

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



**COMPARACION DEL METODO TRADICIONAL
PARA LA DETERMINACION DE COLIFORMES
FECALES CON LOS METODOS A-1 Y EC DIRECTO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A**

MARIA DEL PILAR LEAL HERNANDEZ

MEXICO, D. F.

1980

M-21701



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PRESIDENTE	Profra. Natalia Salcedo Olavarrieta
VOCAL	Profr. Enrique García Galeano
SECRETARIO	Profra. Guadalupe Velez Pratt
PRIMER SUPLENTE	Profra. Angela Sotelo López
SEGUNDO SUPLENTE	Profr. Alejandro Garduño Torres

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Centro de Investigación y Entrenamiento para el Control de la Calidad del Agua (CIECCA), SARH.

SUSTENTANTE: Ma. del Pilar Leal Hernández

ASESOR DEL TEMA: Profra. Natalia Salcedo Olavarrieta

A mis padres y hermanos

Con mucho cariño a mi tío Beto

Mi más sincero agradecimiento a la
Profra. Natalia Salcedo Olavarrieta
por su asesoría y paciencia

Agradezco a la Srita.

QFB Luz María Oropeza Mendoza, Jefe del Departamento
del CIECCA, las facilidades que me brindó para la reali-
zación de este trabajo.

Con especial cariño a Espe, Vicky y amigos

Al Profr. Josué Villalobos Ortíz

CONTENIDO

- I. RESUMEN
- II. INTRODUCCION
- III. MATERIAL Y METODOS
- IV. RESULTADOS (1a. parte): ANALISIS BACTERIOLOGICO
- V. RESULTADOS (2a. parte): ANALISIS ESTADISTICO
- VI. COMPARACION DE COSTOS
- VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES
- VIII. ANEXO
- IX. BIBLIOGRAFIA

I. RESUMEN

I. RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objeto de ver si existía una diferencia significativa entre el procedimiento de los métodos estándar de la Asociación Americana de Salud Pública (APHA) (Método Tradicional), el método rápido A-1 desarrollado por Wallace H. Andrews y Maynard - W. Presnell y el método EC directo para la determinación de coliformes fecales en aguas dulces.

Se hizo el análisis bacteriológico de 125 muestras de agua en el Centro de Investigación y Entrenamiento para el Control de la Calidad del Agua (CIECCA), tomadas en el Embarcadero Fernando Celada en Xochimilco, empleando simultáneamente los tres métodos. El método tradicional que consiste en la siembra en caldo lactosado e incubación a 35 ± 0.5 por 24 - 48 horas y resiembra de los tubos positivos en medio EC a $44.5 \pm 0.2^{\circ}$ C por 24 h; el método rápido A-1 que emplea un nuevo medio denominado A-1 en el que los tubos inoculados se incuban directamente en baño de agua con circulación forzada a $44.5 \pm 0.2^{\circ}$ C por 24 horas y el método EC directo que es una modificación del tradicional y consiste en sembrar las muestras directamente en el medio EC, sin pasar por la siembra en caldo lactosado, e incubar también a 44.5° C por 24 horas en un baño de agua.

Los resultados se reportan como NMP/100 ml y mediante un análisis de varianza de los datos obtenidos se concluye que se puede utilizar indistintamente cualquiera de los tres métodos para la determinación de coliformes en aguas dulces con características similares a las utilizadas en este

estudio. Se recomienda el uso del método rápido A-1 por su economía en tiempo y costo.

II INTRODUCCION

II. INTRODUCCION

Recientemente se ha dado importancia relevante a los aspectos microbiológicos involucrados en la contaminación del agua, puesto que es de vital importancia que su calidad sea la adecuada y cumpla las funciones que de ella se esperan.

Tanto las aguas superficiales como las subterráneas pueden estar contaminadas con desechos industriales y domésticos incluyendo escurrimientos agrícolas. Conforme aumenta la población la contaminación es más seria (virus, bacterias, hidrocarburos, plaguicidas e insecticidas, incluyendo metales pesados) y las aguas que contienen cualquiera de los anteriores contaminantes ponen en peligro la salud y la vida de los humanos, animales y vegetales.

Las bacterias que se encuentran en las aguas naturales pertenecen principalmente a los géneros Pseudomonas, Chromobacterium, Achromobacter, Micrococcus, Bacillus, Proteus, Flavobacterium, Leptospira, Clostridium, Streptococcus, Enterobacter y Escherichia. Estos tres últimos son contaminantes y no forman parte de su flora natural. (8,9)

Las aguas, cuando estan contaminadas con materia fecal, son portadoras potenciales de organismos patógenos tales como los agentes causantes de la fiebre tifoidea y paratifoidea, disentería, cólera y enfermedades virales, por ejemplo, hepatitis o poliometitis, por lo tanto es indeseable la contaminación del agua por desechos intestinales - - bajo dos aspectos: (1) desde el punto de vista de peligro por infección-

(sanitario) y (2) por razones estéticas .

Aunque pudiera suponerse que el objeto de los análisis bacteriológicos de rutina del agua fuera el de aislar los microorganismos patógenos es pecíficos, no es así por las razones siguientes:

1. Los microorganismos patógenos llegan al agua esporádicamente y no sobreviven en ella durante largo tiempo; por lo tanto pueden no encontrarse en la muestra enviada al laboratorio ⁽¹⁵⁾.
2. Si existen en pequeño número es fácil que escapen a las técnicas de investigación ⁽¹⁵⁾.
3. Para su identificación se requiere de un período de tiempo lar go, así como de técnicas muy específicas. Si existieran microor ganismos patógenos en el agua analizada, muchas personas que hubieran consumido agua durante el intervalo que transcurre en tre la toma de la muestra y la obtención de resultados podrían haberse infectado. ^(9,15)

Es bien sabido que los microorganismos patógenos se encuentran en las heces y en la orina de las personas infectadas. Por otra parte, ciertas es pecies bacterianas, en particular Escherichia coli y los organismos afines llamados coliformes, los estreptococos fecales (por ejemplo - - Streptococcus faecalis) , Clostridium especialmente Clostridium perfrin gens y ciertas especies de bacterias anaerobias Bifidobacterium (Lacto bacillus) bifidus son huéspedes normales del intestino grueso del hombre y de algunos animales y se encuentran por consiguiente en las heces .

La presencia de estos microorganismos en el agua revela una contaminación fecal. Puesto que el análisis bacteriológico del agua para investigar bacterias patógenas está rodeado de los inconvenientes mencionados líneas arriba, se hace hincapié en demostrar la presencia o ausencia de organismos de origen intestinal o de desecho más comunes, en especial los microorganismos del grupo coliforme.

El grupo coliforme fecal incluye a los bacilos cortos, gram negativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas y ácido a $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ en un período de 24 horas. Las ventajas de analizar el grupo coliforme y no al de patógenos específicos son:

1. Los organismos coliformes están constantemente presentes, tanto en los intestinos de humanos sanos como en enfermos, en gran número y miles de millones de estos organismos son excretados diariamente por una persona. Se estima que, para cualquier bacilo tifoideo u otro patógeno (por ejemplo Entamoeba histolytica o virus de la polio o hepatitis) en suministros de agua contaminada, usualmente hay millones de organismos coliformes especialmente E. coli.
2. Otra ventaja es que los organismos del grupo coliforme sobreviven más tiempo en un ambiente acuático que la mayoría de los patógenos intestinales, por lo tanto es posible localizar una contaminación reciente o no tan reciente.
3. La presencia de estos organismos se puede identificar fácilmente

te mediante técnicas de rutina.

4. La ausencia de coliformes es una evidencia de la potabilidad del agua desde el punto de vista microbiológico.
5. El aumento en cantidad es aproximadamente proporcional al grado de contaminación.
6. Los miembros del grupo coliforme no son patógenos excepto algunas cepas.

Desventajas del grupo coliforme como índice de contaminación.

1. Algunos miembros del grupo coliforme se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente en comparación a su presencia en los intestinos de animales de sangre caliente.
2. No es posible determinar con precisión el momento en que principió la contaminación.
3. Algunas de las especies pueden crecer en aguas contaminadas
4. A veces la flora bacteriana no coliforme impide el crecimiento de los coliformes (prueba falsa negativa) o produce gas sin haber microorganismos coliformes (prueba falsa positiva).
5. Un número pequeño de coliformes fecales da negativa la prueba de la temperatura.

Los métodos oficiales de análisis bacteriológico para la determinación y enumeración de coliformes fecales se describen en "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater". Estas determinaciones microbiológicas son un buen índice de contaminación fecal, pero presentan un gran inconveniente, el tiempo, ya que el análisis bacteriológico requiere de un período mínimo de 48 horas y máximo de 72 horas (24 - 48 horas prueba presuntiva y 24 horas prueba confirmativa) para obtener resultados. Debido a esto han surgido una serie de investigaciones con el objeto de encontrar métodos más perfeccionados y a su vez más rápidos para determinar la calidad bacteriológica del agua.

En marzo de 1972 apareció en la revista Applied Microbiology un artículo firmado por Wallace H. Andrews y Maynard W. Presnell⁽³⁾ en el que informaban de un nuevo método para determinar coliformes fecales en agua de mar. Este nuevo método utiliza tubos de fermentación con un medio especial denominado A-1 y una incubación directa en baño de agua a $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, sin pasar antes por la siembra en caldo lactosado, como en el método tradicional lo especifica la 14a. edición de los métodos estándares para el examen de aguas y aguas de desecho⁽⁴⁾.

Una de las ventajas de este método es su rapidez, ya que los resultados se obtienen en 24 horas, a diferencia de las 72 horas que tarda el método tradicional. También parece ser que con el medio A-1 se obtiene una mayor recuperación de coliformes fecales que con el medio EC⁽²⁾. En 1974 se publicó en el Octavo Congreso sobre Saneamiento de Moluscos⁽¹²⁾ un trabajo preliminar sobre la comparación del método tradicional, del método

rápido A-1 y del método A-1 modificado. Esta modificación consistió en una preincubación de los tubos a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante tres horas y su posterior incubación en baño de agua a $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ durante 21 horas más; el objetivo de este estudio era determinar si existía alguna lesión en los microorganismos por alta temperatura, ya que el método fue diseñado para aguas muy frías.

En 1977, en el Décimo Congreso sobre Saneamiento de Moluscos, se presentó el trabajo final de esta comparación, realizado por J.J. Micescier⁽¹⁴⁾ y colaboradores en el cual se informaba que los tres métodos son igualmente efectivos en la enumeración de E.coli.

En 1978 se realizó una comparación entre los tres métodos: el método tradicional, el A-1 y el A-1 modificado, aplicándolos a aguas dulces, puesto que originalmente el método A-1 fue desarrollado para aguas estuarinas. El objetivo de esta comparación era ver si el método A-1 se podía emplear en el análisis de aguas potables o aguas dulces. Los resultados de esta comparación se presentaron en el Primer Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria efectuado en Guadalajara, Jal.⁽¹⁰⁾ De los resultados obtenidos se concluyó que se puede utilizar cualquiera de los tres métodos para determinar coliformes fecales en agua dulce.

El objetivo de este trabajo es continuar con la comparación preliminar iniciada por M. Galván García y colaboradores con dos modificaciones. La primera, es la eliminación del A-1 modificado puesto que en los estudios anteriores se vió que no habían ninguna lesión por temperatura tanto en aguas estuarinas como dulces, y la introducción de una modificación al método tradicional que consiste en sembrar directamente en medio EC -

sin pasar por la prueba presuntiva en caldo lactosado. Resumiendo, el objetivo de este trabajo es ver si existe una diferencia significativa en la determinación de coliformes fecales en aguas dulces empleando el método tradicional, el A-1 y el EC directo. En este trabajo también se comparan los costos de los tres medios ya que de nada serviría el tener un método rápido si es más costoso que el tradicional y por último, en base a los resultados que se obtengan, es nuestro deseo que este trabajo sirva de apoyo para la inclusión del método A-1 dentro de las normas mexicanas para análisis de aguas.

III. MATERIAL Y METODOS

III MATERIAL Y METODOS

A. Material

1. Equipo

- a. Incubadora equipada con dispositivo mecánico para la circulación de aire con termómetro y termostato
- b. Estufa de esterilización de aire caliente
- c. Autoclave
- d. Baño de agua con agitación y regulación de temperatura
- e. Balanza analítica
- f. Matraces de 1000 y 500 ml
- g. Pipetas de 10,5 y 1 ml
- h. Pipeteros de aluminio
- i. Frascos de cristal Pyrex con tapones de rosca
- j. Cajas de Petri de 100 mm de diámetro, de Pyrex
- k. Tubos de ensayo de Pyrex (25 x 150 mm)
- l. Tubos con dispositivo de Durham
- m. Gradillas metálicas
- n. Mechero
- ñ. Asas de siembra
- o. Frascos de muestreo bacteriológico
- p. Microscopio
- q. Potenciómetro
- r. Tapones metálicos

2. Medios de cultivo

a. Caldo lactosado

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Lactosa	5.0 g
Agua destilada	1000 ml
pH final 6.8 - 7	

b. Medio EC

Triptosa	20.0 g
Lactosa	5.0 g
Mezcla de sales biliares	1.5 g
Fosfato dibásico de potasio, K_2HPO_4	4.0 g
Fosfato monobásico de potasio, KH_2PO_4	1.5 g
Cloruro de sodio, $NaCl$	5.0 g
Agua destilada	1000 ml
pH final 6.9	

c. Gelosa-eosina azul de metileno (EMB)

Peptona	10.0 g
Lactosa	10.0 g
K_2HPO_4	2.0 g
Agar, grado bacteriológico	15.0 g
Eosina Y	0.4 g

Azul de metileno	0.065 g
Agua destilada no es necesario ajustar el pH	1000 ml

d. Gelosa Nutritiva

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Agar, grado bacteriológico	15.0 g
Agua destilada	1000.0 ml
pH final 6.8 ± 0.1	

e. Medio A - 1

Lactosa	5.0 g
Triptona	20.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Salicina	0.5 g
Triton x - 100	1.0 ml
*	
pH antes de la esterilización	6.9
* Agua destilada	1000 ml

3. Soluciones y reactivos

a. Agua peptonada

Peptona	5.0 g
Agua destilada	1000 ml

b. Reactivos para la tinción de Gram

1) Alcohol-acetona. Mezclar volúmenes iguales de alcohol etílico de

95% con acetona

2) Solución de lugol

Yodo (cristales) 1.0 g

Yoduro de potasio 2.0 g

Agua destilada 300 ml

Triturar el yodo y el yoduro de potasio en un mortero. Adicionar agua destilada en pequeñas porciones, mezclando bien después de cada adición hasta completar un volumen total de 300 ml

3) Oxalato de amonio - cristal violeta

Cristal violeta 2. g

Alcohol etílico al 95% 20 ml

Oxalato de amonio monohidratado 0.8 g

Agua destilada 80 ml

Disolver el cristal violeta(90% de contenido seco) en el alcohol etílico; disolver 0.8 g de oxalato de amonio monohidratado en el agua destilada; mezclar las dos soluciones y dejar en reposo por 24 horas antes de usarla; filtrar a través de papel dentro de un frasco ámbar.

4) Safranina

Safranina 2.5 g

Alcohol etílico al 95% 100 ml

Agua destilada 100 ml

Disolver la safranina en 100 ml de alcohol etílico de 95%. Adicionar 10 ml de la solución alcohólica de safranina a 100 ml de agua destilada.

B. METODOS

1. Preparación y esterilización del material de vidrio y medios de cultivo.

El material de vidrio, excepto los frascos de muestreo, se esterilizó en estufa de aire caliente a 170°C durante 2 h. A las pipetas, antes de meterlas a esterilizar, se les colocó un tapón de algodón en el extremo contrario a la punta.

Los frascos de vidrio para las muestras se esterilizaron en autoclave a 121°C, 1 kg/cm² de presión, por 15 min., colocándoles previamente a la esterilización una tira de papel entre el cuello y la tapa del frasco para evitar que se pegue la tapa con el calor; encima de la tapa, cubriendo a su vez el cuello del frasco, se colocó un capuchón de papel de aluminio. También antes de la esterilización se les colocó 1 ml de tiosulfato de sodio al 10%.

La preparación y esterilización de los medios de cultivo deshidratados se hizo siguiendo las instrucciones del fabricante para rehidratar y esterilizar. (Caldo Lactosado, Medio EC, EMB).

La gelosa nutritiva se hizo a partir de sus ingredientes básicos, ya que no se contó con el medio deshidratado, esterilizándose a 1 kg/cm² de presión, 121°C, durante 15 min.

El medio A-1 no existe deshidratado, por lo que se tiene que preparar a partir de sus ingredientes básicos. Se recomienda disolver la lactosa, el cloruro de sodio, la salicina y el triton x -100 en agua destilada y por último la triptona. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 10 min. Es común la formación de flóculos, particularmente en el medio de doble concentración pero eso no indica que el medio esté echado a perder.

El tiempo que transcurrió entre la preparación de los medios de cultivo y su utilización nunca fue mayor de una semana.

2. Recolección y transporte de las muestras

Las muestras se tomaron en frascos de vidrio de boca ancha, de 125 ml, con tapón esmerilado, estériles. Los frascos contenían 0.1 ml de solución de tiosulfato de sodio al 10% para evitar la acción bactericida del cloro-residual. La solución de tiosulfato de sodio se aplica a los frascos limpios y secos antes de la esterilización.

El procedimiento de toma de muestras fue: Se aflojó el papel que protegía el tapón y se sumergió el frasco cerrado con el cuello hacia abajo, se destapó y giró de modo que el cuello quedó ligeramente más elevado que la base. Como no había corriente ésta se provocó manualmente. Una vez llenas, aproximadamente hasta 3/4 partes de la botella, se taparon. Todo esto dentro del cuerpo de agua.

Se recolectaron 125 muestras a partir del 1ro. de noviembre de 1978 al 20 de febrero de 1979, en el embarcadero Fernando Celada de Xochimilco. Se escogió este lugar ya que por estudios anteriores se sabe que existe gran cantidad de coliformes fecales. Los muestreos se realizaron dos veces por semana, tomándose nueve muestras en total cada semana (5 el primer día y 4 el segundo día) siendo generalmente los días lunes y martes de cada semana. Las muestras se tomaron aproximadamente a 4 m de la orilla del embarcadero y se transportaron en hielo; el intervalo transcurrido entre el muestreo y el análisis en ningún caso excedió - de 4 horas.

3. Diluciones

Se utilizaron tres diluciones por muestra, 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , preparadas por la adición de 10 ml de muestra (o dilución) a 90 ml de agua peptonada estéril (1). Ver figura Núm. 1.

4. Inoculación

De cada dilución se inoculó 1 ml a series de 5 tubos de fermentación para los tres métodos .

Para el método tradicional se inocularon series de cinco tubos con caldo lactosado. Se agitaron e incubaron a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

Se examinó cada tubo a las 24 ± 2 horas agitando suavemente antes del examen. Los tubos que presentaron formación de gas se consideraron positivos. Los que no presentaron formación de gas se volvieron a incubar

durante otras 24 ± 2 horas. La formación de gas dentro de 48 ± 3 horas, constituye una prueba presuntiva positiva y nos da un indicio de la presencia de coliformes.

La ausencia de gas a las 48 ± 3 horas, indica una prueba negativa, es decir, ausencia de coliformes.

Los tubos positivos de la prueba presuntiva se sembraron con un asa de siembra en tubos de fermentación con medio EC y se incubaron a $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ en baño maría con circulación forzada por 24 ± 2 horas, conforme al procedimiento para examinar el agua de los Métodos Estándar para el Análisis de Agua y Aguas de Desecho de la Asociación Americana de la Salud Pública (APHA)⁽⁴⁾.

La presencia de gas en los tubos indica la presencia del grupo coliforme fecal y constituye una prueba confirmativa. En la Fig. Núm.2 se presenta una síntesis de la prueba para la determinación de coliformes fecales.

Para las pruebas rápidas A-1 y EC directa, se inocularon series de cinco tubos de fermentación que contenían el medio A-1 y EC, respectivamente, con las mismas diluciones; se agitó cuidadosamente y se incubaron directamente los tubos de fermentación inoculados a $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ en un baño de agua circulante durante 24 ± 2 h.

Los tubos positivos fueron aquellos que presentaron formación de gas al final de la incubación, indicándonos la presencia del grupo coliforme fecal. En la Fig. Núm. 3 se presenta la marcha analítica de las pruebas rápidas A-1 y EC directa.

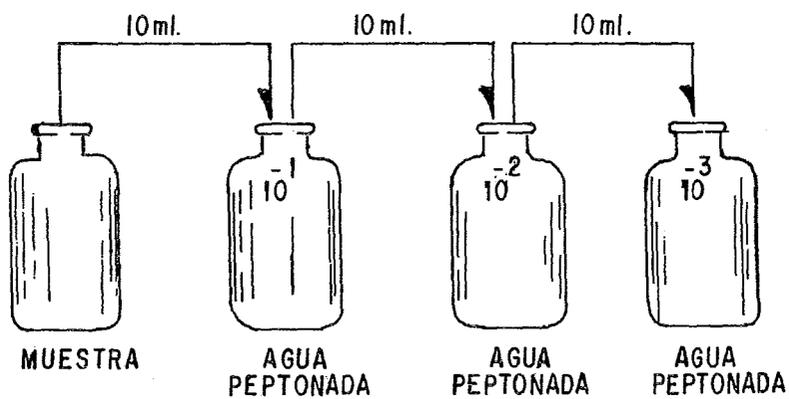
5. Lectura de los resultados

Por definición coliformes fecales son aquéllas bacterias de forma bacilar (bacilos cortos), aerobias o anaerobias facultativas, gram negativas, no esporuladas, que fermentan la lactosa con producción de acidez y gas a $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ en 24 h. Para la lectura de los resultados se consideran tubos positivos aquéllos que presentan gas en el tubo de fermentación invertido, dentro del tubo de ensayo que contiene el medio de cultivo, al final del período de incubación, a la temperatura mencionada.

Los resultados se reportan como "número más probable" (NMP) de coliformes fecales por 100 ml de muestra y se obtuvieron multiplicando el NMP (Tablas incluidas en los métodos estándares) por la dilución de la serie central.

En la tabla Núm.1 de la Sección IV se enlistan los resultados del análisis bacteriológico obtenidos por los tres métodos.

FIGURA Núm.1



Preparación de las diluciones

FIGURA Núm. 2

Marcha de la determinación de coliformes fecales
Método Tradicional

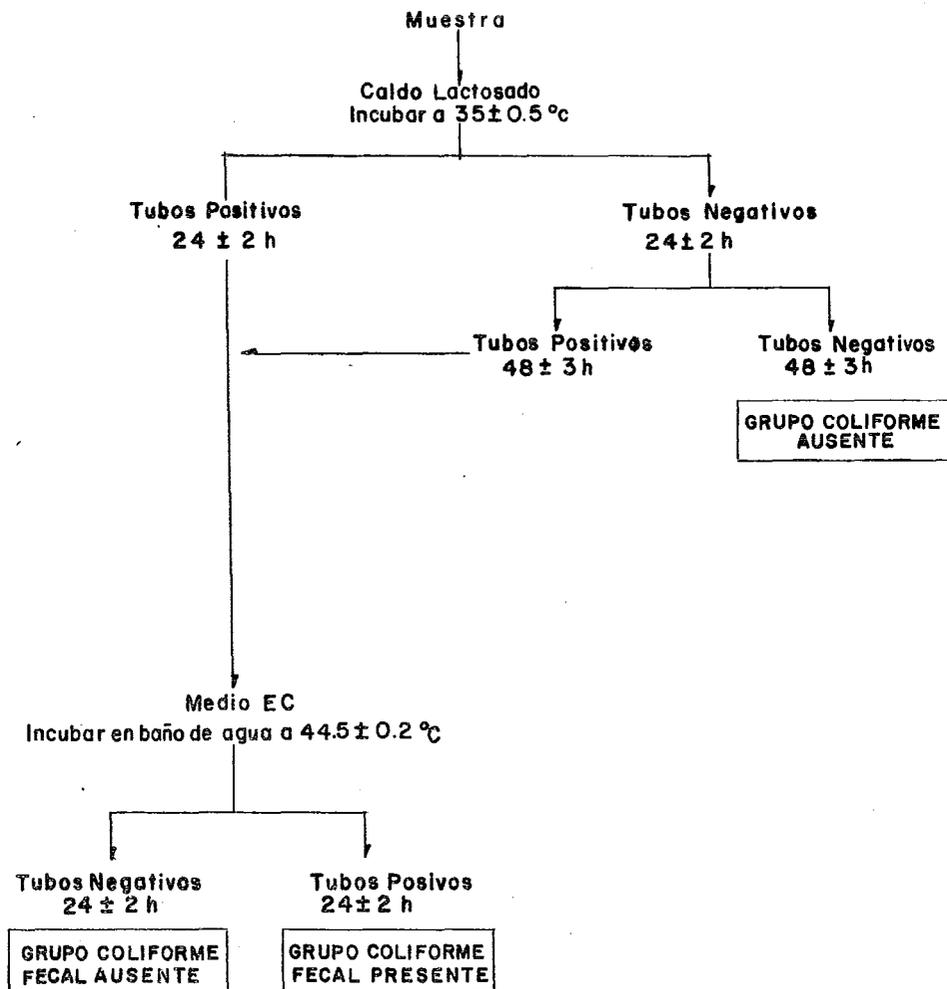
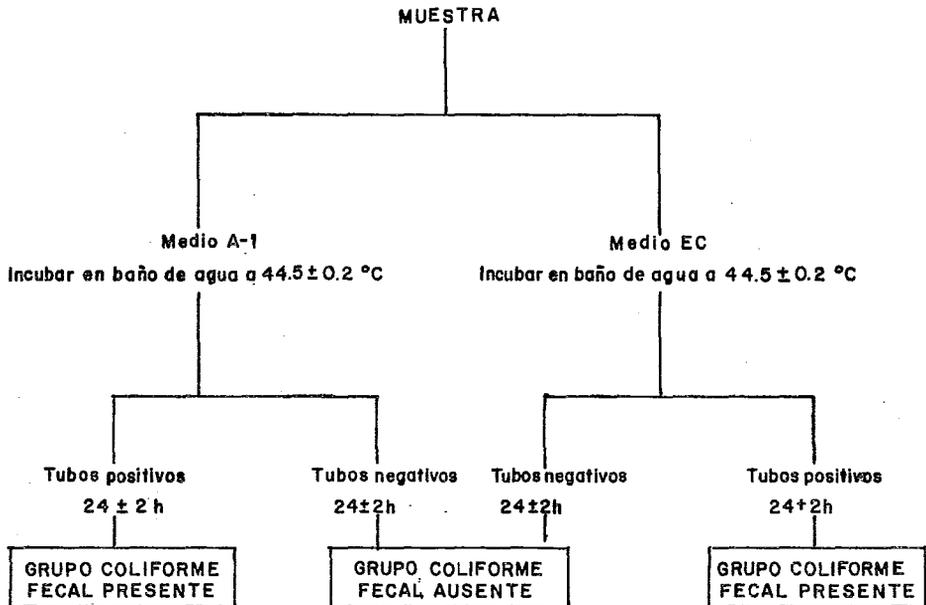


Fig. Núm. 3

Marcha de la deteterminación de coliformes fecales
Prueba A-1 y EC directo



IV. RESULTADOS (1a. PARTE): ANALISIS BACTERIOLOGICOS

TABLA Núm.1

Resultados del número más probable (NMP) obtenidos en las muestras analizadas siguiendo el método tradicional, A-1 y EC directo

Muestra número	Método tradicional	A- 1	EC directo
1	2.2×10^3	17×10^3	0.2×10^3
2	0.7×10^3	17×10^3	0.7×10^3
3	0.5×10^3	17×10^3	0.2×10^3
4	1.3×10^3	14×10^3	1.3×10^3
5	1.3×10^3	7×10^3	0.2×10^3
6	2.3×10^3	9.4×10^3	2.3×10^3
7	7×10^3	7×10^3	7×10^3
8	35×10^3	7×10^3	7.9×10^3
9	11×10^3	4.9×10^3	7.9×10^3
10	35×10^3	13×10^3	13×10^3
11	11×10^3	17×10^3	24×10^3
12	35×10^3	24×10^3	4.9×10^3
13	20×10^3	40×10^3	20×10^3
14	20×10^3	20×10^3	20×10^3
15	16×10^4	24×10^4	24×10^4
16	16×10^4	24×10^4	24×10^4
17	16×10^4	24×10^4	24×10^4
18	35×10^3	24×10^4	24×10^4
19	16×10^4	24×10^4	24×10^4
20	92×10^3	24×10^4	24×10^4
21	49×10^7	20×10^6	20×10^6

Muestra número	Método tradicional	A - 1	EC directo
22	17×10^7	60×10^6	20×10^6
23	26×10^7	20×10^6	20×10^6
24	17×10^7	27×10^7	70×10^6
25	26×10^7	17×10^7	70×10^6
26	13×10^8	54×10^8	24×10^9
27	28×10^8	35×10^8	22×10^8
28	92×10^8	35×10^8	54×10^8
29	28×10^8	54×10^8	13×10^8
30	28×10^3	92×10^3	35×10^3
31	92×10^3	92×10^3	54×10^3
32	17×10^3	22×10^3	17×10^3
33	35×10^3	54×10^3	13×10^3
34	22×10^3	17×10^3	22×10^3
35	54×10^3	28×10^3	13×10^3
36	11×10^3	54×10^3	16×10^4
37	1.7×10^3	4.6×10^3	2.6×10^3
38	2.9×10^3	2.7×10^3	2.3×10^3
39	3.3×10^3	4.9×10^3	3.3×10^3
40	2.2×10^3	7.9×10^3	3.3×10^3
41	0.9×10^3	3.3×10^3	3.3×10^3
42	0.6×10^3	4.9×10^3	2.3×10^3
43	1.1×10^3	4.6×10^3	4.9×10^3

Muestra número	Método tradicional	A-1	EC directo
44	7.9×10^3	7.9×10^3	2.3×10^3
45	0.8×10^3	1.3×10^3	2.2×10^3
46	0.7×10^3	0.5×10^3	0.2×10^3
47	0.2×10^3	1.3×10^3	1.7×10^3
48	22×10^3	3.3×10^3	4.9×10^3
49	6.3×10^3	17×10^3	3.3×10^3
50	13×10^3	7.9×10^3	3.3×10^3
51	13×10^3	4.9×10^3	3.3×10^3
52	2.2×10^3	2.1×10^3	2.3×10^3
53	3.3×10^3	3.3×10^3	7×10^3
54	3.3×10^3	2.3×10^3	0.4×10^3
55	3.3×10^3	7.9×10^3	1.7×10^3
56	4.9×10^3	7×10^3	24×10^3
57	4.9×10^3	7×10^3	17×10^3
58	13×10^3	7×10^3	2.3×10^3
59	7.9×10^3	4.9×10^3	1.4×10^3
60	2.3×10^3	9.4×10^3	2.2×10^3
61	2.3×10^3	3.3×10^3	0.8×10^3
62	7.9×10^3	3.3×10^3	2.3×10^3
63	7×10^3	1.7×10^3	0.5×10^3
64	2.3×10^3	1.7×10^3	1.7×10^3
65	3.3×10^3	3.3×10^3	0.8×10^3

Muestra número	Método tradicional	A - 1	EC directo
66	2.2×10^3	1.1×10^3	2.3×10^3
67	2.7×10^3	2.2×10^3	2.3×10^3
68	11×10^3	6.3×10^3	7.9×10^3
69	11×10^3	17×10^3	4.9×10^3
70	2.7×10^3	22×10^3	13×10^3
71	3.5×10^3	17×10^3	11×10^3
72	2.7×10^3	17×10^3	4.9×10^3
73	4.9×10^3	13×10^3	24×10^3
74	14×10^3	7.9×10^3	17×10^3
75	13×10^3	7.9×10^3	4.9×10^3
76	13×10^3	7×10^3	4.9×10^3
77	3.4×10^3	17×10^3	3.3×10^3
78	3.5×10^3	17×10^3	24×10^3
79	35×10^3	17×10^3	24×10^3
80	11×10^3	13×10^3	7.9×10^3
81	7.9×10^3	13×10^3	6.3×10^3
82	1.7×10^3	7.9×10^3	4.9×10^3
83	4.9×10^3	7.9×10^3	4.9×10^3
84	3.3×10^3	4.9×10^3	2.3×10^3
85	17×10^3	7×10^3	4.6×10^3
86	4.9×10^3	13×10^3	7.9×10^3
87	7.9×10^3	17×10^3	13×10^3

Muestra número	Método tradicional	A-1	EC directo
88	4.9×10^3	7.9×10^3	4.9×10^3
89	24×10^3	11×10^3	24×10^3
90	54×10^3	11×10^3	7.9×10^3
91	7×10^3	11×10^3	13×10^3
92	17×10^3	7.9×10^3	7.9×10^3
93	13×10^3	13×10^3	7.9×10^3
94	22×10^3	7×10^3	13×10^3
95	22×10^3	4.9×10^3	11×10^3
96	35×10^3	22×10^3	54×10^3
97	13×10^3	35×10^3	3.3×10^3
98	24×10^3	11×10^3	7.9×10^3
99	1.7×10^3	1.7×10^3	1.7×10^3
100	1.4×10^3	3.3×10^3	0.7×10^3
101	7×10^3	4.6×10^3	2.3×10^3
102	1.3×10^3	3.3×10^3	1.3×10^3
103	1.3×10^3	3.3×10^3	2.2×10^3
104	0.8×10^3	1.7×10^3	0.2×10^3
105	0.5×10^3	1.7×10^3	4.9×10^3
106	1.7×10^3	0.5×10^3	0.7×10^3
107	1.3×10^3	0.8×10^3	0.8×10^3
108	3.3×10^3	3.3×10^3	4.9×10^3
109	13×10^3	2.3×10^3	3.3×10^3

Muestra número	Método tradicional	A - .1	EC directo
110	7.9×10^3	7.9×10^3	3.3×10^3
111	3.3×10^3	3.3×10^3	2.3×10^3
112	17×10^3	4.9×10^3	3.3×10^3
113	2.6×10^3	7.9×10^3	3.3×10^3
114	2.3×10^3	7.9×10^3	7.9×10^3
115	3.3×10^3	4.9×10^3	7.9×10^3
116	3.3×10^3	4.6×10^3	1.7×10^3
117	13×10^3	7×10^3	4.9×10^3
118	1.7×10^3	4.9×10^3	2.2×10^3
119	4.9×10^3	7×10^3	4.9×10^3
120	3.3×10^3	7×10^3	11×10^3
121	7.9×10^3	7.9×10^3	2.3×10^3
122	0.8×10^3	1.4×10^3	2.3×10^3
123	1.7×10^3	2.3×10^3	1.3×10^3
124	0.8×10^3	3.3×10^3	1.7×10^3
125	1.4×10^3	1.3×10^3	2.2×10^3

V. RESULTADOS (2a. PARTE): ANALISIS ESTADISTICO

V. ANALISIS ESTADISTICO

Este análisis se planea para probar la hipótesis de que "no hay diferencia significativa entre los tres métodos".

Los valores del número más probable (NMP) se pasan a logaritmos con objeto de facilitar el manejo de los datos (tabla Núm. 2).

El trabajo estadístico efectuado en este estudio fue un análisis de varianza para una variable de clasificación simple.

Las operaciones matemáticas son las siguientes:

a) Suma de cuadrado de columnas (SCc)

Fórmula

$$SCc = \sum \frac{T_i^2}{n_i} - \frac{T_{tt}^2}{n}$$

$$\begin{aligned} \sum \frac{T_i^2}{n_i} &= \frac{(517.424)^2}{125} + \frac{(530.901)^2}{125} + \frac{(505.466)^2}{125} \\ &= \frac{267\,727.595}{125} + \frac{281\,855.871}{125} + \frac{255\,495.877}{125} \\ &= 2\,141.820 + 2\,254.846 + 2\,043.967 \end{aligned}$$

$$\sum \frac{T_i^2}{n_i} = 6\,440.633$$

$$\frac{T_{tt}^2}{n} = \frac{(1\,553.791)^2}{375} = \frac{2\,414\,266.471}{375}$$

$$\frac{T_{tt}^2}{n} = 6\,438.043$$

$$SCc = 6\,440.633 - 6\,438.043$$

$$SCc = 2.59$$

b) Suma cuadrado total (SCT)

Fórmula

$$SCT = \sum n_i^2 - \frac{T_{tt}^2}{n}$$

b) Suma cuadrado total (SCT)

Fórmula

$$SCT = \sum n_i^2 - \frac{T_{tt}^2}{n}$$

$$= 7\,175.225 - 6\,438.043$$

$$SCT = 737.182$$

c) Suma de cuadrados del error (SCE)

Fórmula

$$SCE = SCT - SCc$$

$$= 737.182 - 2.59$$

$$SCE = 734.592$$

d) Los valores de los cálculos de suma de cuadrados, grados de libertad, cuadrado medio, F experimental y F de tablas, se muestran en la tabla Núm. 4.

Resultados del análisis de varianza

Tenemos:

Ho = Hipótesis

MT = Método Tradicional

A-1 = Medio A-1

EC = Medio EC directo

Ho = MT = A-1 = EC

F experimental = 0.656

F de tablas = 4.61

Como la F experimental es menor que la F de tablas para un nivel de confianza de 99 %, se acepta la hipótesis de que no hay diferencia significativa

DATOS DE NMP EXPRESADOS EN LOGARITMOS

Muestra número	Método Tradicional (MT)	A - 1	EC directo
1	3.342	4.230	2.301
2	2.845	4.230	2.845
3	2.698	4.230	2.301
4	3.113	4.146	3.113
5	3.113	3.845	2.301
6	3.361	3.973	3.361
7	3.845	3.845	3.845
8	4.544	3.845	3.897
9	4.041	3.690	3.897
10	4.544	4.113	4.113
11	4.041	4.230	4.380
12	4.544	4.380	3.690
13	4.301	4.602	4.301
14	4.301	4.301	4.301
15	5.204	5.380	5.380
16	5.204	5.380	5.380
17	5.204	5.380	5.380
18	4.544	5.380	5.380
19	5.204	5.380	5.380
20	4.963	5.380	5.380
21	8.690	7.301	7.301
22	8.230	7.778	7.301

23	8.414	7.301	7.301
24	8.230	8.431	7.845
25	8.414	8.230	7.845
26	9.113	9.732	10.380
27	9.447	9,544	9.342
28	9.963	9.544	9.732
29	9.447	9.732	9.113
30	4.447	4.963	4.544
31	4.963	4.963	4.732
32	4.230	4.342	4.230
33	4.544	4.732	4.113
34	4.342	4.230	4.342
35	4.732	4.447	4.113
36	4.041	4.732	5.204
37	3.230	3.662	3.414
38	3.462	3.431	3.361
39	3.518	3.690	3.518
40	3.342	3.897	3.518
41	2.954	3.518	3.518
42	2.778	3.690	3.361
43	3.041	3.662	3.690
44	3.897	3.897	3.361
45	2.903	3.113	3.342
46	2.845	2.698	2.301

47	2.301	3.113	3.230
48	4.342	3.518	3.690
49	3.799	4.230	3.518
50	4.113	3.897	3.518
51	4.113	3.690	3.518
52	3.342	3.322	3.361
53	3.518	3.518	3.845
54	3.518	3.361	2.602
55	3.518	3.897	3.230
56	3.690	3.845	4.380
57	3.690	3.845	4.230
58	4.113	3.845	3.361
59	3.897	3.690	3.146
60	3.361	3.973	3.342
61	3.361	3.518	2.903
62	3.897	3.518	3.361
63	3.845	3.230	2.698
64	3.361	3.230	3.230
65	3.518	3.518	2.903
66	3.342	3.041	3.361
67	3.431	3.342	3.361
68	4.041	3.799	3.897
69	4.041	4.230	3.690
70	3.431	4.342	4.113
71	3.544	4.230	4.041

72	3.431	4.230	3.690
73	3.690	4.113	4.380
74	4.146	3.897	4.230
75	4.113	3.897	3.690
76	4.113	3.845	3.690
77	3.531	4.230	3.518
78	3.544	4.230	4.380
79	4.544	4.230	4.380
80	4.041	4.113	3.897
81	3.897	4.113	3.799
82	3.230	3.897	3.690
83	3.690	3.897	3.690
84	3.518	3.690	3.361
85	4.230	3.845	3.662
86	3.690	4.113	3.897
87	3.897	4.230	4.113
88	3.690	3.897	3.690
89	4.380	4.041	4.380
90	4.732	4.041	3.897
91	3.845	4.041	4.113
92	4.230	3.897	3.897
93	4.113	4.113	3.897
94	4.342	3.845	4.113
95	4.342	3.690	4.041
96	4.544	4.342	4.732

97	4.113	4.544	3.518
98	4.380	4.041	3.897
99	3.230	3.230	3.230
100	3.146	3.518	2.845
101	3.845	3.662	3.361
102	3.113	3.518	3.113
103	3.113	3.518	3.342
104	2.903	3.230	2.301
105	2.698	3.230	3.690
106	3.230	2.698	2.845
107	3.113	2.903	2.903
108	3.518	3.518	3.690
109	4.113	3.361	3.518
110	3.897	3.897	3.518
111	3.518	3.518	3.361
112	4.230	3.690	3.518
113	3.414	3.897	3.518
114	3.361	3.897	3.897
115	3.518	3.690	3.897
116	3.518	3.662	3.230
117	4.113	3.845	3.690
118	3.230	3.690	3.342
119	3.690	3.845	3.690

120	3.518	3.845	4.041
121	3.897	3.897	3.361
122	2.903	3.146	3.361
123	3.230	3.361	3.113
124	2.903	3.518	3.230
125	<u>3.146</u>	<u>3.113</u>	<u>3.342</u>
	517.424	530.901	505.466

$$\sum MT, AI, EC = 1\ 553.791$$

1 553.791

CUADRADO DE LOS LOGARITMOS DE NMP Y SUS TOTALES

Muestra número	Método Tradicional (log NMP) ²	A - 1 (log NMP) ²	EC directo (Log NMP) ²
1	11.169	17.893	5.295
2	8.094	17.893	8.094
3	7.279	17.893	5.295
4	9.691	17.189	9.691
5	9.691	14.784	5.295
6	11.296	15.785	11.296
7	14.784	14.784	14.784
8	20.648	14.784	15.187
9	16.330	13.616	15.187
10	20.648	16.917	16.917
11	16.330	17.893	19.184
12	20.648	19.184	13.616
13	18.499	21.178	18.499
14	18.499	18.499	18.499
15	27.082	28.944	28.944
16	27.082	28.944	28.944
17	27.082	28.944	28.944
18	20.648	28.944	28.944
19	27.082	28.944	28.944
20	24.631	28.944	28.944
21	75.516	53.305	53.305
22	67.733	60.497	53.305

23	70.795	53.305	53.305
24	67.733	71.082	61.544
25	70.795	67.733	61.544
26	83.047	94.712	107.744
27	89.246	91.088	87.273
28	99.261	91.088	94.712
29	89.246	94.712	83.047
30	19.776	24.631	20.648
31	24.631	24.631	22.392
32	17.893	18.853	17.893
33	20.648	22.392	16.917
34	18.853	17.893	18.853
35	22.392	19.776	16.917
36	16.330	22.392	27.082
37	10.433	13.410	11.655
38	11.985	11.772	11.296
39	12.376	13.616	12.376
40	11.169	15.187	12.376
41	8.726	12.376	12.376
42	7.717	13.616	11.296
43	9.248	13.410	13.616
44	15.187	15.187	11.296
45	8.427	9.691	11.169
46	8.094	7.279	5.295

47	5.295	9.691	10.433
48	18.853	12.376	13.616
49	14.432	17.893	12.376
50	16.917	15.187	12.376
51	16.917	13.616	12.376
52	11.169	11.036	11.296
53	12.376	12.376	14.784
54	12.376	11.296	6.770
55	12.376	15.187	10.433
56	13.616	14.784	19.184
57	13.616	14.784	17.893
58	16.917	14.784	11.296
59	15.187	13.616	9.897
60	11.296	15.785	11.169
61	11.296	12.376	8.427
62	15.187	12.376	11.296
63	14.784	10.433	7.279
64	11.296	10.433	10.433
65	12.376	12.376	8.427
66	11.169	9.248	11.296
67	11.772	11.169	11.296
68	16.330	14.432	15.187
69	16.330	17.893	13.616
70	11.772	18.853	16.917

71	12.560	17.893	16.330
72	11.772	17.893	13.616
73	13.616	16.917	19.184
74	17.189	15.187	17.893
75	16.917	15.187	13.616
76	16.917	14.784	13.616
77	12.468	17.893	12.376
78	12.560	17.893	19.184
79	12.560	17.893	19.184
80	16.330	16.917	15.187
81	15.187	16.917	14.432
82	10.433	15.187	13.616
83	13.616	15.187	13.616
84	12.376	13.616	11.296
85	17.893	14.784	13.410
86	13.616	16.917	15.187
87	15.187	17.893	16.917
88	13.616	15.187	13.616
89	19.184	16.330	19.184
90	22.392	16.330	15.187
91	14.784	16.330	16.917
92	17.893	15.187	15.187
93	16.917	16.917	15.187
94	18.853	14.784	16.917
95	18.853	13.616	16.330

96	20.648	18.853	22.392
97	16.917	20.648	12.376
98	19.184	16.330	15.187
99	10.433	10.433	10.433
100	9.897	12.376	8.094
101	14.784	13.410	11.296
102	9.691	12.376	9.691
103	9.691	12.376	11.169
104	8.427	10.433	5.295
105	7.279	10.433	13.616
106	10.433	7.279	8.094
107	9.691	8.427	8.427
108	12.376	12.376	13.616
109	16.917	11.296	12.376
110	15.187	15.187	12.376
111	12.376	12.376	11.296
112	17.893	13.616	12.376
113	11.655	15.187	12.376
114	11.296	15.187	15.187
115	12.376	13.616	15.187
116	12.376	13.410	10.433
117	16.917	14.784	13.616
118	10.433	13.616	11.169
119	13.616	14.784	13.616
120	12.376	14.784	16.330

121	15.187	15.187	11.296
122	8.427	9.897	11.296
123	10.433	11.296	9.691
124	8.427	12.376	10.433
125	9.897	9.691	11.169

$$\sum n_i^2 = \frac{2\,397.054}{\quad} + \frac{2\,483.269}{\quad} + \frac{2\,294.902}{\quad}$$
$$\sum n_i^2 = 7\,175.225$$

ANALISIS DE VARIANZA
Tabla Núm.4

Fuente	GL	SC	CM	F exp.	99 % N.C. F de tabla
Columna	2	2.59	1.295	0.656	4.61
Error	372	734.592	1.974		
Total	374	737.182	1.971		

VI. COMPARACION DE COSTOS

VI. COMPARACION DE COSTOS

En esta comparación únicamente se considera el costo de medios, no se incluye equipo ni material de vidrio.

En el caso del medio A-1 como no se encuentra en forma deshidratada, se obtuvo el costo total a partir de sus componentes.

El precio por gramo del caldo lactosado, EC y componentes del A-1 son de fecha 3 de enero de 1980.

Los cálculos y resultados obtenidos se observan en las tablas Núm. 5 y Núm. 6 respectivamente.

Tabla Núm.5 Cálculos realizados para obtener el costo/muestra en el Método A-1, tradicional y EC directo

Método A-1	Sustancia o Medio	g o ml/1000 ml H ₂ O	g o ml/150 ml A-1	\$/g *	\$/muestra
	Lactosa	5	0.75	0.322	0.241
	Triptona	20	3	0.99	2.97
	Cloruro de sodio	5	0.75	0.22	0.165
	Salicina	0.5	0.075	30.8	2.31
	Triton x-100	1	0.15	0.464	<u>0.069</u>
				TOTAL	5.75
Método Tradicional					
	Caldo lactosado	13	1.95	1.511	2.946
	Medio EC	37	5.55	1.533	<u>8.51</u>
				TOTAL	11.45
Método EC directo					
	EC	37	5.55	1.533	<u>8.51</u>
				TOTAL	8.51

* Estos precios son de fecha 3/1/1980.

Tabla Núm.6 Comparación del costo/ muestra
entre el método A-1, tradicional y EC directo.

M E T O D O	\$/ MUESTRA
A - 1	5.75
Tradicional	11.45
EC directo	8.51

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

VII CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A. CONCLUSIONES

1°.- En base a los resultados obtenidos en el análisis estadístico de que no existe diferencia significativa entre el método rápido A-1, el EC directo y el método tradicional, se concluye que existe la posibilidad, con una confiabilidad de 99%, de utilizar indistintamente cualquiera de los tres métodos estudiados para la determinación de coliformes fecales, siempre y cuando los análisis se realicen en aguas que presenten características similares a las muestras analizadas, es decir para "aguas dulces" y con un grado de contaminación alto.*

2°.- De los tres métodos empleados, el método rápido A-1 y el EC directo presentan mayor ventaja con respecto al tradicional en relación al tiempo que se emplea en el análisis pues los dos primeros pueden proporcionar resultados en 24 horas mientras que el método tradicional requiere de 72 horas.

3°.- En relación al costo del análisis por muestra es más económico el método rápido A-1 ya que el costo por muestra del análisis es de \$5.75 con respecto a los costos de los métodos tradicional y EC directo que son de \$11.45 y \$8.51 por muestra respectivamente.

* Se considera alto grado de contaminación una densidad de coliformes fecales del orden de $10^3/100$ ml de muestra.

4°- Por último, puesto que no existe diferencia significativa entre el método rápido A-1, el método EC directo y el método tradicional y comparando las ventajas que presentan entre ellos se puede concluir - que por tiempo y costo es más conveniente utilizar el método rápido A-1 para la determinación de coliformes fecales en muestras de agua dulce y con un elevado grado de contaminación.

B. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar una serie de estudios semejantes a éste, con aguas de otras características, con el objeto de contar con un método rápido, económico y de mayor aplicación, de tal forma que en un futuro pueda aceptarse oficialmente como un método estándar.

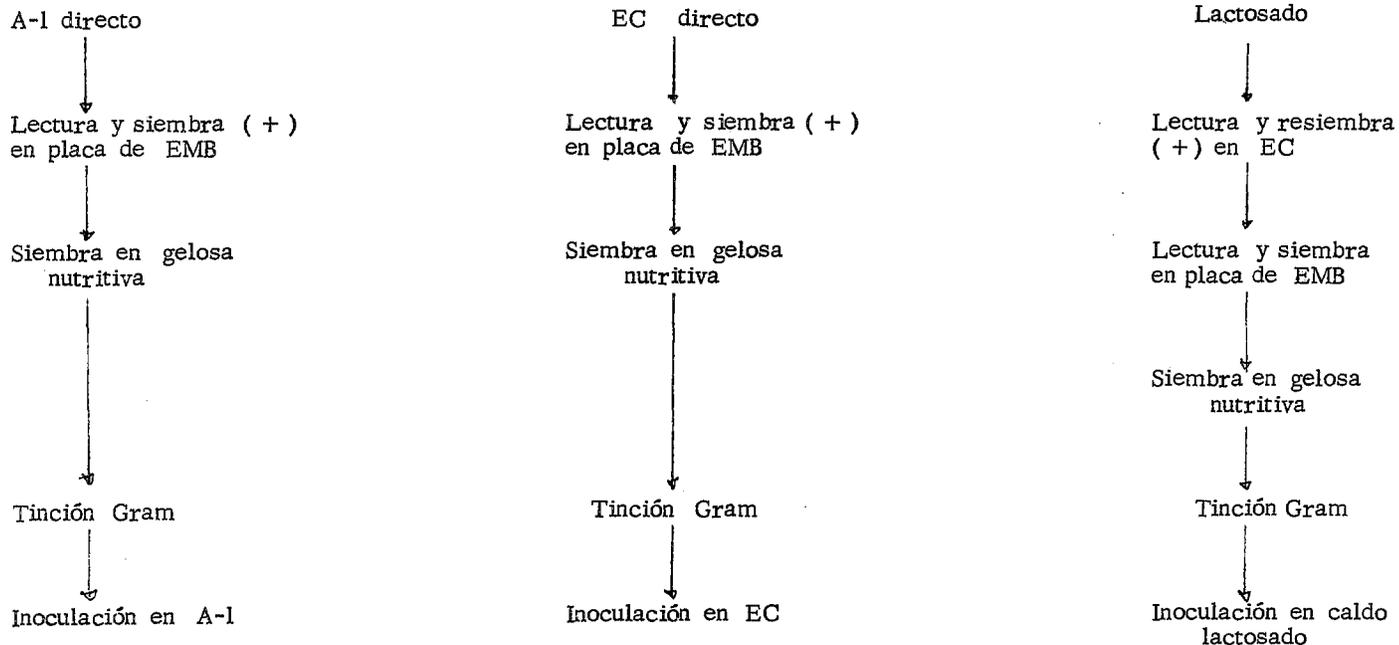
VIII. ANEXO

VIII ANEXO

Antes de hacer la comparación de los tres métodos (A-1, EC directo y Método Tradicional) se hizo la prueba completa de una muestra para - comprobar si lo que se estaba analizando eran realmente coliformes feca les y de esta forma aislar una cepa pura con la cual se volvió a resembrar en los medios A-1, EC, lactosado y ver si existían variaciones. Se anexan cuadros de procedimiento y resultados.

CUADRO DE PROCEDIMIENTO PARA AISLAR UNA CEPA PURA

M U E S T R A



CUADRO DE RESULTADOS OBTENIDOS AL INOCULAR
UNA CEPA DE COLIFORMES FECALES EN A-1, EC
DIRECTO Y METODO TRADICIONAL

Cepa	Caldo lactosado	EC	A- 1	EC directo
Tradicional (Lact-EC)	10	10	10	10
A-1	5	5	5	5
EC	5	5	5	5

IX. BIBLIOGRAFIA

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Amos, J.R., Brown, F.L. Mink, O.G.(1969) *Introducción a la Estadística*
New York. Harper & Row, Publ.
2. Andrews, W.H., Diggs, C.D. y Wilson C.R (1975) Evaluation of a Medium
for the Rapid Recovery of Escherichia coli from Shellfish. *Applied
Microbiology* 29 (1): 30 - 31.
3. Andrews, W.H. y Presnell, M. W. (1972) Rapid Recovery of Escherichia -
coli from Estuarine Water. *Applied Microbiology*. 23 (3):521-523
4. APHA, AWWA, WPCF, (1976) *Standard Methods for the Examination of Water
and Wastewater*. (14 th. ed.) Washington, D. C.: Joint Editorial Board
5. Brook, T.D., (1978). *Biología de los Microorganismos* (2a. Ed.) Barcelona:
Omega.
6. Dixon W.J. y Massey F.J., Jr.(1969) *Introduction to Statical Analysis*. (3 th.ed.)
Tokyo: Mc Graw-Hill, Inc.
7. Edwards, P.R. y Ewing W. (1972) *Identification of Enterobacteriaceae*
(3 th.ed.) Atlanta, Georgia; Burgess Publishing Company.
8. Frazier, W.C. (1976) *Microbiología de los Alimentos*. (2a. ed.) Barcelona:
Acribia.
9. Frobisher, M., Hinsdill, R., Crabtree, K. y Goodheart C., (1974)
Fundamentals of Microbiology. (9 th. ed.) Filadelfia, Londres,
Toronto: W.B. Saunders Company.

10. Galvan, M., Leal, P., Robles, E. y Ramírez P. - Comparación del Método Tradicional para la Determinación de Coliformes Fecales con el Método Rápido A-1, Presentado en el Primer Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Sociedad Mexicana de Ingeniería Sanitaria, S.C. - Guadalajara, Jal., Dic.(1978).
11. Guinea, J. Sancho, J. y París R.(1979) Análisis Microbiológico de Aguas. Barcelona: Omega.
12. Hunt, D.A. y Springer, J. Preliminary Report of Total Coliform and Fecal Coliform Values in Shellfish Growing Area Waters and a Proposal for a Fecal Coliforms Growing Area Standard. Proceeding of Eighth National Shellfish Sanitation Workshop. Food and Drug Administration. No. 75 - 2025, p. 97-104.(1974).
13. Meyell, G.G. y Meynell E.(1969).Bacteriología Experimental, Barcelona: Omega.
14. Miescier, J.J. Car. V.E., Musselman, J.F., y Furfari, S.A. Collaborative Evaluation of Fecal Coliform Methods for the Examination of Sea Water: Split Sample Analysis. Presented at the Microbiology Task Force Meeting, 10 th National Shellfish Sanitation Workshop, Hunt Valley, Maryland, June 28,(1977).
15. Pelczar, M.J. y Reid, R.D.(1966).Microbiología (2a. ed.) New York : Mc Graw-Hill, Inc.

16. SARH. Manual de Microbiología del Agua Vol. I y II(1979) Para consultar acudir a la biblioteca del Centro de Investigación y Entrenamiento para el Control de la Calidad del Agua. Av. San Bernabé Núm. 549, San Jerónimo Lídice, México 20,D.F.

17. SARH. Manual de Análisis de Aguas y Aguas de Desecho, Vol. III, (1979)- (4a. ed.). Para consultar acudir a la biblioteca del Centro de Investigación y Entrenamiento para el Control de la Calidad del Agua.- Av. San Bernabé Núm. 549, San Jerónimo Lídice, México 20, D.F.