

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

"ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS METODOS DE FILTROS
DE MEMBRANA Y TUBOS DE FERMENTACION PARA
DETERMINAR LA INCIDENCIA DE BACTERIAS
COLIFORMES EN EL AGUA"

173

TESIS MANCOMUNADA

Que para obtener el título de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a n

ENRIQUETA GARCIA CRUZ
GRACIELA MERCADO CALDERON

México, D. F.

1976



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.

LAB POSU

AGE 1976

FRONT 141

REAR 141

176



CON CARIÑO A MIS PADRES
RAUL Y CONSUELO
COMO RESPUESTA A SUS DEBUELOS Y
SACRIFICIOS

A MIS HERMANOS
RAUL, PATRICIA, GEORGINA,
MARTIN ALFREDO, VICTOR HUGO
Y GABRIEL.

A MIS ABUELOS Y
TIOS

A LA FAMILIA
GALVEZ CALDERON
POR SU APOYO AL
INICIO DE MI CARRERA

PARA TI MIGUEL

CON CARÍÑO

Jurado asignado originalmente - según el tema.

PRESIDENTE: Profa. Sara Manrique Regil

V O C A L : Prof. Oscar Amor Dodero

SECRETARIO: Prof. Ramón Guevara Estrada

1er. SUPLENTE: Profa. Dea Coronado P.

2do. SUPLENTE: Prof. Miguel J. Montiel

Sitio donde se desarrolló el tema.

Laboratorio de la Dirección General de Aguas y Saneamiento del Departamento - del Distrito Federal.

Nombre completo y firma de los sustentantes.

Enriqueta García Cruz _____
Graciela Mercado Calderón _____

Nombre completo y firma del asesor del tema.

Oscar Amor Dodero _____

Nombre completo y firma del supervisor técnico.

Q. Magdalena Pérez
Duarte de Díaz. _____

CON AGRADECIMIENTO A LA SEÑORA
Q. ROSALENA PEREZ FUENTE DE DIAZ
POR SU VALIOSA AYUDA EN LA REALI-
ZACION Y REVISION DE ESTE TRABAJO.

A LA SEÑORA Q.F.B.
PATRICIA JIMENEZ DE V.
POR SU DESINTERECADA AYUDA

A MIS MAESTROS CON GRATITUD.
DE UNA MANERA ESPECIAL AL PFR.
Q.F.B. OSCAR AMOR DODERO
POR SU VALIOSA ASESORIA

A MIS COMPAÑEROS DE ESTUDIO

AL PERSONAL DEL LABORATORIO
DE LA DIRECCION DE AGUAS Y-
SANEAMIENTO CON AFECTO Y
GRATITUD.

"ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS METODOS DE FILTROS DE MEMBRANA Y TUBOS DE FERMENTACION PARA DETERMINAR LA INCIDENCIA DE BACTERIAS COLIFORMES EN EL AGUA"

CAPITULOS.

- I. Introducción
- II. Indicadores bacteriológicos de contaminación del agua.
 - 2.1 Definición
 - 2.2 Propiedades de un indicador bacteriológico - "ideal" de contaminación.
 - 2.3 Razones para elegir el índice de coliformes como índice de contaminación.
 - 2.4 Diferenciación entre coliformes fecales y no fecales.
- III. Antecedentes históricos del análisis bacteriológico del agua.
- IV. Normas de calidad de agua potable.
- V. Material y métodos.
 - 5.1 Recolección y transporte de muestras para el examen bacteriológico del agua.
 - 5.2 Método de los tubos de fermentación.
 - a) Equipo
 - b) Medios de cultivo
 - c) Pruebas: presuntiva, confirmativa y completa.
 - 5.3 Método de los filtros de membrana.
 - a) Equipo
 - b) Medio de cultivo
 - c) Técnica
- VI. Resultados
- VII. Comparación entre ambos métodos.
- VIII. Conclusiones.
- IX. Bibliografía

I

I N T R O D U C C I O N

Dada la gran importancia que para los seres vivos representa el agua, como vehículo de transmisión de enfermedades infecciosas, creímos de interés hacer un estudio teórico y práctico de dos métodos que se utilizan actualmente en bacteriología para el análisis de la misma, estos son:

a) Método de los tubos de fermentación, el cual ha sido el procedimiento común que se ha venido aplicando por varias décadas.

b) Método a base de filtros de membrana recientemente llevado a la práctica y que ofrece nuevas perspectivas para el control sanitario del agua.

Este estudio tiene por objeto valorizar los resultados y definir cual sería el procedimiento de mayor utilidad, confiabilidad y rapidez.

II

Indicadores bacteriológicos de contaminación del agua.

2.1 Definición.

Un indicador bacteriano de contaminación es cualquier organismo que por su sola presencia podría demostrar que - ha ocurrido una contaminación y generalmente sugerir la - fuente de la misma.

En un sentido más estricto, los indicadores bacterianos de contaminación están asociados primariamente con la demostración de que la contaminación del agua ha sido originada por las excretas de animales de sangre caliente (incluyendo al hombre, animales salvajes y domésticos, aves, etc.) (4)

2.2 Propiedades de un indicador bacteriológico "ideal" de contaminación.

Un indicador bacteriológico ideal de contaminación de be reunir los siguientes parámetros:

- 1) Ser aplicable en todos los tipos de agua.
- 2) Siempre estar presente en el agua cuando existan - bacterias patógenas de origen intestinal. Esto incluye los siguientes puntos:
 - a) Su concentración debe tener una relación directa - al grado de contaminación fecal.
 - b) Deben tener una supervivencia mayor en este medio - que las bacterias patógenas entéricas.
 - c) Deberán desaparecer rápidamente del agua, con la - subsiguiente desaparición de bacterias patógenas a través - de su curso natural o por métodos efectuados por el hombre.
 - d) Siempre deberán estar ausentes en un agua de cali - dad sanitaria aceptable.

3) Contribuir por si mismos a la realización de pruebas cuantitativas sin la interferencia o confusión de resultados debida a bacterias extrañas.

4) Ser inocuos al hombre y otros animales.

Como estos parámetros están sujetos a diversas limitaciones se podría decir que no existe un indicador "ideal" de contaminación bacteriológica. (4)

2.3 Razones para elegir el índice de coliformes como índice de contaminación.

1a La ausencia de estas bacterias es una evidencia de que el agua es bacteriológicamente pura.

2a La concentración de coliformes es directamente proporcional a la cantidad de contaminación de origen fecal.

3a Si las bacterias patógenas de origen intestinal están presentes, también existen las bacterias coliformes en un número muy superior a las primeras.

4a Las bacterias coliformes se encuentran en el intestino del hombre y otros animales de sangre caliente, -- siendo eliminadas en grandes cantidades en las heces.

5a Son más persistentes en el medio acuático que las bacterias patógenas de origen intestinal.

6a Generalmente son inocuas al hombre y pueden ser determinadas cuantitativamente en el laboratorio.

Limitaciones.-

i) Algunos de los constituyentes del grupo coliforme tienen una amplia distribución ecológica en adición a su frecuencia en el intestino.

ii) Las pruebas para grupos coliformes están sujetas a interferencias, debido a: otros tipos de bacterias y otros microorganismos. (4)

2.4 Diferenciación entre coliformes fecales y no fecales.

Las pruebas de diferenciación entre coliformes fecales y no fecales se basan en la suposición de que Escherichia coli y especies estrechamente relacionadas son de naturaleza fecal, mientras que Enterobacter aerogenes y especies cercanas no se consideran de origen fecal directo.

Se han empleado muchas pruebas para separar a E. coli y especies cercanas del resto de las bacterias coliformes: Enterobacter aerogenes, Citrobacter freundii, Citrobacter intermedius y Klebsiella sp. las cuales pueden estar presentes en el agua en ausencia de contaminación fecal. (2)

Esta diferenciación es discutible ya que de hecho se considera un agua potencialmente peligrosa cuando existen grandes cantidades microorganismos coliformes, ya sean del género Escherichia, Enterobacter o intermediarios. (4,11)

La prueba que utiliza un medio específico para coliformes fecales (medio EC) desarrollada por Perry y Hajna es el método recomendado actualmente para la diferenciación de coliformes fecales y no fecales, que se basa en la evidencia de que E. coli y otros coliformes de origen fecal, son capaces de desarrollarse y fermentar los carbohidratos a temperaturas superiores que la temperatura normal del cuerpo, mientras que coliformes de origen no fecal, no se desarrollan a temperaturas superiores a 37°C.

Esta prueba da una excelente correlación con aquellas muestras de origen fecal conocido o muy probable y resulta dos muy similares a los obtenidos en las pruebas bioquímicas conocidas como IMViC. (4)

COMPARACION ENTRE ESPECIES COLIFORMES AISLADAS DE EXCRETAS DE ORIGEN ANIMAL, SUELOS NO CONTAMINADOS Y SUELOS CONTAMINADOS UTILIZANDO LAS PRUEBAS DEL IMVIC Y LA PRUEBA DE EC.

PRUEBA	EXCRETAS DE ORIGEN ANIMAL	SUELO NO CONTAMINADO	SUELO CON-VEGETACION TAMINADO	VEGETACION
Indol	94.0%	19.4%	82.7%	52.0%
Rojo de metilo	93.3%	75.6%	97.9%	63.6%
Voges Proskauer	5.1%	40.7%	97.3%	53.6%
Utilización de citrato	3.6%	88.2%	19.2%	85.1%
Medio EC	96.4%	9.2%	82.9%	14.1%
Cultivos estudiados	8 747	2 348	665	1 203

Las ventajas que presenta esta prueba diferencial son las siguientes:

a) Aproximadamente el 95% de las bacterias coliformes de origen fecal se pueden desarrollar a temperaturas elevadas.

b) Estos organismos son poco frecuentes en el agua,-- excepto cuando están asociados con una contaminación fecal.

c) La supervivencia de coliformes fecales en el medio acuático es menor que la del grupo coliforme total, por lo cual, un número elevado de coliformes fecales es un indicio de una contaminación reciente en el agua.

d) Los coliformes fecales generalmente no se reproducen fuera de su habitat normal, a excepción de ciertos residuos industriales con un elevado contenido de carbohidratos.

Limitaciones.-

i) Existe un número relativamente pequeño en las heces de origen animal de algunas variedades de E. coli que no dan positiva la prueba.

ii) No hay una correlación numérica establecida entre la relación coliformes totales/coliformes fecales en la interpretación de la calidad sanitaria del agua.

La prueba para coliformes fecales, es aplicable a estudios de investigación en la contaminación de ríos, aguas de residuos industriales, aguas negras tratadas, aguas para baños públicos y aguas de mar.

Este método no se recomienda como un sustituto para la prueba de bacterias coliformes en el examen de aguas potables, ya que ninguna bacteria coliforme de cualquier género debe ser tolerada en un agua que ha sido sometida a un tratamiento de purificación. (4)

III

Antecedentes históricos del análisis bacteriológico del agua.

Escherichia coli, es la especie bacteriana más constante en el intestino de hombres y animales, forma parte de la flora normal de estos. Tiene dentro de sus principales funciones en el organismo: suprimir el crecimiento de ciertos microorganismos proteolíticos, presentes en el intestino e intervenir en la síntesis de vitaminas. Ciertos tipos serológicos llegan a producir en algunas ocasiones, infecciones en el aparato genito-urinario y otros están relacionados con brotes de diarreas infantiles. (7,11)

Este microorganismo fue estudiado detalladamente por Escherich, quien logró aislarlo en 1886 de las heces de un paciente con cólera y le dió el nombre de Bacterium coli y B. lactis aerogenes; otro bacteriólogo, Migula, -- fue quien le dió el nombre de E. coli. (14)

Otro microorganismo que podría tener la misma importancia que E. coli, es Enterobacter aerogenes; aunque éste abunda mas en el suelo que en materias fecales, su presencia en el agua es un índice de contaminación superficial de la misma y se considera potencialmente peligroso.

(1,2,4,11,17)

El primero en reconocer la necesidad de hacer una estimación cuantitativa de coliformes en el agua, fué Theobald Smith, quien en 1892 hizo un proyecto para analizar el agua de los ríos Mohawk y Hudson en el estado de New York; igualmente contribuyó a ello Von Freudenreich, que en 1895 hizo el aislamiento de éstos organismos en depósitos de agua, tomando muestras de 100 ml y concluyó que estaban ausentes en aguas de gran pureza y presentes en grandes cantidades en los casos en que el agua había sido

contaminada por heces de origen animal o humano. (4,14)

Entre otras bacterias contaminantes del agua, además del grupo coliforme están: Streptococcus, Lactobacillus, Staphylococcus, Proteus, Pseudomonas y algunas bacterias-esporuladas. (4)

Se ha llegado a demostrar también la presencia de microorganismos patógenos en aguas de alcantarillado mal -- procesadas y en raras ocasiones en agua de uso común. (7)

Entre éstos los más importantes son:

Protozoarios: Endamoeba histolytica, Balantidium coli

Bacterias: Salmonella sp., Shigella sp., Escherichia coli (enteropatógena), Leptospira sp., Brucella sp., Mycobacterium sp. y Vibrio cholerae.

Virus: Virus de la hepatitis infecciosa, poliovirus, Coxsackie virus, ECHO virus (citopatógenos). (4,11)

Entre los padecimientos de origen hídrico más comunes se destacan por su importancia: el cólera, la disentería-bacilar o shigellosis, la salmonelosis, la fiebre tifoidea y la amibiasis (27%), cuyas fuentes de infección son generalmente heces y orina de personas infectadas.

Actualmente en los exámenes rutinarios del agua no se busca la presencia de microorganismos patógenos, ya -- que éstos se encuentran en un número muy pequeño en relación a las bacterias coliformes y se ha llegado a la conclusión de que en un agua de buena calidad no se debe --- aceptar la presencia de gérmenes coliformes. (1,7,13)

IV

Normas de calidad de un agua potable.

En la aplicación de los métodos seleccionados para -- realizar este estudio, se consideró primordialmente que la Dirección de Ingeniería Sanitaria en su Reglamento Federal sobre Provisión de Agua Potable, considera como agua potable, toda aquella cuya ingestión no causa efectos nocivos a la salud.

Por esta razón la Secretaría de Salubridad y Asistencia ha fijado las siguientes características que puede con tener el agua para considerarla potable desde el punto de vista bacteriológico:

Un agua potable estará libre de gérmenes patógenos -- procedentes de contaminación fecal humana y se considera - que está libre de estos organismos cuando la investigación bacteriológica da como resultado final:

a) Menos de 20 microorganismos coliformes por litro - de muestra, definiéndose como organismos del grupo coliforme, "todos aquellos bacilos no esporulados, Gram negativos, que fermentan la lactosa con formación de gas".

b) Menos de 200 colonias bacterianas por mililitro de muestra, en placas de agar incubadas a 35°C durante 24 hrs.

c) Ausencia de colonias bacterianas licuantes de la - gelatina, cromógenas o fétidas, en la siembra de un mililitro de muestra, incubadas a 20°C durante 48 hrs. (3,16)

Material y Métodos.5.1 Recolección y transporte de muestras para el examen bacteriológico del agua.

Para la recolección de las muestras se utilizan frascos de vidrio (polipropileno o borosilicato) de boca ancha, con tapón esmerilado, de 125 ml de capacidad.

A cada frasco perfectamente limpio y seco, se le adiciona 0.1 ml de tiosulfato de sodio al 10% para obtener -- una concentración final de 100 mg por litro. Este es un -- agente desclorador que se agrega a muestras de agua naturales cloradas, con el fin de neutralizar cualquier cloro residual y evitar la acción bactericida del mismo.

Se cubre la tapa de los frascos con papel aluminio y se esterilizan en horno a 170-180°C durante una hora.

Las muestras analizadas en esta investigación se recolectaron en la siguiente forma:

Se abre completamente la llave, dejando correr el agua durante 5 minutos, se destapa el frasco cuidadosamente y se llena, dejando un espacio de aire para facilitar la agitación y homogeneización de la muestra en el momento del análisis; se marca cada frasco apropiadamente.

Las muestras deben ser analizadas dentro de los términos siguientes:

No exceder de 6 horas a partir de su recolección si son aguas naturales y 12 horas si son aguas tratadas.

Para su almacenamiento la temperatura no debe ser mayor de 10°C. (1,4,9)

5.2 Método de los tubos de fermentación.

Este método para determinar la concentración total de coliformes empleando tubos múltiples de fermentación, se ha venido aplicando desde principios de siglo, como una técnica normal para el análisis bacteriológico del agua.

Este procedimiento ha sufrido a través del tiempo varias modificaciones y comprende en la actualidad tres tipos de pruebas que son:

- a) Prueba presuntiva.
- b) Prueba confirmativa.
- c) Prueba completa.

Demostrándose al hacer éstas pruebas la presencia del grupo coliforme que incluye todos los organismos aerobios y anaerobios facultativos, Gram negativos, de forma bacilar no esporulados que fermentan la lactosa con producción de gas a las 24 ó 48 horas de incubación y a una temperatura de 37°C. (1,4,11,15,17)

Equipo.

- a) Incubadora a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$
- b) Horno para esterilizar a $170-180^{\circ}\text{C}$
- c) Autoclave
- d) Tubos de ensaye de 175 x 22 mm con tubos vial de fermentación.
- e) Tubos de ensaye de 150 x 18 mm con tubos vial de fermentación.
- f) Tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- g) Pipetas bacteriológicas de 10 ml
- h) Cajas de Petri de 13 x 100 mm
- i) Baño María
- j) Portaobjetos
- k) Asa de platino ó nicromel de 3 mm de diámetro
- l) Frascos de vidrio con tapón esmerilado (de 125 - ml de capacidad).

Esterilización.

Las pipetas bacteriológicas y las cajas de Petri se esterilizan en horno a $170-180^{\circ}\text{C}$ durante una hora. Los frascos de vidrio se esterilizan bajo las mismas condiciones especificadas anteriormente en el punto 5.1. (1,4)

Medios de cultivo.

Para el análisis bacteriológico del agua por el método de tubos de fermentación, se utilizaron medios deshidratados de la marca Difco, incluyendo las pruebas presuntiva, confirmativa y completa.

Prueba presuntiva: 1) Caldo lactosado

- Prueba confirmativa: 2) Caldo lactosado-bilis-verde-brillante.
- 3) Gelosa de Endo
- 4) Gelosa Eosina-Azul de Metileno de Levine.
- Prueba completa: 5) Agar nutritivo

Caldo lactosado. Este medio se preparó a base de extracto de carne, peptona, lactosa y agua destilada.

Caldo lactosado-bilis-verde brillante. Este medio contiene peptona, lactosa, bilis de buey, colorante verde brillante y agua destilada.

Gelosa de Endo. Contiene peptona, lactosa, fosfato dipotásico, agar, sulfito de sodio, fucsina básica y agua destilada.

Levine EAM agar. Contiene peptona, lactosa, fosfato dipotásico, agar, eosina, azul de metileno, agua destilada.

Agar nutritivo. La fórmula de este medio es a base de extracto de carne, peptona, agar y agua destilada.

PRUEBA PRESUNTIVA

En esta prueba el caldo lactosado sirve como medio de enriquecimiento para los organismos coliformes que se encuentran en el agua. Dado que no existen inhibidores en este medio, puede dar lugar al desarrollo de una gran variedad de microorganismos no coliformes que fermentan la lactosa con producción de gas, como lo son ciertos microorganismos aerobios y anaerobios formadores de esporas como -- Clostridium welchii y Bacillus subtilis ó por la acción sinérgica de dos microorganismos diferentes para fermentar la lactosa con formación de gas; por lo que es necesario recurrir a la prueba confirmativa que es mas específica y asegurarse que dicha fermentación fué debida a bacterias del grupo coliforme. (4,9)

Para llevar a cabo esta prueba, se marcan e identifican los tubos de acuerdo con las claves que les correspondan a las muestras por analizar; inoculando 10 ml de muestra a cada uno de 5 tubos con 10 ml de caldo lactosado. Incubar los tubos a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 horas.

Esta prueba se considera positiva al observar la acumulación de gas en cualquier cantidad en los tubos vial invertidos, resultante de la fermentación de la lactosa y -- posteriormente se somete el cultivo a las pruebas confirmativa y completa.

Si el resultado de esta prueba es negativo, el estudio del cultivo se da por terminado y se reporta como prueba presuntiva negativa, concluyendo que el agua es bacteriológicamente potable. (1,4,18)

PRUEBA CONFIRMATIVA

Esta prueba es necesaria para comprobar que la acumulación de gas en los tubos primarios de fermentación ha sido causada por el desarrollo de organismos coliformes. El empleo de caldo lactosado-bilis-verde brillante permite el desarrollo de estos gérmenes y suprime el crecimiento de prácticamente todas las especies de bacterias no coliformes; para este objetivo el medio ha sido adicionado de ciertos agentes inhibidores como son: el colorante verde brillante, el cual posee una acción bacteriostática selectiva sobre las bacterias Gram positivas y las sales biliares que actúan como agentes tensoactivos que dañan selectivamente la membrana celular de las bacterias Gram positivas alterando su permeabilidad. (5,7,11,17)

La lactosa y los tubos vial invertidos, nos sirven para demostrar la presencia de gas, producto de la fermentación de la lactosa por bacterias coliformes.

Esta prueba se realiza, sembrando una asada del contenido de cada tubo positivo de la prueba anterior, a un tubo de caldo lactosado-bilis-verde brillante, incubándose a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 horas o en placas de Gelosa Levine EAM o gelosa de Endo incubadas a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, para obtener colonias aisladas y proseguir con la prueba completa.

En estas placas se pueden desarrollar tres tipos de colonias: típicas nucleadas, con o sin brillo metálico; atípicas, opacas, anucleadas, de color rosa y todas las restantes negativas.

Cuando esta prueba da resultado positivo se considera como una confirmación de los resultados positivos obteni-

dos en la primer prueba.

Si el resultado es negativo el estudio del cultivo se da por terminado y los resultados positivos obtenidos en la primer prueba se consideran "falsos positivos" debido a la presencia de otras especies bacterianas. (1,4,11,12)

PRUEBA COMPLETA

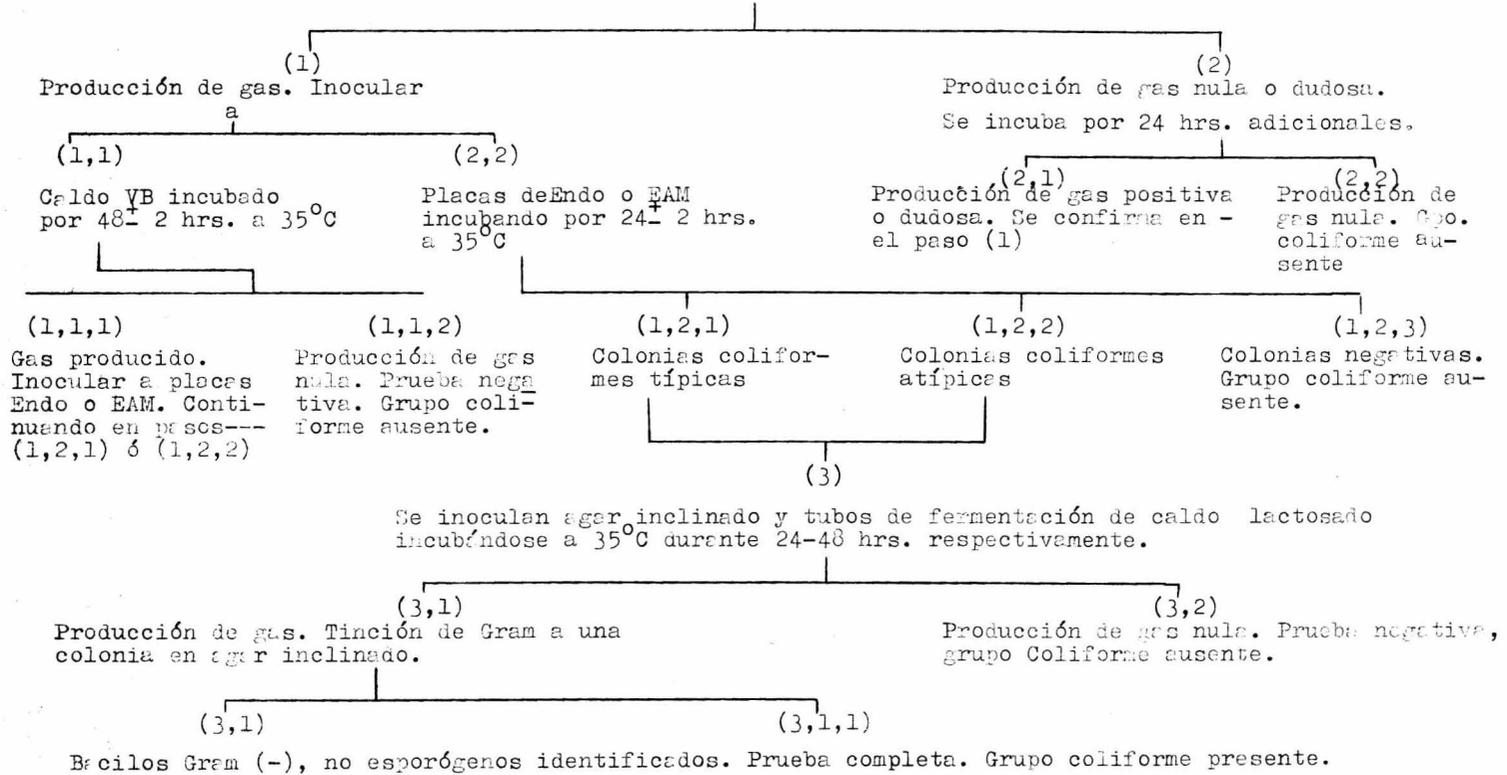
Esta prueba se lleva a cabo inoculando las colonias típicas o atípicas de las placas sólidas de Levine EAM --- agar o Gelosa de Endo en un tubo de fermentación de caldo-lactosado y un tubo de agar nutritivo inclinado, incubándose durante 24 a 48 horas a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

La formación de gas en los tubos secundarios de caldo lactosado y la observación de bacilos no esporulados Gram-negativos al realizar la Tinción de Gram a partir del cultivo en agar nutritivo inclinado, debe considerarse como una prueba positiva, demostrando la presencia de algún --- miembro del grupo coliforme en el volumen de agua examinado.

La ausencia de gas o la morfología no coliforme constituye una prueba negativa. (1,4,9,11)

ESQUEMA DE LA SECUENCIA DE LAS PRUEBAS PRESUNTIVA
CONFIRMATIVA Y COMPLETA

Se inoculan tubos de fermentación de caldo lactosado y se incuban a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 hrs.



5.3 Método de los filtros de membrana.

Esta nueva técnica se originó en Alemania durante la II Guerra Mundial utilizándose actualmente como un método oficial para determinar la potabilidad de aguas de bebida o uso doméstico; se ha demostrado que puede dar una información equivalente a la que se obtiene en el método de tubos de fermentación. (1,4)

Los primeros estudios los realizó Pick en 1855 utilizando membranas de colodión en sus investigaciones biológicas. Sanarelli en 1891 desarrolló filtros de membrana impermeables a las bacterias pero permeables a sus toxinas.

Beschold al inicio de 1900 hizo estudios sistemáticos de las propiedades fisicoquímicas de una gran variedad de estas membranas. Después de 1911 se realizaron numerosas investigaciones en diferentes países con respecto a las propiedades de las membranas de colodión. (3)

Zsigmondy y Bachmann en 1916-1918 desarrollaron y perfeccionaron los métodos de producción, los cuales fueron posteriormente comercializados. A principios de 1930 W. J. Elford en Inglaterra y P. Fraber en Francia hicieron nuevas contribuciones para la producción de membranas con un control del tamaño de los poros. A partir de 1950 los bacteriólogos del Subcomité de Métodos Normales para el examen de aguas potables y aguas negras de la Asociación Americana de Salud Pública han iniciado estudios intensivos acerca de las aplicaciones de los filtros de membrana en el campo de la bacteriología. (1,4)

Los filtros de membrana son pequeños discos de ésteres de celulosa (nitrato de celulosa) de 0.15 mm de grosor y 47 mm de diámetro, planos y flexibles.

El diámetro de cada poro oscila entre $0.45\mu \pm 0.2$; - son esterilizables en autoclave a 121°C durante 10 minutos.

Poseen una velocidad de flujo de 65 ml/min/cm^2 y un índice de refracción uniforme. Estan libres de substancias químicas inhibidoras del crecimiento bacteriano y no les afecta el líquido a filtrar.

Las membranas filtrantes son capaces de retener las bacterias presentes en el agua, ya que poseen un gran número de poros de tamaño uniforme que no sobrepasa las dimensiones bacterianas comprendidas entre $0.4-0.7$ micras de ancho por $1-4$ micras de longitud. (4,17)

Equipo.

Aparato de filtración.-

Se utilizó una unidad de filtración Millipore para un análisis simultáneo de 6 muestras, este consta de:

Seis embudos de vidrio Pyrex graduados (100,200 y300 ml).

Seis soportes de vidrio Pyrex con placa porosa

Un matraz de filtración al vacío

Una bomba para vacío

Membranas de filtración Millipore-HA esterilizadas (47 mm y 0.45 mm)

Cojines absorbentes esterilizados

Pinzas metálicas con punta lisa

Dos matraces de bola de fondo plano (500 ml)

Dos matraces Erlenmeyer (1000 ml)

Pipetas graduadas de 10 ml

Frascos de muestreo de boca ancha con tapón esmerilado de 125 ml.

Cajas de petri de 60 x 15 mm Pyrex

Vasos de precipitados de 250 ml

Lámparas de alcohol

Lámpara de luz fluorescente

Microscopio estereoscópico

Incubadora a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$

Esterilización.

Los embudos y soportes del aparato de filtración se envuelven en papel especial y se esterilizan en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Los frascos de muestreo, cajas petri y pipetas se esterilizan en horno a $170-180^{\circ}\text{C}$ durante una hora.



EQUIPO DE FILTRACION MILLIPORE
DE SEIS UNIDADES

Reactivos.

Alcohol etílico absoluto (99.5°)

Soluciones.

a) Solución amortiguadora de fosfatos pH= 7.2

Disolver 34 g de KH_2PO_4 en 500 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.2 con NaOH 1 N, aforar a 1000 ml con agua destilada.

b) Solución amortiguadora diluida.

De la solución anterior tomar 1.25 ml llevar a -- 1000 ml con agua destilada; esterilizar a 121°C durante - 15 minutos.

Medio de cultivo.

El medio empleado para la detección de coliformes por medio de filtros de membrana es el medio Caldo de Endo-FM (BBL).

Preparación del medio de cultivo.

Disolver 4.8 g de medio en 100 ml de agua destilada - a la cual se le han agregado dos ml de alcohol etílico absoluto. Transferir a un matraz Erlenmeyer con tapón, posteriormente calentar en Baño María durante 3 a 5 minutos, en friar a 45°C, ajustar el pH entre 7.1 y 7.3; se recomienda preparar el medio diariamente, aunque se puede conservar - a una temperatura de 2 a 10°C durante 96 horas resguardándolo de la luz.

El medio Caldo de Endo-FM (BBL) contiene las siguientes sustancias: triptona, tiopeptona, casitona, extracto de levadura, lactosa, fosfato monobásico, cloruro de sodio y fucsina básica.

Técnica.

El procedimiento a base de membranas filtrantes para la enumeración de coliformes, comprende la filtración de un volumen conocido de agua a través de una membrana filtrante, la cual posee poros de tamaño uniforme y de un -- diámetro óptimo para la retención completa de bacterias.

La membrana filtrante es entonces puesta en contacto con un cojincillo saturado de medio líquido selectivo --- (Caldo de Endo-FM) para proceder a la incubación bajo las condiciones adecuadas de tiempo, temperatura y humedad.

Se examinan los cultivos, contando las colonias coliformes típicas, reportándose los resultados como número - de coliformes por 100 ml de muestra. (1,4,9,10)

Estos gérmenes desarrollan sobre la superficie de la membrana colonias características con brillo metálico verdoso e iridiscente, que puede presentarse en la periferia de la colonia, en la porción central o cubrirla completamente. Este brillo se debe a que en la vía metabólica de la fermentación de la lactosa, se forma un complejo ácido aldehído que se combina con la fucsina del medio.

La secuencia a seguir para este proceso es: en las - cajas petri esterilizadas y marcadas convenientemente se coloca por medio de un dispositivo especial, un cojinci-- llo absorbente esterilizado en cada una, saturando este - con 1.8-2.2 ml de caldo de Endo-FM.

El área de trabajo debe tener condiciones de esterilidad por lo que se distribuyen lámparas de alcohol alrededor del equipo filtrante.

Sobre la capa porosa del sistema de filtración se coloca la membrana filtrante esterilizada, con la superficie

cuadrículada hacia arriba, por medio de unas pinzas previamente sumergidas en alcohol y flamméas.

La muestra por analizar, se agita varias veces para permitir su homogeneización y después de esto el frasco se flamea la boca del mismo y se vierte en el embudo un volumen de 100 ml, procediéndose a la filtración.

Nota: es necesario utilizar una trampa de agua entre la bomba y la unidad filtrante.

Se lava el embudo con una solución amortiguadora diluída (20-30 ml) con objeto de bajar todas las porciones del agua problema y asegurarse de que todos los gérmenes se depositen en la membrana.

Terminada la filtración, se retira la membrana con las pinzas flameadas y se coloca con la superficie cuadrículada hacia arriba sobre el cojincillo que se tiene en las cajas petri con el medio de cultivo, evitando atrapar burbujas de aire entre la membrana y el cojincillo. Para volver a utilizar el equipo es necesario esterilizar este con lavados de agua hirviente antes de filtrar la siguiente serie de muestras.

Al finalizar el proceso, las cajas de petri se incuban en una atmósfera húmeda (aproximadamente el 90%) a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 22 a 24 horas. Se observan las cajas para efectuar el recuento de microorganismos empleando un microscopio esteroscópico y una lámpara de luz fluorescente cuyos rayos deben incidir con un ángulo de $60-80^{\circ}$ al plano de la membrana filtrante.

Se reportan aquellas colonias que presenten brillo metálico, como organismos coliformes.

Los resultados obtenidos se anotan en términos de microorganismos coliformes por 100 ml de muestra. El cómputo se hace de la siguiente forma:

$$\begin{array}{l} \text{Microorganismos coliformes por} \\ 100 \text{ ml de muestra} \end{array} = \frac{100 \times \text{col. coliformes}}{\text{ml de muestra filtrados}}$$

Las bacterias coliformes presentes en el agua, pueden en algunas ocasiones producir colonias atípicas y para la identificación de estas, se recurre a hacer su comprobación de la siguiente manera:

De las colonias atípicas de filtros de membrana, se inoculan tubos de fermentación de caldo lactosado, incubándose a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48 horas.

De los tubos positivos se siembra un tubo en agar nutritivo inclinado, incubándose a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Del cultivo en agar hacer una Tinción de Gram; los cultivos puros de las colonias atípicas de los filtros de membrana que sean coliformes deben ser bacilos no esporulados Gram negativos.

En ésta técnica se pueden llegar a presentar en algunas ocasiones, resultados falsos positivos, debido a ciertas especies de Serratia marcescens y fermentadores lentos de la lactosa, llegando a producir brillo metálico sobre la colonia. Se ha observado también que un crecimiento abundante en la superficie de la membrana impide el desarrollo del brillo metálico en algunas colonias coliformes.

Los resultados falsos negativos pueden presentarse en ambos métodos principalmente cuando hay un cambio en el rango de pH de 5.5 a 7.5 o a la presencia de agentes inhibidores como fenoles, ácido sulfhídrico, sulfitos, iones de metales pesados como plomo y mercurio, así como organismos competitivos del género Pseudomonas.



FILTRACION SIMULTANEA DE SEIS MUESTRAS DE AGUA APLICANDO EL METODO DE FILTROS DE MEMBRANA



OBSERVACION DE LAS COLONIAS COLIFORMES TYPICAS UTILIZANDO UN MICROSCOPIO ESTEROSCOPICO Y UNA LAMPARA DE LUZ - FLUORESCENTE.

VI

Resultados.

El total de muestras analizadas simultáneamente por uno y otro método fue de 2 174; con los resultados obtenidos se encontró que 2 093 muestras coinciden en ambos métodos tomando en cuenta las muestras contaminadas y las no contaminadas mismas que corresponden al 96.28%.

Para esto se consideraron contaminadas las muestras que presentaron por el método de tubos de fermentación uno o mas tubos positivos en la prueba confirmativa y en relación al método de filtros de membrana aquellas muestras que presentaron dos o mas colonias típicas en la superficie de la membrana.

De las muestras que no coinciden en ambos métodos 48 dieron resultado positivo por el método de tubos de fermentación y negativo por el método de filtros de membrana, 33 muestras dieron resultado positivo en filtros de membrana y negativo en tubos de fermentación, haciendo un total de 81 muestras que corresponden al 3.72%.

TABLA 1

Mes	Muestras analizadas	Muestras que coinciden en ambos méts.	Muestras positivas que no coinciden en ambos méts.	
Nov.	545	513	TF 16	FM 16
Dic.	432	415	15	2
Enero	614	594	7	13
Feb.	583	571	10	2
TOTAL	2 174	2 093	48	33

TF = Tubos de fermentación

FM = Filtros de membrana

Análisis estadístico de los resultados.

De las muestras contaminadas por los dos métodos se hizo un estudio estadístico tomando en cuenta lo siguiente:

a) Para el método de tubos de fermentación se consideró el número de tubos positivos y negativos (ó sea de 0 a 5) en la prueba confirmativa y la frecuencia con que estos se presentaron.

b) Para el método de filtros de membrana se tomó en cuenta el número de colonias características representativas desde 0 a 30 colonias y más de 30 colonias se consideraron como incontables, ordenándose éstos datos en intervalos de clase, para poder darle a cada uno un valor empírico, observándose también su frecuencia .

TABLA 2

TF		FM	
Tubos (+)	valor real	Col. típicas	valor empírico
0	0	0	0
1	1	1 a 6	1
2	2	7 a 12	2
3	3	13 a 18	3
4	4	19 a 24	4
5	5	25 a 30	5
		más de 30	6

En cada método estos valores se agruparon anotando la frecuencia observada y el total de muestras contaminadas para obtener la media aritmética por la siguiente fórmula:

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

donde X_i = valores observados
 n = número de muestras

Y una vez obtenida la media aritmética (\bar{X}), sacar la desviación estándar a partir de la siguiente fórmula:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n}}$$

TABLA 3

TUBOS DE FERMENTACION

X_i	f	f_a	fX_i	ΣfX_i	$X_i - \bar{X}$	$(X_i - \bar{X})^2$	$f(X_i - \bar{X})^2$	$\Sigma f(X_i - \bar{X})^2$
0	33	33	0	0	-2.22	4.9284	162.6372	162.6372
1	42	75	42	42	-1.22	1.4884	62.5128	222.1500
2	14	89	28	70	-0.22	0.0484	0.6776	25.8276
3	16	105	48	118	0.78	0.6084	9.7344	235.5620
4	7	112	28	146	1.78	3.1684	22.1788	257.7408
5	37	149	185	331	2.78	7.7284	285.9508	543.6976

$$\bar{X} = \frac{\Sigma X_i}{n} = \frac{331}{149} = 2.22$$

$$s = \sqrt{\frac{\Sigma (X_i - \bar{X})^2}{n}} = \sqrt{\frac{543.6976}{149}} = 1.9102$$

TABLA 4

FILTROS DE MEMBRANA

X_i	f	f_a	fX_i	ΣfX_i	$(X_i - \bar{X})$	$(X_i - \bar{X})^2$	$f(X_i - \bar{X})^2$	$\Sigma f(X_i - \bar{X})^2$
0	51	51	0	0	-1.69	2.8561	145.6611	145.6611
1	59	110	59	59	-0.69	0.4761	28.0899	173.7510
2	6	116	12	71	0.31	0.0961	0.5766	174.3276
3	4	120	12	83	1.31	1.7161	6.8644	181.1920
4	1	121	4	87	2.31	5.3361	5.3361	186.5281
5	2	123	10	97	3.31	10.9961	21.9922	208.5203
6	26	149	156	253	4.31	18.5761	482.9786	691.4989

$$\bar{X} = \frac{\Sigma X_i}{n} = \frac{253}{149} = 1.6979$$

$$S = \sqrt{\frac{\Sigma (X_i - \bar{X})^2}{n}} = \sqrt{\frac{691.4989}{149}} = 2.1542$$

TABLA 5

COMPARACION DE ALBOS METODOS

	TUBOS DE FERMENTACION	FILTROS DE MEMBRANA
TURBIEDAD	No presenta problema	Se presentan problemas
VOLUMEN DE NUESTRA	Menor volumen	Volumenes mayores (100, 200, 300 ml)
MEDIOS DE CULTIVO	Varios medios y mayor volumen de ellos	Un medio de cultivo y menor volumen del mismo
TIEMPO PARA OBTENER RESULTADOS	De 4 a 6 días	22 a 24 horas
INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS	Cualitativo Cuantitativo: sólo por técnica del NMP	Cualitativo y Cuantitativo
ESPACIO EN LA INCUBACION	Mayor espacio	Menor espacio
EQUIPO NECESARIO	Mas material de vidrio	Menos material
COSTO	Mas económico	Mas costoso

VII

Comparación entre ambos métodos.

Turbiedad.

La turbiedad del agua por analizar no presenta problemas al ser empleada la técnica de los tubos de fermentación.

La técnica del filtro de membrana no puede ser empleada en muestras que presentan turbiedad, que puede ser debida a la presencia de material gelatinoso finamente dividido, tal como fierro suspendido, manganeso, aluminio coloidal o algas que llegan a formar una película delgada en toda la superficie de la membrana, dando lugar a una obstrucción de los poros, así como material cristalino o sílice.

Cuando la turbiedad se debe a una alta concentración de coliformes, el volumen de la muestra no debe ser mayor de 2 a 3 ml y en su caso se recomienda hacer diluciones -- apropiadas con solución amortiguadora estéril para que así la filtración se facilite.

Si en los abastecimientos de agua potable existen -- grandes poblaciones de bacterias no coliformes, esto puede dificultar el análisis de coliformes por el método de filtros de membrana, porque es posible que haya inhibición en el crecimiento de estos.

Ahora la existencia de bacterias no coliformes sobre la superficie de la membrana puede contrarrestar el mecanismo supresivo del medio MF-Endo y producir un crecimiento excesivo que enmascare la detección visual de bacterias coliformes sobre la superficie del filtro. El mecanismo selectivo de este medio no puede ser efectivo en aguas que -

contengan más de 400 colonias no coliformes por una colonia coliforme en 100 ml de muestra.

Se ha encontrado que aguas altamente contaminadas -- con desechos industriales conteniendo cantidades de una ppm de Zn, Cu ó fenoles, ejercen un efecto bactericida ó bacteriostático que impide el desarrollo bacteriano; por lo que el método de membranas filtrantes no es recomendable en éste caso.

Volumen de muestra.

Por el método de filtros de membrana, se pueden analizar con mayor comodidad volúmenes mayores de muestra -- que son más representativos, dando una información más -- precisa cuando los niveles de coliformes son bajos.

Medio de cultivo.

Para los tubos de fermentación, se utilizan cuando -- menos dos o tres medios diferentes que requieren mayor vo -- lumen, y un solo medio de cultivo es necesario para los -- filtros de membrana, del cual se ocupa un volumen de 1.8- -- a 2.2 mililitros por muestra.

Tiempo para obtener resultados.

Para la prueba de tubos múltiples de fermentación se requiere de 4 a 6 días para obtener resultados definiti-- vos, y por el método de filtros de membrana es de 24⁺ 2 - horas para obtener los mismos resultados.

Este ahorro de tiempo en la valorización de la cali-- dad sanitaria del agua es importante ya que se pueden rea-- lizar en forma inmediata las medidas de control pertinen-- tes.

Interpretación de los resultados.

Harold & Woodward encontraron que los valores obteni

dos con los filtros de membrana son de dos a cinco veces más precisos que aquellos que se obtienen con el método de tubos de fermentación, ya que este método indica única mente la presencia ó ausencia de organismos coliformes en el inóculo, a menos que se recurra a la técnica del NMP, - donde se obtiene el número de bacterias por estimación estadística, con límites de confianza del 95%. (9)

Espacio de incubación y material de vidrio.

La técnica de filtros de membrana requiere menos espacio de incubación, por ejemplo: el espacio ocupado por 5 cajas Petri de 60 x 15 mm necesarias para 5 muestras es aproximadamente 4 a 5 veces menor que el necesario para - incubar 25 tubos de fermentación. Además necesita menos material de vidrio, lo que significa ahorro en espacio, - tiempo de lavado y esterilización.

Costo.

Haciendo una comparación de cada método en cuanto a material utilizado, el método de los filtros de membrana requiere de un equipo mas especializado (Aparato de filtración, membranas y cojincillos) que resulta ser mas -- costoso y además requiere de importación.

El método de tubos de fermentación, aunque es laborioso requiere un material de fácil adquisición, más barato, por lo que resulta ser más económico.

VIII

Conclusiones.

El método de los filtros de membrana, presentó venta ja en cuanto a precisión, ya que nos da un número entero, que es el número de colonias con brillo metálico que se desarrollan sobre la superficie de la membrana, relacionando este recuento directo con el volumen filtrado.

En cuanto a la preparación del medio de cultivo caldo de Endo-FM (BBL), se prolongó el tiempo de calentamiento sin lograrse una disolución completa del mismo, lo que pudo haber dado lugar a la evaporación del etanol, siendo ésta una posible causa en la variación de los resultados.

Al hacer el análisis estadístico de los resultados se encontró que el método de los tubos de fermentación es más sensible que el método de los filtros de membrana; es to se concluyó ya que la desviación estándar del método de tubos de fermentación es menor que su media aritmética, en cambio en el método de los filtros de membrana su desviación estándar resultó mayor que la media aritmética, tomando en cuenta que se le dieron valores empíricos a las colonias características representativas.

Bibliografía.

1. American Public Health Association
Standard Methods for the Examination of Water
and Wastewater, 13th ed.
Washington, D. C. (1971)
pp. 451-504, 669.
2. Buchanan, R. E. & N. E. Gibbons, Coeds.
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed.
The Williams & Wilkins Co.
Baltimore, (1974)
pp. 290-295, 324, 339.
3. Caballero, P.
Discusión sobre las Normas de Calidad para Agua
Potable.
Rev. Ingeniería Hidráulica, SRH.
4: 34-41 (1950)
4. Current Practices in Water Microbiology
Training Manual
U. S. Environmental Protection Agency
Water Program Operations
Cincinnati, Ohio. (1971)
5. Davis, B. D.
Tratado de microbiología
Salvat, Edit. S. A.
Barcelona, España. (1972)
pp. 789-793

6. Difco Laboratories. Preparation of Media from Dehydrated Culture Media. Difco Manual. 9th Edition. Difco Labs. Detroit, Michigan. (1953) pp. 30-40, 45.
7. Dopter y Sacpec
Manual de Bacteriología, II
Salvat, S. A.
México, D. F. (1933)
pp. 950-975
8. Dorlow, H. M.
Methods in Microbiology
Academic Press
New York (1969)
pp. 169-204
9. Geldreich, Edwin E.
Handbook for Evaluating Water Bacteriological Laboratories, 2nd Ed.
Cincinnati, Ohio. (1975)
pp. 49-52, 97-105, 117-128
10. Harold A. T. & R. L. Woodward
Use of Molecular Filter Membranes For Water Potability Control
J.A.W.W.A.
48 (11): 1381-1401 (1965)

11. Jawetz, E.
Manual de Microbiología Médica
El Manual Moderno, S. A. 4a Ed.
México, D. F. (1970)
pp. 96-98
12. Lynch, A. M.
Métodos de Laboratorio
Internacional, Edit.
México, D. F. (1965)
pp. 391-401
13. Mc Arthy, J. Delaney
Measuring Coliform in Water.
Water and Sewage Works
New York (1961)
pp. 108,228-243
14. Prescott, S. C.
Water Bacteriology
John Wiley and Sons, 6th Ed.
New York, (1950)
pp. 2-71
15. Sale, A. J.
Bacteriología
Gustavo Gili, Edit.
México, D. F. (1965)
pp. 589-610

16. Secretaría de Salubridad y Asistencia
Certilla de Saneamiento; Cap. II- Agua
Dirección de Ingeniería Sanitaria, (1961)
pp. 83

17. Smith and Conant
Zinsser Microbiology
Appleton Century-Crofts, Inc.
New York, (1960)
pp. 414

18. Thomas, H. A.
Estimation of Coliform Density by the Membrane
Filter and the Fermentation Tube Methods.
A.J.P.N. 45 (11): 1431-1437 (1955)