

Detección de bacterias en agua potable a través de un Sistema de percepción sensorial y una lengua electrónica

Carrillo Jeniffer¹, y Durán Cristhian²

¹Grupo de sistemas multisensoriales y reconocimiento de patrones (GISM) de la Universidad de Pamplona, Pamplona,

¹Jeniffer.carrillo@unipamplona.edu.co

²cmduran@unipamplona.edu.co

Resumen– La evaluación de la calidad del agua sigue siendo hoy día un reto para las instituciones de salud pública. Una de las bacterias de mayor abundancia y la que está principalmente asociada con el riesgo sanitario del agua es *Escherichia coli* (*E.coli*), la presencia de esta bacteria indica que existe un mayor riesgo de la presencia de otras bacterias y virus de origen fecal, muchos de los cuales son patógenos. Actualmente para la detección y cuantificación de las bacterias existen técnicas que presentan limitaciones, la más importante de ellas es el prolongado tiempo de las incubaciones requiriendo para ello por lo menos de 24-28 horas, además de instalaciones y personal adecuado. El presente artículo consiste en la implementación de una metodología para clasificación de diferentes especies bacterianas y detección de *E. coli* en agua potable, mediante métodos alternativos instrumentales como nariz y lengua electrónica. Para la realización de las diferentes pruebas se prepararon un conjunto de muestras (bacterias), las cuales consistieron en colonias individuales de *E.coli*, *Pseudomonas Aeruginosa* y *Klebsiella oxytoca*, transferidas en placas de agar nutritivo y suspendidas en agua estéril. La discriminación de las medidas se realizó mediante el análisis de componentes principales (PCA), alcanzando un 97.6% de varianza capturada a través de la nariz electrónica. Por otro lado, con la lengua electrónica la discriminación de las bacterias fue de un 99.4% de variación en el conjunto de datos, obteniendo una respuesta similar con ambos métodos.

Palabras claves-- *E.coli*, agua potable, nariz electrónica, lengua electrónica, filtración por membrana, PCA.

I. INTRODUCCIÓN

El control y monitoreo del agua para el consumo humano proveniente de las plantas de tratamiento de agua potable o acueductos, es una estrategia importante para evaluar la eficiencia de operación de la planta y ajustar los parámetros operacionales para producir un agua de alta calidad que cumpla con las exigencias de la normatividad.

Actualmente el acondicionamiento de agua potable es un proceso que implica el cumplimiento de ciertos parámetros fisicoquímicos y microbiológicos que están regulados en las normatividades vigentes de calidad del agua, a nivel internacional la Organización Mundial de la Salud establece que el agua apta para consumo humano debe estar libre de

cualquier microorganismo que pueda afectar la salud del consumidor, este parámetro es utilizado como guía de calidad para la creación de reglamentos o normas, también sirve para evaluar los riesgos de contaminación, vigilar los procesos de tratamiento y hacer planes correctivos para alcanzar la calidad deseada [1]. En Colombia la calidad microbiológica solo incluye el control de bacterias como coliformes totales y fecales donde los valores admisibles se encuentran contenidos en la resolución 2115/2007 en su artículo 25, donde indica que el valor permitido para estos microorganismos es de cero por cada 100 ml, cuando se trata de agua para el consumo humano.

Adicionalmente en esta normatividad se encuentran estipulados los diferentes métodos convencionales (Fermentación de tubos múltiples, filtración por membrana, enzima sustrato, sustrato definido, entre otros) usados para la detección de las bacterias, sin embargo, hay que recalcar que estos métodos son tediosos, representan altos costos, tiempos de análisis, ya que siguen siendo un obstáculo para establecer en un tiempo determinado la calidad microbiana del agua para consumo humano.

Hoy en día, una forma de verificar la calidad microbiológica del agua, es monitorear constantemente un indicador bacteriano tan importante como *Escherichia coli* [2], sin embargo, existe una gran limitación en el momento de analizar esta bacteria en la mayoría de plantas de tratamiento de agua potable, ya que no tienen buenos laboratorios, tecnologías especializadas y personal capacitado que permita realizar dichas pruebas microbiológicas, limitando la frecuencia del análisis (1 a 2 veces al mes). A su vez, las muestras deben enviarse a laboratorios certificados generando costos, errores derivados del muestreo que pueden alterar los análisis y retrasos en la obtención de resultados, es por eso que las limitaciones de los métodos convencionales han llevado a que las investigaciones se enfoquen en el desarrollo de métodos rápidos y precisos para la identificación de las bacterias.

Para un monitoreo en tiempo real muchas investigaciones se han orientado hacia el desarrollo de métodos rápidos y precisos para su detección, como el uso de las tecnologías de nariz y lengua electrónica usadas para el análisis específico, identificación y reconocimiento de los compuestos orgánicos

volátiles emanados por las especies bacterianas. En la actualidad se han hecho varios estudios usando la nariz y lengua electrónica [3-10]. En este estudio se comprobó que tanto la nariz y la lengua son técnicas que permiten obtener resultados en forma rápida para la detección de la bacteria *E. coli* y la clasificación de otras bacterias.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Preparación de las muestras control

Las bacterias usadas en el ensayo fueron cultivadas por agotamiento en Agar Nutritivo, a 37°C/24h. A partir de esos cultivos se prepararon 10 ml de una suspensión bacteriana en viales en agua estéril, con una concentración aproximada de 3×10^8 UFC/ml usando para ello el patrón N° 1.0 de la escala de McFarland. Este procedimiento se usó para las cepas bacterianas: *Escherichia coli* (cepa ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Klebsiella oxytoca* (ATCC 49131). Con el objetivo de tener un volumen de 300 ml de muestra, las suspensiones bacterianas se diluyeron 30 veces en agua estéril y fueron incubadas durante 12 horas a 37°C con el objetivo de mejorar el enriquecimiento de los compuestos generados.

B. Nariz y lengua electrónica

En la figura Fig. 1, se describen cada una de las etapas que se llevaron a cabo para el desarrollo de los sistemas de percepción sensorial.

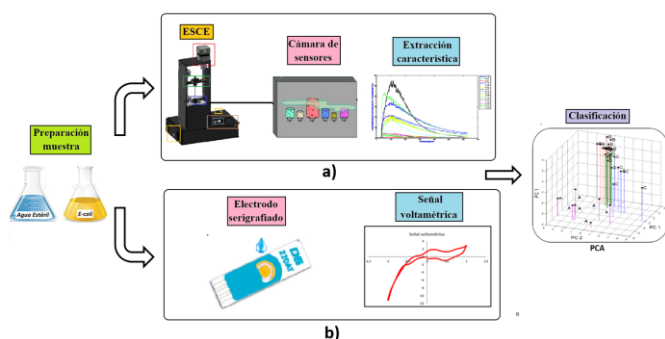


Fig. 1 Esquema general de la metodología implementada.

En la Fig. 1a, se observa el procedimiento llevado a cabo mediante una nariz electrónica desarrollada en el Lab de electrónica de la Universidad de Pamplona (B-NOSE), para la detección de los compuestos orgánicos volátiles (COV's) emitidos por las especies bacterianas y el agua. Para aumentar la concentración de los analitos, las muestras se acondicionaron a una temperatura de 50 °C durante 10 minutos, usando un sistema de extracción de espacio de cabeza estático (ESCE). Una vez alcanzado el tiempo y la temperatura de incubación, las muestras fueron extraídas por medio de la conmutación de una electro-bomba y luego

transferidas a una cámara de medida desarrollada en material metacrilato provista de una matriz de 16 sensores comerciales de gases químicos. En la table I, se describen las principales características de los sensores que conforman la B-NOSE.

TABLA I
LISTA DE LA MATRIZ DE SENSORES DE LA B-NOSE

Sensor	Aplicación	Tipo de Gas sensible	label
TGS 826	Detección de olores	Amoníaco y aminas	2
TGS 831	Detección de gas halocarburos (gases refrigerantes)	R-22, Monoclorodifluorometano	2
TGS 821	Detección de gas combustible	Hidrógeno	2
TGS 842	Detección de gas combustible	Metano Y gas natural	2
TGS 880	Control de cocción	humo de los alimentos (Alcohol, olor)	2
TGS 825	Detección de gas toxico	sulfuro de hidrógeno	2
TGS 813	Detección de gas combustible	Hidrocarburos en general	1
TGS 800	Control de calidad del aire	contaminantes del aire en general	1
TGHS 822	Detección de vapores de disolventes	Alcohol y disolventes orgánicos	1
TGS 832	Detección de gas halocarburos (gases refrigerantes)	R-134 ^a , 1,1,1,2-Tetrafluoroethane	1
TGS 830	Detección de gas halocarburos (gases refrigerantes)	R-22, Monoclorodifluorometano	1

La Fig 1b ilustra las etapas realizadas por la lengua electrónica, la cual consiste de un potenciostato portátil (1) μ STAT200 de la empresa Dropsens con electrodos serigrafados de carbón: C110 y electrodos de oro: 220AT.

Para la configuración del potenciostato se utilizó el software DropView 200, donde la técnica de voltametría cíclica fue aplicada con los siguientes parámetros: Ebegin: 0, indica el potencial de donde comienza el escaneo. Evtx1: -2 Volts, potencial donde se invierte la dirección de escaneo. La aplicable. Evtx2: +1 Volts, potencial donde la dirección de escaneo se invierte nuevamente o donde el escaneo se detiene (si Evtx2 = Ebegin), Srate (V/s): 0.5, tiempo de escaneo y nscans: 1, número de escaneos. El rango de corriente se ubicó en modo automático. Es importante tener en cuenta que una corriente más alta se selecciona cuando la corriente excede 2 veces la corriente aplicada. Se selecciona una corriente más baja cuando la corriente medida es menor que 0.05 veces el rango de corriente aplicada. Los rangos de corriente seleccionables son especificados en la pestaña "Método".

La table II, presenta las características de los sensores usados en las diferentes pruebas.

TABLE II
LISTA DE SENSORES DE LA LENGUA

Sensor	DRP-220AT (ORO)	DRP-C110 (CARBONO)
Contactos eléctricos	Plata	Plata
Electrodo de trabajo	Oro	Carbono
Electrodo auxiliar	Oro	Carbono
Electrodo de referencia	Plata	Plata

C. Tratamiento de datos.

El pre-procesamiento y procesamiento de los datos se realizó mediante métodos de extracción de parámetros con el fin de obtener la máxima información del conjunto de datos. normalización y reconocimiento de patrones. Inicialmente se obtuvo el parámetro estático del conjunto de datos para obtener la información máxima (Gmax) de la respuesta del sensor y el valor de línea base (Gmin), luego se normalizaron mediante la técnica de normalización por columna para el caso de la nariz y auto-escalado para lengua. El procesamiento de datos se llevó a cabo con el método de análisis PCA (método discriminatorio). Cabe mencionar que el pre procesamiento y el procesamiento de los datos se usaron para los sistemas de percepción sensorial.

III. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la Fig 2 se observa una buena discriminación de las categorías usando PCA, y alcanzando un porcentaje del 97.9% de la varianza capturada en los primeros PC's, indicando que la nariz electrónica es capaz de diferenciar la bacteria *E.coli* de otras bacterias que son similares y pueden tender a la confusión como es el caso de *Klebsiella oxytoca* y *Pseudomonas aeruginosa*.

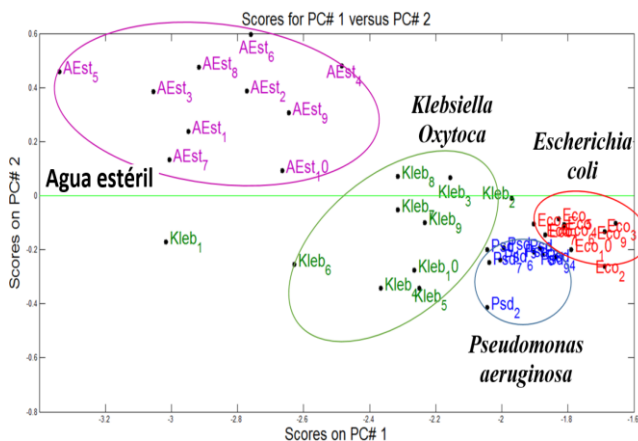


Fig. 2 Análisis PCA de bacterias usando nariz electrónica

Es importante resaltar que fue considerado el caso donde todas las muestras de las tres especies bacterianas y agua estéril se combinaron en un solo conjunto de datos (40 medidas en total, 10 de cada una) las cuales fueron calentadas a 50°C con el objetivo de generar un confiable espacio de cabeza para la extracción de los VOC's.

La Fig. 3 presenta los resultados obtenidos con la lengua electrónica en donde la Figura 3(a) ilustra una excelente discriminación de las categorías, con un porcentaje de varianza del 99.4%, usando el sensor de oro. En la Figura 3(b) se presenta el resultado del sensor de carbón alcanzando un 96.27% de varianza capturada.

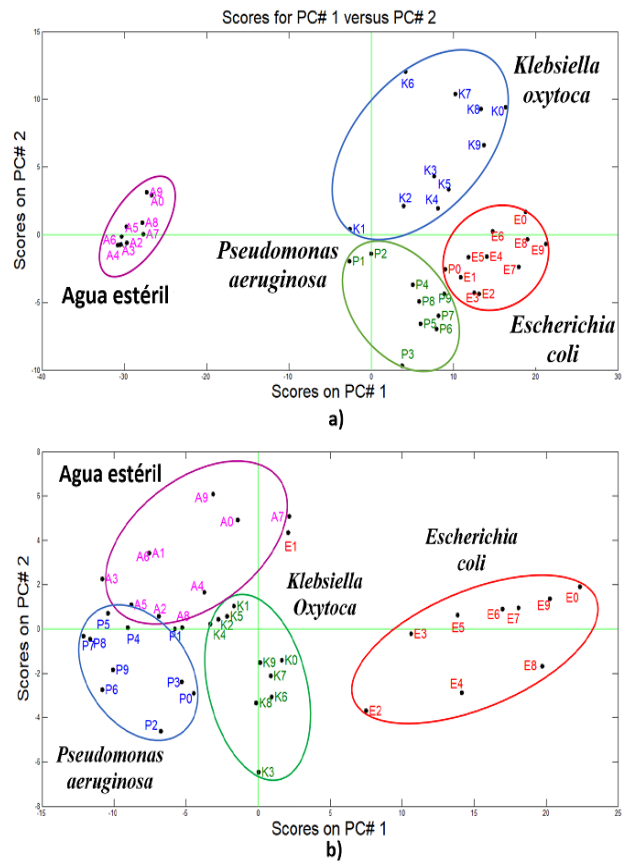


Fig. 3 Plot Analysis: a) PCA Sensor 22AT b) PCA Sensor C110

La Fig. 4 y Fig. 5 muestran las discriminaciones de las muestras recolectadas en los cuatro puntos de captación de la planta de tratamiento de agua potable del municipio de Toledo. Para la elaboración de la gráfica se tomaron como referencia unas muestras de agua estéril libres de cualquier contaminante y unas muestras contaminadas en el laboratorio con *Escherichia coli* a una concentración de 1×10^7 UFC/ml, con el objetivo de determinar en qué lugar o cuadrante del gráfico PCA se proyectan las medidas de la planta. Una de las características más importantes que se pueden observar en la

Fig. 4, es la diferencia entre las categorías usando los *scores* del PCA, obteniendo un 98.5 % de la varianza en el caso de la nariz electrónica.

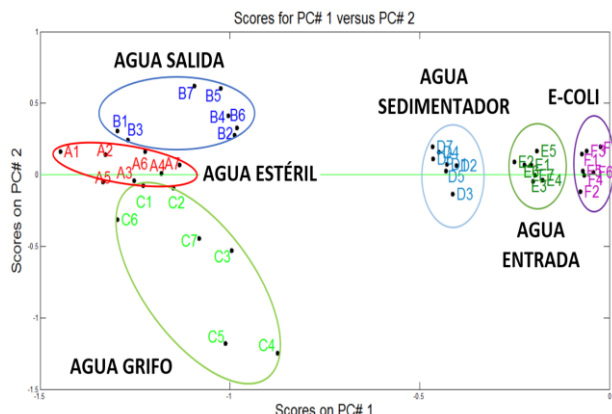


Fig. 4 Respuesta del análisis PCA para la discriminación de las muestras de la planta de tratamiento con nariz electrónica.

Por otro lado, en la Fig. 5, se utilizó también el sensor C110 para determinar la confiabilidad de la lengua electrónica en la detección de la bacteria *E.coli*, verificando de esta manera el correcto funcionamiento del sistema.

El análisis PCA también confirma el uso de la lengua para la discriminación de las muestras de agua en los diferentes puntos de captación, obteniendo un porcentaje de varianza de 86.3% en los primeros PC's.

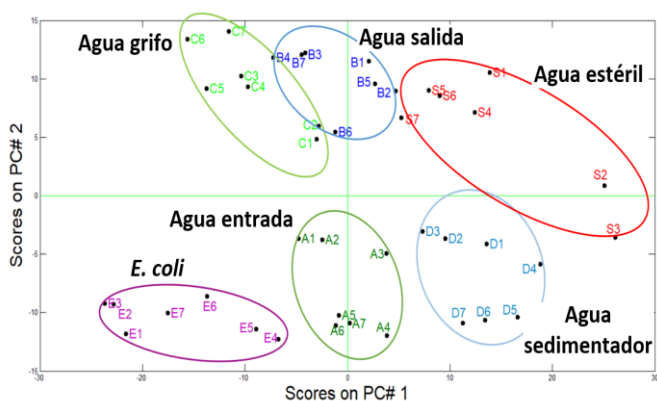


Fig. 5 Respuesta del análisis PCA para la discriminación de las muestras de la planta de tratamiento con la lengua electrónica.

Para validar los resultados obtenidos de la Fig 4 y 5, se usó en paralelo el método de filtración por membrana. De acuerdo con los requisitos microbiológicos exigidos por la resolución Colombiana 2115, se consideran como muestras contaminadas con *E. coli* aquellas que superan el valor del indicador tomado como límite de aceptabilidad (0 UFC/100 ml de agua).

A partir de los resultados conseguidos con la nariz y la lengua electrónica, se puede deducir que en la planta de tratamiento las muestras de agua de salida y agua de grifo se

agrupan en la categoría de muestras libres de la bacteria *E. coli*, quedando ubicadas cerca de las muestras de referencia de agua estéril proyectadas en el gráfico PCA, coincidiendo con la concentración obtenida por el método de filtración por membrana que fue de 0 UFC/ml en los dos casos propuestos.

El mismo comportamiento se presentó con las muestras contaminadas por *E. coli* haciendo el análisis por el método de filtración por membrana. (Ver tabla III).

TABLE III
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO USANDO EL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA

Análisis	Agua entrada de la planta	Agua sedimentador	Agua salida de la planta	Agua de grifo
<i>E. coli</i>	125 UFC/ml	26 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml

Desde un punto de vista microbiológico, en las plantas de tratamiento la población de *E.coli* presentó un comportamiento similar. El agua ingresa con una cantidad de *E. coli* superior a los 100 CFU/ml, después del sedimentador la carga de la bacteria se ve disminuida entre 5 y 10 veces y finalmente el agua a la salida de la planta no presenta células viables de *E. coli* en 100 ml de agua, tal y como lo exige la norma, evidenciando la eficiencia del proceso de tratamiento de las plantas.

Por otro lado, también se observó que el sistema de distribución no es una fuente de contaminación por esta bacteria, ya que las muestras de los grifos en las casas presentaron resultados negativos.

IV. CONCLUSIONES

En este estudio se alcanzó a evaluar la especificidad del método evaluando la capacidad de la metodología propuesta (nariz electrónica + sistema de extracción y lengua electrónica), para diferenciar los compuestos o analitos de interés, en este caso la bacteria *E. coli* con otros de similar condición.

Los resultados de esta herramienta son prometedores ya que, debido a su portabilidad, sensibilidad, selectividad rapidez y bajo costo es posible tomar las respectivas medidas correctivas, preventivas en un acueducto y así producir un agua de alta calidad para el consumo humano cumpliendo con las exigencias de la normatividad.

REFERENCES

- [1] Manuscript Templates for Conference Proceedings, IEEE. http://www.ieee.org/conferences_events/conferences/publishing/templates.html
- [2] M. King, B. Zhu, and S. Tang, "Optimal path planning," *Mobile Robots*, vol. 8, no. 2, pp. 520-531, March 2001.

- [3] H. Simpson, *Dumb Robots*, 3rd ed., Springfield: UOS Press, 2004, pp.6-9.
- [4] M. King and B. Zhu, "Gaming strategies," in *Path Planning to the West*, vol. II, S. Tang and M. King, Eds. Xian: Jiaoda Press, 1998, pp. 158-176.
- [5] B. Simpson, et al, "Title of paper goes here if known," unpublished.
- [6] J.-G. Lu, "Title of paper with only the first word capitalized," *J. Name Stand. Abbrev.*, in press.
- [7] Y. Yorozu, M. Hirano, K. Oka, and Y. Tagawa, "Electron spectroscopy studies on magneto-optical media and plastic substrate interface," *IEEE Translated J. Magn. Japan*, vol. 2, pp. 740-741, August 1987 [*Digest 9th Annual Conf. Magnetics Japan*, p. 301, 1982].
- [8] M. Young, *The Technical Writer's Handbook*, Mill Valley, CA: University Science, 1989.