



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

**DETERMINAR COLIFORMES TOTALES Y  
FECALES EN DIFERENTES MARCAS DE  
AGUA ENBOTELLADA EN GARRAFON DE (19  
LITROS) POR EL MÉTODO DEL NÚMERO  
MÁS PROBABLE (NMP) DE LA NOM-112-SSA1-  
1994 Y EL MÉTODO DE DETECCIÓN DE  
ENZIMAS (EDM) “READYCULT”**

**T E S I S**

que para obtener el título de

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A**

**FLORENTINO ROMERO AMBROSIO**

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. ANDREA A. BECERRIL OSNAYA





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **AGREDECIMIENTOS**

### **DOY GRACIAS**

#### **A MI ESPOSA**

ANA LUISA SERRANO GUTIÉRREZ, POR SER MI COMPAÑERA DE SIEMPRE Y QUE JUNTOS HEMOS LUCHADO SOBRE TODO EN LOS MOMENTOS MÁS DIFÍCILES HAS MOSTRADO TU ENTEREZA Y DESICIÓN, A TI TAMBIÉN TE CORRESPONDE ESTE ESFUERZO QUE CULMINA LO QUE PARECÍA QUE NUNCA IBA A SER POSIBLE.

#### **A MIS HIJOS**

A TI NOECITO SIEMPRE POR TU GRAN PACIENCIA Y ESE GRAN AMOR QUE TIENES PARA ENTENDER A LOS DEMÁS TE DEDICO MI TESIS, A TI YAYI CON EL MISMO AFECTO DE SIEMPRE TE DEDICO TAMBIÉN MI TESIS POR ÚLTIMO A TI MONIQUITA CON LA MISMA ALEGRÍA QUE HE DEDICADO A TUS HERMANOS LA TESIS TE LA DEDICO A TI. A LOS TRES LES PIDO QUE COMPARTAN CONMIGO LA SATISFACCIÓN DE HABER CONCLUIDO UN OBJETIVO MÁS DE MI VIDA.

#### **A MIS PADRES**

A MI PAPÁ AGUSTÍN ROMERO GRANADADO CON EL MAYOR AFECTO DEDICO ESTA TESIS, ESTOY SEGURO QUE SENTIRÁ UNA GRAN EMOCIÓN COMO CORRESPONDE AL AFECTO QUE ME HA TENIDO SIMPRE. A MI MADRE MATILDE AMBROSIO MALDONADO QUE EN PAZ DESCANSE SU GRAN AMOR QUE SIEMPRE ME DIO ME RECONFORTA PENSAR QUE AÚN ESTÁ CONMIGO PARA DISFRUTAR ESTE ESFUERZO QUE CONCLUYE.

#### **A MIS HERMANOS**

A MI HERMANA TERESA ROMERO AMBROSIO TE DEDICO CON MUCHO CARIÑO Y TE INVITO A QUE COMPARTAS CONMIGO LA SATISFACCIÓN DE HABER CONCLUIDO MI CARRERA PROFESIONAL. A MI HERMANO NÉSTOR CON EL MISMO AFECTO QUE A LOS DEMÁS FAMILIARES TE DEDICO MI TITULACIÓN.

### **A MI ASESORA DE TESIS**

MAESTRA ANDREA BECERRIL OSNAYA GRACIAS MIL GRACIAS POR ESE APOYO INCONDICIONAL QUE ME HA BRINDADO COMO PROFECIONAL, PERO COMO PERSONA SENCILLAMENTE ES USTED EXCEPCIONAL, SIEMPRE COMPARTES SUS CONOCIMIENTOS SUS EXPERIENCIAS DE LA VIDA LO CUAL RECONFORTA ESCUCHARLA Y ENCAUSA A SEGUIR LUCHANDO POR QUE LAS COSAS SEAN MEJORES.

### **MAESTRA LUPITA AVILES**

MUCHAS GRACIAS POR TODO EL APOYO QUE ME BRINDO TANTO EN LA PARTE EXPERIMENTAL COMO EN LA PARTE ESCRITA DE LA TESIS FUE POSIBLE QUE CONCLUYERA ESTE TRABAJO.

### **A MI ASESORA DE TESIS INTERNA**

MAESTRA MARICELA GARCÍA ARTEAGA GRACIAS POR DARMELA CONFIANZA Y TRATARME COMO SI FUERA UN ALUMNO RECIEN EGRESADO, LO CUAL ME MOTIVO Y ME DIO MÁS ÁNIMO PARA CONCLUIR EL TRABAJO.

### **A TODOS MIS SINODALES**

GRACIAS MAESTROS POR TODAS LAS OBSERVACIONES QUE HICIERON A LA PARTE ESCRITA DE LA TESIS Y QUE CON SUS CONOCIMIENTOS SE ENRIQUECIO EL TRABAJO FINAL.

### **A LA UNIVERSISIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

GRACIAS POR DARMELA OPORTUNIDAD DE REALIZAR EL ANHELO DE SER PROFESIONISTA MI AGRADECIMIENTO POR SIEMPRE. A LA FES. ZARAGOZA MI ALMA MATER MI ETERNA GRATITUD.

**A PATRICIA RIVERA GARCIA**

COMPAÑERA DE GENERACIÓN GRACIAS POR TU APOYO POR TU AMISTAD,  
SIEMPRE TE RECUERDO CON AFECTO.

**A TODAS AQUELLAS PERSONAS**

QUE DE BUENA FE FESTEJAN LA CONCLUSIÓN DE MI CARRERA PROFESIONAL

**MUCHAS GRACIAS**

# INDICE

I.	INDICE DE TABLAS	Pág.
II.	INDICE DE FIGURAS	
III.	INDICE DE GRÁFICAS	
IV.	RESUMEN	
1.0	INTRODUCCIÓN .....	1
2.0	GENERALIDADES DEL AGUA .....	3
3.0	PARÁMETROS DE CALIDAD DEL AGUA .....	6
4.0	MÉTODOS PARA DETERMINAR LA CALIDAD DEL AGUA.....	10
5.0	PROCESOS DE POTABILIZACIÓN Y CALIDAD DEL AGUA.....	17
6.0	JUSTIFICACIÓN.....	23
7.0	HIPÓTESIS .....	24
8.0	MATERIAL .....	25
9.0	MÉTODO .....	27
10.0	RESULTADOS.....	36
11.0	ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	44
12.0	CONCLUSIONES.....	54
13.0	ABREVIATURAS.....	56
14.0	ANEXO 1.....	58
15.0	ANEXO 2.....	59
16.0	ANEXO 3 .....	61
17.0	ANEXO 4 .....	62
18.0	BIBLIOGRAFÍA .....	64

## I INDICE DE TABLAS

TABLAS	Pág.
Tabla 1 Especificaciones sanitarias organolépticas y físicas del agua envasada NOM-041-SSA1-1993 .....	7
Tabla 2 Especificaciones sanitarias establecidas en la NOM-041-SSA1-1993 para aguas envasadas de consumo humano.....	8
Tabla 3 Parámetros radiológicos establecidos en la NOM-127-SSA1-1994 para aguas envasadas de consumo .....	9
Tabla 4 Relación de claves de aguas analizadas (garrafón de 19 L).....	27
Tabla 5 Serie de tubos para la prueba presuntiva.....	29
Tabla 6 Patrones de INVIC para la identificación de <i>E. coli</i> por pruebas Bioquímicas.....	33
Tabla 7 Resultado del análisis de 40 muestras de agua envasada en garrafón de 19 L., en la determinación de coliformes totales y fecales por los métodos del NMP y EDM Readycult y como prueba adicional el análisis de microorganismos mesófilos.....	37
Tabla 8 Resumen de resultados de 40 muestras de aguas trabajadas por los métodos del NMP y EDM “Readycult” en la determinación de coliformes totales y fecales y microorganismos mesófilos.....	38
Tabla 9 Tabla de contingencia que muestra los valores de predicción para calcular la sensibilidad y especificidad por el método del NMP en la determinación de coliformes totales.....	39

Tabla 10	Tabla de contingencia que muestra los valores de predicción para calcular la sensibilidad y especificidad por el método del NMP en la determinación de coliformes fecales.....	40
Tabla 11	Tabla de contingencia que muestra los valores de predicción para calcular la sensibilidad y especificidad por el EDM en la determinación de coliformes totales.....	41
Tabla 12	Tabla de contingencia que muestra los valores de predicción para calcular la sensibilidad y especificidad por el EDM en la determinación de coliformes fecales.....	42
Tabla 13	Porcentajes de valores de sensibilidad y especificidad obtenidos al determinar coliformes totales y fecales por los métodos del NMP y EDM en 40 muestras de agua envasada en garrafón de 19 L.....	43
Tabla 14	Porcentaje de microorganismos mesófilos encontrados en las muestras analizadas.....	44
Tabla 15	Relación de marcas de agua que dieron positivo para coliformes totales y fecales por el método del NMP.....	48
Tabla 16	Resultado del análisis microbiológico realizado a las muestras de agua que dieron positivo por el EDM ReadyCult para coliformes totales y fecales.....	49
Tabla 17	Resultado del análisis microbiológico realizado a las muestras de agua por los métodos del (NMP y EDM) para coliformes totales y fecales .....	50



## II INDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
Figura 1	Identificación de coliformes totales método del (EDM) “Readycult”.....	15
Figura 2	Identificación de <i>E. coli</i> método del (EDM) “Readycult”.....	16
Figura 3	Procesos de potabilización de aguas superficiales.....	17
Figura 4	Procesos de potabilización de aguas subterráneas.....	18
Figura 5	Serie de tubos inoculados con muestra y CLRF incubar a 37°C 24-48 h.....	30
Figura 6	Prueba presuntiva positiva.....	30
Figura 7	Confirmación de la presencia de <i>E. coli</i> en medio selectivo CBVB incubado a 37 y 44°C, hay formación de gas prueba (+).....	31
Figura 8	Pruebas diferenciales para la identificación de <i>E. coli</i> aislado por el método del NMP.....	32
Figura 9	Identificación de coliformes totales y <i>E. coli</i> por el método del (EDM) Readycult a través de reacciones enzimáticas y usando uv a 365 nm.....	35

### III INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica		Pág.
Gráfica 1	Porcentaje de muestras con microorganismos mesófilos a 25°C.....	45
Gráfica 2	Porcentaje de muestras con microorganismos mesófilos a 37°C.....	45
Gráfica 3	Porcentajes de muestras totales con microorganismos mesófilos a 25°C y 37°C.....	46
Gráfica 4	Porcentaje de muestras con coliformes totales y fecales método del NMP.....	48
Gráfica 5	Porcentaje de muestras detectadas con coliformes totales y fecales por el (EDM) “Readycult”.....	49
Gráfica 6	Porcentaje de muestras detectadas con coliformes totales por los métodos del NMP y EDM “Readycult”.....	51
Gráfica 7	Porcentaje de muestras detectadas con coliformes fecales por los métodos del NMP y EDM “Readycult”.....	51

## IV RESUMEN

La disponibilidad del agua con las garantías higiénicas necesarias para el consumo humano y otros usos depende estrechamente de los sistemas de eliminación de residuos líquidos y abastecimiento del agua, a través de la red de distribución. Consumir agua contaminada propicia la aparición de epidemias causadas por microorganismos enteropatógenos como *Vibrio cholerae* (cólera), *Salmonella typhi* (fiebre tifoidea), otras cepas diferentes de *Salmonella* y *Shigella* (infecciones de gravedad variable), y *Entamoeba histolytica* (disenteria amebiana). La característica común de estas enfermedades es que los organismos infecciosos se liberan en las heces de individuos enfermos y de portadores clínicamente asintomáticos. La contaminación fecal, a través de los efluentes de aguas residuales sin depurar o depuradas de forma inadecuada, crean condiciones para la diseminación rápida de los patógenos. La ruta primaria de infección es la ingestión del agua; pero las frutas, las verduras y utensilios de mesa lavados con agua contaminada, son otros portadores posibles. (Atlas y Bartha, 2002).

La contaminación del agua como fuente de transmisión de enfermedades es un tema no exclusivo de un país o grupo de personas, su importancia es a nivel mundial, las medidas de higiene y salubridad están sujetas a normas que regulan la calidad del agua dependiendo del uso a que se destinen en cada país.

En este trabajo se llevó a cabo la determinación de Coliformes Totales y Fecales de 40 marcas de agua envasada en garrafones de 19 litros, por los Métodos del Número Más Probable (NMP) de la NOM-112-SSA1-1994, y la NOM-041-SSA1-1993 enunciadas en las Normas Oficiales Mexicanas de la Secretaría de Salubridad y el Método de Detección de Enzimas (EDM), "Readycult". El método del sustrato cromogénico y fluorogénico fue aprobado por Standard Methods desde 1992, principio básico del EDM, y para complementar el trabajo se determinó los microorganismos mesófilos a 25 Y 37<sup>0</sup>C estipulado en la NOM-041-SSA1-1993, por considerar de interés sanitario en la calidad del agua de consumo humano.

Los resultados que se obtuvieron para coliformes totales nos indican que en el caso del método del (NMP), se encontró que 25% de las marcas de agua analizadas contienen estos microorganismos, y no cumplen con los límites establecidos en la NOM-041-SSA1-1993, para considerarlas aptas para consumo humano.

Respecto a la determinación de Coliformes Fecales, 5 marcas de agua dieron resultados positivos a esta prueba, lo que corresponde a un 12.5 %, y en términos comparativos corresponde a un 50% menos del total de muestras que dieron resultados positivos para coliformes totales.

La determinación de microorganismos mesófilos a 25 y 37<sup>0</sup>C, nos indica que hay un 27.5% de muestras que rebasan ampliamente los límites de calidad del agua para considerarlas aptas para consumo humano, como lo establece la NOM-041-SSA1-1993.

Los resultados que se obtuvieron en la determinación de coliformes totales y fecales por el método de Detección de Enzimas (EDM) "Readycult", se encontró que 15 muestras dieron resultados positivos y le corresponde un 37.5%, y un 25% de estas muestras dieron resultados positivo para coliformes fecales, además se obtuvieron resultados en 24 horas, se detectaron coliformes totales y fecales simultáneamente. Estos resultados comparados con los obtenidos por el método del NMP, fue más elevado el porcentaje de muestras detectadas positivas por el EDM en los parámetros evaluados. Considerando el tiempo en que fue hecho el estudio y las marcas de agua analizadas, los resultados obtenidos nos dan una referencia para considerar como una opción de uso el método de EDM, principalmente en casos de emergencia, se debe conocer inmediatamente la fuente de contaminación del agua o alimento.

## I Introducción

El agua compone dos tercios del peso total de nuestro cuerpo y es un elemento esencial para la vida. Se ha estimado que un ser humano necesita en promedio 50 litros de agua por día para satisfacer sus necesidades más elementales de alimentación y servicios; la variedad de usos que el hombre hace del agua, no ha hecho más que aumentar la dependencia de ese elemento para su supervivencia.

El agua es un recurso imprescindible pero escaso para la vida. Menos de 1% del agua del planeta es agua dulce y accesible para el hombre, aunque este porcentaje varía considerablemente según el lugar, el clima y la época del año. Si a ésta situación sumamos la contaminación causada por los efluentes domésticos e industriales, la deforestación y las prácticas del uso del suelo, están reduciendo notablemente la disponibilidad de agua utilizable. (Nason, 1994).

Debido a la importancia que tiene el agua en la vida del hombre, si está contaminada se convierte en un medio con gran potencial para transmitir una amplia variedad de enfermedades. Una encuesta reciente por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS), destaca los siguientes hechos:

Cada día mueren aproximadamente 30.000 personas por causas de enfermedades hídricas, el 80% de estos decesos ocurren en países en vías de desarrollo, la cuarta parte de estas muertes se presenta en niños menores de 5 años (Tebbutt, 1999).

Los factores asociados a los fallecimientos en menores de 5 años, se deben principalmente al ingerir agua contaminada. Si continúa la tendencia actual de contaminación de los recursos hídricos subterráneos y superficiales, la falta de agua y el deterioro de la calidad de la misma, se convertirán en los factores que limiten el desarrollo económico, la expansión en la producción de alimentos y la restricción en el suministro de los servicios básicos de salud e higiene para millones de personas en todo el mundo. A medida que la población mundial continúe su rápido crecimiento, requerirá de mayores volúmenes del líquido para sus necesidades más elementales, esto traerá consigo que en poco tiempo se origine una crisis mundial por las reservas de agua dulce (Harrison, 1999).

La OMS estima que 1.5 billones de infecciones están asociadas con el ciclo del agua en todo el mundo y causan 6 millones de muertes, además cada hora se reportan 65,000 casos de diarrea, ésta situación propicia una rápida multiplicación de los microorganismos patógenos, los cuales utilizan como vector de contaminación el agua (Horan, 1991).

La presencia de microorganismos patógenos en el agua o alimentos constituyen un peligro constante para la salud humana. Las enfermedades de origen hídrico más comunes ciertamente son las que causan el mayor daño a escala global y son aquellas que se propagan por el agua contaminada con heces u orina humana. La mayoría de las enfermedades siguen una ruta de transmisión fecal-oral y los brotes se caracterizan porque enferman simultáneamente varias personas que toman de la misma fuente de agua.

El agua como parte fundamental de la vida ha pasado a ser parte de la comercialización como cualquier producto, lo que implica un proceso de producción que está regido por normas de calidad que cada país debe tener, las cuales están sujetas a estándares en los parámetros físicos, químicos y biológicos que las propias autoridades sanitarias deben fijar para su operabilidad y aplicación. La aplicación de las normas de sanidad asegura que el agua al consumirla no lleva ningún riesgo de transmitir alguna enfermedad y por lo tanto proporcionara salud y cumplirá con la función metabólica en el organismo. (Tebbutt, 199).

La evaluación microbiológica del agua de consumo humano es una medida preventiva para evitar la diseminación de enfermedades de origen hídrico entre la población. Debido a la gran comercialización de marcas de aguas embotelladas es necesario tener puntos de referencia sobre la calidad sanitaria que éstas presentan, y sobre todo es importante conocer otras variables de evaluación como la sensibilidad y especificidad para determinar coliformes totales y fecales en agua de beber (Manafi, 1993).

También es necesario comprobar que otras técnicas para análisis bacteriológico son viables de utilizar con resultados confiables como los que emite el método del Número Más Probable (NMP) de la NOM-112-SSA1-1994 adoptada por la Secretaria de Salud y publicada en el Diario Oficial de la Federación, en 1995. Tomo DV, No. 14. En éste trabajo se llevó a cabo el análisis de 40 diferentes marcas de agua embotellada en garrafón de 19 litros, se realizó utilizando el método del (NMP) y el Método de Detección de Enzimas (EDM). “Readycult”. Con la finalidad de obtener resultados que nos permitan comparar cual método muestra más sensibilidad y especificidad para detectar Coliformes Totales y Fecales en agua envasada en garrafones de 19 L. (Normas Oficiales Mexicanas SSA1, 1994).

## **2. Generalidades del agua**

El volumen total de agua permanece constante lo que cambia es la calidad y disponibilidad y depende fundamentalmente de las condiciones geográficas, geológicas y climatológicas. En términos de distribución el mayor volumen de agua se encuentra en los océanos como agua salina (97.5%), el resto de agua se encuentra en lagos, ríos e inmobilizada en los casquetes polares y en los glaciares, un porcentaje mínimo de esta agua está localizada en el subsuelo como agua subterránea (Environmental Technology, 1996).

De acuerdo a su distribución las aguas se encuentran como aguas superficiales, subterráneas y aguas de mar.

### **2.1 Aguas superficiales**

Es un término que describe cualquier tipo de agua que se encuentra escurriendo o estancada en la superficie tales como arroyos, ríos y embalses. En relativo reposo se encuentra en lagos, mares y océanos; y finalmente, en estado sólido, acumulada en grandes cantidades como hielo o nieve. Estas aguas están generalmente exentas de gérmenes y sales. Al fundirse presentan las mismas características del agua de lluvia, y al escurrir a través de la corteza terrestre toma las propiedades del agua superficial o subterránea (Unda, 2000).

En circulación por encima y a través de la corteza terrestre, el agua reacciona con los minerales del suelo y de las rocas. Los principales componentes disueltos en el agua superficial y subterráneos son los sulfatos, los cloruros, los bicarbonatos de sodio y potasio, y los óxidos de calcio y magnesio. Las aguas de la superficie suele contener también residuos domésticos e industriales. Las aguas subterráneas poco profundas pueden contener grandes cantidades de compuestos de nitrógeno y de cloruros, derivados de los desechos humanos y animales. (Arevalo, 2000).

### **2.2 Aguas subterráneas**

El agua subterránea es un recurso vasto de la naturaleza, los mantos acuíferos se forman por capas permeables de roca, arena y grava lo que permite la saturación de este líquido almacenándolo por largos periodos, estos mantos freáticos son los que aportan la mayoría de agua potable para las poblaciones humanas del mundo.

La cantidad de agua almacenada bajo la superficie en forma de agua subterránea y agua de suelo, supera el 20% de los recursos mundiales de agua dulce.

Las aguas subterráneas en general, ofrecen en condiciones naturales, una seguridad contra la contaminación, el movimiento lento del agua en el subsuelo a través de formaciones porosas, acarrea su purificación mecánica y biológica, así como procesos de difusión. Mientras más profunda sea el agua subterránea, estará menos contaminada por microorganismos patógenos. (Granados & Pérez, 1995).

### **2.3 Aguas de mar**

En pequeñas cantidades es incolora, en grandes cantidades toma coloración acentuada por los animales y plantas microscópicas presentes.

La temperatura es variable, según las latitudes, como también lo es su peso específico en los distintos océanos. La densidad varía de 1.0149 a 1.029 gr/cm<sup>3</sup>, el pH promedio del agua superficial oceánica es de alrededor de 8.1, el agua de mar tiene poco contenido orgánico siendo su valor alrededor de 1mg/L. La cantidad de gases disueltos varía fundamentalmente con la temperatura, luz y profundidad.

La concentración total de iones en el agua de mar es mucho mayor a la del agua dulce por contener grandes cantidades de sales disueltas, predominando los iones de sodio y cloruros, los cuales están presentes en concentraciones unas mil veces superior a las encontradas en el agua dulce (Bair, 2001).

## **2.4 Contaminación del agua**

El agua pura no se encuentra en la naturaleza. Cuando el vapor de agua se condensa en el aire y cae, absorbe polvo y disuelve oxígeno, anhídrido carbónico y gases. En la superficie del suelo incorpora bacterias del aire, arrastra materia orgánica e inorgánica, disuelve algunas sales como nitratos, nitritos, amoníaco etc. (Steel & Mac Ghee, 1981).

Otras impurezas de materia mineral soluble incluyen iones metálicos como los de calcio, magnesio, hierro y sodio que se mantienen en equilibrio químico con aniones del tipo del sulfato, bicarbonato, carbonato, oxhidrilo y cloruros. Estas sustancias van disolviéndose conforme el agua fluye sobre la tierra o se filtra a través de ella.

Es conveniente señalar la presencia de ciertas bacterias patógenas responsables del origen de enfermedades gastrointestinales; determinadas algas producen olores desagradables; ciertas sales en grandes cantidades, ocasionan sabores repulsivos, dureza o corrosividad y algunos gases dan origen a olores desagradables.

La acumulación natural de impurezas y microorganismos en el agua es el resultado de los procesos físicos, químicos y biológicos llevados a cabo en forma espontánea (American Society for Testing and Materials, 1997).

## **2.5 Contaminación física del agua**

Son alteraciones de las propiedades físicas del agua como color, sabor, olor y temperatura. Sus orígenes son diversos: como descargas de aguas termales, sustancias radiactivas, contenido de sólidos en sus diferentes variantes de materiales flotantes, sustancias coloides, sedimentos, lodos de plantas de albañal y espumas de detergentes (Jiménez, 2001).

El olor y el sabor del agua se ven alterados por la producción de sales de zinc, cobre o hierro, cloruros y sulfatos, provenientes del agua vertida con materia orgánica principalmente (Granados & Pérez, 1995).

## **2.6 Contaminación química del agua**

Comprende compuestos orgánicos e inorgánicos generados en los drenados de minas, desechos solubilizados de la agricultura, derrames de petróleo, pesticidas, aguas residuales municipales, desechos líquidos industriales y compuestos radiactivos. Producen efectos diversos y pueden ser de origen natural o sintético. Algunos son desechos directos otros se forman por la reacción entre diferentes compuestos en el agua (Jiménez, 2001).

La mayor parte de los contaminantes tóxicos se encuentran en las sustancias químicas contenidas en las aguas residuales; los más peligrosos son los metales pesados como el plomo, el mercurio, cromo, cadmio, hierro etc., los contaminantes orgánicos son los fenoles, detergentes sintéticos, proteínas, grasas e hidratos de carbono y petróleo.

Los efectos negativos en la vida del hombre y de los animales inferiores es inmediato y a largo plazo de consecuencias a veces irreversibles (Granados & Pérez, 1995).

### **2.7 Contaminación biológica del agua**

La contaminación del agua por microorganismos se presenta por descargas que contienen desechos humanos. La actividad biológica de los microorganismos en las aguas contaminadas produce muchos cambios químicos y bioquímicos, debido al desarrollo biológico, indicando la actividad de los microorganismos y el grado de descomposición de los sólidos formados y por ende la eficacia de cualquier proceso de tratamiento en particular (Departamento de Sanidad del Estado de Nueva York, 1996).

La contaminación biológica puede provocar enfermedades inducidas por microorganismos tales como bacterias, virus, protozoarios, etcétera. Las enfermedades comúnmente producidas por éstos son tifoidea, cólera, disentería, hepatitis infecciosa y amibiasis entre otras (Enkerlin et al, 1997).

Reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) estiman que el 80% de todas las enfermedades, y más de un tercio de los fallecimientos en países en vías de desarrollo, se debe al consumo de agua contaminada (Tebbutt, 1999).



### **3.0 Parámetros de calidad del agua**

Debido a la cantidad de parámetros que participan en el diagnóstico de la calidad del agua y lo complejo que éste puede ser, se han diseñado índices para sintetizar la información proporcionada por esos parámetros. Los índices tienen el valor de permitir la comparación de la calidad del agua en diferentes lugares y momentos, y de facilitar la valoración de los vertidos contaminantes y de los procesos de autodepuración, entre estos parámetros se encuentran el oxígeno disuelto, los coliformes totales y fecales, la temperatura, la turbidez, nitratos, fosfatos, etc..

Para mejorar la calidad de las aguas, es conveniente revisar diferentes parámetros. Algunos de éstos se utilizan en el control de los procesos de tratamiento realizando mediciones de forma continua o discreta, dependiendo del grado de contaminación y el uso a que va a ser destinada el agua. (Catalán, 1982).

Los parámetros se pueden clasificar en cuatro grandes grupos: físicos químicos, biológicos y radiológicos.

#### **3.1 Parámetros físicos sabor y olor**

El sabor y olor del agua son determinaciones organolépticas subjetivas, para las cuales no existen instrumentos de observación, ni registro, ni unidades de medida. Tienen un interés evidente en las aguas potables destinadas al consumo humano. Las aguas adquieren un sabor salado a partir de las 300 ppm de  $\text{Cl}^-$ , y un gusto salado y amargo con más de 450 ppm de  $\text{SO}_4^{2-}$ , el  $\text{CO}_2$  le da un gusto picante. Trazas de fenoles u otros compuestos orgánicos le confieren un color y sabor desagradables.

#### **3.2 Color**

El color es la capacidad de absorber ciertas radiaciones del espectro visible, algunos colores en aguas naturales son indicativos de la presencia de ciertos contaminantes. En general el agua presenta colores inducidos por materiales orgánicos de los suelos vegetales, como el color amarillento debido a los ácidos húmicos. La presencia de hierro puede darle color rojizo, y la de manganeso un color negro. El color afecta estéticamente la potabilidad de las aguas (Rigola, 1999).

Las medidas de color se hacen por comparación con un estándar arbitrario a base de cloruro de cobalto, ( $\text{CoCl}_2$ ) y cloroplatinato de potasio ( $\text{K}_2\text{PtCl}_6$ ). Las unidades de acuerdo a la NOM-041-SSA1-1993 se reportan en la tabla 1

#### **3.3 Turbidez**

La turbidez es la dificultad del agua para transmitir la luz debido a materiales insolubles en suspensión o coloides muy finos, que se presentan principalmente en aguas superficiales.

La medición se hace con un nefelómetro, el cual mide la intensidad de la luz difractada al incidir un rayo luminoso sobre las partículas en suspensión, las cuales inducen la turbidez por diversas sustancias.

Para aguas purificadas envasadas la NOM-041-SSA1-1993, establece las especificaciones mostradas en la tabla 1

Tabla 1 Especificaciones sanitarias organolépticas y físicas del agua envasada NOM-041-SSA1-1993

PARÁMETROS	CARACTERÍSTICAS	LÍMITE MÁXIMO PERMISIBLE
Olor	Inodoro	
Sabor	Insípido	
Color		15 Unidades de color verdadero en la Escala de platino-cobalto
Turbiedad		5 unidades de UNT*

\* Unidades de turbiedad nefelométrica o su equivalente en otro método

### 3.4 Temperatura

La temperatura es el principal ejemplo de la complejidad del agua, su efecto puede ser dañino o benéfico dependiendo de las circunstancias. El aumento de la temperatura por encima de las variaciones naturales, produce una disminución del oxígeno disuelto en el agua y a su vez disminuye la capacidad de oxidar los productos de contaminación orgánica. Por otra parte favorece la proliferación de bacterias, lo cual incrementa el riesgo de contraer enfermedades de origen hídrico (American Society for Testing and Materials, 1997).

### 3.5 Parámetros químicos

Las sustancias minerales contenidas en el agua deben quedar comprendidas entre los límites que la experiencia ha encontrado necesarios o tolerables para consumo humano, los cuales en su mayor parte han sido fijados como normas y abarcan un amplio espectro de estos contaminantes pudiendo ser orgánicos o inorgánicos (Unsa, 2000).

De acuerdo a la NOM-127-SSA1-1994. Está referida al agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamiento a que debe someterse el agua para su potabilización, esta norma establece las características químicas como: las debidas a elementos o compuestos químicos, que como resultado de investigación científica se ha comprobado pueden causar efectos nocivos a la salud humana.

Los límites permisibles de metales se refieren a su concentración total en el agua, la cual incluye los suspendidos o los disueltos, y están expresados en mg/L. (Normas Oficiales Mexicanas SSA1, 1995).

### 3.6 Parámetros biológicos

El agua potable debe estar exenta de gérmenes patógenos de origen entérico y parasitario intestinal que son los que pueden transmitir enfermedades, como *Salmonellas*, *Shigellas*, *Ebertellas*, *Amoebas* etcétera.

Tres grupos son normalmente usados para indicar la contaminación fecal del agua, *E. coli* o coliforme fecal, *Streptococos* fecales y *Clostridium perfringes*. Los tres grupos son aptos para sobrevivir por diferentes periodos de tiempo en ambientes acuáticos. (Gray, 1992).

El grupo coliforme y *Escherichia coli* en su conjunto, son los organismos más comunes utilizados como indicadores de contaminación fecal. Las bacterias coliformes son microorganismos de forma cilíndrica, capaces de fermentar la glucosa y la lactosa. Otros organismos usados como indicadores de contaminación fecal son los *estreptococos* fecales y los *clostridios*. Éstos últimos son organismos anaerobios, formadores de esporas. Las esporas son formas resistentes de las bacterias capaces de sobrevivir largo tiempo, cuya presencia en ausencia de coliformes es indicativo de una pasada e intermitente contaminación (Rigola, 1999).

El término coliforme incluye gran número de bacterias que se clasifican en varias divisiones y grupos como *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y puede incluirse *Ercinia* entre otras.

Los requisitos bacteriológicos actuales para determinar la calidad del agua se basan en la determinación del grupo coliforme lo cual representa contaminación fecal.

De acuerdo a la NOM-041-SSA1-1993 para aguas purificadas envasadas establece lo siguiente: tabla 2

Tabla 2 Especificaciones sanitarias establecidas en la NOM-041-SSA1-1993 para aguas envasadas de consumo humano

1	Número de microorganismos mesófilos	<100 UFC/1mL
2	Organismos Coliformes Totales	2NMP/100 MI ó 2UFC/100 mL
3	Organismos Coliformes Fecales	No detectables NMP/100 mL ó 0 UFC/100 mL
4	Pseudomonas	Ausencia

*Escherichia coli* o coliformes fecales debe haber ausencia o no detectables en ambos casos.

Los resultados de los exámenes bacteriológicos se deben reportar en unidades de NMP/100 mL

(Número Más Probable/100 mL), si se utiliza la técnica del número más probable o UFC/100 mL (Unidades Formadoras de Colonias /100 mL), si se utiliza la técnica de filtración de membrana (Normas Oficiales mexicanas, 1995).

### 3.7 Parámetros radiológicos

La presencia de materiales radiactivos en las aguas es un riesgo de importancia creciente. Las aguas se contaminan con líquidos residuales procedentes de laboratorios de investigación, hospitales que emplean radio isotopos, lavanderías que sirven a dichos laboratorios y hospitales, por la actividad de reactores nucleares refrigerados por agua, instalaciones de proceso de combustibles de los reactores y por la minería y preparación del uranio (Steel & Mc Ghee, 1981).

La preocupación que existe en la actualidad por los peligros asociados a los vertidos residuales de las plantas nucleares ha conducido al establecimiento de normas específicas. En el caso de México la NOM-127-SSA1-1994, establece los siguientes valores tabla 3

Tabla 3 Parámetros radiológicos establecidos en la NOM-127-SSA1-1994 para aguas envasada de consumo humano

CARACTERÍSTICAS	LÍMITE PERMISIBLE Bq/L
Radiactividad alfa global	0.1
Radiactividad beta global	1.0

El contenido de constituyentes radiactivos, los límites se expresan en Bq/L (Bequerel por litro).

#### **4.0 Métodos para determinar la calidad del agua**

El análisis bacteriológico del agua es vital en la prevención de epidemias como resultado de la contaminación del agua. El ensayo se basa en el supuesto de que todas las aguas contaminadas son potencialmente peligrosas. Por consiguiente el control sanitario del agua potable, puede efectuarse mediante diferentes técnicas, así tenemos la técnica de fermentación de tubos múltiples (NMP), (ensayo presuntivo, ensayo confirmativo y ensayo completo), mediante la técnica del filtro de membrana (MF), mediante el ensayo de presencia-ausencia (P/A), mediante la prueba (MMO-MUG o Colilert), métodos de detección de enzimas o ReadyCult (EDM), (Romero, 1999).

Las pruebas del (NMP), la del (MF) y las (P/A) requieren un mínimo de dos días adicionales para la separación, confirmación e identificación del microorganismo, de ahí surge la necesidad de utilizar un método rápido, particularmente en emergencias, se debe determinar el indicador bacteriano y patógenos en el agua. (Manafi & Rosmann, 2004).

Actualmente se ha estimulado el desarrollo de métodos rápidos tales como: métodos fluorométricos, detección de Impedancia, detección de Adenosin Trifosfato (ATP), métodos radiométricos inmunológicos, tecnología molecular y métodos de detección de enzimas (EDM) ReadyCult.

#### **4.1 Número más probable**

El método del número más probable es un método multiestadístico, el ensayo consta de tres fases, presuntiva, confirmativa y fase completa, la serie de tubos son inoculados con la muestra, si después de un periodo de incubación presentan gas se consideran positivos. Los tubos con producción de gas son inoculados en otros medios, hasta completar las tres fases, dependiendo del número de tubos con gas, se consulta las tablas estadísticas para determinar el número de coliformes totales y fecales, que prácticamente se determina en las dos primeras fases del ensayo y se reportan como NMP/mL (American Public Health Association, 1992).

En el análisis bacteriológico es importante conocer no solamente que los organismos coliformes están presentes, también es necesario determinar su número más probable (NMP) por unidad de volumen en el agua. El NMP de organismos coliformes en una muestra de agua es la densidad más probable en producir un resultado particular (Romero, 1999).

Dos son las principales pruebas de investigación de gérmenes del grupo coliforme:

presuntivo, y confirmativo.

#### **4.2 Prueba presuntivo**

La prueba de presunción tiene por objeto demostrar en el agua la presencia de bacterias fermentadores de lactosa con desprendimiento de gas. Se realiza mediante la siembra de tres series de tubos con caldo lactosado, (ver anexo 3) que en su interior lleva una campana de Durham invertida que permite acumular gas y leer el tubo, previamente incubado a 37°C (Unda, 2000).

### **4.3 Prueba confirmativa**

Consiste en resembrar cada uno de los tubos positivos de la prueba presuntiva en medios especiales (líquidos o sólidos), en los cuales pueden crecer exclusivamente ciertos gérmenes del grupo coliforme (*Escherichia- Aerobacter*).

El líquido más usado es el caldo lactosado bilis-verde brillante y de los sólidos el medio Levine o el Endo (ver anexo 2) (Unda, 2000).

### **4.4 Conteo total en placa**

El ensayo de conteo en placa sobre agar nutriente, con incubación a 20°C, 35°C o 37°C durante 48.<sup>+3</sup> horas, es útil como prueba de control de rutina de la calidad del agua en los diferentes procesos de tratamiento y como un método de estimación de la calidad sanitaria de la misma.

Además, el ensayo sirve para indicar la eficiencia de la coagulación, filtración y desinfección del agua; para estimar las condiciones sanitarias de tanques, filtros, tubería de distribución, etc., para evaluar la calidad y como indicador de contaminación súbita de nuevas fuentes de abastecimiento de agua (APHA, AWWA, WPCF, 1989).

### **4.5 Técnica del filtro de membrana**

Este método se basa en la filtración de una muestra para encontrar células viables sobre la superficie de una membrana y transferirla a un medio de cultivo apropiado, para después contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL), desarrolladas después de la incubación (NOM-112-SSA1-1994).

Todos los organismos que producen una colonia oscura, generalmente verde-púrpura con brillo metálico después de incubación por 24 horas en medio de cultivo Endo, son consideradas miembros del grupo coliforme. La cantidad de muestra que se ha de filtrar debe ser aquella que produzca crecimiento de cerca de 50 colonias de coliformes y no más de 200 colonias. Los filtros preparados se colocan directamente sobre el medio nutriente y se incuban normalmente, durante 24 horas a 35°C o 37°C.

A diferencia del ensayo con tubos múltiples NMP, el conteo con filtro de membrana es un conteo real y no estadístico, además se obtiene una recuperación más alta de coliformes y el conteo se puede hacer a las 18 o 24 horas.

La técnica del filtro de membrana puede usarse con éxito en el análisis de aguas salinas y tiene sus limitaciones en el análisis de aguas turbias con proporciones de altas concentraciones de bacterias coliformes. (Rigola, 1999).

### **4.6 Ensayo de presencia–ausencia de coliformes**

En el ensayo de presencia –ausencia de coliformes es una modificación del procedimiento de tubos múltiples y se simplifica en utilizar una muestra de 100 mL inoculada en una botella de cultivo, para tener una información cualitativa sobre la presencia o ausencia de coliformes un resultado positivo indica que uno o más organismos coliformes estaban presentes. Para este

ensayo la muestra se incuba a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , y se observa a las 24 y 48 horas para detectar reacción ácida. Cuando existen condiciones ácidas, la fermentación de la lactosa forma un color amarillo en el medio de cultivo.

Entre las ventajas señaladas para este ensayo incluyen a) simplicidad, b) la posibilidad de trabajar un mayor número de muestras. Entre las desventajas: no cuantifica el número de coliformes y se pierde la magnitud de la contaminación (AHPA, AWWA, WPCF, 1986).

#### **4.7 Ensayo con medio MMO-MUG (Colilert)**

El método de MMO-MUG, Colilert ha sido desarrollado recientemente para la determinación simultánea de coliformes totales y *E coli*. Es viable utilizar diluciones en tubos como en el método del (NMP) o inoculando directamente en muestras de 100 mL y se incuba por 24 o 48 horas a  $35^{\circ}\text{C}$ . La lactosa que contiene el medio y la adición de un sustrato cromogénico o fluorogénico, incide en la aparición de un color amarillo en la muestra, debido a la hidrólisis del ortonitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) por la acción de  $\beta$ -galactosidasa.

La apariencia, bajo la luz normal, de una muestra con color amarillo es indicadora de un resultado positivo para coliformes totales, y la fluorescencia bajo luz ultravioleta, es indicadora de un resultado positivo para coliformes fecales (Schets et al, 1993).

#### **4.8 Método de detección de enzimas (EDM) Readycult**

El Readycult es un método rápido para el análisis de agua en la determinación de coliformes totales y fecales, es empleado ampliamente en las industrias de alimentos y farmacéuticas para el control de la calidad del agua que utilizan, en los diferentes procesos de fabricación.

El caso particular del método de detección de enzimas, está basado sobre enzimas específicas. Los medios de cultivos utilizados permiten la detección, enumeración e identificación simultáneamente y pueden llevarse a cabo directamente sobre la placa de aislamiento o en el caldo, evitando el uso de subcultivos y pruebas biológicas adicionales.

Se han desarrollado compuesto que producen colores brillantes o productos fluorescentes cuando actúan sobre enzimas bacterianas o cuando reaccionan con metabolitos bacterianos específicos.

En general, cuatro grupos de compuestos fluorogénicos y cromogénicos pueden distinguirse tales como colorantes fluorogénicos, indicadores de pH-fluorescente, indicadores redox y sustratos de enzimas.

Sustratos de enzimas fluorogénicas son derivados de la coumarina, entre los que se encuentran el 4-metilumbeliferon (4-MU), 7-amido-4-metilcoumarina (7-AMC), o 4-trifluorometilumbeliferon (4-TMU). Existe un amplio rango de sustratos con diferentes rutas metabólicas, de fácil detección visual de los productos de la actividad enzimática utilizando fuentes de luz ultravioleta (uv) y la disponibilidad de fluorómetros para medir la fluorescencia en tubos o en pantallas de multitubos.

El sustrato de enzimas sintéticas es específico en particular para una enzima tales como azúcar o aminoácidos y un compuesto fluorogénico capaz de absorber luz ultravioleta (uv) y emitir luz visible como el 4-trifluorometilumbeliferon (4-MU), es soluble en agua, altamente sensible y específico.

Los sustratos de enzimas cromogénicas son compuestos que actúan como sustratos para enzimas específicas y cambian de color debido a la acción de la enzima. Estos son principalmente derivados de fenoles como o- y p-nitrofenol (ONP-PNP), p-nitroanilina (PNA), indoxil (Y), 5-bromo-4-cloro-3-indolil (X), 5-bromo-6-cloro-3-indol (magenta), 6-cloro-3-indolil (salmon), n-metilindolil (verde) y 5-yodo-3-indolil (yodo), (Manafi, 1998).

El medio de ReadyCult coliforme (ver apéndice 2) contiene el sustrato de enzimas cromogénicas 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-GAL) para la detección de  $\beta$ -galactosidasa (una enzima presente e indicativa del grupo coliforme). La hidrólisis por  $\beta$ -D-galactosidasa libera un compuesto cromogénico X-GAL (azul-indigo) que vuelve el medio de un color amarillo a un color azul-verdoso en el punto final de la reacción. También contiene sustratos de enzimas fluorogénicas 4-metil umbeliferil- $\beta$ -D-glucoronido (MUG) para la detección de  $\beta$ -D-glucoronidasa (una enzima específica para *E.coli*), la hidrólisis de  $\beta$ -D-glucoronidasa libera 4-metilumbeliferon que es fluorescente cuando es expuesto a luz ultravioleta. La fluorescencia indica la presencia de *E. coli* (Merck KGaA, 2000).

Los sustratos cromogénicos son solubles en el agua, estables al calor, específicos para una enzima, no muestran difusión (derivados de indolil) y un amplio rango de sustratos con diferentes colores están disponibles. Algunos sustratos son dependientes de O<sub>2</sub> para que se lleve a cabo la reacción.

#### **4.9 Características de identificación de coliformes totales por el método de detección de enzimas**

La prueba más relevante usada en la enumeración del grupo coliforme es la hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa. La ruptura de este disacárido es catalizada por la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa. Ambos monosacáridos galactosa y glucosa después de ser transformadas por reacciones bioquímicas son metabolizados a través de los ciclos glicolíticos y del citrato. Los productos finales del metabolismo son ácidos y/o dióxido de carbono.

El ensayo (MUG) 4-metil umbeliferil- $\beta$ -D-glucoronido está basado en la actividad enzimática de  $\beta$ -D-glucoronidasa (GUD), la cual actúa sobre el sustrato 4-metil umbeliferil- $\beta$ -D-glucoronido (MUG), para liberar 4-metil umbeliferone (MU), cuando al ser expuesto a luz ultravioleta a (365 nm), MU exhibe una fluorescencia azul brillante fácilmente visible en el medio o alrededor de la colonia. Cerca del 95% de *E. coli* produce GUD, incluyendo especies anaerogénicas, (no productoras de gas). Una excepción es la *E. coli* antiemorrágica (EHEC) 0157:H7, la cual es considerada GUD negativa. (Feng, 1995).

La producción de GUD por otros miembros de la familia Enterobacteriaceae es raro, estudios realizados por (Feng, and Hartman, 1982) encontraron GUD en algunas *Shigellas* entre un (44-58%) y en algunas *Salmonellas* entre un (20-29%). Sin embargo la no detección de alguno de estos patógenos por medio de GUD no es una desventaja que influya en un brote epidémico.



De acuerdo a la definición enzimática de coliformes, en el sistema Readycult, está relacionada con la posesión del gen que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa el cual es responsable de la hendidura a través de la membrana celular de la bacteria y del rompimiento de lactosa en glucosa y galactosa por la enzima  $\beta$ -galactosidasa mediante el mecanismo del operón lactosa (Manafi & Rosmann, 2004), (Duncan, 2004).

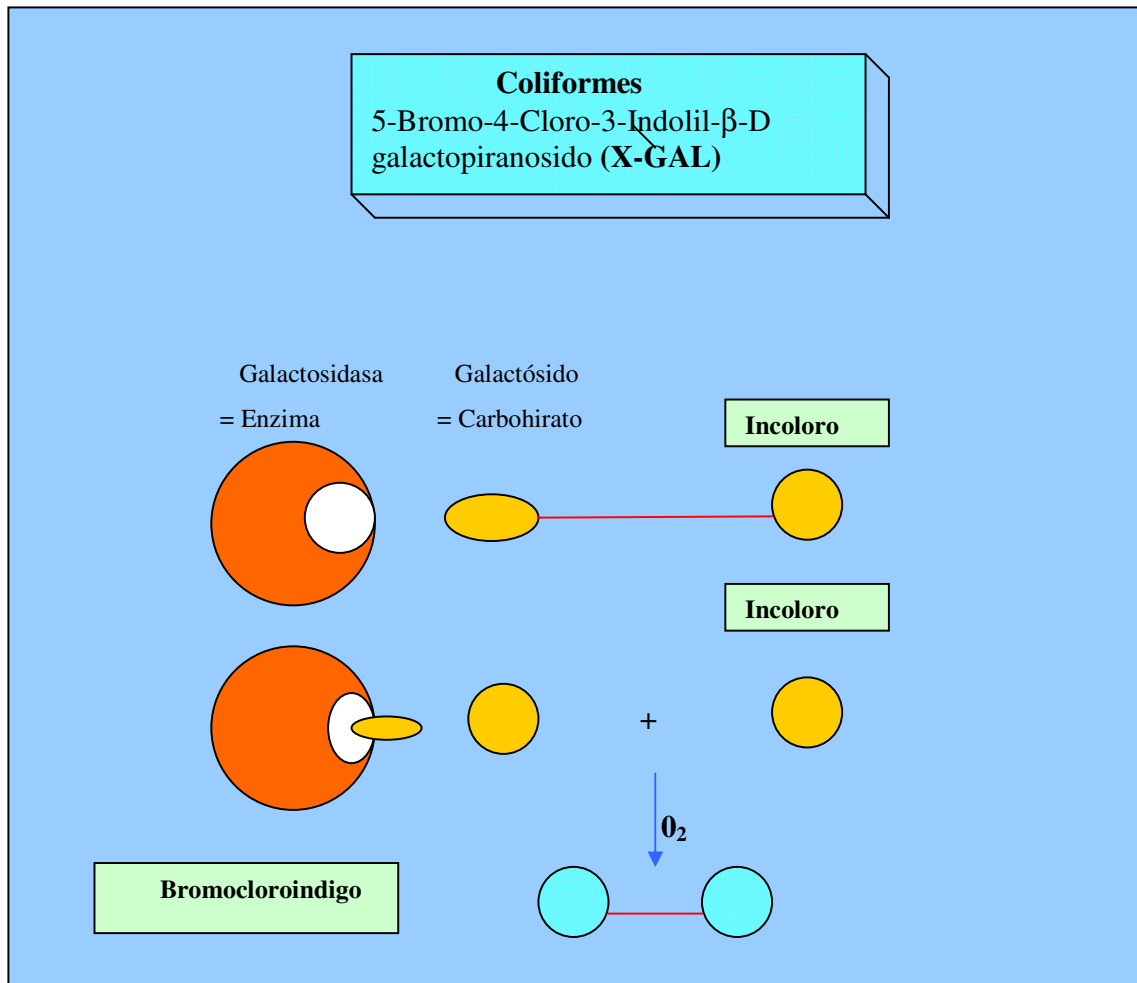
El mecanismo de la utilización de la lactosa requiere de tres enzimas: Una permeasa que favorece el paso de la lactosa a través de la membrana de la bacteria (codificado por el gen Lac Y). Una acetilasa (codificada por el gen Lac A) y una  $\beta$ -galactosidasa, enzima citoplasmática que permite, la hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa (codificada por el gen Lac Z). Estas tres enzimas son inducidas por la lactosa, siendo esta el inductor (Etiene, 2001), (Koneman, 1999).

La determinación de  $\beta$ -galactosidasa es completada por el uso de un sustratos cromogénico tales como o-nitrofenil- $\beta$ -D- galactopiranosido (ONPG), p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (PNPG) 6-bromo-3-indolil- $\beta$ -galactopiranosido (Salmon-Gal), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (XGAL) o 6-bromo-2-naftil- $\beta$ -D-galactopiranosido (BNGAL) y el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactopiranosido (MUGAL).

La combinación de un sustrato cromogénico y uno fluorogénico es usado para la detección simultánea de coliformes totales y *E. Coli*.

La presencia de coliformes totales produce un color azul verdoso después de la hidrólisis de (X-GAL) 5-bromo-4-cloro-indol- $\beta$ -D-galactopiranosido (Fig.1), por la enzima característica  $\beta$ -D-galactosidasa. Con la adición del sustrato cromogénico X-GAL, el cual es hidrolizado por los coliformes y el sustrato fluorogénico MUG que es altamente específico para *E. Coli* es posible la detección simultánea de coliformes y *E.coli* (Manafi, 1998).

Fig 1 Identificación de coliformes totales método del (EDM) “Readycult”



(Merck KGaA, 2000).

#### 4.10 Características de identificación de *Escherichia coli* por el método de detección de enzimas

*E. coli* se caracteriza por la producción de 4-metilumbeliferon (4-MU) después de la hidrólisis de 4-metilumbeliferon-β-D-glucuronido (MUG) por la acción de β-D-glucuronidasa (GUD), el cual muestra fluorescencia azul cuando se irradia con luz (uv), a (365 nm) (Fig. 2).

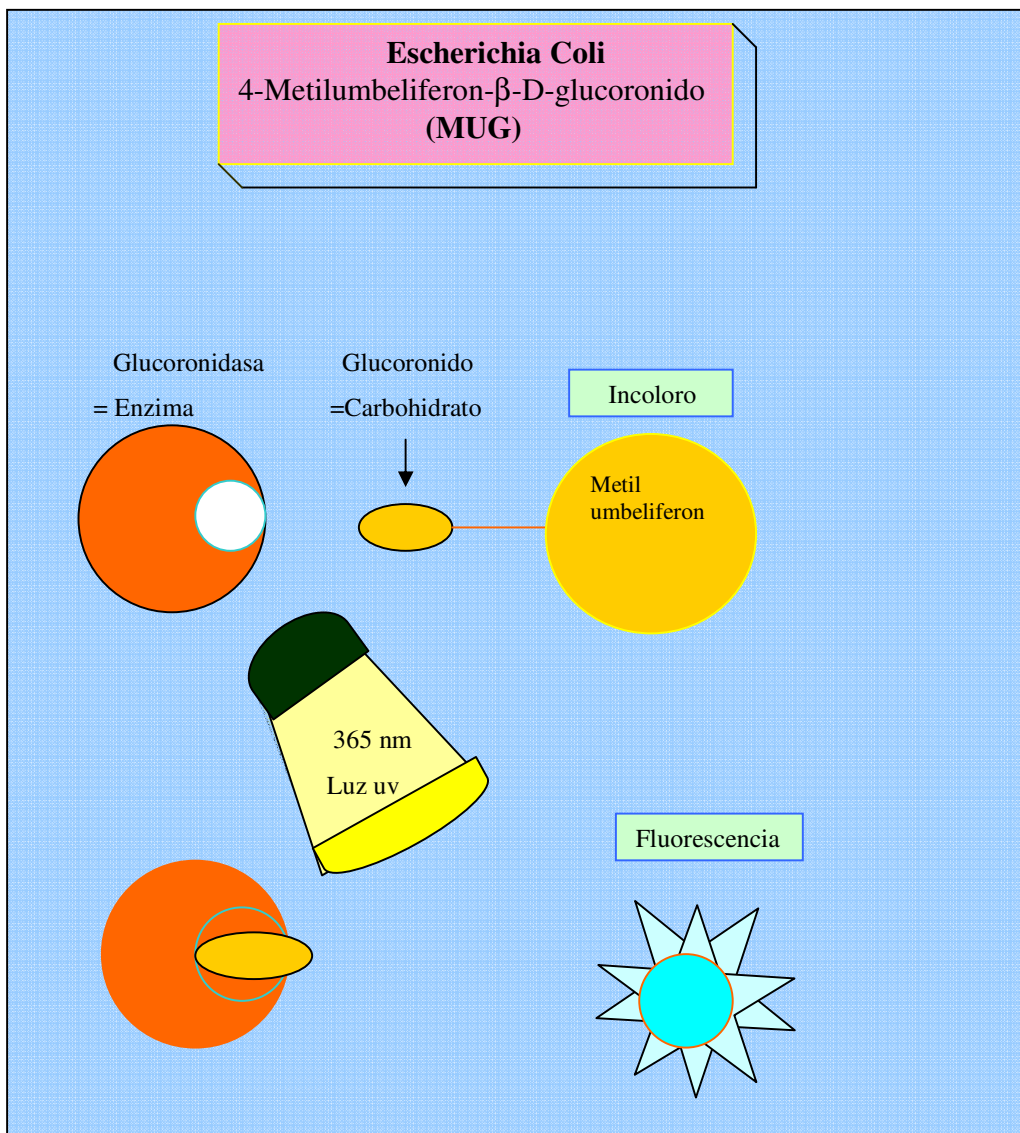
La actividad de la enzima β-D-galactosidasa resulta de la hidrólisis de o-nitrofenol galactopiranosido (ONPG) para Colilert a un (ONP) de color amarillo, y (X-GAL) 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido para Readycult dando un color azul-índigo.

Para confirmar la presencia de *E. coli*, la fluorescencia azul del caldo bajo luz ultravioleta y la producción de indol puede demostrarse usando el reactivo de Kovac, éste forma un anillo color rojo en la superficie del caldo, de este modo se confirma la presencia de *E. coli*.

El indol, un bencipirrol, es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano, con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. La producción de indol es una característica importante para la identificación de muchas especies de microorganismos, de particular utilidad en la diferenciación de *Escherichia coli* (positiva) de los miembros del grupo de *Klebsiella-Enterobacter-Serratia*.

La prueba de indol se basa en la formación de un complejo de color rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído, producto activo de los reactivos de Kovac y Ehrlich. (Koneman, 1999).

Fig. 2 Identificación de *E. coli* método del (EDM) "Readycult"



(Merck KGaA, 2000).

## 5.0 Procesos de potabilización y calidad del agua

Agua purificada envasada, aquella sometida a un tratamiento físico o químico que se encuentra libre de agentes infecciosos, cuya ingestión no causa efectos nocivos a la salud y para su comercialización se presenta en botellones u otros envases con cierre hermético y que además cumple con las especificaciones que se establecen en la norma NOM-041-SSA1-1993.

Se emplea el término potabilización cuando el agua es tratada bajo ciertos procesos físicos, químicos y biológicos hasta volverla apta para consumo humano. La potabilización forma parte del sistema de abastecimiento de agua, un medio de transporte, el tratamiento y la distribución a los puntos de empleo.

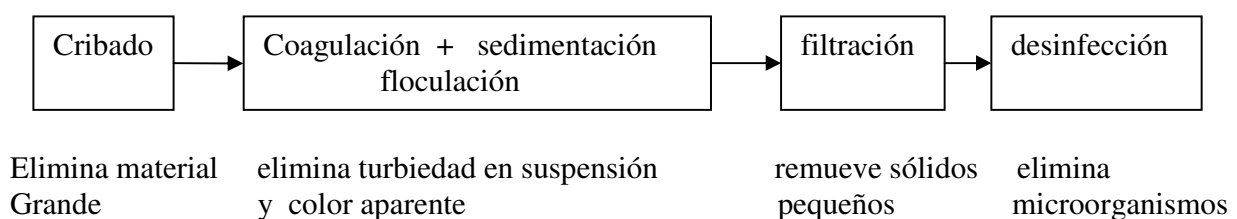
La definición de agua potable es un concepto legal que consiste en especificar una lista de compuestos y asociarlos a un nivel tolerable. En legislaciones de diferentes países se consideran entre 80 y 130 compuestos, a pesar del número de compuestos sintéticos que se manejan con frecuencia es del orden de 70,000. De esta forma, aún cuando se cumplan con las normas de potabilización no se puede asegurar la ausencia de otro contaminante (Jiménez, 2001).

La producción de agua segura, en lo que a enfermedades se refiere requiere precipitación química, adsorción, sedimentación y filtración, con el fin de eliminar formas biológicas, colorantes, sabores, olores, hierro, silicatos y manganeso. El tratamiento mínimo para la producción de agua potable es una filtración directa a través de lechos granulares, pero la coagulación, la sedimentación y la filtración son las principales operaciones unitarias utilizadas normalmente en la producción de agua potable.(American Water Association Research Foundation, 1998).

La calidad del agua no es un término absoluto; es algo que siempre esta en relación con el uso o actividad a que se destina. La manera más sencilla y práctica de estimar la calidad del agua es medir y definir ciertos parámetros físicos, químicos y biológicos establecidos en estándares o normas reguladoras (Canesa & Fernández, 1995).

Los objetivos de la potabilización y calidad son proporcionar agua segura para el consumo humano, y que no implique ningún riesgo de contraer alguna infección gastrointestinal que ponga en riesgo la salud del consumidor. En general, para el agua superficial los procesos típicos de potabilización son los que se muestran en la (Fig. 3).

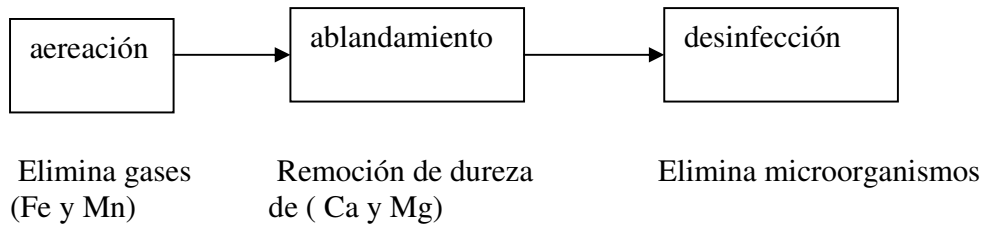
Fig.3 Procesos de potabilización de aguas superficiales



El agua subterránea, al igual que el agua superficial debe ser sometida a una serie de procesos, para volverla apta para consumo humano, como se muestra en la (Fig. 4). Este tratamiento se

deriva principalmente de las características de los sustratos de suelo que atraviesa el agua y de la profundidad de los mantos freáticos donde finalmente se deposita.

Fig. 4 Procesos de potabilización de aguas subterráneas



### 5.1 Cribado y tamizado

Para esta operación se usa un rejilla protectora gruesa con una abertura de 75 mm para evitar que los objetos grandes lleguen hasta la entrada. Las rejillas principales normalmente están dispuestas en forma de una malla con abertura de 5 a 20 mm con una banda sin fin, un disco o un tambor a través del cual tiene que pasar el flujo. El material cribado que se retira del agua, se regresa a la fuente de aguas abajo del punto de extracción.

Las rejillas finas tienen aberturas de 5 mm o menos. Aunque puede llegarse a eliminar entre un 5 y 25% de sólidos en suspensión 40 a 50% se eliminan por sedimentación (Tebbutt, 1999).

### 5.2 Coagulación

El objetivo de la coagulación es facilitar o hacer posible la sedimentación de partículas finamente divididas y esparcidas en el agua.

La coagulación consiste en la neutralización de cargas superficiales mediante adición de electrolitos. Antes de efectuar la floculación es esencial dispersar el coagulante, cuya dosis normal de 30 a 100 mg/L. Esto se lleva a cabo en una cámara de mezclado rápido con una turbina de alta velocidad (Rigola, 1999).

El coagulante es una sal metálica que reacciona con los iones que producen la alcalinidad del agua para producir un flóculo insoluble del hidróxido del metal que incorpore a las partículas coloidales. Mediante la floculación de esta fina precipitación se producen sólidos sedimentables.

El coagulante más popular en el tratamiento de agua es el sulfato de aluminio (alumbre)  $Al_2(SO_4)_3$ . Cuando se añade  $Al^{+3}$  en forma de sulfato, parte de los iones trivalentes se dirigen a la neutralización de las cargas negativas del coloide, simultáneamente, la mayor parte reacciona con agua formando hidróxido insoluble. El hidróxido insoluble atrapa los coloides neutralizados y facilita su decantación (Tebbutt, 1999).

Las partículas formadas en la coagulación, pueden ser aún pequeñas y de baja densidad. El tamaño de las partículas se puede aumentar con la adición de electrolitos, polímeros de moléculas de alto peso molecular y soluble en agua, por disociación electrolítica en el agua, la disociación da formas iónicas múltiples, capaces de actuar de puentes de unión entre las partículas coaguladas (Rigola, 1999).

### **5.3 Floculación**

El término floculación se refiere a la aglomeración de partículas coaguladas en partículas floculentas; es el proceso por el cual una vez desestabilizados los coloides, se provee una mezcla suave de partículas para incrementar la tasa de encuentros o colisiones entre ellas sin romper los agregados preformados (Romero, 1999).

Los coagulantes forman un precipitado floculento que tiene una enorme área de superficie por unidad de volumen. En este precipitado la materia suspendida y coloidal del agua se separa gracias a los fenómenos de atracción electrofísica, adsorción, absorción y aglutinación física (Manual de Aguas para usos Industriales, 1992)

Los cambios bioquímicos producidos en los sólidos coloidales o no sedimentables, eliminan la molécula de agua retenida en ellos. Esta pérdida de agua hace que se aglomeren o floculen formando sólidos más pesados o sedimentables (Fair, 1996).

De la misma manera que la coagulación, la floculación es influenciada por fuerzas químicas y físicas asociadas como la carga eléctrica de las partículas, la capacidad de intercambio, el tamaño y la concentración del floculado, el pH, la temperatura del agua y la concentración de los electrolitos.

La floculación se lleva a cabo en un tanque llamado floculador con algún dispositivo de mezcla suave y lenta, con tiempo de retención relativamente prolongado, durante el cual las partículas se aglomeran incrementan su tamaño y adquieren mayor densidad (Romero, 1999).

### **5.4 Sedimentación**

Es la operación por la cual se remueven las partículas sólidas de una suspensión mediante la fuerza de gravedad; en algunos casos se denomina clarificación o espesamiento. La sedimentación ocurre de maneras diferentes, según la naturaleza de los sólidos, su concentración y su grado de floculación.

En el agua se pueden encontrar partículas llamadas discretas, las cuales no cambian su tamaño, o forma o peso específico cuando se sedimentan las partículas floculentas y precipitantes, en las cuales la densidad y el volumen cambia a medida que ellas se adhieren unas a otras mediante mecanismos de floculación, precipitación, arrastre o barrido. La existencia de diferentes tipos de partículas en concentraciones distintas hace que sea necesario considerar tipos desiguales de sedimentación.

### **5.5 Filtración**

El empleo de filtros tiene por objeto eliminar sustancias de los vertidos que se hacen pasar a través de ellos. El filtrado también se usa para retirar el agua que contiene los lodos y hacer más fácil su tratamiento posterior, en ocasiones se presentan problemas al retirar los materiales que han quedado retenidos, pues a menudo éstos contiene sustancias tóxicas o peligrosas que deben ser tratadas antes de su eliminación (Seoanes, 1995).

## 5.6 Aereación

La aereación se practica en el tratamiento de agua por tres razones: 1) para introducir oxígeno del aire; 2) para dejar que escapen los gases disueltos, como el bióxido de carbono y el ácido sulfhídrico; 3) para eliminar las sustancias volátiles causantes de olor y/o sabor (Fair, 1996).

La aereación del agua de consumo también da lugar a reacciones que producen bióxido de carbono procedente de los compuestos orgánicos más fácilmente oxidables. Otra ventaja de la aereación, es el aumento de contenido de oxígeno del agua, oxida al  $\text{Fe}^{2+}$ , el cual es soluble a  $\text{Fe}^{3+}$ , formando hidróxidos insolubles y queda como sólido sedimentado.

Sí la concentración del oxígeno disuelto es de 7 a 10 ppm, la del bióxido de carbono de 3 a 5 ppm, y no hay ácido sulfhídrico el proceso de aereación puede calificarse como eficaz. (Bair, 2001).

## 5.7 Ablandamiento

La remoción de ciertos materiales inorgánicos solubles se puede lograr al agregar reactivos adecuados para convertir las impurezas solubles en precipitados insolubles que pasan así a la fase de floculación y se puedan remover por sedimentación.

Para una dureza debida al calcio y con la forma de carbonato. La adición de cal equivalente a la cantidad de bicarbonato presente formará carbonato de calcio insoluble. El agua ablandada se satura con carbonato de calcio.

Para todas las formas de dureza debida al calcio, al agregar ceniza de soda cálcica ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), la dureza no debida a carbonato se convierte en  $\text{CaCO}_3$  el cual precipita. (Tebbutt, 1999).

## 5.8 Desinfección

La desinfección es un proceso en el cual los organismos patógenos son destruidos o inactivados. Este proceso puede llevarse a cabo mediante diferentes tratamientos fisicoquímicos, incluyendo: aplicaciones directas de energía térmica, radiación ultravioleta gamma, rayos X, radiación ultrasónica y la adición de reactivos químicos; este último método es el más común en la desinfección de aguas y aguas residuales.

La presencia y generación de enzimas dentro de la célula bacteriana sugiere que el mecanismo de desinfección implique al menos dos pasos: 1) penetración del desinfectante a través de la pared celular; y, 2) reacción con la enzima dentro de la célula.

### 5.8.1 Cloro

A temperaturas y presiones ordinarias el  $\text{Cl}_2$  es un gas amarillo verdoso, que inflama las membranas mucosas y es muy tóxico. El cloro es un oxidante fuerte que se suministra en forma gaseosa o como soluciones de hipoclorito de sodio o calcio y reacciona con el agua para formar ácido clorhídrico y ácido hipocloroso, este último es el principal desinfectante en el agua. El  $\text{Cl}_2$  reacciona con la mayoría de los elementos y compuestos, principalmente materiales orgánicos. Se

ha observado que al aumentar el pH del agua se debe aumentar la dosificación de cloro libre y el tiempo de contacto, para mayor efectividad de desinfección, Desde el punto de vista operacional, el Cl<sub>2</sub>, el ácido hipocloroso y el ión hipoclorito constituyen el cloro disponible libre (Weber, 1979).

Los compuestos de cloro más utilizados son el hipoclorito de sodio (NaOCl), y el dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>). El ácido hipocloroso tiene una efectividad como desinfectante de 40 a 80 veces mayor que el hipoclorito. Si se utilizan sales de hipoclorito en lugar de cloro gas, la hidrólisis de esta sal depende del pH del medio y es a pH < 7,5 cuando la reacción de hidrólisis será importante, transformándose el hipoclorito en ácido hipocloroso, la desinfección utilizando cloro, se lleva a cabo por la oxidación de los grupos terminales de los aminoácidos de las células bacterianas y de las cápsulas proteicas de los virus.

En la práctica la cloración del agua potable implica el suministro de 2 a 3 mg/L de cloro, con tiempo de contacto de 15 a 30 min., además de garantizar el adecuado gradiente de velocidad para el mezclado. La dosis adecuada debe dejar al menos 0.2 mg/L de cloro libre residual después de 15 min. en tiempo de contacto. (Jiménez, 2001).

El uso de cloro y sus compuestos son ampliamente reconocidos para la desinfección de las aguas por las siguientes razones:

- Se obtiene fácilmente como Cl<sub>2</sub> gas, (líquido o polvo), es barato.
- Es fácil de aplicar debido a su solubilidad relativamente alta (700 mg/L.)
- Deja un residuo en solución no dañino para el hombre y protege los sistemas de distribución del agua.
- Es muy tóxico para la mayoría de los microorganismos por inhibir sus actividades metabólicas.

Tiene algunas desventajas como ser un gas venenoso que requiere un manejo cuidadoso, causa problemas de sabor y olor, especialmente en presencia de fenoles.

El cloro es un poderoso agente oxidante que se combina rápidamente con agentes reductores y compuestos orgánicos no saturados. 1 mg/L de cloro oxida 2 mg/L de DBO.

El ácido hipocloroso es el desinfectante más efectivo. Así, la desinfección más efectiva ocurre en niveles ácidos de pH= 2 (Sans & Ribas, 1999).

La disolución acuosa del cloro contiene muy poco cloro gas. Sí el pH del agua es alto, se produce la ionización del ácido débil hipocloroso para dar ión hipoclorito con menos capacidad de penetrar en las membranas de las bacterias a causa de su carga eléctrica (Bair, 2001).

### **5.8.2 Ozono**

El ozono al igual que el cloro se utiliza en los procesos de purificación del agua. El ozono (O<sub>3</sub>) no puede almacenarse o transportarse debido a su bajo tiempo de vida, por tanto debe generarse “in



situ”, mediante una descarga eléctrica, de unos 20,000 voltios, en aire seco. El aire cargado de ozono resultante, es burbujado a través del agua, siendo unos diez minutos suficiente tiempo de contacto. Se cree que su principal acción es debida a los radicales libres de hidróxilo e hidroperoxi, los cuales se producen cuando el ozono reacciona con el agua.

El ozono reacciona en el agua con algunos compuestos de bromo en particular con los que contienen el grupo carbonilo, como el formaldehído y otros aldeídos de bajo peso molecular, lo cual conduce a la formación de compuestos orgánicos. También el ozono reacciona con el ion bromato ( $\text{BrO}_3$ ), que es un compuesto cancerígeno, el cual reacciona posteriormente con la materia orgánica para producir compuestos organobromados tóxicos (Bair, 2001).

## 5.0 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la comercialización de aguas purificadas envasadas en diferentes presentaciones se ha incrementado, varios problemas se deben superar para cumplir con el suministro de agua, entre ellos se puede mencionar la distribución pública, que es insuficiente para abastecer la demanda de consumo y uso de la población, la sobreexplotación de los mantos acuíferos, aunado a esto, el incremento de la densidad poblacional en el Distrito Federal y zona metropolitana, se suma al principal problema, la escasez del agua a nivel nacional. Esta situación ha permitido el surgimiento de un número importante de purificadoras de agua con diferentes capacidades de producción, distribución y sobre todo lo más importante la calidad sanitaria que estas presentan y cuando no cumplen con la normatividad sanitaria representan un problema de salud pública para la población consumidora.

La NOM-041-SSA1-1993, es específica en cuanto a la calidad sanitaria del agua purificada envasada, para que se cumpla este requisito, se complementa con el uso de la NOM-112-SSA1-1994 que se refiere a la determinación de bacterias coliformes totales y fecales por el método del (NMP) como requisito deben estar ausentes en el agua de consumo humano. Existen otros métodos como el del filtro de membrana, (MF), el de presencia / ausencia (P/A), estas técnicas requieren un mínimo de 72 horas para asegurar que están presentes o ausentes los coliformes, seguido de otras 48 horas para la confirmación e identificación de la bacteria por medio de pruebas bioquímicas y en algunas ocasiones la realización de pruebas serológicas. La utilización de tres o cuatro días para obtener el resultado de la calidad del agua hace necesario utilizar un método rápido, particularmente en emergencias se debe determinar inmediatamente el indicador patógeno causante de la contaminación biológica del agua o del alimento.

En el caso del método de detección de enzimas (EDM) “Readycult”, permite la detección e identificación de coliformes totales y *E.coli* simultáneamente en 24 horas, sin pruebas bioquímicas adicionales, no requiere preparación de medios de cultivo, esto permite obtener resultados en menos de 48 horas para dar el diagnóstico de la contaminación y resolver el problema de origen.

El PROY-NOM-181-SSA1-1998, en su apéndice informativo A. Se refiere a la determinación de Coliformes Totales, Método del Sustrato Cromogénico, aprobado por el Comité Standard Methods 1992, donde hace referencia al principio del sustrato cromogénico y fluorogénico en la identificación de las enzimas  $\beta$ -D-galactosidasa para coliformes y  $\beta$ -D-glucoronidasa para *E. coli*, esta información hace relevante la necesidad de implementar nuevas metodologías, porque afirma que harán las pruebas correspondientes para evaluar la efectividad del método del Sustrato Cromogénico en muestras de agua de beber y alimentos.

Estas son las razones de obtener resultados por otro método en la determinación de coliformes totales y fecales, en agua de beber, con la finalidad de hacer evaluaciones más rápidas y sean tan confiables como las emitidas por el método del NMP, y a la vez sirva como primera opción de uso en caso de brotes epidémicos por el consumo de agua o alimentos contaminados.

## **7.0 HIPÓTESIS**

Los resultados del análisis microbiológico del agua envasada en (garrafón de 19 litros) obtenidos por los métodos: del Número Más Probable (NMP) y Detección de Enzimas (EDM) “Readycult”, son comparables en la determinación de coliformes totales y fecales, la diferencia en uso de material, reactivos y tiempo de operación definirá alguna diferencia, fundamentalmente la sensibilidad y especificidad de alguno de los dos métodos evidenciará los resultados que se obtengan.

- **OBJETIVOS**

- **Objetivo General**

Comparar los resultados del análisis microbiológico realizado a muestras de agua purificada envasada en garrafones de 19 litros, determinar la sensibilidad y especificidad de los métodos del NMP y EDM para detectar coliformes totales y fecales.

- **Objetivos Particulares**

- Determinar los Coliformes Totales y Fecales por el Método del NMP
- Determinar los Coliformes Totales y Fecales por el Método del (EDM) “Readycult”
- Comprobar la calidad microbiológica de las muestras de agua analizadas de acuerdo a los límites establecidos en la NOM-041-SSA1-1993.

## 8.0 MATERIAL

Se utilizaron 40 muestras de agua purificada envasada en garrafrones de 19 litros de diferentes marcas obtenidas en el periodo de mayo de 2004 a diciembre de 2004

### 8.1 Cristalería

- Agitador de vidrio
- Cajas Petri 100 \* 120 mm.
- Campanas Durhan
- Frascos con tapa de rosca 150 mL
- Frascos goteros 25 mL
- Frascos ambar 400 mL
- Matraz Erlenmeyer de 500 y 1000 mL
- Probeta de 100 mL
- Pipetas graduadas de 1.0, 2.0 y 10.0 mL
- Portaobjetos de 26 \* 76 m m , 1.1 a 1.2 mm de espesor
- Tubos de ensaye 20 \* 200 mm (50 mL) con tapón de rosca
- Tubos de ensaye 16 \* 150 mm (20 mL) con tapón de rosca
- Tubos de ensaye 10 \* 85 mm (8 mL) con tapón de rosca
- Vasos de precipitado de 250 y 400 mL

### 8.2 Equipo

- \* Balanza Analítica “ sauter”, Tipo 414/13, Serie 14991
- \* Microscopio Compuesto “Olimpus”, modelo CH20BIMF110
- \* Autoclave ALL American modelo 1925x
- \* Horno Pasteur “Rios Rocha” modelo RSCF-43
- \* Refrigerador “Forma Scientific”
- \* Lámpara de luz ultravioleta modelo UVL-56 Marca Blak. Ray

### 8.3 Medios de cultivo

- \* Agar Mac-Conkey (Merck)
- \* Agar para métodos estándar (Bioxon)
- \* Agar nutritivo (Bioxon)
- \* Caldo Rojo de Fenol con Lactosa (Dibco)
- \* Caldo-verde-brillante-bilis-lactosa (Merck)
- \* Agar LIA= lisina hierro agar (Bioxon)
- \* Caldo KIA= agar hierro de Kligler
- \* Medio OF = medio para oxidación-fermentación
- \* Caldo VP = Voges Proskauer
- \* Caldo SIM= Citrato de Simons
- \* Caldo UREA= urea
- \* Agar TSI= triple azúcar hierro

#### 8.4 Reactivos

*	Alcohol etílico	Pureza 99.8%, Marca Baker Analiyzed
*	Acetona	Marca Fermont
*	Cristal violeta	Marca Sigma
*	Safranina	Marca Sigma Pureza 85%
*	Peróxido de hidrógeno al 30% P/V	Productos Químicos Monterrey
*	Indicador Rojo de metilo	Marca Sigma
*	Lugol	Marca Sigma
*	Aceite de inmersión	Marca Sigma
*	Tiosulfato de sodio. 5H <sub>2</sub> O	Marca Baker Analyzed Pureza 99.5%
*	Reactivos de Erlich o Kovacs	
*	Tiras reactivas de oxidasa (N,N,N'-Tetrametil -P-fenilendiamina) (Merck)	
*	Hidróxido de potasio al 40% P/V	

## 9.0 MÉTODO

El estudio se realizó en 40 muestras de agua purificada envasada en garrafón de 19 litros de diferentes marcas y se utilizó simultáneamente el método del NMP y el método del (EDM) Readycult. El motivo de haber trabajado las muestras sencillas por el método del (EDM), se debe a que así lo define la técnica, existe también la alternativa de usar este mismo método en series de tubos como en el NMP, pero por cuestiones de tiempo, dinero, espacio, material etc., se eligió la técnica de inocular los 100 mL de muestra en una sola botella de cultivo, considerando que este volumen es representativo, respecto a las diluciones que se hicieron en el método del NMP, y que finalmente no se altera la veracidad de la técnica. Las diluciones de tres tubos es reconocida por (Food and Drug Administration (FDA) en (Bacteriological Analytical Manual, 1998) como se muestra en la tabla No. 5

La otra razón de haber trabajado muestras sencillas por un método y doble por el otro, es la compra de material de vidrio, garrafones de agua de diferentes marcas, medios de cultivo entre ellos el Readycult, el paquete es para trabajar 20 muestras solamente. (No contando con ningún financiamiento el costo económico lo asumió el interesado del trabajo).

La relación de las muestras analizadas se encuentran en la tabla 4

Tabla 4 Relación de claves de aguas analizadas (garrafón de 19 litros)

Núm de muestra	Clave	Núm de muestra	Clave
1	QS	21	ADM
2	VI	22	ACC
3	PSA	23	APD
4	DP	24	AB
5	AW	25	APS
6	AP	26	AMP
7	AE	27	PAH
8	PA	28	AET
9	APD	29	ABW
10	ALF	30	PVC
11	APV	31	PCA
12	ALA	32	PW
13	AQP	33	ASA
14	ASP	34	PDW
15	HPA	35	PWH
16	APR	36	APM
17	AQS	37	APP
18	APW	38	AQV
19	AAL	39	WHE
20	AEP	40	ATR

El significado de las claves se encuentran en el anexo 1

La parte experimental se realizó de la siguiente manera: los tres primeros pasos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Química Inorgánica “Tratamiento de Aguas” de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1 y los cuatro pasos siguientes se realizaron en el Laboratorio de Diagnóstico Clínico de la misma Facultad.

- \* Preparación de la muestra
- \* Inoculación de los medios de cultivo con la muestra
- \* Observaciones y lecturas
- \* Aislamiento de bacterias
- \* Pruebas bioquímicas primarias
- \* Pruebas bioquímicas secundarias
- \* Identificación de las bacterias aisladas utilizando tablas de identificación

### **9.1 Preparación de material y medios de cultivo**

El material de cristalería utilizado en la parte experimental se lavó con detergente y enjuagó con agua destilada.

Las pipetas y cajas Petri fueron esterilizadas en autoclave a (15 libras/de presión y 121°C por 15 minutos), envueltas en papel previamente, a las pipetas se les colocó un tapón de algodón en la parte superior.

Los medios de cultivo se prepararon según las indicaciones especificadas en los marbetes de cada frasco del medio (anexo 2).

Los desechos de las muestras en estudio se esterilizaron en autoclave (15 libras/de presión , 121°C por 15 minutos).

La parte experimental y análisis de muestras se realizó bajo las normas de esterilidad y asepsia restringiendo el acceso a personas ajenas y trabajando en lugar cerrado para evitar corrientes de aire.

### **9.2 Preparación de las muestras**

Los frascos fueron esterilizados antes de su uso, a (121°C, 15 lb /de presión por 15 minutos). Se utilizó como agente decolorante el tiosulfato de sodio al 10%, 0.2 mL por c/100mL, para neutralizar los residuos de halógenos y para inhibir la acción bactericida de éstos.

Al adicionar el tiosulfato de sodio se homogenizó con movimientos rotatorios derecha-izquierda y viceversa, dejando reposar la muestra por 15 minutos. El estudio microbiológico se inició inmediatamente después de esta etapa, bajo los siguientes procedimientos (Hammer, 1986).

### **9.3 Determinación de bacterias mesófilas aerobias**

Para esta determinación se utilizó el agar cuenta estándar por ser un medio que permite una excelente recuperación de las bacterias: éstas se dispersan en el agar líquido, que al solidificar las inmoviliza, de modo que al crecer dará origen a una colonia. Las placas consideradas

estadísticamente válidas son las que presentan de 30 a 300 colonias, éstas se reportan como unidades formadoras de colonias o UFC/mL. (Laboratorio de Microbiología Sanitaria del I.P.N., ENCB; (1985).

La determinación se hizo por duplicado inoculando 1 mL de muestra a cada caja petri y adicionando 20 mL del medio fundido y mantenido a 45<sup>0</sup>C se mezcló perfectamente con movimientos rotatorios en ambos sentidos sobre una superficie lisa. Es importante que no transcurran más de 20 minutos entre la colocación de las muestras en la caja y la adición del medio.

Las placas se dejan solidificar y se incuban invertidas a 35<sup>0</sup>C durante 24 horas. Se cuentan todas las colonias presentes, utilizando cuenta colonias (Hitchins and Feng, 1995).

#### 9.4 Pruebas bacteriológico para determinar la calidad sanitaria del agua

La detección de coliformes fecales consta de cuatro etapas

##### 9.4.1 Prueba presuntiva

Consiste en sembrar una serie de tubos de fermentación con caldo lactosado rojo de fenol como se indica en la tabla 5

Tabla 5. Series de tubos para la prueba presuntiva

Serie de	Número de tubos	Volumen del medio (mL)	Concentración del medio	Volumen de muestra
15 tubos	5	10	doble	10 mL
	5	10	Sencillo	1.0 mL
	5	10	Sencillo	0.1 mL
9 tubos	3	10	Doble	10 mL
	3	10	Sencillo	1.0 mL
	3	10	Sencillo	0.1 mL
7 tubos	5	10	Doble	10 mL
	1	10	Sencillo	1.0 mL
	1	10	Sencillo	0.1 mL

La serie de tubos inoculados con la muestra se incuban a 37<sup>0</sup>C por 24 – 48 horas (Fig. 5), los tubos se leen a las 24 horas para verificar si hubo producción de ácido y gas, esto se comprueba por el vire de color del medio de rojo a amarillo, el desplazamiento de medio en la campana de Durhan (Fig. 6).



## Numeración de coliformes - coliformes. fecales - *E. coli* (NMP)

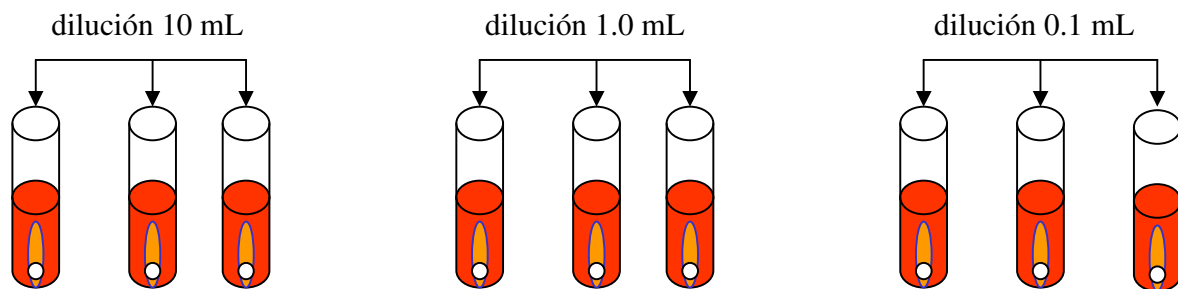


Fig. 5 Serie de tubos inoculados con muestra y CLRF incubar a 35 – 37<sup>0</sup>C / 24 – 48 horas

CLRF= Caldo Lactosado Rojo de Fenol

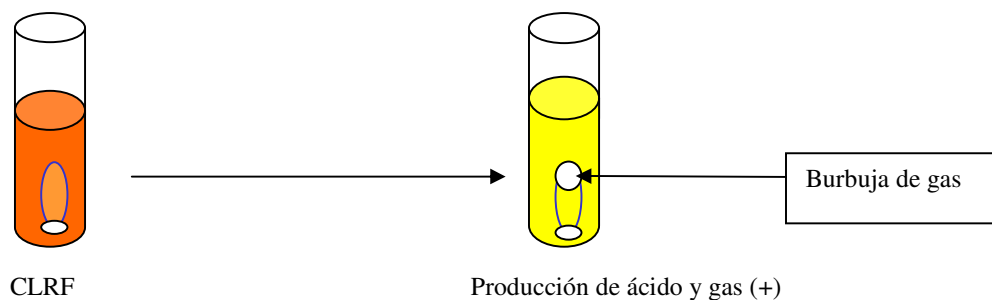


Fig. 6 Prueba presuntiva positiva

Cuando no se produce ácido y gas en los tubos después de 48 horas de incubación éstos se consideran negativos.

La aparición de gas proveniente de la fermentación de la lactosa hace suponer la existencia de coliformes. El número de tubos que presenten gas, se consideran positivos. Sin embargo es necesario confirmar si se trata de coliformes, debido a que el caldo lactosado no es muy selectivo, por lo tanto pueden desarrollarse otros fermentadores de lactosa no productoras de gas.

### 9.4.2 Prueba confirmativa

Resembrar de cada uno de los tubos positivos de la prueba presuntiva, dos tubos con 10 mL de Caldo Lactosado-Bilis-Verde-Brillante (CLVB), e incubar un tubo a 37<sup>0</sup>C y otro a 44<sup>0</sup>C de 24 a 48 horas y se consideran positivos si presentan gas en cualquier cantidad y producción de ácido, esto confirma la presencia de Coliformes fecales (Fig. 7).

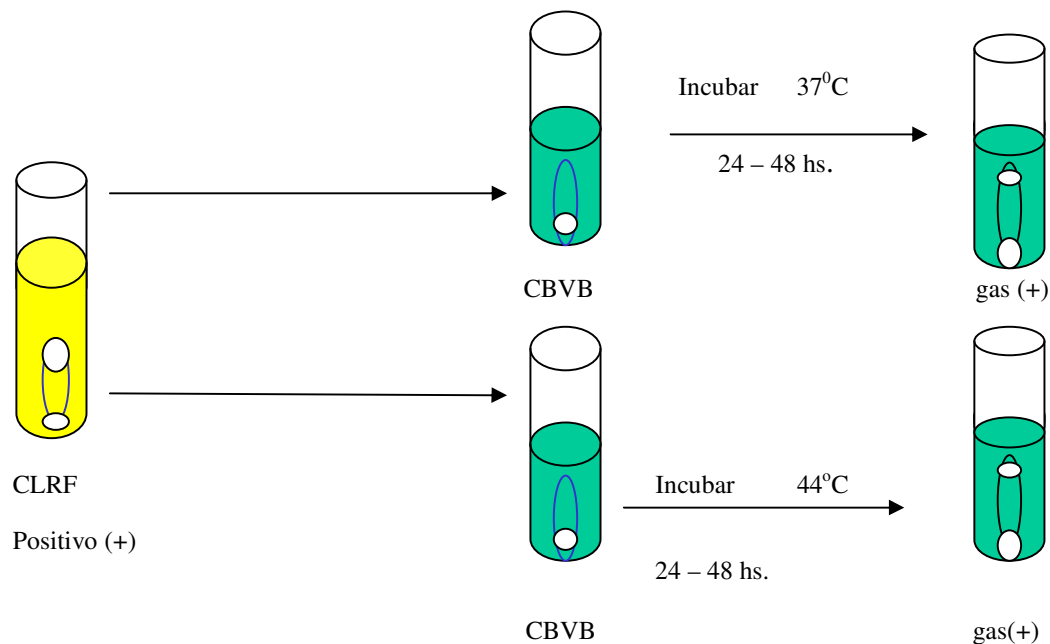


Fig. 7 Confirmación de la presencia de *E. coli* en medio selectivo CBVB, incubado a 37 y 44°C hay formación de gas prueba (+)

### 9.4.3 Prueba completa

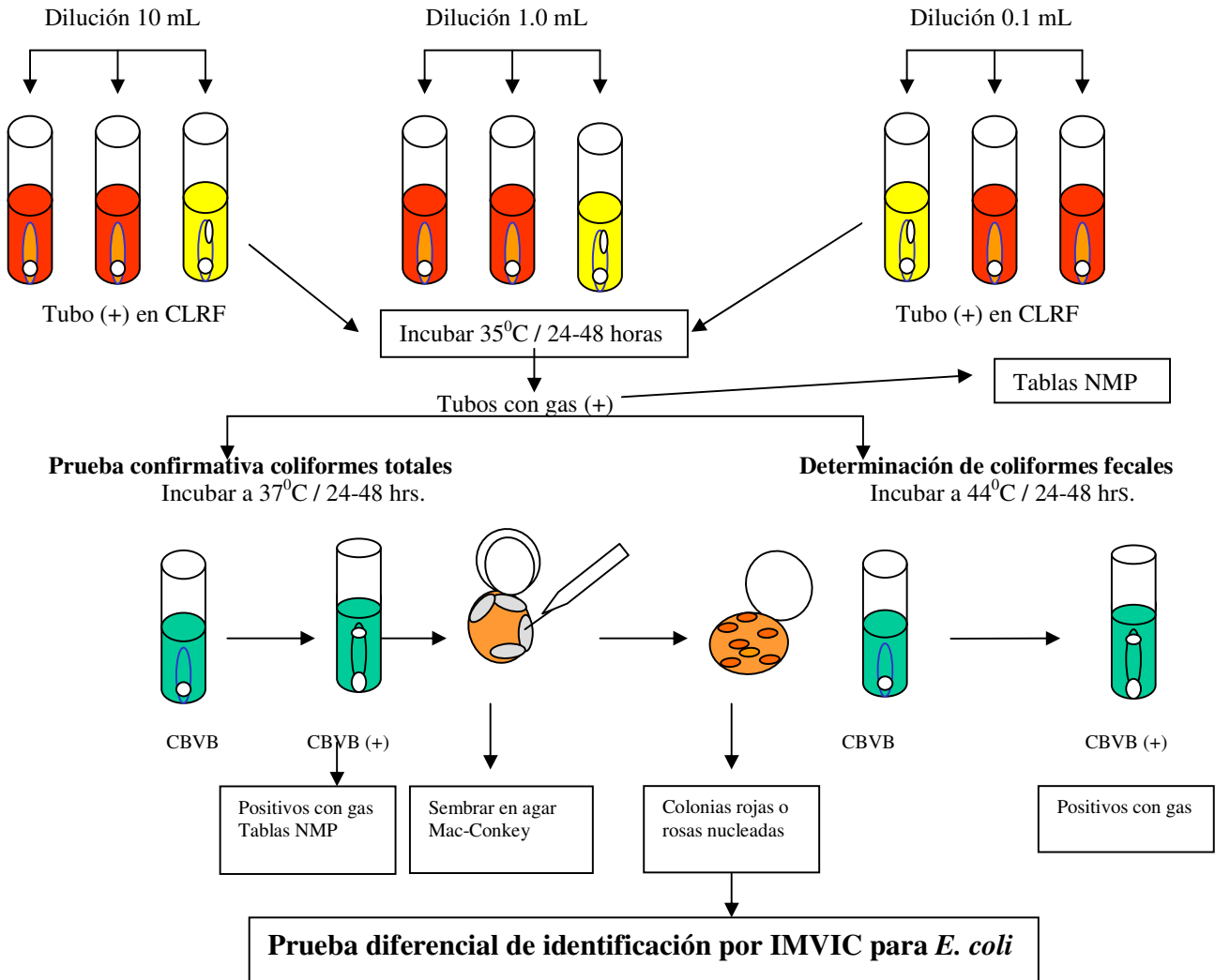
Consiste en verificar la presencia de coliformes de acuerdo a las características que definen a éstas, se procede al aislamiento en agar Mac-Conkey a partir de los tubos (+) de la prueba presuntiva incubar a 37°C durante 24 a 48 horas, después del crecimiento definido de las colonias se hace una tinción de Gram y se observa al microscopio, para comprobar la presencia de bacilos cortos Gramnegativos, no esporulados (Fig.8), (Hammer. 1995).

### 9.4.4 Prueba diferencial

Tiene por objeto distinguir entre *Escherichia coli* y otros coliformes no fecales posibles de detectarse en el agua no provenientes de heces si no del suelo, plantas u otros ambientes. Para ello se llevan a cabo pruebas bioquímicas primarias (Gram, Catalasa, Oxidasa, Motilidad) algunas pruebas secundarias adicionales.

## MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE

### Prueba presuntiva



- Examen microscópico (Gram)
  - **Indol: Caldo triptofano** 37°C / 24 hrs.
  - **Voges-Proskauer**  
medio MRVP 37°C / 48 hrs.  
KOH y α-naftol
  - **Rojo de metilo**  
medio MRVP 37°C / 24 hrs.  
rojo de metilo (+)
  - **Citrato medio de Simons** 37°C / 7
- Identificación: IMVIC**  
(++ - -)

Fig.8 Pruebas diferenciales para la identificación de *E. coli* aislada por el método del NMP

Interpretación: Todos los medios de cultivo que fermenta la lactosa con la producción de gas en 48 horas a 35°C aparecen como Gramnegativos no esporulados no formadores de esporas dan patrones de **IMVIC** como se muestra en la tabla 6. (Mehlman & Andrews, 1978). Op City. Encontraron que el examen microbiológico es apropiado cuando un mínimo de 8-10 reacciones bioquímicas son realizadas para una adecuada diferenciación, debido a que el estatus de las enterobacterias es más complejo y en particular las bacterias coliformes.

Tabla 6 Patrones de **IMVIC** en la identificación de *E. coli* por pruebas bioquímicas &

Especie	Indol	Rojo de Metilo	Voges-Proskauer	Citrato
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-
<i>Escherichia freundii</i>	-	+	-	(+ / -)
	+	+	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	+	(+ / -)
	+	-	+	+
<i>Klebsiella ozaenae</i>	-	+	-	-
	+	+	-	+

## 9.5 Método de Detección de Enzimas (EDM) “Readycult”

La definición de bacterias coliformes totales en el sistema “EDM” está basada en la presencia de  $\beta$ -D- galactosidasa y de  $\beta$ -D- glucuronidasa de *E. coli*. Actualmente un número de diferentes medios de cultivo están basados en pruebas de enzimas. Estos medios permiten la enumeración e identificación simultánea de coliformes totales y *E. coli*, con la adición del sustrato cromogénico 5- bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-GAL) el cual es hidrolizado por las coliformes y el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil - $\beta$ -D-glucuronido (MUG) que es altamente específico para *E.coli*.

### 9.5.1 Procedimiento

\* Agregar 50 ó 100 mL de la muestra de agua a un frasco estéril, éste puede ser desechable de 100 a 200 mL de capacidad con tapa de rosca. **Precaución: ¡Si utiliza frascos de vidrio, no debe ser fluorescente por si mismo!**

\* Tomar el sobre que contiene el reactivo y golpearlo suavemente para asegurar que los gránulos estén en el fondo del paquete, doblar la parte superior del sobre hasta que se rompa, (no tocar la zona de apertura del paquete), además realizar la inoculación de la muestra en zona previamente esterilizada para evitar posible contaminación.

\* Agregar el contenido a la muestra de agua. Cerrar el frasco y agitar hasta disolver completamente los gránulos.

\* Incubar de 18 a 24 horas a una temperatura de 35 a 37<sup>0</sup>C. Si se incuba a temperatura ambiente (de 20 a 25<sup>0</sup>C ) el tiempo de incubación se incrementará hasta 48 horas.

\* **Interpretación de Resultados para la Detección de Coliformes Totales /*E. coli***

\* **Negativo:** No hay cambio de color. El caldo permanece ligeramente amarillo.

\* **Positivo** a coliformes Totales. Cambio de color del caldo a azul verdoso. Se considera positiva la prueba si se produce cualquier cambio de color incluso solo en la sección superior del caldo de cultivo, confirmando la presencia de coliformes (reacción X-GAL). En prueba positiva no hay decoloración al agitar.

\* *E. coli* se verifica el color azul verdoso de los frascos positivos, comprobando la fluorescencia utilizando una lámpara de ultravioleta de onda larga a 365 nm, la fluorescencia azul clara indica presencia de *E. coli* (Fig. 9).

La bacteria *E. coli* que posee las enzimas - $\beta$ -glucuronidasa y triptofanasa. En Readycult coliformes, estas enzimas son capaces de producir un color azul-verde fluorescente bajo luz ultravioleta a (365 nm) y una reacción positiva de indol si se forma un anillo de color rojo en la superficie del caldo al adicionar el reactivo de Kovacs' o Erlich's, esto debe ser positivo tanto la fluorescencia como el indol (MERCK KGaA, 2000).

Presencia de *E. coli*: **Fluorescencia (+), Indol (+)**

## MÉTODO DE (EDM) "READYCULT" COLIFORMES

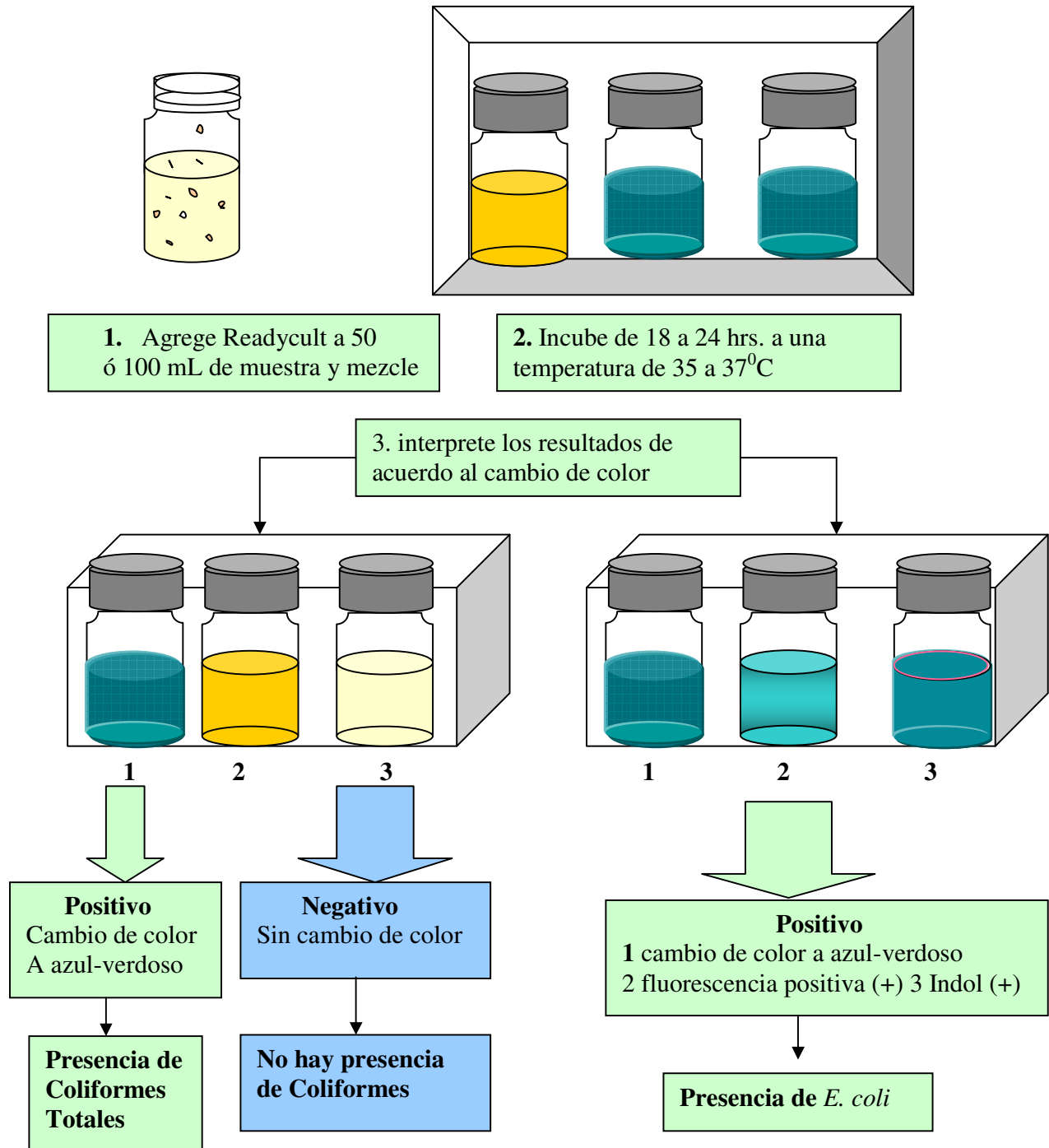


Fig. 9 Identificación de coliformes totales y *E. coli* por el método del (EDM) Readycult a través de reacciones enzimáticas y usando uv a 365 nm.

## 10 RESULTADOS

Los resultados obtenidos al hacer el análisis bacteriológico de coliformes totales y fecales por los métodos del NMP de la NOM-112-SSA1-1994 y el EDM en 40 marcas de agua y como un parámetro adicional la determinación de microorganismos mesófilos de acuerdo a lo establecido en la NOM-041-SSA1-1993. Las marcas de agua en estudio fueron producidas y distribuidas principalmente al Norte del Estado de México que comprende los Municipios de Cuautitlán Izcalli, Cuautitlán de Romero Rubio, Tlalnepantla y Ecatepec.

El análisis de las muestras se hizo en el periodo de junio de 2004 a diciembre del mismo año. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7 y 8, de donde se puede hacer las observaciones, así tenemos que para coliformes totales por el método del NMP, un total de 10 muestras dieron resultados positivos para esta prueba y en 5 muestras del mismo lote se encontró con coliformes fecales. Respecto a los resultados utilizando el método del EDM “Readycult” en 15 muestras se encontraron coliformes totales y 10 muestras dieron resultados positivos para coliformes fecales. Por último el análisis de las mismas 40 marcas de agua respecto a los microorganismos mesófilos un total de 11 muestras tanto a 25°C como a 37°C se encontró con UFC/100 mL que rebasan ampliamente los límites permitidos y estipulados en la NOM-041-SSA1-1993.

En las tablas de contingencia 9, 10, 11 y 12, se presentan los valores utilizados para calcular la Sensibilidad y Especificidad de cada método en estudio, y que cada uno con sus particularidades nos dan los porcentajes (tabla 13), que nos permite hacer la comparación de la conveniencia o no de tomar en cuenta el método del EDM “Readycult”, como una primera opción de uso en el análisis de aguas envasadas para consumo humano.

Tabla 7 Resultados del análisis de 40 muestra de agua envasada en garrafón de 19 L. en la determinación de coliformes totales y fecales por los métodos del NMP y EDM “Readycult” y como prueba adicional el análisis de microorganismos mesófilos.

Número de muestras	Clave de muestras	Producción de gas y cambio de color CLRF			Coliformes Totales NMP/100 mL	P. Confirmativa Coliformes Fecales En CBVB 37°C y 45°C	Mesófilos				Readycult 37°C			
		T[D] 10mL	T[S] 1mL	T[S] .1mL			25°C Caja 1 y 2		37°C Caja 1 y 2		color Azul/verde	Fluorescencia	Indol	
1	QS	-	-	-	-	-	-	33	40	-	-	-	-	-
2	VI	-	-	-	-	-	-	83	70	-	-	-	-	-
3	PSA	-	-	-	-	-	-	301	301	30	8	-	-	-
4	DP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	AW	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-
6	AP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	AE	-	-	-	-	-	-	80	20	-	-	-	-	-
8	PA	1	-	-	4	+	+	5	2	-	-	+	+	+
9	AD	-	-	-	-	-	-	42	35	73	85	-	-	-
10	ALF	-	-	-	-	-	-	301	301	301	301	+	+	+
11	APV	-	-	-	-	-	-	301	301	301	301	+	+	-
12	ALA	-	-	-	-	-	-	10	13	-	-	-	-	-
13	AQP	-	-	-	-	-	-	3	2	9	3	-	-	-
14	ASP	-	-	-	-	-	-	46	-	-	-	-	-	-
15	HPA	3	3	3	1100	+	+	301	301	301	301	+	+	+
16	APA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	AQS	3	3	2	1100	+	-	301	301	301	301	+	+	+
18	WA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	AAL	-	-	-	-	-	-	60	40	20	-	-	-	-
20	AEP	3	3	2	1100	+	-	30	3	-	-	+	+	-
21	ADM	3	3	2	1100	+	+	301	301	301	301	+	+	+
22	ACC	-	-	-	-	-	-	9	1	10	1	-	-	-
23	APD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
24	AB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	APS	-	-	-	-	-	-	7	-	2	-	-	-	-
26	AMP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	PAH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	AET	1	-	-	4	+	+	-	-	-	-	+	+	+
29	ABW	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	PVC	-	-	-	-	-	-	301	301	301	301	-	-	-
31	PCA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	PW	3	3	3	1100	+	-	5	-	301	301	+	+	+
33	ASA	3	3	2	1100	+	-	301	150	301	301	+	+	+
34	PDW	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
35	PWH	-	-	-	-	-	-	301	301	301	301	+	+	-
36	APM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	APP	-	-	-	-	-	-	-	2	-	6	-	-	-
38	AQV	3	3	3	1100	+	+	301	301	301	301	+	+	-
39	WHE	-	-	-	-	-	-	-	60	-	13	-	-	-
40	PAA	3	2	1	150	+	-	301	301	301	301	+	+	-

Nota: T[D]= tubo concentración doble  
T[S]= tubo concentración sencilla  
CLRF Caldo lactosado rojo de fenol  
Readycult= Método rápido  
(+) positivo



Tabla 8 Resumen de resultados de 40 muestras de agua trabajadas por los métodos del NMP y EDM "Readycult" en la determinación de coliformes totales, fecales y microorganismos mesófilos

Número de muestras	Clave de muestras	Producción de gas y cambio de color CLRF			Coliformes Totales NMP/100 mL	Coliformes Fecales En CBVB 37°C y 45°C		Promedio de UFC/ mL		(EDM) Readycult 37°C		
		T[D] 10mL	T[S] 1mL	T[S] .1mL		25°C	37°C	color Azul/verde	Fluorescencia	Indol		
1	QS	-	-	-	-	-	-	36		-	-	-
2	VI	-	-	-	-	-	-	76		-	-	-
3	PSA	-	-	-	-	-	-	301	19	-	-	-
4	DP	-	-	-	-	-	-			-	-	-
5	AW	-	-	-	-	-	-		10	-	-	-
6	AP	-	-	-	-	-	-			-	-	-
7	AE	-	-	-	-	-	-	50		-	-	-
8	PA	1	-	-	4	+	+	3		+	+	+
9	AD	-	-	-	-	-	-	38	79	-	-	-
10	ALF	-	-	-	-	-	-	301	301	+	+	+
11	APV	-	-	-	-	-	-	301	301	+	+	-
12	ALA	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-
13	AQP	-	-	-	-	-	-	2	6	-	-	-
14	ASP	-	-	-	-	-	-	23	-			
15	HPA	3	3	3	1100	+	+	301	301	+	+	+
16	APA	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-
17	AQS	3	3	2	1100	+	-	301	301	+	+	+
18	WA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	AAL	-	-	-	-	-	-	50	10	-	-	-
20	AEP	3	3	2	1100	+	-	17	-	+	+	-
21	ADM	3	3	2	1100	+	+	301	301	+	+	+
22	ACC	-	-	-	-	-	-	5	5	-	-	-
23	APD	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
24	AB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	APS	-	-	-	-	-	-	3	1	-	-	-
26	AMP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	PAH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	AET	1	-	-	4	+	+	-	-	+	+	+
29	ABW	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	PVC	-	-	-	-	-	-	301	301	-	-	-
31	PCA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	PW	3	3	3	1100	+	-	2	301	+	+	+
33	ASA	3	3	2	1100	+	-	301	301	+	+	+
34	PDW	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
35	PWH	-	-	-	-	-	-	301	301	+	+	-
36	APM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	APP	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-
38	AQV	3	3	3	1100	+	+	301	301	+	+	-
39	WHE	-	-	-	-	-	-	30	6	-	-	-
40	PRT	3	2	1	150	+	-	301	301	+	+	

Nota: T[D]= tubo concentración doble  
T[S]= tubo concentración sencilla  
CLRF Caldo lactosado rojo de fenol  
Readycult= Método rápido  
(+) positivo

Tabla 9 Tabla de contingencia que muestran los valores de predicción para calcular la Sensibilidad y Especificidad por el método del NMP en la determinación de coliformes totales

	EDM (+)	EDM (-)	Muestras totales
NMP (+)	A 10	B 5	15
NMP (-)	C 5	D 20	25
	15	25	40

$$S = \frac{A}{A+C} = \frac{10}{10+5} = \frac{10}{15} = 0.66 = 66\% \quad E = \frac{D}{B+D} = \frac{20}{5+20} = \frac{20}{25} = 0.8 = 80\%$$

S = Sensibilidad

E = Especificidad

A = muestras (+) con coliformes totales método del NMP y (+) por el EDM

B = muestra (-) sin coliformes totales método del NMP y (+) por el EDM

C = muestras (+) con coliformes totales método del NMP y (-) por el EDM

D = muestras (-) sin coliformes totales método del NMP y (-) por el EDM

Tabla 10 Tabla de contingencia que muestran los valores de predicción para calcular la Sensibilidad y Especificidad por el método del NMP en la determinación de coliformes fecales.

	NMP (+)	NMP (-)	Muestras totales
EDM (+)	A 5	B 1	6
EDM (-)	C 4	D 30	34
	9	31	40

$$S = \frac{A}{A+C} = \frac{5}{5+4} = \frac{5}{9} = 0.55 = 55\% \quad E = \frac{D}{B+D} = \frac{30}{1+30} = \frac{30}{31} = 0.96 = 96\%$$

S = Sensibilidad

E = Especificidad

A = muestras (+) con coliformes fecales método del NMP y (+) por el EDM

B = muestra (-) sin coliformes fecales método del NMP y (+) por el EDM

C = muestras (+) con coliformes fecales método del NMP y (-) por el EDM

D = muestras (-) sin coliformes fecales método del NMP y (-) por el EDM

Tabla 11 Tabla de contingencia que muestran los valores de predicción para calcular la sensibilidad y especificidad por el método del EDM en la determinación de coliformes totales.

	EDM (+)	EDM (-)	Muestras totales
NMP (+)	A 10	B 5	15
NMP (-)	C 1	D 24	25
	11	29	40

$$S = \frac{A}{A+C} = \frac{10}{10+1} = \frac{10}{11} = 0.9 = 90\% \quad E = \frac{D}{B+D} = \frac{24}{5+24} = \frac{24}{29} = 0.82 = 82\%$$

S = Sensibilidad

E = Especificidad

A = muestras (+) con coliformes fecales método del EDM y (+) por el NMP

B = muestra (-) sin coliformes fecales método del EDM y (+) por el NMP

C = muestras (+) con coliformes fecales método del EDM y (-) por el NMP

D = muestras (-) sin coliformes fecales método del EDM y (-) por el NMP

Tabla 12 Tabla de contingencia que muestran los valores de predicción para calcular la Sensibilidad y Especificidad por el método del EDM en la determinación de coliformes fecales.

	EDM (+)	EDM (-)	Muestras totales
NMP (+)	A 4	B 5	9
NMP (-)	C 1	D 30	31
	5	35	40

$$S = \frac{A}{A+C} = \frac{4}{4+1} = \frac{4}{5} = 0.8 = 80\% \quad E = \frac{D}{B+D} = \frac{30}{1+30} = \frac{30}{31} = 0.96 = 96\%$$

S = Sensibilidad

E = Especificidad

A = muestras (+) con coliformes fecales método del EDM y (+) por el NMP

B = muestra (-) sin coliformes fecales método del EDM y (+) por el NMP

C = muestras (+) con coliformes fecales método del edm y (-) por el NMP

D = muestras (-) sin coliformes fecales método del NMP y (-) por el EDM

Tabla 13 Porcentajes de los valores de sensibilidad y especificidad, obtenidos al determinar coliformes totales y fecales por los métodos del NMP y el EDM en 40 muestras de agua envasada en garrafón de 19 L.

Método	Sensibilidad Coliformes Totales %	Especificidad Coliformes Totales %	Sensibilidad Coliformes Fecales %	Especificidad Coliformes Fecales %
NMP	66	80	55	96
EDM	90	82	80	96

## 11.0 ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se trabajaron un total de 40 muestras de agua envasada en garrafón de 19 litros de diferentes marcas comerciales, fueron evaluados los parámetros de coliformes totales y coliformes fecales por los métodos de NMP NOM-112-SSA1-1994 y el Método de Detección de Enzimas (EDM), “Readycult” y como prueba adicional la detección de microorganismos mesófilos a 25 y 37°C, de acuerdo a lo expresado en la tabla 2 muestra los límites permisibles de éstos microorganismos para aguas de consumo humano.

De acuerdo a la definición de la NOM-041-SSA1-1993, el agua purificada envasada, es aquella que se encuentra libre de agentes infecciosos, cuya ingestión no cause efectos nocivos a la salud y para su comercialización se presenta en botellones u otros envases con cierre hermético y que además cumpla con las especificaciones establecidas en la misma Norma. Tabla 2

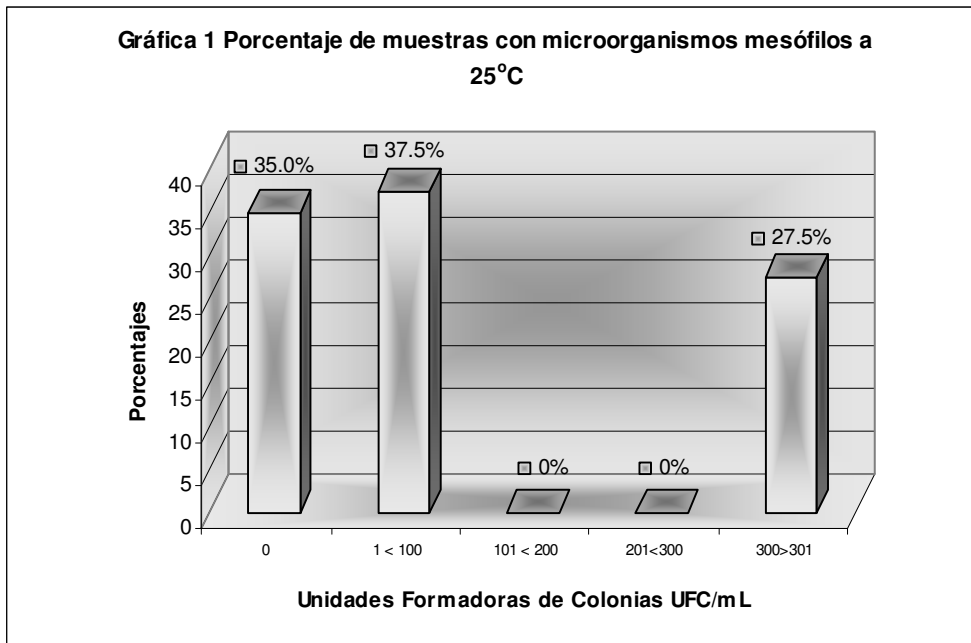
La determinación de microorganismos mesófilos en agua embotellada en garrafones de 19 litros, se hizo con la finalidad de comprobar si es apta para consumo humano; como lo establece la mencionada norma, la cual limita a < 100 UFC/mL. Esta consideración que enmarca un parámetro de calidad para el agua de consumo humano debe prevalecer como requisito indispensable de normatividad sanitaria, considerando la amplia gama de microorganismos mesófilos presentes en el medio ambiente, y que de manera reiterada han incidido en infecciones gastrointestinales.

En la tabla 14 se muestra el comportamiento que tuvieron las muestras de agua al hacer el estudio de los mesófilos a 25°C y 37°C, mediante la técnica de vaciado en placa, las muestras se trabajaron por duplicado.

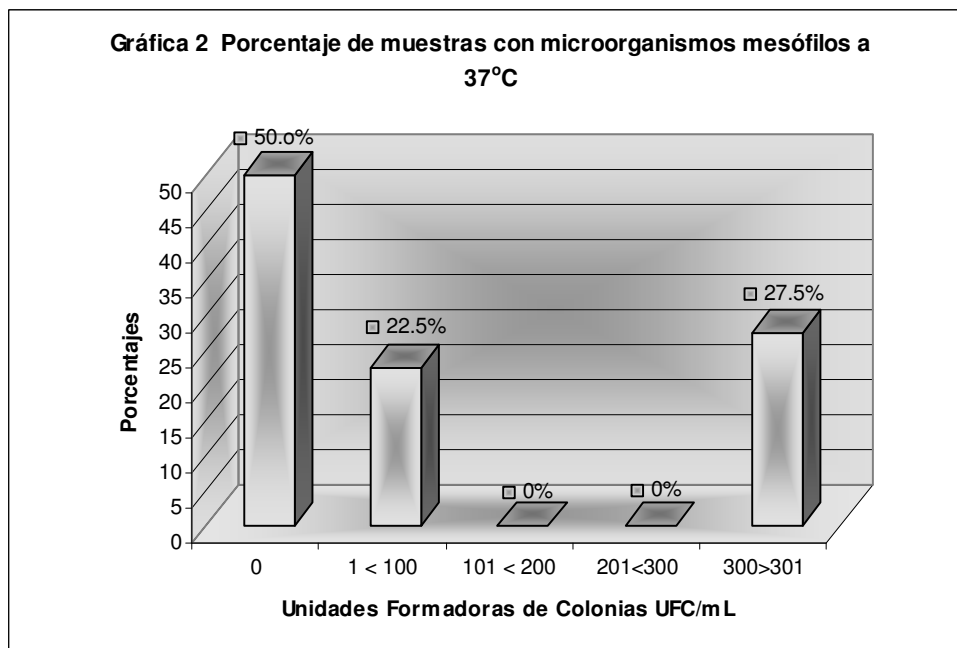
Tabla 14 Porcentaje de microorganismos mesófilos encontrados en las muestras analizadas

RANGOS UFC/mL	UFC/mL		% de UFC/mL		muestras totales con y	% de muestras totales con y	% de muestras totales
	25°C	37°C	37°C	37°C	sin UFC/mL	sin UFC/mL	Sin UFC/mL
	No. de muestras	%	No. de muestras	%	No. de muestras	%	%
0	14	35	20	50	21	52.5	47.5
1 < 100	15	37.5	9	22.5	17	42.5	57.5
101 < 200	0	0	0	0	0	0	0
201 < 300	0	0	0	0	0	0	0
300 > 301	11	27.5	11	27.5	12	30	70

De las 40 muestras de agua trabajadas envasadas en garrafón de 19 litros 14 muestras a 25°C no presentaron microorganismos mesófilos, estas muestras representan el 35% tabla 14, gráfica 1. En la tabla 14 y gráfica 1 se observa que en el rango de 1 < 100 UFC/mL con 15 muestra y un porcentaje de



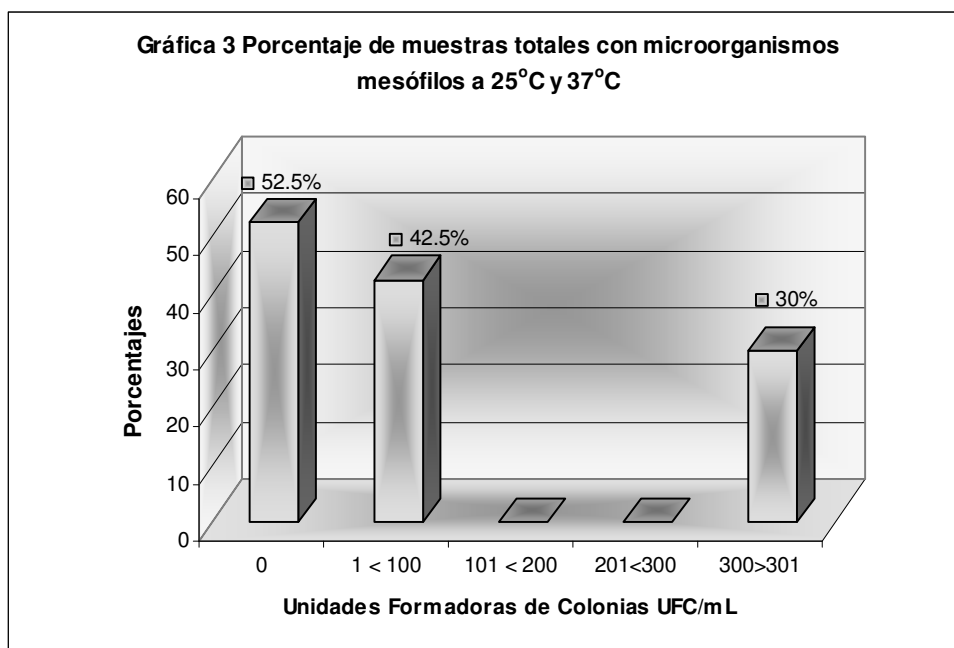
37.5%, de acuerdo a lo establecido en la NOM-041-SSA1-1993, estas muestras son aptas para consumo humano por que no rebasan los límites establecido como contaminadas de m.o. mesófilos, al sumar las muestras de los rangos de 0 a 100 y de 1<100 UFC/mL, obtenemos la cantidad de 29 muestras que representan el 72.5%. También en la tabla 14 se reportan los mesófilos a las dos temperaturas de incubación y en la tabla 8 se reportan los promedios de éstos microorganismos, que evidencian que estas marcas si son aptas para el consumo humano.





A 37°C hay 20 muestras con cero UFC/mL, y equivalen al 50% del total, también hay 9 muestra que están en el rango de 1<100 con un 22.5% de UFC/mL, tabla 14, gráfica 2. En la tabla 7 se puede consultar los valores de las muestras que dieron positivo para mesófilos a esta temperatura. También en la tabla 8 se reportan los promedios de las muestras con mesófilos tanto a 25°C como a 37°C.

En la tabla 14, gráfica 3 se reportan los porcentajes totales de las muestras analizadas a (25°C) como a (37°C). Así tenemos que un 52.5% de muestra tienen cero UFC/mL, un 42.5% tienen menos de 100 UFC/mL y los rangos de 101<200, 201<300 reportan cero UFC/mL. El 30% corresponden a 12 muestras que están en el rango de 300>301 UFC/mL. Las marcas que dieron resultados positivos para mesófilos fueron: SA, ALF, APV, HPA, AQS, ADM, PVC, PW, ASA, PWH, AQV y ATR. El nombre de las claves se encuentra en el anexo 1. Cabe hacer la observación correspondiente que 11 muestras tanto a 25°C como a 37°C, coinciden los resultados positivos, pero la muestra con clave SA a 25°C y la muestra con clave PW a 37°C sólo dieron positivo en las respectivas temperaturas. Por tal razón al hacer la suma correspondiente nos dan 12 muestras en el rango mencionado.



Dentro de las bacterias autóctonas que se han identificado se encuentran los géneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Acinetobacter* y *Cytophaga*.

La microflora alóctona o contaminante, puede surgir durante el proceso de embotellado del agua envasada. Existen tanto especies saprófitas como patógenas humanas. Entre los microorganismos patógenos se encuentran las bacterias de los géneros *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Clostridium*, *Feromonas*, *Vibrio* y *Pseudomonas sp* (considerándose a la *Pseudomonas aeruginosa*

como el principal representante de este último género), (Leclers, H., 1992), (González, M. I., 1993).

El hecho de que 12 muestras del total de las 40 analizadas, presenten crecimiento de m.o. mesófilos; y que rebasan ampliamente los límites establecidos por la NOM-041-SSA1-1993, no quiere decir que alguna de las muestras, que presentaron  $100 < \text{UFC/mL}$ , no contengan algunos m.o. patógenos por lo que se debe considerar este tipo de contaminación, debido a la amplia gama de m.o. reportados como mesófilos aislados de muestras de agua envasadas en presentaciones de 1 litro y garrafones de 19 litros. (Avilés & Zamudio, 1996), identificaron por el método microestandarizado SensIdent Merck algunas especies como *Citrobacter freundii* 10.52%, *Shigella species* 2.62% y *Acinetobacter iowffii* 7.82%, potencialmente patógenos a los humanos. Otros m.o. mesofílicos que directamente afectan la salud de los humanos son *Shigella*, *Enterobacter*, y *Klebsiella* 2.63% algunos m.o. son patógenos oportunistas nosocomiales como *Pseudomonas* y *Citrobacter*, la presencia de algunos de éstos m.o. en muestras de agua envasada de consumo humano hace interesante considerar su importancia sanitaria.

Respecto a la determinación de coliformes totales, los resultados que se obtuvieron se enlistan en las tabla 15 y 8, ahí se puede observar el número de muestras que dieron resultados positivo en la prueba presuntiva en caldo lactosado rojo de fenol (CLRF). En este medio se observan algunas características propias de los coliformes totales como desplazamiento del líquido dentro de la campana de Durham, cambio de color del medio de rojo a amarillo (Fig. 6), debido a la acidez y la disminución del pH, por la presencia de gas ( $\text{CO}_2$ ). Estas características observadas hicieron evidente la presencia de coliformes totales o fermentadores de lactosa, en la prueba presuntiva, ver tabla 8, anexo 3, donde se puede comprobar cuantas coliformes estaban presentes en cada muestra.

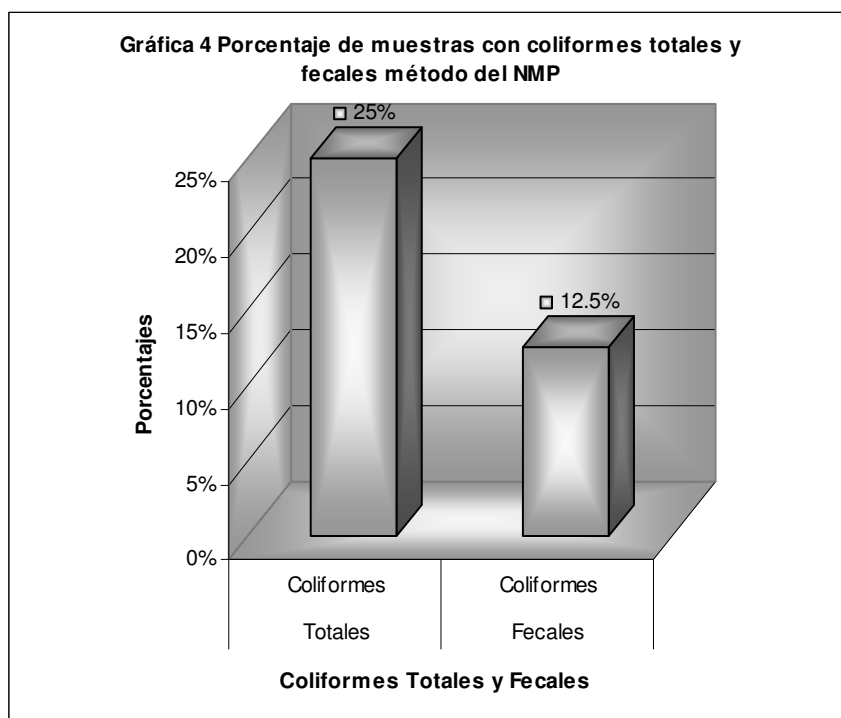
El porcentaje correspondiente a las 10 muestras que resultaron positivas, equivale aun 25%, tabla 15, tabla 8 y en la gráfica 4 y gráfica 6 se representan estos porcentajes a la prueba evaluada, ver anexo 3 para corroborar cuantos NMP contiene cada muestra positiva, considerando lo establecido en la NOM-041-SSA1-1993, estas muestras no son aptas para consumo humano, debido a que solo admite un máximo de 2 NMP/100mL ó 2 UFC/mL, para estar dentro de los límites permisibles de calidad sanitaria.

También en la tabla 15, gráfica 4 se reportan las muestras que dieron positivo para coliformes fecales y fueron 5 muestras correspondiéndoles un 12.5% del total de las 40 muestras analizadas en la prueba confirmativa en Caldo Bilis Verde Brillante, por su selectividad este medio solo permite el crecimiento de ciertos m.o. del grupo coliforme e inhibe el desarrollo de otros microorganismos, estos resultados también se pueden corroborar en la tabla 7 y 8 y en el anexo 3 se puede consultar el número de coliformes fecales correspondientes a estas muestras que dieron resultados positivos para esta prueba.

Haciendo otra observación en la determinación de Coliformes totales y fecales por el método del NMP los resultados presentados en la tabla 15 gráfica 4, se observa que en la prueba presuntiva dieron positiva 10 muestras, para coliformes totales, de las cuales 7 coinciden con la contaminación de mesófilos con más de 300 UFC/mL, y estas mismas marcas presentan los límites máximos de contaminación de NMP. Ver Anexo 1 y Anexo 3.

Tabla 15 Relación de marcas de agua que dieron positivo para coliformes totales y fecales por el método del NMP

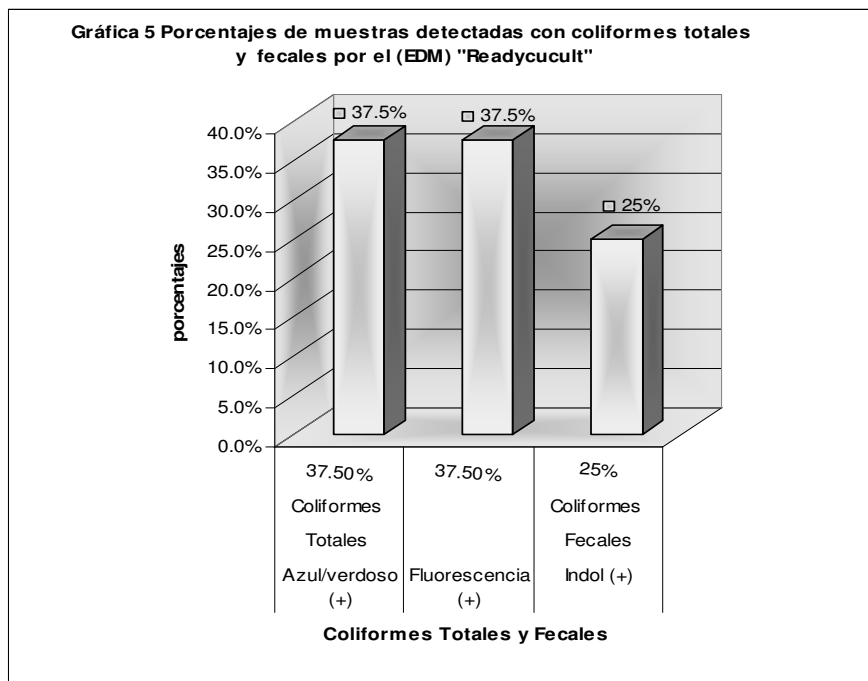
clave	Prueba Presuntiva producción de gas y cambio de color en CLRF			Coliformes Totales NMP/100mL %	Prueba Confirmativa Coliformes Fecales producción de gas en	Prueba Confirmativa Coliformes Fecales producción de gas en
	t(10mL)	t(1mL)	t(,1mL)		CBVB 37 <sup>0</sup> C %	CBVB 45 <sup>0</sup> C %
				25	22,5	12.5
PA	1	0	0	4	+	+
HPA	3	3	3	1100	+	+
AQS	3	3	2	1100	+	-
AEP	3	3	2	1100	+	-
ADM	3	3	2	1100	+	+
AET	1	0	0	4	+	+
PW	3	3	0	240	+	-
ASA	3	3	2	1100	+	-
AQV	3	3	3	1100	+	+
ATR	3	2	1	150	-	-



De los datos de la tabla 15, las 10 muestras que se encontraron más de 2 NMP/100 mL, son las marcas: PA, HPA, AQS, AEP, ADM, AET, PW, ASA, AQV y ATR, estas son las muestras que presentaron coliformes totales y las marcas que dieron positivo para coliformes fecales fueron 5, ver tabla 15, gráfica 4 y gráfica 7, las marcas son las siguientes: PA, HPA, ADM, AET y AQV.

Tabla 16 Resultado del análisis microbiológico realizado a las muestras de agua que dieron positivo por el (EDM) "Readycult" para coliformes totales y fecales

Clave	(EDM) Readycult Coliformes Totales		(EDM) Readycult	(EDM) Readycult Coliformes Fecales
	color	Incubación	Fluorescencia (+)	Indol (+)
	Azul/verdoso (+) %	37°C	%	%
	37.5		37.5	25
PA	+		+	+
ALF	+		+	+
APV	+		+	-
HPA	+		+	+
AQS	+		+	+
AEP	+		+	-
ADM	+		+	+
APD	+		+	+
AET	+		+	+
PW	+		+	+
ASA	+		+	+
PDW	+		+	+
PWH	+		+	-
AQV	+		+	-
ATR	+		+	-



La identificación de *E. coli* con medios que contienen  $\beta$ -glucuronidasa 4-metilumbeliferil  $\beta$ -D-glucuronidasa, ha demostrado su efectividad en diferentes muestras de alimentos, muestras clínicas y aguas embotelladas (Hartman 1989; Moberg 1985; Feng & Hartman 1982) y Dunningan & Rice, 1993) Op City. obtubieron un 96.6% de muestras positivas de *E. coli* por el

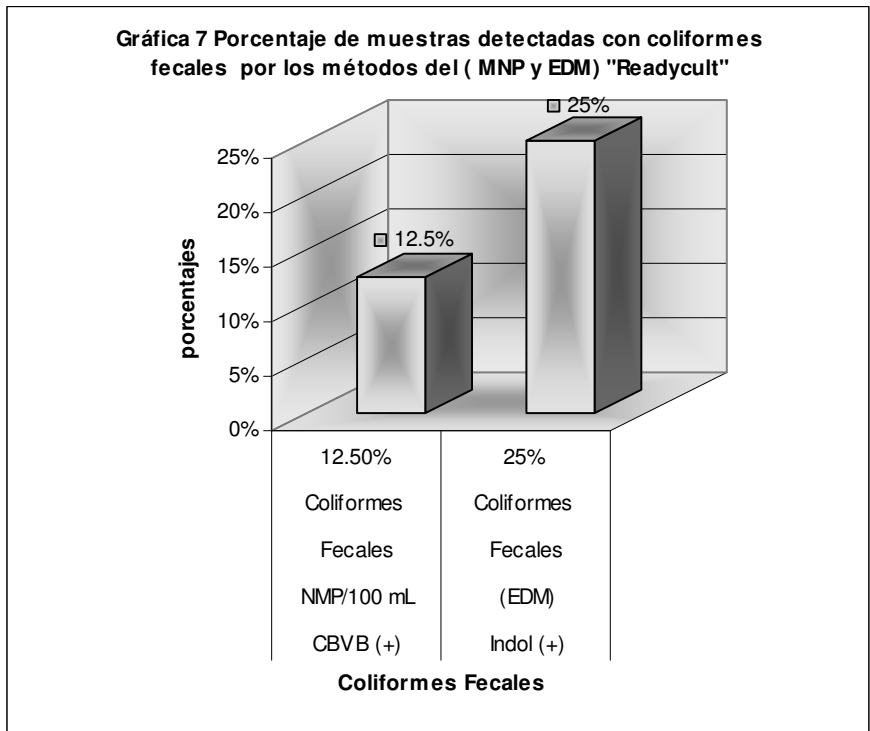
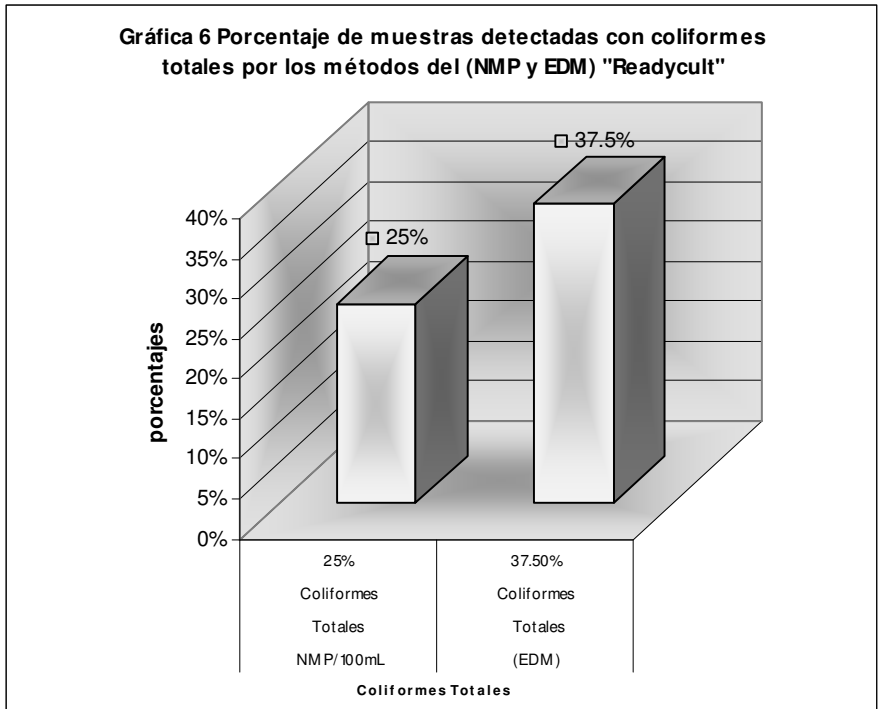
método de filtro de membrana pero esencialmente el contenido del medio utilizado fue 4-metilumbeliferon- $\beta$ -D-glucoronido (MUG), sustrato cromogénico que es el principio del medio de cultivo del Readycult. Otros estudios semejantes donde se utilizó la técnica del NMP, en muestras de leche pasteurizada pero utilizando el Readycult encontraron que este medio es más fácil de utilizar y redujeron el tiempo de incubación por lo que obtuvieron los resultados a las 24 horas, además el color de la leche no representó problema alguno para diferenciar el cambio de color que dieron las muestras positivas que en si representa una ventaja (Beloti, et al, 2002).

La gran calidad nutricional de las peptonas y el buffer de fosfatos incorporado en el diseño del medio de Readycult, garantiza un rápido crecimiento de coliformes en tanto que el Laurilsulfato inhibe ampliamente la flora acompañante especialmente los gram-positivos. El contenido del sustrato cromogénico 5- bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-GAL), el cual es hidrolizado por los coliformes y el sustrato fluorogénico (MUG) que es altamente específico para *E. coli*. (MERCK KGaA, 2000).

Utilizando el método de (EDM) Readycult los datos expresados en la tabla 16 gráfica 5 y gráfica 6 se puede observar que del total de muestras trabajadas 15 dieron positivas para coliformes totales cambio de color del medio de amarillo a azul/verdoso, este total representa el 37.5%, éstas muestras se identifican con las claves: PA, ALF, APV, AS, AEP, ADM, APD, AET, PW, ASA, PDW, PWH, AQV, ATR. De estas 15 muestras sólo 10 muestran confirman la presencia de Coliformes Fecales por la Fluorescencia (+) e Indol (+) gráfica 5 y 7, las marcas de agua fueron: PA, ALF, HPA, AQS, ADM, APD, AET, PW, ASA, PDW (ver anexo 1).

Tabla 17 Resultados del análisis microbiológicos realizado a las muestras de agua por los métodos del (NMP y EDM) para coliformes totales y fecales

clave	Prueba presuntiva cambio de color en CLRF			coliformes totales NMP/100mL 25%	Prueba confirmativa en CBVB 37°C		Clave	EDM Readycult coliformes totales color Azul/verdoso (+) 37.50%	EDM Readycult Fluorescencia (+) 37.50%	EDM Readycult Coliformes Fecales Indol (+) 25%
	t(10mL)	t(1mL)	t(.1mL)		45°C	12,5%				
PA	1	0	0	4	+	+	PA	+	+	+
HPA	3	3	3	1100	+	+	ALF	+	+	+
AQS	3	3	2	1100	+	-	APV	+	+	-
AEP	3	3	2	1100	+	-	HPA	+	+	+
ADM	3	3	2	1100	+	+	AQS	+	+	+
AET	1	0	0	4	+	+	AEP	+	+	-
PW	3	3	0	240	+	-	ADM	+	+	+
ASA	3	3	2	1100	+	-	APD	+	+	+
AQV	3	3	3	1100	+	+	AET	+	+	+
ATR	3	2	1	150	-	-	PW	+	+	+
							ASA	+	+	+
							PDW	+	+	+
							PWH	+	+	-
							AQV	+	+	-
							ATR	+	+	-



De la tabla 17 y tabla 8 al hacer la comparación de los resultados empleando los métodos del NMP y (EDM) Readycult se observa que en la determinación de Coliformes Totales por el NMP, hubo 10 muestras que dieron resultados positivos, estas marcas representan el 25%, mientras que

con el (EDM) 15 muestras dieron resultados positivos, y corresponde a un 37.5%, gráfica 5 y gráfica 6. Estas diferencias de porcentajes nos permiten decir que el EDM identificó un 66% más de coliformes totales que el método del NMP.

Haciendo un análisis comparativo referente a la determinación de coliformes fecales *E. coli* por el método del NMP y EDM, 5 muestras resultaron positivas para coliformes fecales por el método del NMP y corresponde al 12.5% del total de muestras analizadas, en la tabla 17 y gráfica 7 se puede verificar y observar el resultado, las marcas que no cumplen con los parámetros de calidad son PA, HPA, AET, ADM y AQV según la NOM-041-SSA-1993. Respecto a la determinación de coliformes fecales por el EDM 10 muestras dieron resultados positivos y corresponde a un 25% del total de muestras gráfica 7, en la tabla 17 se puede observar que hay una coincidencia en 4 marcas de agua con *E. coli*, tanto por el método del NMP como para el EDM, las marcas son PA, HPA, ADM y AET, ver anexo 1. Los resultados expresados en la tabla 17 y gráfica 7 nos permiten decir que en este estudio el EDM “Readycult” identificó un 50% más de muestras con *E. coli*, que el método del NMP.

La disminución en el número de muestras positivas respecto a los coliformes fecales se debe principalmente a que otros miembros de la familia *enterobacteriaceae* producen la enzima  $\beta$ -glucosidasa, por ejemplo algunas *Shigellas* (44-58%), y *Salmonellas* (20-29%), lo cual arroja resultados falsos positivos o falsos negativos (Feng, et. al, 1998).

Respecto a los porcentajes de sensibilidad y especificidad expresados en la tabla 13, resultan de utilizar los valores de predicción contenidos en las tablas 9, 10, 11 y 12, para hacer el cálculo correspondiente en ambos métodos en la determinación de coliformes totales y fecales. En el método del NMP la sensibilidad para coliformes totales fue de 66% y para coliformes fecales de 55%. De igual manera para el EDM, la sensibilidad para coliformes totales fue de 90% y para coliformes fecales de 80%.

Asimismo la especificidad calculada para cada método en los parámetros evaluados tenemos que en el método del NMP la especificidad para coliformes totales fue de 80% y para coliformes fecales de 96%, mientras que para el EDM la especificidad para coliformes totales fue de 82% y para coliformes fecales de 96%. Estos valores nos permiten considerar la definición de sensibilidad, la cual está dada por la proporción ó porcentajes de pruebas positivas en ambos parámetros, y la especificidad es la proporción ó porcentaje de muestras no negativas. Con los conceptos de sensibilidad y especificidad definidos sólo agregaríamos que a medida que los porcentajes se acerquen al 100% es más válida la prueba (Dawson, 2005), (Wassertheil, 1990).

Los porcentajes de sensibilidad de 66% y 55% para coliformes totales y fecales reportados en la tabla 13 nos dicen que verdaderamente, esa proporción de muestras fueron positivas en los parámetros evaluados, en cambio los porcentajes de especificidad nos dice que el NMP, identifica un 80 y 96% de muestras no contaminadas. De igual manera los porcentajes de 90 y 80% correspondientes a la sensibilidad para coliformes totales y fecales por el EDM “Readycult” nos indican que en esa proporción las muestras analizadas fueron verdaderamente positivas. Mientras que los porcentajes de especificidad de 82 y 96% para los mismos microorganismos nos infiere que en esa proporción identifica la muestra que no están contaminadas.

Cabe mencionar que los resultados obtenidos en la determinación de coliformes fecales por el método de EDM, el cambio de color del medio de amarillo a azul/verdoso que es indicativo que hay coliformes totales, con la fluorescencia y la prueba del Indol positivo se confirmó la presencia de *E. coli*, éstas muestras que resultaron positivas por el EDM “Readycult” fueron sometidos a pruebas bioquímicas primarias y secundarias, para tener la certeza de la presencia de *E. coli* dando los resultados reportados y analizados en este estudio.



## 12.0 CONCLUSIONES

- \* El 27.5% de las muestras presentaron mesófilos tanto a 25°C como a 37°C en un grado tal que rebasa los límites permitidos por la NOM-041-SSA1-1993, por lo tanto no son aptas para consumo humano
- \* La presencia de Coliformes Totales en un 25% de las muestras de agua nos indican que no cumplen con los parámetros de calidad establecidos en la NOM-112-SSA1-1994.
- \* Respecto a la determinación de Coliformes Fecales el 12.5% de las muestras no son aptas para consumo humano de acuerdo a lo establecido en la NOM-112-SSA1-1994.
- \* La determinación de Coliformes Totales por el método del EDM Readycult nos indican que un 37.5% dieron resultados positivos para esta prueba. Se detectó un 66% más que por el método del NMP
- \* El 25% de las muestras dieron resultados positivos para Coliformes Fecales, se detectó el 50% más que por el método del NMP.

Respecto al Método de Detección de Enzimas “Readycult” en este trabajo se encontraron las siguientes características:

- a) Disminución del tiempo de operación de 3 a 4 días en la obtención de resultados respecto al a la determinación de coliformes fecales en comparación con el método del NMP
- b) Detección simultánea de coliformes totales y fecales en una misma etapa
- c) La presencia de coliformes totales y fecales es fácil de identificar por el cambio de color del medio de amarillo a azul verdoso, la observación de fluorescencia del medio bajo luz ultravioleta a (365 nm) y la formación de un anillo de color rojo al adicionar el reactivo de Kovac's, Tampoco se necesitan esquemas de verificación de resultados
- d) Disminución en el uso de reactivos
- e) Disminución en el uso de material.
- f) Los parámetros de sensibilidad y especificidad obtenidos para coliformes totales y fecales por el EDM nos muestran que la sensibilidad de 90 y 80% son valores que se acercan más al 100% como resultado ideal para la validación de la prueba, en contraste con los resultados de sensibilidad de 66 y 55% para coliformes totales y fecales por el NMP, nos muestran diferencias de porcentajes considerables que es necesario tomar en cuenta de acuerdo a la definición de sensibilidad como prueba de validación

- g) La especificidad obtenida en la determinación de coliformes totales y fecales por el EDM, la cual equivale al 80 y 96%, también esta prueba presenta valores cercanos al 100%, lo cual nos permite decir que estos valores son tan semejantes a los obtenidos por el método del NMP, que en este estudio es el patrón de referencia.

Habiendo encontrado algunas diferencias favorables en la operabilidad y la ejecución de la metodología en la obtención de resultados por el EDM respecto al método del Número Más Probable así tenemos: la disminución del tiempo en obtener resultados en sólo 24 hs, la determinación de coliformes totales y fecales simultáneamente, manejo de material y uso de reactivos en menor cantidad, así como los porcentajes de sensibilidad y especificidad que contrastan favorablemente a los porcentajes obtenidos por el método del NMP. Se concluye que el Método de Detección de Enzimas debe considerarse como una primera opción de uso para dar el diagnóstico de contaminación del agua de consumo humano.

## ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AWWA	American Water Asociation
(7-AMC)	7-Amido-4-metilcoumarina
CLRF	Caldo Lactosado Rojo de Fenol
CBVB	Caldo bilis verde brillante
Cd	Concentración doble NMP
Cs	Concentración sencilla NMP
cm	Centímetro
°C	Grado centigrado
EDM (Enzyme Detection Methods)	Método de Detección de Enzimas
Fig.	Figura
GUD	-β-D-glucoronidasa
hr.	Horas
L.	Litros
uv	Luz ultravioleta
Inc.	Incubación
INVIC	Indol-Voges-Proskauer-Rojo de Metilo-Citrato
Mc	Mc Conkey
mL.	Mililitro
m.o.	Microorganismo
MF (Membrane Filtration)	Filtro de membrana

MUG	4-Metilumbeliferil- $\beta$ -D-Glucoronido
4MU	4-metilumbeliferil (Fluorescencia azul)
NMP	Número Más Probable
NOM	Norma Oficial Mexicana
ONP	O-nitrofenol
ONPG	O-Nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido
PNA	P-nitroanilina
PNP	P-nitrofenol
PNPG	P-nitrofenol- $\beta$ -D-glucoronido
Pág.	Página
P/A	Presencia ausencia
“Readycult” (Merk)	Rápido
(4-TMU)	4-Trifluorometilumbeliferon
Salmón GAL	6-bromo-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopiranosido
VP	Voges - Proskauer
(XGAL)	5-bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopiranosido
XGLUC	5-bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucoronido
(Y)	Indolil

## ANEXO 1

### NOMBRE DE LAS CLAVES DE MARCAS DE AGUA TRABAJADAS

Núm de muestra	Clave	Nombre	Núm de muestra	Clave	Nombre
1	QS	Quality Seal	21	ADM	Agua don Marco
2	VI	Agua Virgen	22	ACC	Agua de Calidad Controlada
3	PSA	Agua San Agustín	23	APD	Agua Purificada Acuario
4	DP	Agua del Peñón	24	AB	Agua Bonafón
5	AW	Agua Whitman	25	APS	Agua Plus
6	AP	Akua Pura	26	AMP	Agua Más Pura
7	AE	Akua Express	27	PAH	Agua Healt
8	PA	Agua el Angel	28	AET	Agua Electropura
9	AD	Agua Destilador	29	ABW	Agua Best Water
10	ALF	Agua la Fuente	30	PVC	Purificada del Valle
11	APV	Agua del Valle	31	PCA	Cristalina Arcoiris
12	ALA	Agua los Angeles	32	PW	Pure Water
13	AQP	Aquapura	33	ASA	Purificada San Agustín
14	ASP	Agua Super purificada	34	PDW	Drinking Water Zonopura
15	HPA	Agua Apasco	35	PWH	Water Healthy
16	APA	Agua Arroyo	36	APM	Purificada de Manantial
17	AQS	Aqua Star	37	APP	Purificada Priser
18	AW	Water Purific	38	AQV	Purifier Water Aqua Vela
19	AAL	Aqua Line	39	WHE	Water House
20	AEP	Agua Electropura	40	ATR	Purificadora Astro Agua

## ANEXO 2

### MEDIOS DE CULTIVO

#### Agar Cuenta estándar: 22.5 g/lit.

(Merck)	Peptona de caseína	5.0 g.
	Extracto de levadura	2.5 g.
D(+)	Glucosa	1.0 g.
	Agar-agar	14.0 g.

pH del medio listo para usarse a 30<sup>0</sup>C 7.0 +/- 0.1

#### Agar Mc Conkey: 50 g/lit.

(Merck)	Peptona de caseína	17.0 g.
	Peptona de carne	3.0 g.
	Lactosa	10.0 g.
	Cloruro de sodio	0.03 g.
	Mezcla de sales biliares	1.5 g.
	Rojo neutro	0.03 g.
	Cristal violeta	0.001 g.
	Agar-agar	13.5 g.

pH del medio listo para usarse a 37<sup>0</sup>C 7.1 +/- 0.1

**Caldo lactosado 13 g/lit**

(MERCK)	Peptona de gelatina	5.0 g
	Extracto de carne	3.0 g
	Lactosa	5.0

pH del medio listo para usarse a 25<sup>0</sup>C 7.1 +/- 0.1

**Caldo bilis verde brillante al 2%: 40 g/lit**

(Merck)	Bilis de buey deshidratada	20.0 g
	Lactosa	10.0 g
	Peptona de carne	10.0 g
	Verde brillante	0.0133 g

pH final 7.2 +/- 0.2

**Readycult Coliformes 100 Composición en (gramos/sobre)**

(Merck) KGaA	Triptosa	0.5 g
	Cloruro de sodio	0.5 g
	Sorbitol	0.1 g
	Triptofano	0.1 g
	Fosfato de potasio dibásico	0.27 g
	Lauril sulfato de sodio	0.01 g
	X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido)	0.008 g
	MUG (4-metil-umbeliferil-β-D-glucoronido)	0.005 g
	IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido)	0.01 g





## ANEXO 4

### GLOSARIO

**Aerobio:** Organismo que requiere aire u oxígeno para poder vivir

**Anaerobio:** Microorganismo que se desarrolla en ausencia de oxígeno molecular

**Cromogénico:** Sustrato cromogénico que por reacciones bioquímicas origina productos coloreados

**Contingencia, tabla de.** Cuadro usado para desplegar cantidades o frecuencias para dos o más variables nominales o cuantitativas

**Desinfectante:** Agente que destruye o inhibe a los microorganismos patógenos

**Especificidad:** Proporción de las veces que una prueba de diagnóstico es negativa en pacientes que no tienen la enfermedad o trastorno. Una prueba específica tiene un número pequeño de tasas falsas positivas

**Enzima específica.** Enzima la cual reacciona solamente con un sustrato particular o muy estrechamente con un compuesto relacionado, ejemplo  $\beta$ -D-galactosidasa, es una enzima específica que reacciona con lactosa o análogos de lactosa como (X-GAL). En adición, enzimas específicas pueden también referirse a esa asociación en ciertas especies o grupos de microorganismos.

**Esterilizar:** Procedimientos físicos o con agentes químicos para destruir todas las formas microbianas

**Fermentación:** descomposición de carbohidratos en anaerobiosis

**Fluorescencia:** Emisión de luz por una sustancia por excitación con energía radiante, como luz ultravioleta

**Hidrólisis.** Descomposición de un sustrato, catalizado por una enzima, por adición de una molécula de agua.

**Infección:** Invasión y multiplicación de microorganismos que pueden llegar a producir enfermedad

**Medio de crecimiento:** Medio de cultivo que proporciona una nutrición adecuada para la mayoría de microorganismos y que permite que se desarrollen

Medio: Diferencial medio que permite diferenciar a un microorganismo particular o a un grupo de microorganismos por reconocimiento de un producto natural del microorganismo o por incorporación de un sustrato y un sistema indicador apropiado

Medio Selectivo: Medio de cultivo que contiene sustancias inhibidoras u un único factor de crecimiento de modo de conferir a un microorganismo o grupo de microorganismos, en particular una ventaja real sobre los otros gérmenes que puedan estar presentes.

Patógeno: Que produce o es capaz de producir enfermedad por lo general un agente vivo

Sensibilidad: Proporción de las veces que una prueba de diagnóstico es positiva en pacientes que tienen la enfermedad o trastorno. Una prueba sensible tiene un índice bajo de falsas negativas.

Sustrato. Sustancia sobre la cual actúa una enzima, que ha sido específico conocer su estructura química

Sustrato de enzima cromogénica. Un sustrato que libera un compuesto cromogénico bajo la hidrólisis por una enzima.

Sustrato de enzima fluorogénica. Un sustrato que libera un compuesto fluorogénico bajo la hidrólisis por una enzima.

Triptofanasa. Un sustrato de enzima definida que libera indol, bajo la división por triptofanasa se forma un anillo de color rojo cuando el reactivo de KOVAC.s es adicionado directamente al caldo. La formación del anillo rojo se debe a la reacción del indol con un aldeído.

Vector: Un agente que transporta microorganismo de un individuo enfermo a otro

5-bromo-4cloro-3-indolil-  $\beta$ -D-galactopiranosido (X-GAL). Un sustrato definido que cambia de color a colores azul-verde después de la hidrólisis de  $\beta$ -D-galactosidasa.

4-metilumbeliferil - $\beta$ -D-glucoronido (MUG)- Un sustrato de enzima que fluoresce bajo luz ultravioleta después de la hidrólisis de - $\beta$ -D-glucoronidasa.

## BIBLIOGRAFÍA

1. American Society for Testing & Materials, (1997). Manual de Aguas para usos Industriales Tercera Edición. Noriega Editores, Limusa pág. 81
2. American Water Association, Research Foundation, (1989), Tratamiento del Agua por Procesos de Membrana, Principios Procesos y Aplicaciones. McGraw-Hill, España, Interamericana, págs. 378, 379, 380
3. Applied an Enviromental Microbiology, January 2001, Vol. 67 No. 1 pág 142
4. Arevalo de Azrak, R. (2000), Perspectiva del Medio Ambiente Mundial
5. Avilés R. & Zamudio C. (1996). Análisis Bacteriológico de Agua Embotellada Comercial, México, 108 p. (Licenciatura en QFB), UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-1
6. Atlas, R. M. & Bartha, R. (2002). Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental Pearson Educación S. A. pág. 496, 499
7. APHA, AWWA, WPCF, (1992), Métodos Normalizados, para Análisis de Aguas Potables y Residuales, 17<sup>th</sup>. Ediciones Díaz de Santos. España.
8. Bair Colin, (2001), Química Ambiental, Editorial Reverte S.A. Barcelona España. págs. 464, 481, 483
9. Beloti V; Marcia de Aguiar Ferreira Barros; Mauricio Pinto Nunes; Elsa Elena Walter de Santana; Luis Augusto Nero; Juliana Aparecida de Souza, (2002), Use of ReadyCult<sup>TM</sup> -LMX for enumeration of total coliformes and *Escherichia coli* in milk Braz., J. Microbiol. Vol. 33 No. 1 Sao Paulo jan. 2002
10. Calvo S. M. (1999), Colección Ingeniería Medioambientalista, Aguas Urbanas Residuales, Tratamiento de Bajo Costo y Aprovechamiento, Ediciones Mundi-Prensa España pág. 193, 200
11. Canesa V. & Fernández V. (1995), Guía Metodológica para la Evaluación del Impacto Ambiental, Ediciones Mundi-Prensa España, págs. 47
12. Castillo M., J., Torner, S., Pla & L. V. García, (1995), Control Sanitario de Aguas Minerales Naturales Envasadas. Alimentaria: Vol. 32, No. 265, España, págs. 105, 113

13. Catalán E. (1982), Tratamiento y Depuración de Aguas; Eficiencia y Alcance de estos Procesos en la Transmisión de Enfermedades Hídricas. Madrid: Ediciones Hermann Blume
14. Dawson B. G. Trapo R. (2005). Bioestadística Médica. Editorial El Manual Moderno S.A de C.V. México D.F. pág. 285,286
15. Departamento de Sanidad del Estado de Nueva York, (1996), Manual de tratamiento de Aguas Negras. Ed. Limusa, S.A. México pág. 25
16. Duncan M. (2004), Domestic Wasterwater Treatment in Developin Countries. Earthscan USA. Pág. 34, 35
17. Enkerlin H., C. Ernest, J. Cano, E. Garza & Vogel E., (1997), Ciencia Ambiental y Desarrollo Sostenible. ITP, e, México, pág. 405
18. Enviromental Tecnology, (1996), Introduccion to Enviromental Tecnology, Naalk. Ostler, Editor, Series Vol. 1 Prentince Hall's, Columbus Ohio E.U.A., pág. 13
19. Etiene Jakelin, (2001), Manual Bioquímica Genética. Biología Molecular, Masson S.A España, pág. 156, 157
20. Fair Geyer Okun, (1996), Abastecimiento de Agua y Remoción de Aguas Residuales Vol. 1 Editorial Limusa, México D.F. Págs. 25,78,79
21. Feng P., Stephen D. Weagant, Michael A. Grant, (1998), Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria in F.D.A., Bacteriological Analytical Manual, 8<sup>th</sup> Edition, Chapter 4 U.S.A.
22. Feng, P., (1995). *Escherichia coli* serotype 0157:H7: Novel vehicles of infection and emergence phenotypic variants. Emergin Infectious 1:16
23. Feng, P. C. .S. & P. A. Hartman, (1982), Fluorogenic assay for immediate confirmation of *Escherichia coli*. Appl. Enviro. Microbiol. 43:1320
24. Granados & Castañeda, (1995), Destrucción del Planeta, Educación Ambiental. Universidad Autónoma de Chapingo México págs. 99,106,107
25. Gray, (1992), Biology of Wasterwater Treatment', Published in the United States by Osford University Press, New York. Pág 594, 598

26. Gray, (1999), *Calidad del Agua Potable, Problemas y Soluciones*. Editorial Acribia S.A. pág. 53
27. Hammer, (1986), *Water and Wasterwater Tecnology*, Second Edition, Prentince Hall International, Inc. U.S.A. págs. 68, 72, 74
28. Hitchins, A. D; P. Feng; W. D. Watkins; S. R. Rippey & L. A. Chander, (1998), *Escherichia coli* and Bacterias Coliforms, p. 4-01-4.29 In U:S Food and Drug Administration (U.S.D.A.) *Manual Bacteriological Analitical* 8<sup>a</sup> Edition. U.S.A.
29. Horan, (1991), *Biological Wasterwater Treatment Systems* Jhon Wiley and Sons NewYork pág. 24
30. Jiménez Cisneros B., (2001), *La Contaminación Ambiental en México: causas efectos y tecnología apropiada*. Ed. Limusa, grupo Noriega Editores. México, pág. 40
31. Koneman E. W. M.D., Jaudeo M. William & Allen D. Ethephen, (1999), *Diagnóstico Microbiológico Textos y Atlas color*, Editorial Panamericana México D.F.
32. Leclers, H., (1992), *The Natural Mineral Waters Microbiology and Regulation*, Revista di Suiza dell, alimentzione Instituto Superiore di Sanita IV Incontro di Aggiornamento Screntifico. pág. 1-20
33. Manafi & Sommer, (1993), *Rapid identification of enterococci with a new fluorogenic- chromogenic assay*, Wat. Sci. Tech., 27, p 271-274
34. Manafi, (1998), *New Approach for the Fast Detection of Indicators, in Particular Enzime Detecction Methods. (EDM)*. OECD Worshop Molecular Methods for Safe Drinking Water. Hygiene Institute, University of Wein, Kinderpitalgasse
35. Manafi & H. Rosmann, (2004), *An Evaluation of Readycult System for Detection Total Coliforms and E. coli in water*, Hygiene Institute, University of Wein, Kinderspitalgasse, Viena Austria, págs. 1-2
36. *Manual de Laboratorio del Departamento de Microbiología*, (1985), Laboratorio de Microbiología Sanitaria; I.P.N., ENCB; México D.F. págs. 6-14
37. Merck KGaA, (2000), *Readycult Coliform 100 Precence/Absence Test for Detection and Identification of Coliform Bacteria and Escherichia coli in Finished Waters*. Germany, págs. 1-10
38. Mober, L. J., M. K. Wagner, & L. A. Kellen, (1998), *Fluorogenic assay for rapid detection of Escherichia coli in chillen and frozen foods: Collaborative study*. J. Assoc. Off Anal. Chem. 71: 589: 602

39. Normas Oficiales Mexicanas SSA1, (1995), Fuente Diario Oficial de la Federación, Tomo DV, No. 14; México. D.F.
40. Rigola Lapeña M., (1999). Tratamiento de Aguas Industriales, Aguas de Proceso y Residuales. Alfaomega Marcombo, Grupo Editor S.A. de C.V. México, págs. 27, 28, 38,39
41. Romero Rojas J. A., (1999), Calidad del Agua, Segunda Edición, Alfaomega Grupo Editor, S.A. de C.V. México, págs. 49, 54, 61, 70
42. Sans Fanfría Ramón, De Pablo Ribas Joan, (1999), Ingeniería Ambiental, contaminación y tratamiento., Alfaomega-Marcombo, España págs. 7,8
43. Shets, .J. Medema, & H. Havelaar, (1993), Comparison of Colilert with Dutch Standard enumeration methods for *Escherichia coli* and total coliforms in Water, Letters in Applied Microbiology Vol. 17, N. 1-6, págs. 17-19
44. Steel & Terence McGhee, (1981), Abastecimiento de Aguas y Alcantarillado. 5<sup>a</sup> Ed. Editorial Gustavo Gili. España, págs. 197, 201, 202.
45. Tebbutt, T.H.V., (1999), Fundamentos de Control de Calidad del Agua, Limusa México D.F. págs. 154,159,160
46. Unda O. F.,(2000), Ingeniería Sanitaria Aplicada a Saneamiento y Salud Pública. Ed. Limusa Noriega Editores, México, págs. 96,99,102
47. Wassertheil-Smoller S. (1999), Biostatistics and Epidemiology. Springer-Verlang New York, Inc. pág 67, 68
48. Weber, Jr. Walter J., (1979), Control de la Calidad del Agua, Procesos Físicoquímicos. Editorial Reverte, S.A. España págs. 429, 432, 443