

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL**



**EVALUACIÓN DEL GRADO DE INHIBICIÓN DE TANINOS  
PRESENTES EN TRES VARIEDADES DE UVA SOBRE *Escherichia*  
*coli* PARA SU USO EN LA DESINFECCIÓN DE AGUA CRUDA.**

**KATERINE GODOY SIERRA**

**BOGOTA D.C  
CARRERA 7 No. 40-62 Tel.3208320**

**EVALUACIÓN DEL GRADO DE INHIBICIÓN DE TANINOS  
PRESENTES EN TRES VARIEDADES DE UVA SOBRE *Escherichia  
coli* PARA SU USO EN LA DESINFECCIÓN DE AGUA CRUDA.**

**KATERINE GODOY SIERRA**

**APROBADO**

---

**Dra. Ingrid Schuler P.h.D**  
Decana Académica

---

**Janeth Arias Palacios**  
Directora De Carrera

**EVALUACIÓN DEL GRADO DE INHIBICIÓN DE TANINOS  
PRESENTES EN TRES VARIEDADES DE UVA SOBRE *Escherichia  
coli* PARA SU USO EN LA DESINFECCIÓN DE AGUA CRUDA.**

**KATERINE GODOY SIERRA**

---

**Janeth Arias Palacios  
Bacterióloga M.C  
Directora**

---

**DORA LUZ GÓMEZ AGUILAR  
Maestría: Biología Fitoquímica  
Coodirectora**

---

**Diana Aldana  
Microbióloga Industrial  
JURADO**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

*Artículo 23 de la Resolución No.13 de julio de 1946 'La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velara por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia''*

## CONTENIDO

RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
JUSTIFICACIÓN.....	10
1. MARCO TEÓRICO .....	12
1.2. IMPORTANCIA DE <i>Escherichia coli</i> sp. ....	13
1.3. LA DESINFECCIÓN.....	14
1.3.1. EL CLORO.....	14
1.3.1.1. SUBPRODUCTOS DE LA CLORACIÓN.....	15
1.4 TANINOS .....	16
1.5 IMPORTANCIA DE LA UVA.....	16
2. OBJETIVO .....	17
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS. ....	17
3. METODOLOGÍA .....	18
3.1 OBTENCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS.....	18
3.1.1. AISLAMIENTO DE <i>Escherichia coli</i> DE AGUA CRUDA.....	18
3.1.2 PREPARACIÓN DE LAS CEPAS .....	18
3.2. EXTRACTOS DE TANINOS PRESENTES EN TRES VARIEDADES DE UVA .....	18
3.2.1 EVALUACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE TANINOS DE UVA.....	19
3.2.1.1. RECuento EN PLACA .....	19
3.2.2 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN.....	19
3.3 RESIDUALIDAD DEL EXTRACTO.....	19
3.4 EVALUACIÓN DEL EXTRACTO COMO DESINFECTANTE.....	20
3.5 ANÁLISIS DE DATOS.....	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	24
6. BIBLIOGRAFÍA.....	25
7. ANEXOS.....	27

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Extractos de taninos presentes en tres variedades de uva y su concentración ..	27
Tabla 2. Recuento en placa de <i>E.coli</i> nativa en Agar TSA, luego del contacto con los extractos.....	31
Tabla 3. Porcentaje de inhibición en decimales de los diferentes extractos sobre <i>E.coli</i> ATCC 8739.....	31
Tabla 4. Recuento en placa de <i>E.coli</i> ATCC 8739 en Agar TSA, luego del contacto con los extractos.....	32
Tabla 5. Porcentaje de inhibición en decimales de los diferentes extractos sobre <i>E.coli</i> ATCC 8739.....	32
Tabla 6. Análisis de varianza de los promedios de los porcentajes en decimales de inhibición de Semilla y Cáscara de las tres variedades de uvas obtenidos para la cepa <i>E.coli</i> nativa. ....	33
Tabla 7. Análisis de varianza de los promedios de los porcentajes en decimales de inhibición de las concentraciones 100ppm, 500ppm, 1000ppm de las tres variedades de uvas para la cepa <i>E. coli</i> nativa. ....	34
Tabla 8. Análisis de varianza de los promedios de los porcentajes en decimales de inhibición de Semilla y Cáscara de las tres variedades de uvas obtenidos para la cepa <i>E.coli</i> ATCC 8739. ....	36
Tabla 9. Análisis de varianza de los promedios de los porcentajes en decimales de inhibición de las concentraciones 100ppm, 500ppm, 1000ppm de las tres variedades de uvas para la cepa <i>E. coli</i> ATCC 8739 .....	37
Tabla 10. Prueba de residualidad del desinfectante: Resultados de la residualidad para los extractos de Semilla y Cáscara de uva Isabella a 5ppm y 10.ppm.....	39
Tabla 11. Recuento de la filtración por membrana luego del uso del Extracto de Cáscara de uva Isabella [10ppm].....	39

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aislamiento de la cepa de <i>E.coli</i> ATCC 8739 en a. Agar McConckey b. Agar TSA .....	28
Figura 2. Aislamiento de <i>E.coli</i> nativa en caldo Florocult. ....	28
Figura 3. Purificación y Aislamiento de <i>E. coli</i> nativa en a. Agar EMB. b. Agar TSA .....	28
Figura 4. Tinción de Gram a. <i>E. coli</i> ATCC 8739 b. <i>E. coli</i> nativa.....	29
Figura 5. Suspensión de <i>E.coli</i> según patrón de McFarland N°2 .....	29
Figura 6. Montaje de la prueba de contacto con los diferentes extractos para <i>E. coli</i> ATCC 8739 en caldo BHI .....	29
Figura 7. Recuento en placa en Agar TSA para <i>E. coli</i> ATCC 8739 luego de la prueba de contacto.....	30
Figura 8. Montaje de la prueba de contacto con los diferentes extractos para <i>E. coli</i> nativa en caldo BHI .....	30
Figura 9. Recuento en placa en Agar TSA para <i>E. coli</i> nativa luego de la prueba de contacto.....	30
Figura 10. Prueba de residualidad del desinfectante: Resultados de la reacción colorimétrica con reactivo de Follin Ciocalteau y carbonato de sodio al 20% de los extractos de Semilla y Cáscara de uva Isabella a 5ppm y 10ppm para cuantificación de taninos.....	39
Figura 11. Filtración por membrana luego del uso del Extracto de Cáscara [10ppm].....	39

## RESUMEN

El agua de consumo humano debe cumplir con una serie de características físico-químicas y microbiológicas del tal forma que no represente ningún peligro para la salud humana. El objetivo del estudio fue evaluar el grado de inhibición que presentan los taninos de tres variedades de uva sobre *Escherichia coli*, para su uso en la desinfección de agua en los procesos de potabilización, buscado reducir los efectos nocivos en la salud humana. Para esto fue necesario desarrollar un estudio experimental en donde se evaluaron diferentes concentraciones de extractos obtenidos de cáscara y semilla de las variedades de uva Isabella, Común y Verde, contra *E.coli* ATCC 8739 (American Type Culture Collection), obtenida en el Cepario de Bacterias de la Pontificia Universidad Javeriana (PUJ) y *E. coli* nativa aislada de una muestra de agua del Río Subachoque tomada del centro de acopio del Acueducto de Madrid Cundinamarca. Para realizar esta evaluación se sembró 1ml de suspensión de los microorganismos evaluados cuya concentración fue de  $6 \times 10^8$  cel/ml según patrón de Mcfarland N°2 en 4,5 ml de caldo BHI (Brain Heart Infusion) y se adicionó un volumen de 4,5ml del extracto a evaluar, luego de un tiempo de contacto de 30 min se incubó a 35°C durante 24 horas. Posteriormente se tomó 0,1ml de cada montaje y se realizó siembra en superficie en agar TSA (Tripticasa Soya Agar) para obtener un recuento en placa; esto se incubó a 35°C durante 24 horas y se realizó lectura obteniéndose UFC/ml para la estimación del porcentaje de inhibición de los extractos sobre los microorganismos de prueba. Como pruebas complementarias para la determinación del uso de los taninos como posible desinfectante en aguas crudas se realizó una cuantificación de la residualidad del extracto en agua cruda por medio de la técnica colorimétrica de cuantificación de fenoles con reactivo de Follin Ciocalteau y carbonato de sodio al 20%; y se evaluó el efecto del extracto de elección sobre una muestra de agua cruda, lo cual fue posible cuantificar a través de filtración por membrana de la muestra con el extracto y la siembra de las membranas en Agar Chromocult. Se determino que no existe una diferencia estadísticamente significativa en la acción antimicrobiana que generan los extracto de las clases de uva Isabella, Común y Verde, y sus partes de extracción Cáscara y Semilla, ni existe diferencia estadísticamente significativa en la interacción entre clase de uva y parte de la uva. El análisis de resultados también permite concluir que existe una diferencia estadísticamente significativa en el efecto inhibitorio generado por las tres concentraciones evaluadas (100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm) obteniéndose el mayor porcentaje de inhibición (99%) en las

concentraciones de 500 ppm y 1000 ppm sin diferencia relevante en la acción que producen estas dos concentraciones. La prueba de residualidad del extracto determinó que el extracto que tiene mayor residualidad es el de Semilla Isabella 10ppm con un valor de 8,19ppm. El extracto de Cáscara Isabella 10ppm fue el elegido para su implementación como desinfectante, este extracto generó una reducción significativa de la carga microbiana de *E.coli* presente en agua cruda del Rio Subachoque.

## INTRODUCCIÓN

El agua al ser un elemento esencial para la vida requiere la presencia de características específicas que garanticen la salud humana, dado el grado de importancia que esta representa en los seres humanos se convierte en uno de los temas de mayor importancia a nivel mundial. Este recurso natural al ser de amplia distribución, es susceptible de contaminación de tipo químico y biológico, esta última se concentra en la presencia de virus, parásitos y bacterias que se convierten en un problema sanitario; dentro del grupo de las bacterias se encuentran los coliformes, que son una familia de microorganismos entre los que se encuentran los géneros *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Citrobacter sp.*, *Escherichia sp.* que se encuentran comúnmente en las plantas, el suelo y los animales, incluyendo a los humanos (OMS, 2006 y Urbaneja, 2004).

El género *Escherichia sp.*, es representado en el grupo de coliformes fecales (grupo de bacterias que soportan temperaturas hasta de 44°C) por la especie *Escherichia coli*, este microorganismo es el indicador de excelencia para determinar si existe contaminación bacteriana de origen fecal en el agua gracias a su rápida y fácil detección, y es por esto que se convierte en el microorganismo de estudio de este trabajo.

Es por esto, que las aguas destinadas al consumo humano deben ser tratadas, para lograr su potabilización y de esta forma eliminar la mayor cantidad posible de microorganismos contaminantes que puedan llegar a afectar la salud de los consumidores. (Germán y Marcén, 1998). El proceso de potabilización se lleva a cabo por procesos tanto físicos como químicos, que garantizan las propiedades físico-químicas, microbiológicas y organolépticas en el agua de consumo humano. Una de las etapas del proceso es la desinfección, en la que se eliminan los microorganismos patógenos que no se han eliminado en las etapas anteriores a esta; El cloro es el desinfectante usado por excelencia, debido a su poder oxidante, su bajo costo, su eficacia y la facilidad de

cuantificación (OMS, 2006). El desafío que se enfrenta con la cloración es el de lograr los máximos beneficios del uso del cloro como excelente desinfectante, con un mínimo de impacto ambiental y toxicidad de sus subproductos. No hay razón para discutir la necesidad de la desinfección del agua para consumo; el problema está en evaluar y comparar el riesgo de su toxicidad y potencia cancerígena de los subproductos de la cloración, frente al beneficio que se obtiene en el control de las enfermedades transmitidas por el agua contaminada. Por lo anterior, en la actualidad se han estudiado posibilidades del uso de sustancias orgánicas con poder bactericida, que no generen problemas a largo plazo en la salud humana como ocurre con el uso del cloro. Los taninos son productos de excreción de muchas plantas, involucrados en mecanismos de defensa de las mismas contra organismos parásitos, estas sustancias poseen actividades terapéuticas, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana, su amplia distribución en plantas y en frutos como las uvas hacen de esta sustancia un producto de fácil acceso e implementación.

Con el fin de comprobar la actividad antimicrobiana de los taninos presentes en uvas se realizó un estudio experimental en el que se determinó el poder inhibitorio de estas sustancias extraídas de tres variedades diferentes de uvas sobre *E.coli*; las variables del estudio fueron tipo de extracto, concentración, porcentaje de inhibición; la población de estudio fueron las cepas de *E.coli* ATCC 8739 y la cepa nativa. Los datos obtenidos se les realizaron un análisis de varianza con el fin de determinar la relación entre uva y parte de la uva que genera mayor inhibición sobre *E.coli* y la concentración de mayor efecto inhibitorio.

## **JUSTIFICACIÓN**

El crecimiento de la población a nivel mundial y el aumento del uso del agua para diferentes actividades, ha incrementado los niveles de contaminación. Esta contaminación está relacionada con los vertimientos de origen doméstico e industrial a los cuerpos de agua. En el caso de los residuos de origen doméstico, la carga contaminante está representada por altos porcentajes de materia orgánica y microorganismos de origen fecal. Estos microorganismos son causantes de enfermedades de origen hídrico, que generan altos porcentajes de morbi-mortalidad en la población. Dentro de los

microorganismos indicadores de esta contaminación se encuentra *Escherichia coli*, esta bacteria patógena puede intervenir en procesos patológicos como la producción de cuadros intestinales, diarreas e infecciones extra intestinales diversas; como medida frente a este microorganismo se han establecido diferentes normas para agua potable a nivel mundial que buscan controlar a través del establecimiento de parámetros microbiológicos la presencia de este patógeno. La legislación colombiana, en el decreto 475 de 1998 por el cual se expiden normas técnicas de calidad del agua potable en Colombia, en su artículo 24 establece como valor admisibles para *E. coli* 0 UFC/ 100 cm<sup>3</sup>.

Dentro de los procesos de potabilización del agua cruda existe la etapa de desinfección que tiene por objetivo la destrucción o inactivación de microorganismos patógenos, es esta etapa la directamente relacionada para poder dar cumplimiento a la normativa establecida en el país con respecto a los parámetros de *Escherichia coli*. Durante los últimos años, el cloro ha sido elegido como el desinfectante químico de mayor uso a nivel mundial, gracias a su facilidad de aplicación, bajos costos y los buenos resultados que se generan frente a la inhibición de microorganismos que representan un riesgo en la salud humana. A pesar de que el cloro presenta muchos beneficios para la salud pública y el tratamiento del agua, estudios recientes indican que también puede existir una relación causal entre la desinfección del agua con cloro y efectos negativos a largo plazo, como el cáncer. Desde 1974 se han conducido en Estados Unidos y España principalmente una serie de estudios, con el fin de evaluar la relación entre cáncer y la calidad del agua potable. Los resultados de estos estudios han demostrado un incremento en el riesgo de contraer cáncer de vejiga y colon por el consumo de pequeñas cantidades de cloro (*Sanchez, 2008*).

Respecto a los ensayos de laboratorio con animales, el Consejo Nacional de Investigaciones de los Estados Unidos reporta datos de pruebas realizadas utilizando una dosis única de cloroformo concluyendo que el riesgo de contraer cáncer es de aproximadamente 1 en 10 millones. Estos trihalometanos (THM) definidos como sustancias químicas producto de la unión del cloro con materia orgánica aun presente en el agua después del proceso de desinfección, también se encuentran implicadas en procesos degenerativos de las células del cuerpo, causando de esta forma enfermedades como el cáncer colon y vejiga principalmente. (*Sanchez, 2008*) De acuerdo al decreto 475 de 1998 por el cual se expiden normas técnicas de calidad del agua potable en Colombia,

el artículo 8 establece como valor admisible de THM's en agua potable 0,1 g/L. medida que en ocasiones no se cumple a cabalidad y genera problemas en la salud a largo plazo. La cloración del agua potable genera THMs y otros subproductos con propiedades mutagénicas y cancerígenas, específicamente relacionados con el cáncer de vejiga.

Debido a los riesgos en la salud humana que desencadenan con el uso del cloro como desinfectante de aguas crudas, se ha generado una necesidad creciente de proporcionar alternativas orgánicas en el tratamiento de aguas crudas, que sean capaces de cumplir con las funciones de los desinfectantes químicos sin generar efectos colaterales en la salud humana. Partiendo de esta necesidad se ha demostrado la capacidad bactericida de algunos compuestos orgánicos provenientes de estructuras vegetales como es el caso de los taninos, los cuales son compuestos polifenólicos presentes en las plantas que poseen actividad bactericida, que puede ser útil en los procesos de desinfección de aguas. Gracias a sus características se desea proponer los taninos como posible opción en la etapa de desinfección de aguas crudas, a través de la evaluación del grado de inhibición que presentan los taninos extraídos de cáscara y semilla de tres variedades de uvas diferentes sobre *Escherichia coli* (microorganismo de mayor prevalencia en aguas crudas). Logrando de este modo la reducción sustancial del empleo de productos tradicionales de desinfección como el cloro disminuyendo así el impacto negativo de los subproductos generados por el uso de este desinfectante químico.

## **1. MARCO TEÓRICO**

### **1.1 GENERALIDADES**

El agua es esencial para la vida y todas las personas deben disponer de un suministro satisfactorio (suficiente, inocuo y accesible). La mejora del acceso al agua potable puede proporcionar beneficios tangibles para la salud. Debe realizarse el máximo esfuerzo para lograr que la inocuidad del agua de consumo sea la mayor posible (OMS, 2006).

El mayor peligro al que se expone el agua potable es la contaminación, por efecto de aguas servidas, de otros desechos o excretas del hombre o de los animales. Al producirse esta contaminación se pueden encontrar agentes patógenos capaces de transmitir enfermedades entéricas (OMS, 2006).

Las normas sobre el agua de consumo pueden diferir, en naturaleza y forma, de unos países o regiones a otros. Entidades como la EPA (*Environmental Protection Agency*) a nivel internacional y el Ministerio de Salud a nivel nacional, dictan normas que regulan las características físico-químicas y microbiológicas con las que debe cumplir el agua potable. A nivel microbiológico se establece como indicador de contaminación por bacterias potencialmente patógenas el número de coliformes en el agua, gracias a su fácil de detección y recuento. Este grupo de bacterias gram negativas con forma bacilar, aerobias o anaerobias facultativas son capaces de fermentar la lactosa a una temperatura de 35 +/- 2°C con producción de gas y ácido en un tiempo de 24 a 48 horas. (*Ministerio de Salud, 1998*). Dentro de este grupo de coliformes totales se encuentran los coliformes fecales, que provienen del tracto intestinal de animales de sangre caliente y que serían los mejores indicadores de riesgo de afecciones humanas (*Perdomo C. et al., 2001*). Este tipo de microorganismos son capaces de fermentar la lactosa a 44 o 44,5 °C, dentro de los géneros de este grupo se encuentra *Escherichia* y en menor grado *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella*. De estos *E.coli* es el único que tiene un origen específicamente fecal, pues se encuentra siempre en grandes cantidades en heces humanas y de animales, e indica la existencia de fallas en la eficacia de tratamiento de aguas, en la integridad en el sistema de distribución y por lo tanto evidencia de contaminación de diferentes orígenes: suelo, superficies de agua dulce, y tracto digestivo (*OMS, 2006*).

## **1.2. IMPORTANCIA DE *Escherichia coli* sp.**

Este microorganismo forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*, la cual está integrada por bacilos Gram negativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin agregado de NaCl, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos como la lactosa, catalasa positivos, oxidasa negativos, reductores de nitratos a nitritos, y poseedores de una proporción G+C de 39 a 59% en su DNA. Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales.

En la mayoría de las circunstancias, las poblaciones de coliformes termotolerantes se componen en un 95% de *E.coli*; por lo tanto, este grupo se considera un indicador de

contaminación fecal aceptable, siendo *E.coli* el microorganismo de elección para los programas de monitoreo para la verificación, incluidos los de vigilancia de la calidad del agua de consumo. Estos microorganismos también se utilizan como indicadores de desinfección, pero los análisis son mucho más lentos y menos fiables que la medición directa de la concentración residual de desinfectante. Además, *E.coli* es mucho más sensible a la desinfección que los protozoos y virus entéricos. Otra característica importante de *E.coli*, es que puede ser vector de algunas enfermedades. En este caso se trata de *E.coli* patógenas, de los cuales existen muchos serotipos diferentes capaces de causar gastroenteritis en humanos y animales, siendo éstas especialmente serias en recién nacidos y niños de edad inferior a 5 años. Pese a que se considera que los *E.coli* patógenos representan menos del 1% del total de coliformes presentes en el agua contaminada, basta con 100 organismos para causar una enfermedad (Gómez, et al. 2005).

### **1.3. LA DESINFECCIÓN**

La desinfección es una operación de importancia incuestionable para el suministro de agua potable. La destrucción de microorganismos patógenos es una operación fundamental que muy frecuentemente se realiza mediante productos químicos reactivos como el cloro.

La desinfección constituye una barrera eficaz para numerosos patógenos (especialmente las bacterias) durante el tratamiento del agua de consumo y debe utilizarse tanto en aguas superficiales como en aguas subterráneas expuestas a la contaminación fecal. La desinfección residual se utiliza como protección parcial contra la contaminación con concentraciones bajas de microorganismos y su proliferación en el sistema de distribución.

#### **1.3.1. EL CLORO**

El cloro es una sustancia energética y activa que existe en la naturaleza en combinación con otros elementos. La preeminencia del cloro como desinfectante se explica indudablemente por su disponibilidad, su bajo costo y su confiabilidad, así mismo por la facilidad con que se puede usar y determinar su concentración, pero principalmente por

su alto poder oxidante y los compuestos que lo contienen y es este poder lo que lo convierte en un excelente disipador de la materia orgánica presente en el agua que llega a las plantas de tratamiento (Rodríguez, 2003).

Su efecto germicida se debe a la reacción fuerte con los lípidos en la membrana celular, la oxidación celular, la alteración de la permeabilidad celular, la alteración del protoplasma celular, la inhibición de la actividad enzimática y el daño del DNA y el RNA celular (EPA, 1999).

Las aguas que llegan a una planta de tratamiento de agua contienen agentes reductores (compuestos orgánicos e inorgánicos como nitritos, iones de hierro, plomo y sulfuros), así como microorganismos y bacterias. El cloro se aplica en exceso de manera que pueda satisfacer la demanda para oxidar estos compuestos y eliminar estas bacterias, y reste una cantidad de cloro residual en los conductos de agua. Este cloro residual es el cloro libre que queda en el agua después que ha sido desinfectada en la planta. Su utilidad es la de continuar desinfectando el agua desde que sale de la planta de tratamiento hasta que llegue al consumidor. Este cloro residual es importante que se encuentre en niveles seguros para el consumo humano. Si este se encuentra en exceso, el cloro puede resultar tóxico para el consumo. Los desinfectantes más comúnmente usados son: cloro gas ( $\text{Cl}_2$ ), hipoclorito de sodio ( $\text{NaOCl}$ , 12.5% de cloro disponible), hipoclorito de calcio [ $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ , 70% de cloro disponible], cloraminas, dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ) y ozono ( $\text{O}_3$ ).

#### **1.3.1.1. SUBPRODUCTOS DE LA CLORACIÓN**

El cloro puede reaccionar con distintos compuestos orgánicos, por lo que aumenta el riesgo de que se produzcan *trihalometanos* (THMs), que son compuestos carcinógenos para el ser humano. Los THMs se encuentran en el agua potable como resultado de la interacción del cloro con materia orgánica natural que se encuentra en el agua. Estos estarán presentes mientras el agua contenga cloro o hipoclorito, además de los precursores orgánicos. Es por esto que hay que mantener la cantidad de cloro residual dentro de unos límites.

Aparentemente, la existencia de riesgo en el consumo de agua clorada radica en la toxicidad indirecta de sus subproductos. La materia orgánica presente en el agua a tratar puede ser producto de la degradación vegetal (Los ácidos húmicos y fúlvicos), o de la

degradación de material animal. Dentro de los subproductos que se pueden formar se encuentran: cloro fenoles, ácido cloro acético, ácido dicloro acético, ácido tricloro acético, tricloro acetaldehído monohidratado, 1-1-dicloropropanona, dicloroacetanitrilo, dibromoacetanitrilo, tricloroacetanitrilo, cloruro de cianógeno, cloropicrin y bromato. Los THMs más predominantes son el cloroformo y el bromodichloroetano; con frecuencia también se encuentran el dibromoclorometano y el bromoformo (*Sánchez, 2008*).

#### **1.4 TANINOS**

Con fórmula química  $C_{14}H_{14}O_{11}$ , los taninos son productos de excreción de muchas plantas, involucrados en mecanismos de defensa de las mismas, contra organismos parásitos. Se encuentran más comúnmente en hojas, ramas y debajo de la corteza. Químicamente los taninos son polímeros de polifenóles, sustancias con alto peso molecular (en 500 a 3000 uma), con %1 a%2 de hidroxilos fenólicos libres, los cuales permiten la formación de enlaces cruzados estables, con proteínas y otros biopolímeros como la celulosa y las pectinas (*Beltrán, 1997*).

Los taninos poseen propiedades como actividades terapéuticas debido a la astringencia (las aplicaciones de la drogas con taninos son bastantes restringidas y derivan de su afinidad por las moléculas proteicas. Por vía tópica, impermeabiliza las capas más externas de la piel y mucosas, protegiendo así las capas subyacentes; tienen también un efecto vaso constrictor sobre pequeños vasos superficiales); actividad antioxidante (numerosos taninos, sobre todo los taninos hidrolizables, inhiben la peroxidación lipídica inducida por ADP y ácido ascórbico sobre mitocondrias hepáticas); Inhibición enzimática (de forma bastante general, los taninos son inhibidores enzimáticos de gran cantidad de enzimas de los microorganismos implicados en la careogénesis) (*Beltrán, 1997*).

#### **1.5 IMPORTANCIA DE LA UVA**

Actualmente, los extractos tánicos comerciales se extraen a partir de árboles cortados. Mediante el uso de los taninos presentes en grano y cáscara de la uva, se contribuye con la protección al medio ambiente evitando la tala de árboles para la obtención de estos extractos. En el procesado de los racimos de uva se obtiene vino, orujos y lías. En los países de la Unión Europea se obtienen anualmente 181 miles de hectolitros de vino, el

cual representa el 66% de la producción del vino a nivel mundial, siendo los países europeos más importantes en cuanto a la producción de vino Francia, Italia y España.

El orujo contiene el 20% de pepita seca. De las pepitas se extrae aceite para uso alimentario y de las pepitas secas desengrasadas se pueden extraer los taninos. Por cada 100 kg de uva vendimiada se obtiene 1,22 - 2,18 kg de harina de pepita desengrasada, que en Europa representa entre 287 y 514 millones de kilos de harina de pepita anuales. La semilla de la uva presenta aproximadamente 6 – 16% de taninos en su composición.

## **2. OBJETIVO**

- Evaluar el grado de inhibición que presentan los taninos de uva sobre *Escherichia coli*, para su uso en la desinfección de agua en los procesos de potabilización, buscado reducir los efectos nocivos en la salud humana.

### **2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Determinar el porcentaje de inhibición de los diferentes extractos de taninos de tres variedades de uva sobre la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739 y la cepa nativa aislada.
- Evaluar la efectividad de los taninos como desinfectante en la inhibición de *E. coli* en aguas crudas mediante el proceso de residualidad del extracto y filtración por membrana para cuantificación de *E. coli*.

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1 OBTENCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS**

Se evaluaron dos cepas diferentes de *Escherichia coli*, una de ella corresponde a la cepa ATCC 8739 obtenida en el Cepario de Bacterias de la Pontificia Universidad Javeriana; y la otra se aisló directamente de una muestra de agua del río Subachoque, obtenida en el centro de acopio de la Empresa de Acueducto, Alcantarillado y Aseo de Madrid, Cundinamarca.

##### **3.1.1. AISLAMIENTO DE *Escherichia coli* DE AGUA CRUDA**

A partir de la muestra de agua tomada directamente del centro de acopio río Subachoque se tomó una alícuota de 1ml de muestra de agua cruda, y se realizaron diluciones seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ . De cada dilución, se tomaron 3ml y se sembró 1ml para cada tubo de NMP con caldo Florocult. Se incubó a 37°C por 48 horas. A partir de los tubos con turbidez se realizaron siembras por aislamiento en agar EMB (Eosina Azul de Metileno); los aislamientos se incubaron a 37°C durante 48 horas. La presencia de colonias de color verde metálico confirma la presencia de *E. coli*. A partir de las colonias presuntivas se realizaron los pasos necesarios para la purificación del microorganismo. La confirmación microscópica se realizó a través de la tinción de Gram.

##### **3.1.2 PREPARACIÓN DE LAS CEPAS**

Los microorganismos se conservaron en agar TSA (Agar Trypticosa Soya) y agar EMB, para la posterior preparación de los inóculos. Las cepas de *E. coli* ATCC 8739 y nativa se aislaron en agar TSA, luego se incubó durante 24 horas a 37°C. A partir de las colonias aisladas de cada cepa se realizó una suspensión de  $6 \times 10^8$  células/ml según patrón de McFarland N°2 en 9 ml NaCl al 0,85%.

#### **3.2. EXTRACTOS DE TANINOS PRESENTES EN TRES VARIEDADES DE UVA**

Se evaluaron diferentes tipos de extractos de taninos obtenidos en solvente etanólico al 96% de semilla y cáscara de las variedades de uva verde, común e Isabella; a diferentes concentraciones, como se referencia en la Tabla 1. Los extractos fueron suministrados por la Universidad Pedagógica Nacional.

### **3.2.1 EVALUACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE TANINOS DE UVA**

Partiendo de la suspensión de los microorganismos realizada para la cepa nativa y la cepa ATCC según patrón N° 2 de McFarland, se inoculó 1 ml de esta suspensión en 4,5 ml de caldo BHI (Brain Heart Infusion) (37 g/L), y se adicionó 4,5 ml de extracto a evaluar. El tiempo de contacto fue de 30 minutos. Los ensayos se incubaron a una temperatura de 37°C durante 24 horas. Se realizó el mismo procedimiento para cada control. Cada concentración se evaluó por triplicado. El control positivo se realizó con etanol al 96% y el control negativo solo con el inóculo de la cepa sin extracto.

#### **3.2.1.1. RECUENTO EN PLACA**

Se realizaron siembras por superficie en Agar TSA (40g/L) tomando una alícuota de 0,1 ml de cada montaje, se incubaron a 37°C durante 24 horas. Cumplido el tiempo de incubación se realizaron recuentos en placa obteniéndose un valor de UFC/ml. Los montajes se realizarán por duplicado.

### **3.2.2 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN**

El porcentaje de inhibición se calculó a partir de la disminución de la carga bacteriana en donde la población inicial corresponde a  $6 \times 10^8$  UFC/ml y la final corresponde al recuento obtenido luego del proceso expresado en  $10^7$  UFC/ml. Para la estimación del valor final se utilizará la siguiente fórmula:

$$\% \text{ no inhibido} = (\text{Población final} / \text{Población inicial}) \times 100$$

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \% \text{ no inhibido.}$$

### **3.3 RESIDUALIDAD DEL EXTRACTO**

El procedimiento fue tomado de los métodos normalizados para el análisis de agua potable, en el cual se establecen los volúmenes para la demanda del cloro como desinfectante en agua potable, por lo tanto, se preparó una solución del extracto etanólico a evaluar de 1000ppm y se realizaron diluciones para trabajar con diferentes concentraciones aforando a 250 ml con agua cruda (tomada del centro de acopio de acueducto de Madrid. Río Suachoque) que anteriormente debió pasar por un proceso de filtración en papel filtro para remover sólidos en suspensión. Una vez preparadas las soluciones patrón se esperó 30 minutos de tiempo de contacto. Al término del tiempo de contacto se tomó una alícuota de 10 ml de cada solución y se le agregó 1 ml del reactivo

de Follin Ciocalteu y 3ml de carbonato de sodio al 20%, para la cuantificación de taninos presentes. En este método la reacción de color es completa después de 60 minutos.

Al término del tiempo requerido para la reacción de color se midió la absorbancia de cada solución a 676.6nm tomando como blanco el agua cruda filtrada sin extracto y se realizó el cálculo de la concentración de residualidad del desinfectante con la siguiente ecuación. La cuantificación se realizará por duplicado.

$$\text{concentracion} = \frac{\text{absorbancia} + 0.011}{0.0882} - \text{abs del blanco} \quad (\text{Martínez y Sierra, 2010})$$

### 3.4 EVALUACIÓN DEL EXTRACTO COMO DESINFECTANTE

Se tomó una muestra de agua del Río Subachoque, la cual se filtró para la eliminación de sólidos presente; a la muestra filtrada se le adicionó el extracto a evaluar hasta obtener un volumen final del 250 ml, con un tiempo de contacto de 30 minutos, luego se realizó filtración por membrana utilizando una membrana de nitrocelulosa 0,45 um y se sembró la membrana en agar Chromocult. Se incubó durante 24 horas a 37°C y se realizaron recuento de coliformes totales y *E.coli*. Se tomó como control positivo la muestra de agua cruda filtrada sin exposición a ningún extracto, la cual sufrió el mismo proceso de filtración por membrana anteriormente señalado. El montaje se realizó por triplicado. (*Resolución 2115 de 2007*)

### 3.5 ANÁLISIS DE DATOS

El análisis de los datos obtenidos se realizó con un análisis de varianza de los promedios de los porcentajes de inhibición obtenidos para cada cepa, y su comprobación con análisis ANOVA.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de la muestra de agua cruda del Río Subachoque tomada del centro de Acopio del Acueducto de Madrid Cundinamarca, fue posible el aislamiento de *E. coli* nativa. Esto se logró gracias al uso del Caldo Florocult y al Agar EMB. El medio de cultivo Florocult permite la detección de enzimas bacterianas características y ofrece la posibilidad de una rápida identificación de bacterias. Por la composición de este medio, al margen de ciertas

especies de *Salmonella* y *Shigella*, la bacteria *E.coli*, es la única especie perteneciente al grupo de las enterobacterias que posee la enzima B-D-glucuroinidasa esta enzima es capaz de escindir el sustrato 4-metil-umberifenil B-D-glucuronido (MUG), formando 4-metilumbeliferona. Esta sustancia se caracteriza por ser fluorescente al iluminarse con luz UV, lo que permite su detección fácilmente este hecho es, al mismo tiempo, un indicador de la presencia de *E.coli* (Figura 2) (MERCK, 2002). Para la obtención de la cepa pura y aislada fue necesario el uso del Agar selectivo EMB, este medio de cultivo permite la diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, está dada por los indicadores eosina y azul de metileno; éstos ejercen un efecto inhibitorio sobre muchas bacterias Gram positivas. Las cepas de *E.coli* presentan un característico brillo metálico con centro oscuro con periferia azulada o rosada (Figura 3a) (MERCK, 2002).

Con la obtención de las cepas de *E.coli* ATCC 8739 y *E.coli* nativa, y la confirmación microscópica de los microorganismos (Bacilos Gram negativos) (Figura 4ab), se realizó la prueba de contacto con los diferentes extractos. Para esto fue necesario el aislamiento de las cepas en Agar TSA, lo cual permitió la preparación de la suspensión de las cepas de acuerdo al patrón N°2 de McFarland, ya que se obtiene la turbidez necesaria para una concentración de  $6 \times 10^8$  cel/ml. El uso del caldo BHI para este procedimiento permitió a los microorganismos desarrollarse en un medio enriquecido pues la infusión de carne de corazón y de cerebro de ternera así como la peptona proveen la fuente de carbono, nitrógeno sulfuro y vitaminas necesarias con lo cual se asegura que la inhibición del microorganismo fue causada por la acción bactericida del extracto evaluado y no por las condiciones de desarrollo a las que se sometieron los microorganismo.

Los resultados obtenidos del recuento en placa para cada montaje según concentración y procedencia del extracto (Tabla 2) se expresaron en UFC/ml para la obtención de un porcentaje de inhibición (Tabla 2, 4) partiendo de la concentración inicial de  $6 \times 10^8$  UFC/ml. El análisis de varianza de los promedio de los porcentajes de inhibición (Tablas 3, 5) permite establecer que los diferentes extractos generan inhibición sobre las cepas *E. coli* ATCC 8739 y *E.coli* nativa en un porcentaje mayor al 94%. De igual forme se determino que no existe una diferencia estadísticamente significativa en la acción antimicrobiana que generan los extracto de las clases de uva Isabella, Común y Verde y sus partes de extracción Cáscara y Semilla, ni existe diferencia estadísticamente

significativa en la interacción entre clase de uva y parte de la uva. El análisis de resultados también permite concluir que existe una diferencia estadísticamente significativa en el efecto inhibitorio generado por las tres concentraciones evaluadas (100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm) obteniéndose el mayor porcentaje de inhibición (99%) en las concentraciones de 500 ppm y 1000 ppm sin diferencia relevante en la acción que producen estas dos concentraciones. *Cowan (1999)* sugiere que la actividad antimicrobiana de los taninos se debe a su interacción sobre las adhesinas, proteínas de la pared celular, y a su capacidad de unirse a polisacáridos. *Kontiohari et al. (2001)* reporta que los taninos pueden prevenir la expresión de las fimbrias P de *E. coli* dentro de sus actividades antibacterianas, y que además tienen actividades antivirales, antiadherentes o antioxidantes.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por *Rodríguez et al. (2005)*, en donde se comprueba el poder antimicrobiano del ácido gálico a diferentes concentraciones (desde 5 ppm hasta 1000 ppm) en una cepa de *E. coli* de origen humano y dos cepas de colección *E. coli* ATCC 25922 y ATCC 35218, se reporta que a bajas concentraciones la inhibición producida por el ácido gálico no es tan fuerte como la inhibición que producen concentraciones de 500 y 1000 ppm. El ácido gálico conforma los taninos hidrolizables, usualmente como ésteres múltiples con la D-glucosa, este ácido orgánico es el compuesto fenólico de mayor predominancia formando taninos en la uva, y es por esto que se toma como patrón de comparación para la cuantificación de taninos.

Para la prueba de residualidad del extracto en su uso como desinfectante se tomó como extractos de interés Uva Isabella de Cáscara y Semilla a concentración de 5 ppm y 10 ppm. Se tomaron estas concentraciones de acuerdo a lo reportado por *Martínez y Sierra. (2010)* ya que se evidencia una menor residualidad después del tiempo de contacto de 30 min comparado con concentraciones entre 100 ppm y 1000 ppm. Lo anterior se confirmó con la reacción colorimétrica de Folin Ciocalteu como se observa en la Figura 10. El reactivo de Folin-Ciocalteu (es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato, usado para la determinación de antioxidantes fenólicos y polifenólicos. Funciona midiendo la cantidad de sustancia analizada que se necesita para inhibir la oxidación del patrón en este caso el ácido gálico una coloración azul confirma la presencia de subunidades de ácido gálico y por lo tanto la presencia de taninos. La tabla 10 permite establecer que el extracto que

tiene una mayor residualidad luego de 30 minutos es el de Semilla Isabella 10ppm con un valor de 8,19ppm seguido de Semilla Isabella 5ppm con un valor de 4,09ppm; por lo tanto se tomó el extracto de Cáscara Isabella 10ppm para su implementación como desinfectante, que aunque no presenta la menor residualidad, es un valor muy bajo (0,98ppm); la resolución 2115 de 2007 del Ministerio de Protección establece como valores admisibles de residualidad del cloro en cualquier punto de la red de distribución esta entre 0,3 y 2,0 ppm, al comparar la residualidad obtenida para extracto de elección se podría decir que se encuentra dentro del rango aceptable.

Mediante la prueba de filtración por membrana fue posible constatar el efecto inhibitorio que posee el extracto de Cáscara Isabella 10ppm sobre *E. coli* presente en agua cruda, luego de 30 minutos de contacto. El uso de Agar Chromocult para esta prueba permitió diferenciación las colonias *E. coli* de las de coliformes ya que este es un medio de cultivo selectivo para el crecimiento de este tipo de microorganismos en muestras de aguas y alimentos. Por la acción conjunta de peptonas selectivas, piruvato y tampón de fosfatos se garantiza un rápido crecimiento también de coliformes con daños sublaterales. El contenido de lauril sulfato inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas sin tener influencias negativas sobre el crecimiento de los coliformes. La formación simultánea de coliformes totales y *E. coli* se hace posible por la nueva formación de dos sustratos cromógenos: el sustrato Salmon–Gal es separado por la enzima B-D-galactosidasa característico de coliformes y provoca una coloración roja de las colonias de coliformes. La formación de la B-D-Glucuronidasa característica para *E. coli* tiene lugar mediante el sustrato X-glucorónido, que al ser cortado por la enzima produce una coloración azul para las colonias positivas. Ya que *E. coli* separa tanto Salmon-Gal como X-Glucurónido, la colonias se tiñen de violeta – azul oscuro y debido a ellos se pueden diferenciar de los coliformes restante que se presentan de color rojo. (MERCK, 2002)

En la Figura 11 se observa el resultado para la filtración del agua tratada con el extracto y para el control con agua cruda sin ningún tratamiento, claramente se observa la diferenciación de colonias Violetas perteneciente a *E.coli* de las colonias rojas pertenecientes a coliformes. El recuento del control dio incontable para *E.coli* y para coliformes, mientras que para las replicas del agua tratada dieron en promedio un recuento de 35 UFC/ 100ml de *E.coli* y 65 UFC/100 ml de coliformes (Tabla 11). Se observa claramente una disminución significativa de la carga bacteriana de acuerdo al

control, pese a que no se logra lo establecido en el decreto 475 de 1998 por el cual se expiden normas técnicas de calidad del agua potable en Colombia, en su artículo 24 como valor admisibles para *E.coli* 0 UFC/ 100 ml se puede intuir que los procesos físico químicos para la potabilización del agua cruda antes de la etapa de desinfección puede potencializar este efecto ya que para el momento en el que se debe aplicar el extracto ya se ha reducido en gran parte la carga microbiana presente en el agua. De igual forma este extracto se puede proponer como una opción orgánica para un efecto conjunto con el cloro, de este modo es posible reducir en gran medida la dosis de cloro que usualmente se agrega al agua para la inhibición de los microorganismos.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Los diferentes extractos presentan una acción antimicrobiana sobre las cepas de *E. coli* ATCC 8739 y *E. coli* nativa, el porcentaje de inhibición es mayor al 94%.
- No existe una diferencia estadísticamente significativa entre el poder inhibitorio entre clase de uva y parte de la uva, las diferentes concentraciones de estos extractos si poseen esta diferencia produciéndose un mayor efecto inhibitorio en las concentraciones de 500 ppm y 1000 ppm.
- Se determinó que el extracto etanólico de taninos de Cáscara Isabella 10ppm se puede implementar como desinfectante de aguas crudas ya que presenta una baja residualidad y un poder inhibitorio significativo sobre *E. coli*
- El extracto etanólico de taninos de uva es una opción orgánica para los procesos de desinfección, ya que por sus propiedades antimicrobianas es posible su uso como potencializador de la acción del cloro, generando una reducción de la concentración que se utiliza de este para la desinfección del agua y de este modo minimizar la formación de subproductos como los THM's que generan riesgos en la salud humana.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

APHA-AWWA-WPCF. Eatons, A. Clesceri, L y Greenberg, A. 2000. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20 th Edition. P. 9-1 – 9-117.

Cowan M. Plant Products As Antimicrobial Agents. Clinical Microbiological Reviews. 12(4): 564-582. 1999.

EPA. Combined Sewer Overflow Technology Fact Sheet Chlorine Desinfection. EPA 832 – F – 99 – 034. 1999

Germán C, Marcén J. Agua de bebida saludable por tubería: una misión casi imposible. Ciudades para un futuro más sostenible, Boletín CF+S, Número 11. Octubre 1999. Zaragoza, España.1998

Gómez M, Vázquez M, Peña P..Determinacion Y Diferenciacion De Escherichia Coli Y Coliformes Totales Usando Un Mismo Sustrato Cromogenico. Laboratorio Central. Santiago de Compostela (España) E-15702. 2005

Kontiohari T, Sundqvist K, Nuutinen M, Pokka T, Koskela M, Uhari M. Randomised trial of cranberrylingonberry juice and Lactobacillus GG drink for the prevention of urinary tract infections in women. British Medical Journal. 322 (30): 1 – 5. 2001.

Martínez E; Sierra C. Propuesta aplicativa de intervención educativa en un ambiente no formal para el aprendizaje de conceptos de desinfección de agua cruda y sus alternativas biológicas. Tesis de Pregrado. Universidad pedagógica nacional 2010.

MERCK. Manual de medios de Cultivo. 2002

Ministerio de Salud. Normas técnicas de calidad del agua potable. Decreto 475 del 10 de Marzo de 1998.

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Guías para la Calidad del Agua Potable: Recomendaciones. Vol. 1: Tercera edición. Ginebra (informe Técnico sin número). 2006.

RESOLUCION 2115. Ministerio de protección social, Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial.2007

Rodríguez M, Alberto M, Manca de Nadra M. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. Food Control 18 (2007) 93–101

Rodríguez F. Procesos de potabilización del agua e influencia del tratamiento de ozonización. Ediciones díaz de Santos S.A. España, Madrid 2003.

Sánchez A. Efectos de los trihalometanos sobre la salud. Hig. Sanid. Ambient. 8: 280-290 (2008)

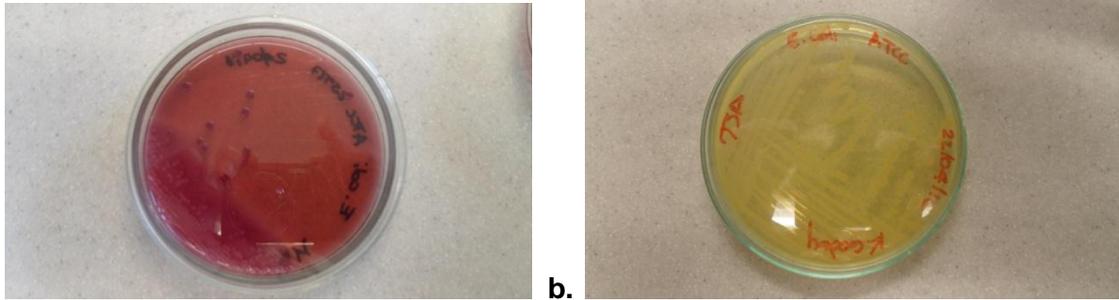
Urbaneja S. Determinación del índice del índice de Bacterias coliforme totales y fecales en muestras de alimento y determinación del índice de Estreptococo del grupo “D” en muestras de alimentos.

## 7. ANEXOS

**Tabla 1.** Extractos de taninos presentes en tres variedades de uva y su concentración

Etanol 96%		
Extracto	Procedencia	Concentración (ppm)
SV <sub>1</sub>	Semilla uva verde	1000
SV <sub>2</sub>	Semilla uva verde	500
SV <sub>3</sub>	Semilla uva verde	100
SI <sub>1</sub>	Semilla uva Isabella	1000
SI <sub>2</sub>	Semilla uva Isabella	500
SI <sub>3</sub>	Semilla uva Isabella	100
SC <sub>1</sub>	Semilla uva común	1000
SC <sub>2</sub>	Semilla uva común	500
SC <sub>3</sub>	Semilla uva común	100
CV <sub>1</sub>	Cáscara uva verde	1000
CV <sub>2</sub>	Cáscara uva verde	500
CV <sub>3</sub>	Cáscara uva verde	100
CI <sub>1</sub>	Cáscara uva Isabella	1000
CI <sub>2</sub>	Cáscara uva Isabella	500
CI <sub>3</sub>	Cáscara uva isabella	100
CC <sub>1</sub>	Cáscara uva común	1000
CC <sub>2</sub>	Cáscara uva común	500
CC <sub>3</sub>	Cáscara uva común	100

Fuente: Autor



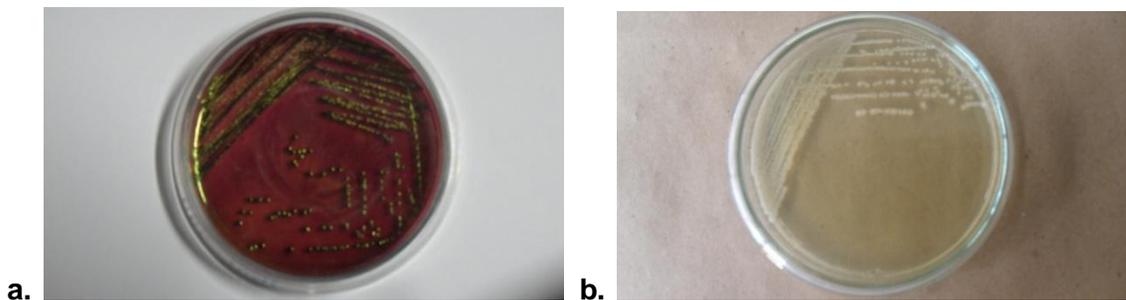
Fuente: Autor

**Figura 1.** Aislamiento de la cepa de *E.coli* ATCC 8739 en **a.** Agar McConckey **b.** Agar TSA



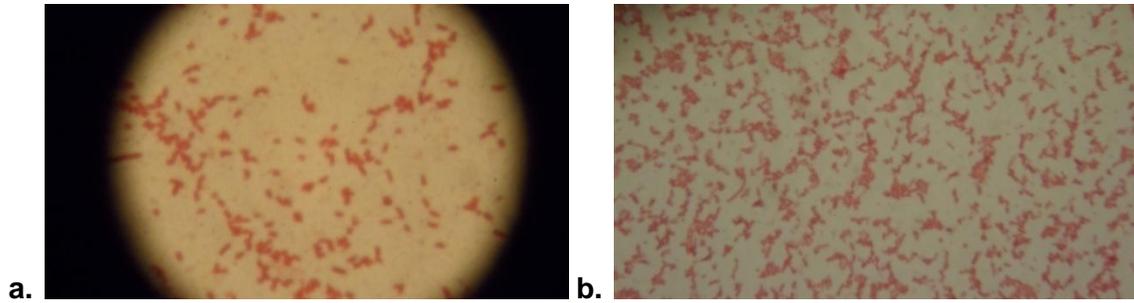
Fuente: Autor

**Figura 2.** Aislamiento de *E.coli* nativa en caldo Florocult.



Fuente: Autor

**Figura 3.** Purificación y Aislamiento de *E. coli* nativa en **a.** Agar EMB. **b.** Agar TSA



Fuente: Autor

**Figura 4.** Tinción de Gram **a.** *E. coli* ATCC 8739 **b.** *E. coli* nativa



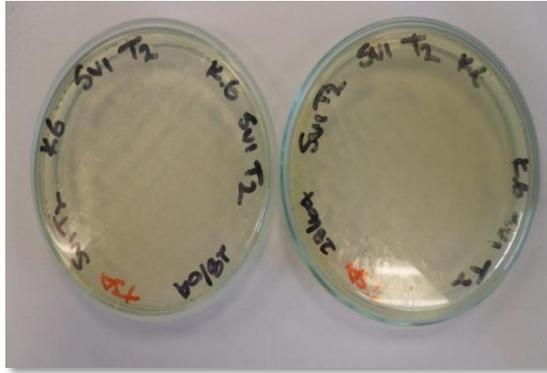
Fuente: Autor

**Figura 5.** Suspensión de *E.coli* según patrón de McFarland N°2



Fuente: Autor

**Figura 6.** Montaje de la prueba de contacto con los diferentes extractos para *E. coli* ATCC 8739 en caldo BHI



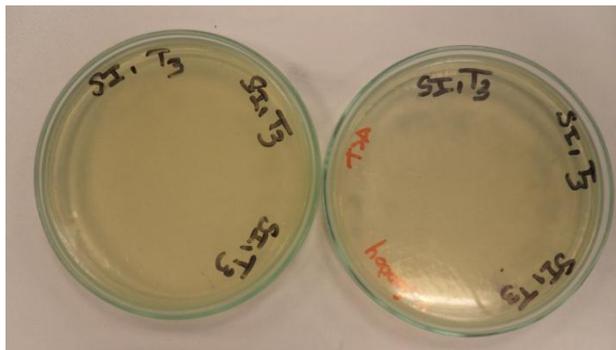
Fuente: Autor

**Figura 7.** Recuento en placa en Agar TSA para *E. coli* ATCC 8739 luego de la prueba de contacto.



Fuente: Autor

**Figura 8.** Montaje de la prueba de contacto con los diferentes extractos para *E. coli* nativa en caldo BHI



Fuente: Autor

**Figura 9.** Recuento en placa en Agar TSA para *E. coli* nativa luego de la prueba de contacto.

**Tabla 2.** Recuento en placa de *E.coli* nativa en Agar TSA, luego del contacto con los extractos.

<i>E. coli</i> nativa						
EXTRACTO	SEMILLA			CÁSCARA		
	100 ppm	500 ppm	1000 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm
ISABELLA	2,00E+07	0,00E+07	0,00E+07	2,00E+07	0,00E+07	0,00E+07
	3,00E+07	1,00E+07	0,00E+07	2,00E+07	0,00E+07	0,00E+07
	0,00E+07	0,00E+07	0,00E+07	0,00E+07	1,00E+07	0,00E+07
COMÚN	2,00E+07	1,00E+07	0,00E+07	1,00E+07	0,00E+00	1,00E+07
	4,00E+07	1,00E+07	0,00E+07	2,00E+07	1,00E+07	0,00E+07
	3,00E+07	0,00E+07	0,00E+07	3,00E+07	0,00E+07	0,00E+07
VERDE	3,00E+07	0,00E+07	0,00E+07	2,00E+07	0,00E+07	0,00E+07
	1,00E+07	1,00E+07	0,00E+07	1,00E+07	1,00E+07	0,00E+07
	2,00E+07	0,00E+07	0,00E+07	2,00E+07	0,00E+07	0,00E+07

Fuente: Autor

**Tabla 3.** Porcentaje de inhibición en decimales de los diferentes extractos sobre *E.coli* nativa

<i>E. coli</i> nativa						
EXTRACTO	SEMILLA			CÁSCARA		
	100 ppm	500 ppm	1000 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm
ISABELLA	0,967	1,000	1,000	0,967	1,000	1,000
	0,950	0,983	1,000	0,967	1,000	1,000
	1,000	1,000	1,000	1,000	0,983	1,000
COMÚN	0,967	0,983	1,000	0,983	1,000	0,983
	0,933	0,983	1,000	0,967	0,983	1,000
	0,950	1,000	0,983	0,950	1,000	1,000
VERDE	0,950	1,000	1,000	0,967	1,000	1,000
	0,983	0,983	1,000	0,983	0,983	1,000
	0,967	1,000	1,000	0,967	1,000	1,000

Fuente: Autor

**Tabla 4.** Recuento en placa de *E.coli* ATCC 8739 en Agar TSA, luego del contacto con los extractos.

<i>E. coli</i> ATCC 8739						
EXTRACTO	SEMILLA			CÁSCARA		
	100 ppm (UFC/ml)	500 ppm (UFC/ml)	1000 ppm (UFC/ml)	100 ppm (UFC/ml)	500 ppm (UFC/ml)	1000 ppm (UFC/ml)
ISABELLA	1,00E+07	1,00E+07	0,00E+07	1,00E+07	0,00E+07	0,00E+07
	2,00E+07	1,00E+07	0,00E+07	2,00E+07	0,00E+07	0,00E+07
	2,00E+07	0,00E+07	1,00E+07	1,00E+07	0,00E+07	0,00E+07
COMÚN	1,00E+07	1,00E+07	0,00E+07	5,00E+07	0,00E+07	1,00E+07
	3,00E+07	1,00E+07	2,00E+07	2,00E+07	1,00E+07	1,00E+07
	3,00E+07	0,00E+07	0,00E+07	2,00E+07	0,00E+00	0,00E+07
VERDE	1,00E+07	1,00E+07	0,00E+07	3,00E+07	1,00E+07	0,00E+07
	2,00E+07	1,00E+07	1,00E+07	1,00E+07	0,00E+07	1,00E+07
	4,00E+07	0,00E+07	0,00E+07	2,00E+07	0,00E+07	0,00E+07

Fuente: Autor

**Tabla 5.** Porcentaje de inhibición en decimales de los diferentes extractos sobre *E.coli* ATCC 8739

<i>E. coli</i> ATCC8739						
EXTRACTO	SEMILLA			CÁSCARA		
	100 ppm	500 ppm	1000 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm
ISABELLA	0,983	0,983	1,000	0,983	1,000	1,000
	0,967	0,983	1,000	0,967	1,000	1,000
	0,967	1,000	0,983	0,983	1,000	1,000
COMÚN	0,983	0,983	1,000	0,917	1,000	0,983
	0,950	0,983	0,967	0,967	0,983	0,983
	0,950	1,000	1,000	0,967	1,000	1,000
VERDE	0,983	0,983	1,000	0,950	0,983	1,000
	0,967	0,983	0,983	0,983	1,000	0,983
	0,933	1,000	1,000	0,967	1,000	1,000

Fuente: Autor

**Tabla 6.** Análisis de varianza de los promedios de los porcentajes en decimales de inhibición de Semilla y Cáscara de las tres variedades de uvas obtenidos para la cepa *E.coli* nativa.

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

RESUMEN	SEMILLA	CÁSCARA	Total
<i>ISABELLA</i>			
Cuenta	3	3	6
Suma	2,966666667	2,972333333	5,939
Promedio	0,988888889	0,990777778	0,989833333
Varianza	0,000124704	9,48148E-06	5,47444E-05
<i>COMÚN</i>			
Cuenta	3	3	6
Suma	2,933	2,955333333	5,888333333
Promedio	0,977666667	0,985111111	0,981388889
Varianza	3,21111E-05	9,48148E-06	3,3263E-05
<i>VERDE</i>			
Cuenta	3	3	6
Suma	2,961	2,966666667	5,927666667
Promedio	0,987	0,988888889	0,987944444
Varianza	1,01111E-05	3,7037E-08	5,12963E-06
<i>Total</i>			
Cuenta	9	9	
Suma	8,860666667	8,894333333	
Promedio	0,984518519	0,988259259	
Varianza	6,88086E-05	1,09938E-05	

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	0,000235704	2	0,000117852	3,80318725	0,052565853	3,885293835
Columnas	6,29691E-05	1	6,29691E-05	2,03207171	0,179500346	4,747225336
Interacción	3,08642E-05	2	1,54321E-05	0,49800797	0,619763599	3,885293835
Dentro del grupo	0,000371852	12	3,09877E-05			
Total	0,000701389	17				

**Tabla 7.** Análisis de varianza de los promedios de los porcentajes en decimales de inhibición de las concentraciones 100ppm, 500ppm, 1000ppm de las tres variedades de uvas para la cepa *E. coli* nativa.

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

RESUMEN	100 ppm	500 pm	1000 ppm	Total
<i>ISABELLA</i>				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	2,9255	2,983	3	8,9085
Promedio	0,975166667	0,994333333	1	0,98983333
Varianza	0,000480583	2,40833E-05	0	0,00025319
<i>COMÚN</i>				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	2,875	2,9745	2,983	8,8325
Promedio	0,958333333	0,9915	0,994333333	0,98138889
Varianza	0,000208333	7,225E-05	2,40833E-05	0,00037667

*VERDE*

Cuenta	3	3	3	9
Suma	2,9085	2,983	3	8,8915
Promedio	0,9695	0,994333333	1	0,98794444
Varianza	0,00015475	9,63333E-05	0	0,00026015

*Total*

Cuenta	9	9	9
Suma	8,709	8,9405	8,983
Promedio	0,967666667	0,993388889	0,998111111
Varianza	0,000265938	5,01736E-05	1,40486E-05

## ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	0,000353556	2	0,000176778	1,50035363	0,249659016	3,554557146
Columnas	0,004832389	2	0,002416194	20,5067976	2,28499E-05	3,554557146
Interacción	0,000166889	4	4,17222E-05	0,35410609	0,837786458	2,927744173
Dentro del grupo	0,002120833	18	0,000117824			
Total	0,007473667	26				

**Tabla 8.** Análisis de varianza de los promedios de los porcentajes en decimales de inhibición de Semilla y Cáscara de las tres variedades de uvas obtenidos para la cepa *E.coli* ATCC 8739.

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

RESUMEN	SEMILLA	CÁSCARA	Total
<i>ISABELLA</i>			
Cuenta	3	3	6
Suma	2,955333333	2,977666667	5,933
Promedio	0,985111111	0,992555556	0,988833333
Varianza	9,48148E-06	9,48148E-06	2,42111E-05
<i>COMÚN</i>			
Cuenta	3	3	6
Suma	2,938666667	2,933333333	5,872
Promedio	0,979555556	0,977777778	0,978666667
Varianza	0,000131704	0,000124704	0,000103511
<i>VERDE</i>			
Cuenta	3	3	6
Suma	2,944	2,955333333	5,899333333
Promedio	0,981333333	0,985111111	0,983222222
Varianza	4,03333E-05	4,15926E-05	3,70519E-05
<i>Total</i>			
Cuenta	9	9	
Suma	8,838	8,866333333	
Promedio	0,982	0,985148148	
Varianza	5,14167E-05	8,4892E-05	

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	0,000311198	2	0,000155599	2,61293666	0,114287828	3,885293835
Columnas	4,45988E-05	1	4,45988E-05	0,74893749	0,403782703	4,747225336
Interacción	6,4679E-05	2	3,23395E-05	0,54307038	0,594590478	3,885293835
Dentro del grupo	0,000714593	12	5,95494E-05			
Total	0,001135068	17				

**Tabla 9.** Análisis de varianza de los promedios de los porcentajes en decimales de inhibición de las concentraciones 100ppm, 500ppm, 1000ppm de las tres variedades de uvas para la cepa *E. coli* ATCC 8739

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

RESUMEN	100 ppm	500 ppm	1000 ppm	Total
<i>ISABELLA</i>				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	2,925	2,983	2,9915	8,8995
Promedio	0,975	0,994333333	0,997166667	0,98883333
Varianza	6,4E-05	2,40833E-05	2,40833E-05	0,00013719
<i>COMÚN</i>				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	2,867	2,9745	2,9665	8,808
Promedio	0,955666667	0,9915	0,988833333	0,97866667

Varianza	2,40833E-05	7,225E-05	0,000161583	0,00036338
----------	-------------	-----------	-------------	------------

*VERDE*

Cuenta	3	3	3	9
Suma	2,8915	2,9745	2,983	8,849
Promedio	0,963833333	0,9915	0,994333333	0,98322222
Varianza	0,000161583	7,225E-05	9,63333E-05	0,00029551

*Total*

Cuenta	9	9	9	
Suma	8,6835	8,932	8,941	
Promedio	0,964833333	0,992444444	0,993444444	
Varianza	0,000133063	4,41528E-05	8,39653E-05	

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	0,000466796	2	0,000233398	2,99976199	0,075098091	3,554557146
Columnas	0,004745907	2	0,002372954	30,4985124	1,6556E-06	3,554557146
Interacción	0,000222148	4	5,5537E-05	0,71379269	0,593267639	2,927744173
Dentro del grupo	0,0014005	18	7,78056E-05			
<b>Total</b>	<b>0,006835352</b>	<b>26</b>				

**Tabla 10.** Prueba de residualidad del desinfectante: Resultados de la residualidad para los extractos de Semilla y Cáscara de uva Isabella a 5ppm y 10.ppm

EXTRACTO	ABS			Prom ABS	[ppm]
CI 10ppm	0,076	0,077	0,074	0,0757	0,983
CI 5ppm	0,027	0,027	0,027	0,0270	0,431
SI 10 ppm	0,712	0,710	0,712	0,7113	8,190
SI 5 ppm	0,348	0,345	0,356	0,3497	4,089

Fuente: Autor



Fuente: Autor

**Figura 10.** Prueba de residualidad del desinfectante: Resultados de la reacción colorimétrica con reactivo de Follin Ciocalteau y carbonato de sodio al 20% de los extractos de Semilla y Cáscara de uva Isabella a 5ppm y 10ppm para cuantificación de taninos.

**Tabla 11.** Recuento de la filtración por membrana luego del uso del Extracto de Cáscara de uva Isabella [10ppm]

	CONTROL			EXTRACTO CI 10PPM UFC/100ml			PROM UFC/100ml
<i>E. coli</i>	Incontable	Incontable	Incontable	30	40	34	35
<b>Coliformes totales</b>	Incontable	Incontable	Incontable	70	60	67	66

Fuente: Autor



Fuente: Autor

**Figura 11.** Filtración por membrana luego del uso del Extracto de Cáscara [10ppm]