sensibilidad cuando la concentración bacteriana es alta. Por el contrario cuando pasamos a una dilución 10⁻², el método de recuento en placa, la sensibilidad pasa al 51%, lo que significa que de las 35 muestras detectó como positivas para *Salmonella* serovariedad Typhimurium la mitad (18 muestras), en cambio NMP, presentó una Sensibilidad del 100%. Lo cual se traduce que el método NMP detec-

ta correctamente las 35 muestras que son verdaderamente positivas según el Gold estándar.

Cuando se evalúan estos dos métodos en la dilución 10^{-3} se observa que la sensibilidad para el recuento en placa baja al 11%, mientras el NMP, se conserva al 100%, lo que indica que NMP, a esta concentración de bacterias reúne los criterios para continuar con el proceso microbiológico de detección de bacterias cuando la concentración es baja. No obstante los resultados para especificidad no se observan porque el método DVC-FISH, no detectó muestras negativas hasta estas primeras 3 diluciones (10^{-1} - 10^{-3})

Al evaluar las tres últimas diluciones (10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}). Se observa que para el método recuento en placa ya su sensibilidad pasó al 0% y su especificidad toma el 100%, es decir que este método convencional en diluciones muy bajas no es nada sensible para detectar bacterias en estado viable no cultivable pero si presenta una alta especificidad para determinar aguas que no tiene presencia de *Salmonella* en este estado. A la par se observa, que en la dilución 10^{-4} este método clasifica o determina como falsos negativos 28 de las 35 muestras. Al igual que en 10^{-5} 20 muestras y 1 muestra en 10^{-6} .

En el caso del NMP en estas últimas tres diluciones, presenta un comportamiento diferente al de recuento en placa, por cuanto clasificó 6 positivas frente a 28 positivas de acuerdo al método de referencia (DVC-FISH), obteniendo una sensibilidad del 21% y clasificando como falsos negativos 22 muestras. En el caso de la especificidad en esta dilución, toma un valor del 71% dejando como falsos positivos 2 de las 7 muestras negativas según el método de referencia.

Por otro lado, en las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} el método NMP bajó la sensibilidad a un 0%, dejando como falsos negativos 20 y 1 muestras respectivamente, teniendo en cuenta que el método de referencia los clasificó como positivos. En el caso de la especificidad el NMP en la dilución 10^{-5} la aumentó en 93% dejando un 1 muestra como falsa positiva de las 14 negativas detectadas por DVC-FISH. Para la dilución 10^{-6} la especificidad aumentó en un 100%, lo que implica que el

método NMP clasificó correctamente 14 muestras que igualmente el método de referencia clasificó como negativas.

En cuanto a los valores predictivos positivos y negativos para el método Recuento en placa fueron del 100% en las primeras 3 diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) y 0% para las 3 últimas diluciones (10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}), por el contrario los negativos fueron del 0% para las 3 primeras diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) y del 20% para 10^{-4} , seguida del 43% para 10^{-5} y finalmente del 97% para la dilución 10^{-6} .

Comparando estos datos con el método del NMP, se encuentra que, NMP presenta unos valores predictivos positivos del 100%, para las primeras 3 diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), un 75% para la dilución 10^{-4} y un 0% para las diluciones 10^{-6} . En otro sentido los valores predictivos negativos fueron del 0% para las 3 primeras diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), del 18% para la dilución 10^{-4} y del 41.2% para las dos últimas diluciones 10^{-5} y 10^{-6} .

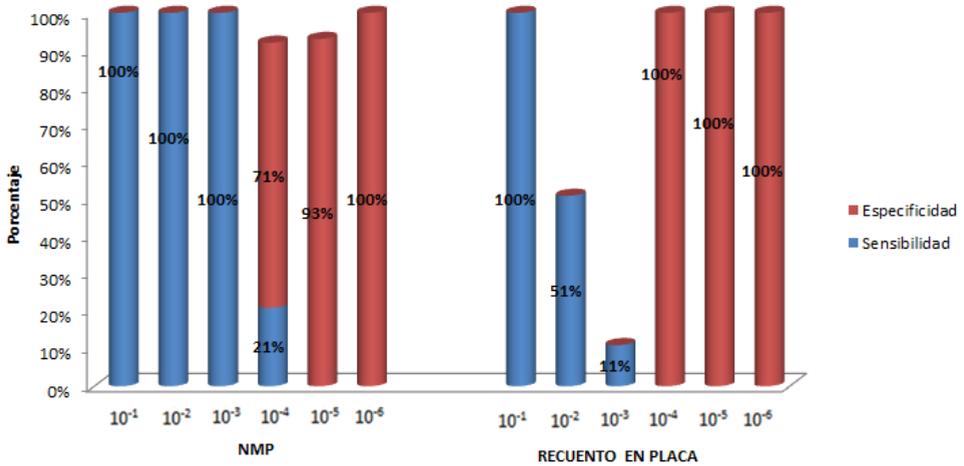
Tabla 10. Medidas de validez del método Recuento en Placa, al evaluar desinfección con Foto-fenton (2ppm de F2+ y 20ppm de H2O2), para Salmone-lla serovariedad Typhimurium, a los 10 minutos de exposición.

Concen- tración	Método +	DVC FISH		Sensibilidad	Especifi- cidad	VPP	VPN
		-					
10^{-1}	+	35		100%	-	100%	-
	Total	35					
10^{-2}	+	18		51%	-	100%	-
	-	17					
	Total	35					
10^{-3}	+	4		11%	-	100%	-
	-	31					
	Total	35					
10^{-4}	-	28	7	0%	100%	-	20%
	Total	28	7				
10^{-5}	-	20	15	0%	100%	-	43%
	Total	20	15				
10^{-6}	-	1	34	0%	100%	-	97%

Tabla 11. Medidas de validez del método NMP, al evaluar desinfección con Foto-fenton (2 ppm de F2+ y 20 ppm de H2O2), para *Salmonella* serovariedad Typhimurium, a los 10 minutos de exposición

Concentración	Método +	D V C		Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
		FISH	_____				
10 ⁻¹	+	35	100%	-	100%	-	-
	Total	35					
10 ⁻²	+	35	100%	-	100%	-	-
	Total	35					
10 ⁻³	+	35	100%	-	100%	-	-
	-	0					
Total		35					
10 ⁻⁴	+	6	21%	71%	75%	18.5%	
	-	22	5				
	Total	28	7				
10 ⁻⁵	+	0	0%	93%	0%	41.2%	
	-	20	14				
	Total	20	15				
10 ⁻⁶	-	1	34	0%	100%	0%	97.1%

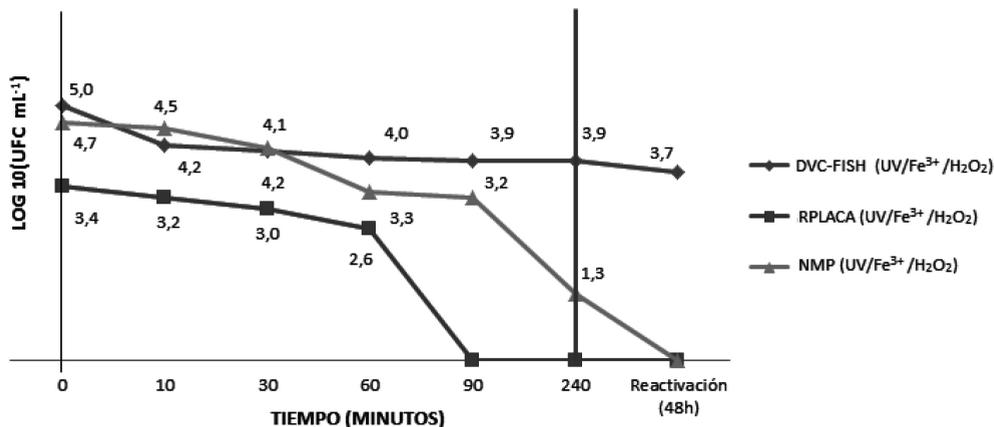
Figura 36. Especificidad y sensibilidad del NMP y recuento en placa, comparados con el método de Referencia o Gold estándar, a los 10 minutos de desinfección con Foto-fenton (2ppm de F_2^+ y 20ppm de H_2O_2).



3.3 Evaluación del proceso de desinfección- Fotocatálisis Homogénea Foto-fenton

Inicialmente se evaluó la respuesta de *Salmonella* serovariedad Typhimurium a la radiación directa de un simulador solar, con presencia del catalizador como $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck) y H_2O_2 (Molabs 30%) que fueron llevados a su vez a unas concentraciones finales de (2ppm de Fe^{2+} y 20 ppm de H_2O_2)

Figura 37. Evaluación de la Sensibilidad de los métodos DVC-FISH, NMP y recuento en placa, para cuantificar *Salmonella* serovariedad Typhimurium, al realizarse Foto-fenton, (2ppm de Fe^{2+} y 20 ppm de H_2O_2), a través del tiempo (t_0 , t 10min, t 30min, t 60min, t 90min, t 240 min y reactivación a las 48h).



Al realizar el seguimiento de la concentración bacteriana se obtiene curvas de desinfección característica de concentración bacteriana viables totales contra el tiempo de desinfección. En gran número de investigaciones se ha observado que dichas curvas presentan tres zonas importantes. La primera es llamada hombro y en esta se observa una disminución lenta de la concentración bacteriana ya que en el tiempo inicial de la reacción al proceso de desinfección se presenta cierta resistencia bacteriana al ataque de los agentes oxidantes anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. En la segunda zona se da un decrecimiento exponencial y las bacterias inician su muerte rápida, después de haber alcanzado su umbral límite de daño necesario y finalmente una zona de inhibición, debida a los subproductos de la reacción, comúnmente, llamada cola, en esta figura 4, se observa que para el método recuento en placa, se cumplen las tres fases características de una curva cinética (Hombro, decrecimiento exponencial y la cola o zona de inhibición). A su vez, el método NMP, solo cumple las dos primeras fases, mientras que para el DVC-FISH, se cumple la primera fase. Esto se debe a que las bacterias entraron en estado Viable no Cultivable por los agentes ox-

idantes o estrés oxidativo, lo cual hace que las bacterias se sean indetectables con métodos convencionales, como ocurrió con el método recuento en placa que a los 90 minutos encuentra el umbral límite de daño, mientras que el método NMP, sigue detectando bacterias viables no cultivables hasta los 240 minutos que termina el periodo de desinfección, igual situación ocurre con el gold estándar DVC-FISH.

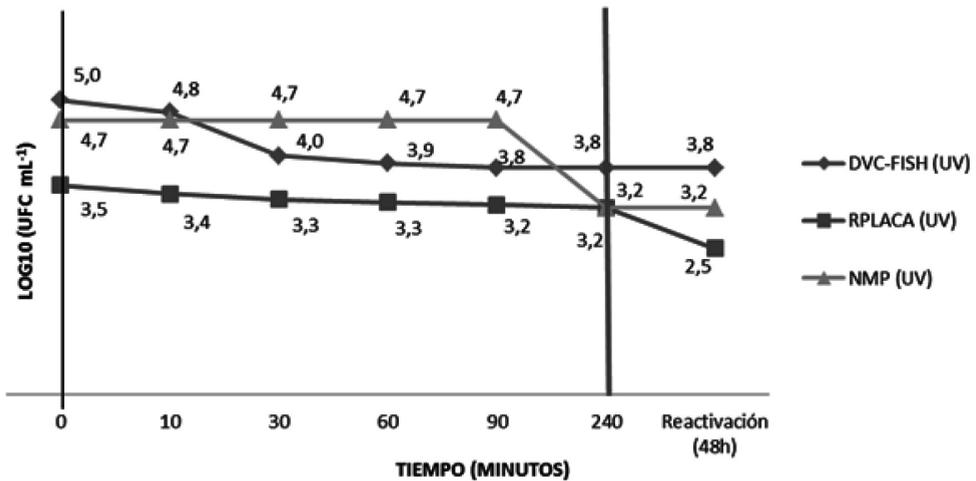
En cuanto al recuento bacteriano, en la figura 4 se observa que el método DVC-FISH cuantifica más bacterias que los otros dos métodos antes de iniciar el proceso de desinfección (tiempo 0), aunque hay que resaltar que con el método NMP la diferencia es solo de 0,3 unidades logarítmicas, mientras que con recuento en placa la diferencia es aproximadamente de 2 unidades logarítmicas y por consiguiente el método NMP es el que tiene recuentos más cercanos al método de referencia en este tiempo inicial (cero). Cuando se sigue la desinfección en el tiempo, se observa que el método NMP a los 10 y 30 minutos detecta más bacterias que el gold estándar DVC-FISH, con la diferencia de 0,3 y 0,1 unidades logarítmicas respectivamente. Esto ocurre porque las bacterias inician un proceso de resistencia al ataque de los agentes oxidantes, que ocasiona un proceso de sobrevivencia donde ocurre una multiplicación bacteriana, causando una sobreestimación. Mientras que en el método DVC-FISH en sus procedimientos utiliza un antibiótico para que las bacterias no formen conglomerados de colonias sino que las bacterias queden sueltas, es decir el antibiótico las separa de las UFC, y hace que a la vez no se multipliquen quedando el número inicial. En el caso del método de recuento en placa en estos dos períodos de tiempo subestima el conteo en 1 unidad logarítmica comparada con el método de referencia DVC-FISH. Siguiendo el tiempo de exposición del proceso de desinfección (Foto-Fenton) se observa que el recuento bacteriano se mantiene en aproximadamente 4 unidades logarítmicas hasta el tiempo de 240 minutos para el método de referencias de DVC-FISH. En el caso de los otros dos métodos su conteo empieza a decaer hasta encontrar el supuesto umbral de daño (muerte total de las bacterias) a los 90 minutos para recuento en placa y la detección de 1,3 unidades logarítmicas para después de 4 horas (240 min) el método NMP.

3.3.1 Recrecimiento pos-tratamiento en la oscuridad. En el período de oscuridad que se inició después de los 240 minutos de exposición al proceso de desinfección hasta completar las 48 horas, se encontró que el método NMP muestra ya el umbral de daño porque no tienen nutrientes, pero si en este momento se le colocaran nutrientes volverían a sobrevivir o activarse, es decir el recuento aumentaría como se ve con el método DVC-FISH, el cual utiliza nutrientes como caldo nutritivo y antibiótico para su conteo, lo que ocasiona que las bacterias no formen conglomerados de colonias sino que las bacterias queden sueltas, como se explicó en el anterior párrafo. Otra posible razón de este fenómeno se explica porque como hay <10 bacterias por mL^{-1} con el NMP a los 240 minutos, estas bacterias siguen haciendo fenton, entonces a las 48 horas de reactivación no se detectan. En cambio el DVC-FISH, demuestra que las bacterias no se murieron sino que conservan su estado viable no cultivable.

3.4. Foto inactivación de *Salmonella* serovariedad Typhimurium suspendidas en solución salina al 0.85%

3.4.1 Irradiación directa en ausencia de catalizador. Teniendo en cuenta que dentro de la Microbiología es importante evaluar la respuesta *Salmonella* serovariedad Typhimurium a la radiación directa de un simulador solar, en ausencia y presencia de catalizador. También se evaluó el comportamiento bacteriano frente a la ausencia del catalizador, donde la concentración de bacterias cultivables decrece, debido a que la irradiación directa en particular la radiación UV, tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento y mantenimiento de las poblaciones bacterianas que es más severo a medida que aumenta el tiempo de exposición, denomina fotólisis, como se puede observar en la figura 5, siguiente.

Figura 38. Evaluación de la Sensibilidad de los métodos DVC-FISH, NMP y recuento en placa, para cuantificar *Salmonella* serovariedad Typhimurium, cuando son expuestas a la UV, sin el proceso Foto-fenton, a través del tiempo (t0, t 10min, t 30min, t 60min, t 90min, t 240 min y reactivación a las 48h).



En la figura 5. Se observa la fase características de una curva cinética hombro para el método recuento en placa hasta los 240 minutos, después de este tiempo inicia la etapa de decrecimiento exponencial continuando hasta el período de oscuridad o reactivación. A su vez el método NMP, también cumple las dos primeras fases (hombro y decrecimiento exponencial), haciendo su decrecimiento exponencial a los 90 minutos, pero vuelve a hacer la fase hombro en el periodo oscuridad o reactivación. Analizando el comportamiento del método DVC-FISH, se observa que solo cumple la primera fase (hombro). Por otro lado se observa que a los 240 min de este proceso de fotólisis las bacterias siguen muriendo para el método de recuento en placa, pero para los métodos de NMP y DVC-FISH si se mantienen estables. Esto explica las limitaciones de este método analítico tradicional para oxidar algunos compuestos altamente estables, que pueden aparecer o desaparecer durante los Procesos Avanzados de Oxidación, como posibles productos intermedios del proceso de oxidación.

3.4.2 Recrecimiento pos-tratamiento en la oscuridad. En el Período Oscuridad, a las 48 horas se observa que para el recuento en placa la fase de de crecimiento ocurre en esta etapa, mientras que los métodos NMP y DVC-FISH, se mantienen estables y con un recuento un poco más alto.

4- DISCUSIÓN

4.1 Efecto del Foto-fenton en la bacteria *Salmonella* Typhimurium a los 10 minutos de desinfección

¿De acuerdo a los resultados encontrados se puede establecer que durante el proceso de desinfección sí se generan bacterias viables no cultivables que se hacen difícil de detectar con los métodos convencionales.

Por consiguiente dichos resultados son comparables con los encontrados por Baudart y colaboradores [20] 2005, cuando evaluaron la calidad del agua, con los métodos de recuento bacteriano, placa y DVC-FISH.

La detección bacteriana con los medios líquidos (NMP), en esta investigación es más alto a los 10 minutos de desinfección, comparado frente a los otros dos métodos, recuento en placa y DVC-FISH. Esto puede deberse a que en la desinfección con la fotocatalisis heterogénea se puede afectar la vía de asimilación de azúcares como es la vía de Embden-Meyerhof y Entner Doudoroff, pero no la vía de la asimilación de las peptonas o proteínas[21].

Por otro lado para poder llegar a una fase de inhibición o inactivación bacteriana completa con el proceso de desinfección por fotocatalisis se debe Oxidar al Acetil coenzima A, para afectar la cadena respiratoria en el ciclo de Krebs y hacer que el proceso sea irreversible[22].

Finalmente al comparar estas hipótesis con los resultados de este trabajo se puede ver claramente que 10 minutos de desinfección con Fo-

to-fenton o la concentración del catalizador usado y las condiciones como está montado el experimento, no son suficientes porque la bacteria aún continúa en un proceso reversible, por lo tanto, suministrarle medios enriquecidos como los caldos del método NMP y DVC-FISH, puede hacer que las bacterias viables no cultivables regeneren su pared o su daño y puedan ser detectadas en unidades más altas que el recuento en placa.

4.2 Evaluación de la Sensibilidad, Especificidad y valores predictivos de los métodos de recuento en placa y NMP, frente al Método DVC- FISH, para la cuantificación de inactivación bacteriana con Foto-fenton a los 10 minutos de exposición

4.2.1 Validación del NMP. Antes de que un método sea utilizado corrientemente en un laboratorio, es necesario que una organización exterior, y el propio laboratorio, lo convaliden debidamente.

Por esta razón, se buscaron otros estudios preliminares que emplearán pruebas diagnósticas para evaluar el proceso de desinfección por fotocatalisis, pero no se hallaron. Las páginas consultadas fueron: <http://www.who.int/hinari/en/> y google académico. Asimismo se consultó, el repositorio de revistas con edición electrónica. [Http://www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com) y [www.elsevier](http://www.elsevier.com), Las variables consideradas fueron: Desinfección, métodos de recuento, NMP, recuento en placa, DVC-FISH, fotocatalisis, validación de métodos, especificidad, sensibilidad y valores predictivos. En los idiomas inglés y español respectivamente.

Este resultado se debe a que los investigadores de la desinfección se han enfocado, en evaluar el comportamiento del proceso de la desinfección, buscando las concentraciones óptimas de los catalizadores, quizá el tiempo adecuado y otras variables, pero no se ha centrado al mismo tiempo en la sensibilidad y especificidad de los métodos que evalúan estas calidades de aguas.

Por otro lado, el referente académico más cercano encontrado fue el de la investigadora Soler[23] (2006), quien realizó un estudio de comparación de métodos de recuento en placa y NMP para aislar

coliformes totales a partir de muestras de alimentos, pero no halló la sensibilidad y especificidad de las pruebas. Aún así la investigadora encontró confiables tanto el NMP, como recuento en placa para aislar coliformes totales procedentes de muestras de alimentos.

Pero se debe tener en cuenta que las colonias bacterianas pueden surgir en grupos o células únicas, todas ellas englobadas bajo el término de unidades formadoras de colonias (UFC), El número final depende de la interacción entre las colonias en desarrollo, para el método recuento en placa, haciendo que el mismo presente desventajas, frente a los otros dos métodos NMP y DVC-FISH.

Es decir en el método recuento en placa no siempre las colonias bacterianas crecen lo suficientemente aisladas, fenómeno que contribuye a subestimar el verdadero recuento bacteriano. Es por esta razón que el método recuento en placa presenta resultados con recuentos bacterianos bajos y alta variación en los resultados de sensibilidad, especificidad, VVP y VPN, cuando se comparan frente a los resultados del NMP y DVC-FISH.

Por otro lado al analizarse la proporción de los resultados falsos negativos para el método de recuento en placa se encontró que empieza en la dilución 10^{-2} (17 muestras), dilución 10^{-3} (31 muestras), dilución 10^{-4} (28 muestras), 10^{-5} (20 muestras) y 10^{-6} (1 muestra), pero no detectó falsos positivos lo que determinó un valor predictivo positivo del 100 %, para las diluciones 10^{-1} - 10^{-3} ; por otro lado para el método del NMP, se encuentra que la proporción de falsos negativos empieza en la dilución 10^{-4} con 22 muestras, 10^{-5} (20) y 10^{-6} (1), NMP, indicando esto que existe una sensibilidad del 100% para las tres primeras diluciones. Lo que significa que el método NMP capta correctamente las 35 muestras que son verdaderamente positivas según el Gold estándar, obteniendo un valor predictivo del 100%, en las primeras 3 diluciones.

Esto indica que el método de recuento en placa tiene más falsos negativos cuando se comparan los dos métodos frente al gold estándar DVC—FISH. Estos resultados del método de recuento en placa tienen serias implicaciones económicas y sanitarias ya que el método

está dejando de detectar bacterias viables no cultivables en el proceso de desinfección, que pueden afectar a muchos pacientes inmunodeprimidos con enfermedades de base y/o niños, pero lo que es más delicado, es que el método asegura que se está realizando un proceso de desinfección completo. Al realizarse el análisis del VPP para el recuento en placa, se encontraron valores del 100% para las 3 primeras diluciones, indicando esto que, para la dilución 10^{-1} , de 35 muestras que se desinfectaron con foto-fenton, todas fueron detectadas como positivas por el método, es decir con crecimiento bacteriano.

Al contrario de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} , en donde la sensibilidad bajó al 51% y 11% respectivamente, lo que significa que de las 35 muestras (Verdaderamente positivas con *Salmonella* serovariedad Typhimurium según el patrón de referencia) el método detectó como positivas la mitad, para la dilución 10^{-2} , y para la dilución 10^{-3} , de las 35 muestras, el método solo detectó como positivas 4 muestras, lo que indica que clasificó 17 muestras como falsas negativas, para la dilución 10^{-2} , y 31 muestras para la dilución 10^{-3} , pero no detectó falsos positivos, lo que determinó un valor predictivo positivo del 100%, para ambas diluciones. Por este motivo el software arrojó VPP del 100% para dichas diluciones. Pero este resultado no es real, debido a que para calcular los VPP, se necesita el dato de los falsos positivos de la prueba, los cuales no fueron detectados por el método, si no que por el contrario, hay que resaltar que se detectaron muchos falsos negativos, esto permite que finalmente se altere el resultado de los VPP para estas diluciones.

Por todo lo anteriormente dicho, los resultados de este estudio están a favor de que la técnica evaluada como recuento en placa no es apropiada para su utilización en la evaluación del proceso de la desinfección por foto-fenton, porque se podría descartar un número apreciable de muestras que realmente son positivas, en 10^{-2} (17) y en 10^{-3} (31), esto, debido a que no es capaz de detectar las bacterias viables no cultivables cuando están en concentraciones bajas. Al comparar los resultados de los VPN, se encuentra que para las tres últimas diluciones (10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}), los porcentajes fueron de 20%, 43% y 97%, respectivamente, indicando esto que, mientras el DVC-

FISH, aun detectaba recuentos bacterianos positivos el recuento en placa los tomó como negativos. Esto pone de manifiesto que el método podría no ser adecuado para descartar una muestra que se ha diagnosticado como contaminada, a pesar de que la especificidad dio 100%, para las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} .

En el caso del NMP, la prueba de la sensibilidad es del 100% para las 3 primeras diluciones y del 21% para la dilución 10^{-4} , indicando esto que detecta más muestras positivas el NMP, al compararlo con recuento en placa; en cuanto a su especificidad, se evidencia que aumenta para las 3 últimas diluciones. Son estos resultados los que hacen pensar que el mejor método para evaluar desinfección por foto-fenton después del DVC-FISH, es el NMP.

Por otro lado se encuentra que los VPP, para las tres primeras diluciones son del 100% y del 75% para la dilución del 10^{-4} , indicando esto que el método detectó como verdaderas positivas las muestras que aún tenían presencia de *Salmonella*.

Por otra parte, se verifica que los VPN se hallaron un poco altos en las 2 últimas diluciones (10^{-4} y 10^{-5}), pero no alcanzaron el 100%, esto significa que el método clasificó como negativas muestras que aún tenían la presencia de *Salmonella*, pero en cambio para la dilución de 10^{-6} , se encontró un buen dato del VPN, del 97.1, lo cual significa que el método clasificó un buen número de muestras que estaban ya negativas para *Salmonella* serovariedad Typhimurium.

Por consiguiente con estos resultados de sensibilidad, especificidad y valores predictivos negativos tan bajos encontrados en la dilución 10^{-4} para el método NMP, se puede concluir que es una técnica no confiable para descartar una muestra que se ha diagnosticado como positiva cuando su concentración es baja. Es decir, cuando se presume la existencia de < 10 bacterias mL^{-1} ó una bacteria en un mL de la muestra. Por tanto en estas condiciones de muestra éstas deberían concentrarse usando mayor volumen de muestra, (10 mL, 100 mL y/o 1000 mL), lo cual ya es recomendado para mediciones de *E coli*[24].

Resumiendo, se observó que de las dos técnicas evaluadas la que mayor muestras positivas detectó en el proceso de foto-fenton, comparada frente al gold estándar fué el NMP, por consiguiente la técnica que obtuvo un porcentaje más alto de falsos negativos, aseverando que la desinfección había sido completa, fué el método recuento en placa.

4.3 Evaluación del proceso de desinfección Fotocatálisis Homogénea Foto-fenton

La fotocatalisis homogénea es mucho más efectiva que la fotólisis para inactivar bacterias entéricas y otros microorganismos. La influencia del catalizador, la radiación absorbida por el catalizador, la composición de la matriz del agua, la concentración y/o fotocatalizador, la temperatura, aireación, agitación, geometría del reactor, pH, temperatura y el tipo de microorganismo que interviene en el proceso entre otras, son variables que pueden modificar las curvas de desinfección[25, 26,27]. Por tal motivo, dentro de este trabajo se empleó como catalizador $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck) y H_2O_2 (Molabs 30%).

Para realizar la fotocatalisis por Foto-fenton, se escogió la concentración 2ppm de Fe^{2+} y 20 ppm de H_2O_2 , la cual es una concentración que está dentro de los rangos propuestos por los investigadores en desinfección por foto-fenton para inactivar bacterias[25]. Como ya se mencionó anteriormente, al realizar el seguimiento de la concentración bacteriana se obtuvieron curvas de desinfección características de concentración bacteriana viables totales contra el tiempo de desinfección. En gran número de investigaciones se ha observado que dichas curvas presentan tres zonas importantes. La primera es llamada hombro y en esta se observa una disminución lenta de la concentración bacteriana ya que en el tiempo inicial de la reacción al proceso de desinfección se presenta cierta resistencia bacteriana al ataque de los agentes oxidantes anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. En la segunda zona se da un decrecimiento exponencial y las bacterias inician su muerte rápida, después de haber alcanzado su umbral límite de daño necesario y finalmente una zona de inhibición, debida a los subproductos de la reacción, comúnmente, llamada cola[28,29]. Los resultados de esta investigación demuestran que para, el método recuento en placa si se

cumple esta curva ya descrita, pero para el NMP y DVC-FIHS no; lo anterior, dado que el método NMP detectó 1.3 unidades logarítmicas y el DVC-FISH, detectó 3.9 unidades logarítmicas a los 240 minutos. Esto se debe a que en el proceso se generaron bacterias viables no cultivables y por esta razón el método recuento en placa a los 90 minutos de desinfección ya no las detectó; esto se comprueba cuando lo comparamos frente al método DVC-FISH. Hay que resaltar que investigadores como Baudart y colaboradores[20] en el 2005, obtuvieron resultados similares cuando compararon los dos métodos, tanto recuento en placa como DVC-FISH para cuantificar bacterias “viables no cultivables” presentes en aguas que están en proceso de potabilización, encontrando que se presentan recuentos muy bajos en el método de cultivo comparados frente al DVC-FISH. De igual forma, al hacer la misma comparación en la red de distribución encontraron iguales resultados.

Además, existen otros estudios, donde realizaron procesos de saneamiento con fotocátalisis heterogénea, evaluando la desinfección con recuento en placa, NMP y Fluorescencia con Dapi- CTC (5-Cyano-2.3-ditoyl tetrazolium chloride), para evaluar bacterias viables no cultivables; se concluyó que en el método recuento en placa las bacterias pierden cultivabilidad debido al estrés oxidativo y por consiguiente el método NMP es el que tiene recuentos más cercanos a la técnica Fluorescencia con Dapi; esto indica que NMP si es un método adecuado para evaluar desinfección con fotocátalisis[30]. Ahora bien, estos resultados son comparables con los encontrados en este estudio ya que aquí se encontró que el método DVC-FISH sirve para evaluar recuento inicial, es decir, bacterias sin estrés oxidativo, bacterias viables, a través del tiempo en el proceso de la desinfección y bacterias viables no cultivables en el periodo de oscuridad, mientras el método NMP es mucho más efectivo para evaluar las bacterias viables no cultivables, dado que durante el proceso de la desinfección no sobreestima la población bacteriana; por último, el método recuento en placa sólo detectó bacterias viables.

Por otra parte, en este trabajo se encontró que para la curva de desinfección de *Salmonella* serovariedad Typhimurium, la fase de

inhibición se alcanza a los 90 minutos, para el método recuento en placa. Estos resultados son similares a los encontrados por Sanabria y colaboradores[21], cuando realizaron un estudio de fotocátalisis heterogénea con *E.coli*, ya que esta bacteria también presenta la fase de inhibición a los 90 minutos para el recuento en placa. De igual manera, en este mismo estudio, al evaluarse el comportamiento de los medios líquidos con azúcares y peptonas, se encontró que *E.coli* en estos medios, después de los 90 minutos, aún seguía viva; resultados que se asemejan a los encontrados en el momento que se evaluó a *Salmonella* serovariedad Typhimurium con el método NMP, ya que la fase de inhibición la hizo en el período de oscuridad a las 48 horas; esto puede deberse a que las pocas bacterias Viabiles no cultivables que detectó el método a los 240 minutos siguen haciendo reacción fenton. Otra posible razón, puede ser que como ya se mencionó anteriormente, la fotocátalisis afecta la vía de asimilación de azúcares como es la vía de Embden-Meyerhof y Entner Doudoroff, pero no la vía de la asimilación de las peptonas o proteínas[21].

Entonces recordando el medio líquido Rappaport (Merck), tiene en su composición proteínas que puede hacer que las pocas bacterias viables no cultivables tomen estos nutrientes. Asimismo esta puede ser una de las posibles razones por la cual ocurre un sobre crecimiento entre los 10 y 30 minutos de desinfección y que finalmente, el tiempo de la fase de inhibición con los medios líquidos sea más prolongada.

También se encontró en otro estudio llevado a cabo por Castaño[31], quien realizó la fotocátalisis heterogénea a bacterias como *Salmonella*, *Shigella* y *E.coli* (las cuales fueron inactivadas después de 3.5 horas, 30 minutos y 1.5 horas respectivamente, cuando se evaluaron en recuento en placa, pero en el momento, que se hizo la comparación con los caldos nutritivos los cuales, también fueron sembrados al tiempo), que todas las muestras presentaron crecimiento, incluso los cultivos en el período de oscuridad, indicando este resultado que las bacterias si entraron en estado viable no cultivable, después de la fotocátalisis y no fueron detectadas por el recuento en placa.

Por otra parte, se encontró que el tiempo efectivo, en las condiciones que se montó el experimento para Foto-fenton, es hasta 10 minutos, en tanto cuando se observó el comportamiento del recuento con el método DVC-FISH, se apreció que de un recuento inicial de 5 unidades logarítmicas, bajó a 4.2 unidades logarítmicas o sea 0.8 unidades logarítmica de diferencia, de ahí en adelante lo que sigue disminuyendo en unidades logarítmicas es poco.

Ahora bien, esto indica que la concentración del catalizador que se empleó, no fue suficiente para inactivar las bacterias totalmente, como lo muestra el método de recuento en placa, ya que están viables, lo que se puede comprobar al observar el recuento del método DVC-FISH.

Asimismo, esto hace pensar en la posibilidad de hacer un montaje para Foto-fenton con diferentes concentraciones del catalizador, para ser más efectivos en la desinfección para bacterias, como lo hicieron los investigadores Bandala y colaboradores[25], en su estudio de Foto-fenton para *E.coli* y *Pseudomonas*.

Por último, el no detectar esas pocas bacterias viables no cultivables que quedan en el proceso de desinfección con foto-fenton, es delicado para la salud humana porque cuando toman un huésped pueden generar síntomas y una enfermedad más agresiva. Asimismo, cuando toman nutrientes pueden sobrevivir de la misma manera que sucede cuando aplicamos el método de conteo directo de Viables no cultivables DVC-FISH. Dicho de otro modo, si se usara agua contaminada con bacterias viables no cultivables en la explotación agrícola, sería un problema para la salud pública. Esta hipótesis se confirma con un estudio realizado por Castro[32], 2011, en donde se investigó si el agua usada para riegos de cultivos era vehículo de transferencia de *Salmonella* sp., demostrándose la existencia de una diversidad de serotipos (variedades) de *Salmonella* encontrados en el agua de uso agrícola, así como una alta resistencia de éstos a varios antibióticos. Además, algunas especies también fueron aisladas de la superficie de los cultivos. De igual manera, otros investigadores como Morales[33] 2009, describen que en su estudio de detección de *Salmonella* spp.,

en melón cantaloupe en unidades de producción y unidades de empaque, fue positivo para el aislamiento de *Salmonella* serovariedad Typhimurium y esto tal vez pudo deberse al agua de irrigación.

4.4 Foto Inactivación de *Salmonella* serovariedad Typhimurium, suspendida en solución salina al 0.85%

4.4.1 Irradiación directa en ausencia de catalizador. En la fotólisis ocurre una cinética de reacción simple en donde se afecta la velocidad de reacción debido a que las bacterias son expuestas sólo a los agentes oxidantes generados por la Luz Ultravioleta como el anión superóxido. Por lo tanto se debe tener en cuenta que este tipo de desinfección bacteriana es más lenta. Cuando se compararon los métodos recuento en placa y NMP, para evaluar este tipo de desinfección, se encontró que la fase de hombro es más lenta para el método de recuento en placa a los 240 minutos, mientras que para el método NMP, es más rápido a los 90 minutos. Esto puede deberse a que ocurre una disminución lenta de la concentración bacteriana, ya que en el tiempo inicial de la reacción se presenta cierta resistencia bacteriana al ataque de las especies oxidantes[28,29]. Por consiguiente como ya se mencionó anteriormente el estrés oxidativo, puede ocasionar en las bacterias daños que pueden ser reversibles o irreversibles, lo cual trae como consecuencia el estado viable no cultivable[33]. Como se observa en estos resultados, aún no hay una total desinfección con el método UV, esto puede deberse a que como no se usa un catalizador que acelere la reacción de desinfección y se sigan generando más productos intermedios del oxígeno, las bacterias tengan tiempo de activar sus mecanismos de defensa genéticos y sigan presentando resistencia.[34]

Asimismo, ya se han hecho estudios previos para evaluar el proceso de bacterias Viables no cultivables generadas en el proceso de desinfección, como es el caso del trabajo de Villarino y colaboradores[33], quien indujo estrés oxidativo a la bacteria *Escherichia coli* (*E.coli*), empleando diferentes dosis de luz ultravioleta, encontrando que al sembrar estas bacterias en cajas petri con medios sólidos, éstas no crecieron; pero cuando se realizó la técnica del conteo de bacterias

viables mediante hibridación *in-situ* con fluorescencia (DVC-FISH), estas fueron observables. Estos resultados son muy parecidos a los encontrados en este trabajo ya que aquí se encontró que el método recuento en placa detectó menos bacterias (3.2 unidades logarítmicas), a los 240 minutos de desinfección y a las 48 horas en el período de reactivación o oscuridad (2.5 unidades logarítmicas), comparado frente al DVC-FISH, el cual detectó 3.8 unidades logarítmicas a los 240 minutos y a las 48 horas período de oscuridad.

A los 240 minutos de desinfección se encontró que tanto recuento en placa como NMP, detectaron, el mismo recuento bacteriano (3.2 unidades logarítmicas), pero al evaluarse el período de reactivación a las 48 horas se observó que el método NMP, detectó más, obteniendo un recuento de 3.2 unidades logarítmicas, es decir este método no varió su recuento en el período de oscuridad mientras que recuento en placa bajó a 2.5 unidades logarítmicas, indicando esto que si se generaron bacterias viables no cultivables, y se puede confirmar esta hipótesis al comparar los resultados frente al DVC-FISH, el cual detectó en la fase de oscuridad o reactivación 3.8 unidades logarítmicas. Finalmente se puede observar que en este proceso aún hay bacterias que tienen daños reversibles que al ser cambiadas a medios enriquecidos o condiciones favorables pueden reactivarse nuevamente, esto puede deberse a la falta de un catalizador que acelere la reacción de la desinfección o la falta de tiempo de exposición.

4.5 Cuantificación de *Salmonella* serovariedad Typhimurium en el periodo de pos tratamiento en la oscuridad, mediante los tres métodos, recuento en placa, NMP y DVC- FISH

La fotocatalisis, heterogénea o homogénea es un método de desinfección que ha demostrado buenos resultados en la reducción de microorganismos patógenos, especialmente *E.coli*, tanto en estudios de laboratorio como en agua potable. Sin embargo, se ha observado un aumento en el número de bacterias horas después de culminado el proceso de iluminación[12]. Por el contrario, en otros resultados obtenidos por Castillo[35], se observó que *E.coli* si se inactivó totalmente con fotocatalisis heterogénea, es decir, no hubo re crecimiento en el período de oscuridad, pero bacterias como *Shigella* spp. y *Sal-*

monella spp., si re crecieron después de haber llegado a una inactivación o fase de inhibición cuando fueron evaluadas con recuento en placa. Posteriormente, en otro trabajo de Castaño[31], 2006, se encontró que aunque las bacterias *Salmonella*, *Shigella* y *E.coli* fueron inactivadas después de 3,5 horas, 30 minutos y 1,5 horas cuando fueron evaluadas por el método de recuento en placa, pero cuando se hizo la comparación de los caldos nutritivos que también fueron sembrados al tiempo, se encontró que todos presentaron crecimiento, incluso los caldos en el período de oscuridad, indicando este resultado que las bacterias si entraron en estado viable no cultivable después de la fotocatalisis y no fueron detectadas por el recuento en placa. Aquí hay que resaltar que *E.coli*, cuando fue evaluada en el período de oscuridad con el método de recuento en placa, no presentó recrecimiento, pero si se obtuvo crecimiento con los medios líquidos, caldos nutritivos. Por otro lado, al analizar a *Salmonella* y *Shigella* en el período de oscuridad, se encontró que estas bacterias presentaron recrecimiento a las 24 pero no a las 48 de horas de reactivación, cuando fueron sembradas en método de recuento en placa.

Concluyendo, estos resultados indican que las pocas bacterias viables no cultivables se hicieron indetectables con el recuento en placa, pero en realidad no habían muerto.

Al seguir comparando los resultados encontrados en este trabajo se puede resaltar que aquí se empleó fotocatalisis con Foto-fenton y que la fase de inhibición para recuento en placa empezó a los 90 minutos y no se obtuvo recrecimiento posteriormente en la oscuridad, es decir, este método evalúa el proceso como una desinfección completa (ver figura 4). Por otra parte, tanto el método NMP hace su fase de inhibición en el período de oscuridad a las 48 horas, dado que a los 240 minutos de desinfección ya hay <10 bacterias mL^{-1} , al tiempo que las pocas bacterias viables no cultivables que quedaron siguieron haciendo reacción fenton y al final ya no fueron detectadas por el NMP. En comparación con el DVC-FISH, este método nos muestra a través del tiempo que las bacterias nunca llegaron a fase de inhibición total, ni aún en el período de oscuridad; la explicación para este fenómeno

es que las bacterias se vuelven viables no cultivables para los métodos de recuento en placa, pero además aclara que las bacterias jamás han hecho recrecimiento, por el contrario, simplemente se volvieron indetectables a cierto grado y horas de estrés oxidativo generado por la desinfección.

También, al comparar el estudio de Castaño[31], 2006 en el que evaluó la desinfección por fotocatalisis heterogénea de *Salmonella* serovariedad Typhimurium, con el método de recuento en placa, se encontró que la bacteria se inhibió a las 3,5 horas, pero obtuvo crecimiento a las 24 horas en el período de oscuridad; mientras en este trabajo, en el que se desinfectó con Foto-fenton, no se obtuvo crecimiento del mismo microorganismo por el método de recuento en placa en el período de oscuridad.

Para entender un poco más estos resultados y el proceso del periodo en la oscuridad, algunos investigadores como Wist[12], proponen que el aumento en la población bacteriana en la etapa de la oscuridad puede tener lugar por la acción de los tres fenómenos diferentes: recrecimiento, reactivación y activación.

El recrecimiento hace referencia a la capacidad que tienen los microorganismos que resistieron al proceso fotocatalítico de crecer, reproducirse y dar origen a una nueva población a expensas de detritus y células muertas [12]. La reactivación, a diferencia del recrecimiento, aumenta el número de microorganismos debido a la capacidad que tienen las bacterias de entrar en estado viable no cultivable durante la iluminación para luego volver a su estado normal cuando las condiciones son favorables. La existencia de células viables pero no cultivables puede ser una respuesta fisiológica de las bacterias para sobrevivir a condiciones de estrés medio ambiental [36,34].

Al comparar estas hipótesis con los resultados de este trabajo se puede concluir que la reactivación es lo más cercano que le puede estar pasando a las bacterias cuando se desinfectan con Foto-fenton ya que el método recuento en placa no las detecta después de 90 minutos de desinfección por la resistencia que ellas generaron al

proceso de desinfección haciéndose viables no cultivables y a esto hay que sumarle que tal vez hubo daño a nivel de DNA, membranas y pared, pero no hubo oxidación del Acetil coA, lo cual si hubiese sido letal [22]. Pero otra posible hipótesis es que se afectó la vía de la asimilación de azúcares pero no la vía de la asimilación de peptonas [21], lo que haría posible que cuando las bacterias tuviesen las condiciones favorables, durante el período de oscuridad, pudieran tomar los nutrientes de los caldos DVC-FISH y NMP y ser detectadas, como sucedió en los experimentos de este estudio.

La activación se produce cuando bacterias que se encontraban en forma inactiva antes de la fotocatalisis, se activan gracias a la irradiación, bajo las condiciones de estrés producidas durante el tratamiento. Al activarse con la irradiación pueden ser detectadas por el método microbiológico de análisis y generar de esta forma un aumento en las diferentes poblaciones de bacterias.

Finalmente, de acuerdo con todos los resultados encontrados tanto en el período de iluminación como de oscuridad, se puede concluir que las bacterias jamás han sido inactivadas o inhibidas totalmente en el proceso de desinfección con Foto-fenton y lo que sucede es que las bacterias tienen daños reversibles que las hacen viables no cultivables en los métodos de recuento en placa, pero si estas bacterias tienen las condiciones favorables como medios líquidos con proteínas pueden restablecer su daño y hacerse cuantificable para los métodos DVC-FISH y NMP.

5. CONCLUSIONES

Se demostró que la sensibilidad del método NMP es mayor que la del método tradicional Recuento en placa, teniendo en cuenta que el método de NMP clasificó correctamente el mayor número de muestras que son verdaderamente positivas hasta una dilución más que el Recuento en placa (NMP hasta la concentración bacteriana 10^{-3} , mientras que el método de Recuento en placa alcanzó su máxima sensibilidad cuando la concentración bacteriana era 10^{-2}).

El método de recuento del NMP es apto para evaluar el proceso de desinfección por Foto-fenton, ya que presenta una sensibilidad, especificidad y valores predictivos más altos frente al método de recuento en placa para detectar bacterias viables no cultivables.

Se realizó la validación del método de recuento NMP para evaluar aguas tratadas con foto catálisis frente al Gold estándar DVC-FISH.

El VPP del método NMP y recuento en placa fue muy bueno hasta la dilución 10^{-3} donde obtuvieron el 100%, mientras que en la dilución de 10^{-4} , recuento en placa perdió la posibilidad de confirmar muestras positivas, mientras que NMP la conservó con una probabilidad del 75%.

Los resultados obtenidos de la especificidad y el valor predictivo negativo de los dos métodos es baja hasta la dilución 10^{-5} , lo que implica que las dos técnicas no son lo suficientemente específicas para confirmar muestras negativas cuando realmente lo son, ni para confirmar la ausencia de *Salmonella* en dichas muestras.

El método recuento en placa no es válido y apto para evaluar el proceso de desinfección por fotocatalisis (Foto-fenton), ya que es un método no confiable cuando la concentración bacteriana es baja (10^{-3} hasta 10^{-6}), debido a que su capacidad discriminatoria no permite detectar las muestras verdaderamente positivas y aumenta el diagnóstico de falsos negativos.

El NMP es un método que puede evaluar la desinfección por Foto-fenton a través del tiempo cuando se compara frente al método DVC-FISH.

La concentración del catalizador empleado en el proceso de desinfección por Foto-fenton, no fue suficiente para inactivar las bacterias de *Salmonella* serovariedad Typhimurium totalmente, ya que a las 4 horas de desinfección aún se encontraron bacterias viables por los métodos de recuento NMP y DVC-FISH.

El método DVC-FISH, sirve para evaluar recuento inicial, es decir bacterias sin estrés oxidativo, bacterias viables, a través del tiempo en el proceso de la desinfección y bacterias viables no cultivables en el período de oscuridad. Mientras que el método NMP, es mucho más efectivo para evaluar las bacterias viables no cultivables, porque en el proceso de la desinfección, no sobreestima la población bacteriana; por último, el método recuento en placa solo detecta bacterias viables.

Los resultados de este trabajo permiten aumentar el fortalecimiento de la Vigilancia de la calidad del agua en Salud Pública. Ya que con los resultados obtenidos en esta investigación se observa la necesidad de implementar aproximaciones como la aquí realizada y usar los datos para realizar ajustes al protocolo definido por el INS, para evaluar la calidad de la agua en el país. Además, el método NMP, permitiría evidenciar la magnitud de los eventos de Interés en Salud Pública al aumentar el número de casos detectados.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos El presente trabajo fue financiado por el proyecto BIOSOLAR-DETOX en el marco del convenio EPFL SUIZA -UNIVALLE, los autores agradecen especialmente por su apoyo a Danny Mercedes Acevedo, Leidy P. Bedoya, Luis E Mora por el apoyo en el desarrollo de los ensayos, Dra Beatriz Olaya, Angela Cubides, Andrey Payan, Julian Muñoz y en general al grupo GAOX, por sus aportes en la discusión.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] WHO. OECD, “Assessing Microbial Safety of Drinking Water Improving Approaches and Methods,” *Sci. Total Environ*, London, 2003.
- [2] FM. Reiff, “El estado de la desinfección del agua potable en América Latina y el Caribe”, *ILSi* , Washington, pp. 101-13, 1996.
- [3] D. C. Cáceres, E. Estrada, R. DeAntonio, and D. Peláez, “La enfermedad diarreica aguda: un reto para la salud pública en Colombia,” *Rev. Panam. Salud Pública*, vol. 17, no. 1, pp. 6–14, 2005.
- [4] OMS, “Guidelines for Drinking-water Quality,” *Atención Primaria*, vol. 23, no. Vdv, p. 7, 2006.
- [5] M. F. Gutiérrez *et al.*, “Comportamiento de la diarrea causada por virus y bacterias en regiones cercanas a la zona Ecuatorial,” *Colomb. Med.*, vol. 36, no. 4 SUPPL. 3, pp. 6–14, 2005.
- [6] U and WHO, “Tratamiento Clínico de la Diarrea,” Nueva York, 2004.
- [7] INd. Salud, “Estadísticas de la Vigilancia en Salud Pública - Serotipos y Patrones de Susceptibilidad Microbiana *Salmonella* spp.” Dic. 2010. [Online]. Available: <http://www.ins.gov.co/?id-categoria=6138#>.
- [8] P. Fernández and P. Díaz, “Pruebas diagnósticas,” pp. 1–6, 2003.
- [9] K. Lemarchand and P. Lebaron, “Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in a French coastal watershed: Relationship with fecal indicators,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 218, no. 1, pp. 203–209, 2003.
- [10] M. Leal, “Tecnologías convencionales de tratamiento de agua y sus limitaciones,” *Esc. Posgrados, UNSAM, Buenos Aires*, pp. 57–66, 2005.
- [11] M. Litter, “Tecnologías avanzadas de oxidación: tecnologías solares,” *Esc. Posgrados, UNSAM, Buenos Aires*, pp. 57–66, 2005.

- [12] J. Wist, J. Sanabria, C. Dierolf, W. Torres, and C. Pulgarin, "Evaluation of photocatalytic disinfection of crude water for drinking-water production," *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, pp.241-6, 2002.
- [13] S. P. Rivera, L. J. Flórez, and J. Sanabria, "Standardization of a quantification method for Salmonella spp . and Shigella spp . in specific liquid media Standardization of a quantification method for Salmonella spp . and Shigella spp . in specific liquid media," *Colomb. Med.*, vol. 41, no. 1, pp. 60–70, 2010.
- [14] S. P. Rivera, "Estandarización de un método microbiológico para cuantificación de Salmonella sp y Shigella sp. y validez de dos métodos de cuantificación, empleados en el diagnóstico de Salmonella sp., presente en aguas artificiales tratadas mediante el proceso de desinfección Foto-Fenton" Universidad del Valle, Santiago de Cali, Colombia, 2011.
- [15] T. Garcia-Armisen and P. Servais, "Enumeration of viable E. coli in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization," *J. Microbiol. Methods*, vol. 58, no. 2, pp. 269–279, 2004.
- [16] S. Nordentoft, H. Christensen, and H. C. Wegener, "Evaluation of a fluorescence-labeled oligonucleotide probe targeting 23S rRNA for in situ detection of Salmonella serovars in paraffin-embedded tissue sections and their rapid identification in bacterial smears," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 35, no. 10, pp. 2642–2648, 1997.
- [17] ME. Legues, CG. Franco, and CP. Bertin, "Pilot study of PML/RARalpha fusion by fluorescence in situ hybridization (FISH) method in acute promyelocytic leukemia," *Rev méd, Chile*, vol.130 no. 7, pp. 737-44, 2002.
- [18] S. Lemeshow, H. D, J. Klar, and S. Lwanga, "Determinación del tamaño de muestras en Estudios Sanitarios Ginebra" *Org. Mundial de la Salud*, 1991.
- [19] Fao, *Manuales para el control de calidad de los alimentos 14. Calidad En El Laboratorio Químico De Control De los alimentos*. Roma, 1996.

- [20] J. Baudart, A. Olaizola, J. Coallier, V. Gauthier, and P. Laurent, "Assessment of a new technique combining a viability test, whole-cell hybridization and laser-scanning cytometry for the direct counting of viable Enterobacteriaceae cells in drinking water," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 243, no. 2, pp. 405–409, 2005.
- [21] J. Sanabria, J. Wist, and C. Pulgarin, "Photocatalytic disinfection treatments: viability, cultivability and metabolic changes of e. coli using diferent measurements methods," *Rev. Dyna*, vol. 78, no. 166, pp. 178–187, 2011.
- [22] P. C. Maness, S. Smolinski, D. M. Blake, Z. Huang, E. J. Wolfrum, and W. A. Jacoby, "Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: Toward an understanding of its killing mechanism," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, no. 9, pp. 4094–4098, 1999.
- [23] J. P. Soler León, "Validación Secundaria Del Método De Número Más Probable Y Recuento En Placa Profunda Para Coliformes Totales Y Fecales En Muestras De Alimentos Basada En La Norma ISO NTC 17025," pp. 1–81, 2006.
- [24] APHA, AWWA, and WEF, "Standard methods for the examination of water & wastewater," 21st Ed. American Public Health Association American Water Works Association Water Enviroment Federation, 2005.
- [25] E. R. Bandala *et al.*, "Application of azo dyes as dosimetric indicators for enhanced photocatalytic solar disinfection (ENPHOSODIS)," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 218, no. 2–3, pp. 185–191, 2011.
- [26] AK. Benabbou, Z. Derriche, C. Felix, P. Lejeune, and C. Guillard, "Photocatalytic inactivation of Escherischia coli: Effect of concentration of TiO₂ and microorganism, nature, and intensity of UV irradiation". *Applied Catalysis B: Environmental*, pp. 246, 2007.
- [27] A. G. Rincón and C. Pulgarin, "Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H₂O₂ on E. coli K12 photocatalytic inactivation by TiO₂: Implications in solar water disinfection," *Appl.*

- Catal. B Environ.*, vol. 51, no. 4, pp. 283–302, 2004.
- [28] K-SE. Dalrymplea, MA. Troztb, D.Goswami, and A. Yogi, “review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection,” *Science Direct*, Julio, vol.98,no.1, pp. 27-38, 2010.
- [29] F. M. Salih, “Formulation of a mathematical model to predict solar water disinfection,” *Water Res.*, vol. 37, no. 16, pp. 3921–3927, 2003.
- [30] KN. Josset, MC. Lett, JM. Ledoux, and V. Keller, Numeration methods for targeting photoactive materials in the UV-A photocatalytic removal of microorganisms,” *Chem Soc Rev*, no. 37, pp. 744-55, 2008.
- [31] O. Castaño, “Comparación del nivel de inactivación de *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium y *Shigella sonnei*, en condiciones controladas usando fotocatalisis heterogénea,” Univ. del Valle, Santiago de Cali, 2006.
- [32] N. Castro del Campo, “El agua de uso agrícola como vehículo de transferencia de *Salmonella* sp.” 2011, Available: http://www.fps.org.mx/divulgacion/index.php?option=com_content&view=article&id=711:el-agua-de-uso-agricola-como-vehiculo-de-transferencia-de-salmonella-sp&catid=37:sinaloa-produce&Itemid=373
- [33] G. R.-S. y T. S. Lucía Morales-Hernández, Ana María Hernández-Anguiano, Cristóbal Cháidez-Quiroz, “Detección de *Salmonella* spp. en Melón Cantaloupe en Unidades de Producción y Unidad de Empaque.” *Agric. Técnica en México.*, vol. 35, pp. 135–145, 2009.
- [34] J. Ramírez Santos, G. Contreras Ferrat, and M. C. Gómez Eichelmann, “La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*,” *Rev. Latinoam. Microbiol.*, vol. 47, no. 3–4, pp. 92–101, 2005.
- [35] Castillo JA, Sanabria GIJ, Wist J, Pulgarín GC. Evaluation of the photocatalytic treatment for the removal of pathogenic agent from different biological wastewater treatment effluent.

Water & Environmental Management Series (WEMS). 139-54,
2005

- [36] K. S. McDougald D., Rice S., Weichart D., “Nonculturability:
adaption or debilitation?” *Microbiol. Ecol.*, vol. 25, no. 1998,
pp. 1-9, 1998