



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

**EVALUACIÓN DE
DESINFECTANTES IÓNICOS**
(ÁCIDOS ORGÁNICOS)

T E S S I

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A:

ROSA MARÍA JUÁREZ ESTRADA

ASESORES: DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA
DR. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN
DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO
MC. NATHALIEL SOTO GUEVARA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos
comunicar a usted que revisamos la Tesis :

Evaluación de desinfectantes iónicos (Acidos Orgánicos)

que presenta la pasante: Rosa María Juárez Estrada
con número de cuenta: 9660609-8 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en
el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 09 de Enero de 2008.

PRESIDENTE MFC. Ma. Eugenia R. Posada Galarza

VOCAL Dra. Susana E. Mendoza Elvira

SECRETARIO QFI. Guadalupe Koizumi Castro

PRIMER SUPLENTE MC. Ana Laura Vázquez Martínez

SEGUNDO SUPLENTE MC. Ma. Guadalupe Aviles Robles



A G R A D E C I M I E N T O S

A DIOS

Gracias a Dios que me ha permitido seguir con vida para poder disfrutar a mis seres queridos.

Por haberme dado la gran lección de mi vida, gracias por darme el valor para seguir adelante
Siempre te llevaré en mi mente y en mi corazón. Que Dios te bendiga.

A MIS PADRES

Que han sido mi Fortaleza y Ternidad, con su ejemplo y perseverancias han forjado mi carácter.
Ustedes me entregaron día a día amor, cariño, comprensión y confianza ante la vida.
Me enseñaron a no tener miedo, y sobre todo a confiar en mí misma.

A MI AMOR

Gracias por haberme motivado a estudiar una carrera profesional, porque has estado a mi lado todo este tiempo dándome tu apoyo y sobre todo por tu amor.

A MIS HERMANOS

Por haberme compartido sus experiencias e inquietudes, por su cariño, confianza, consejos y apoyo.
Por la motivación que me dieron para lograr uno de mis objetivos. Sobre todo gracias por ser mis hermanos.

A MI CUÑADO

Gracias por todo tu apoyo, comprensión y cariño. Por estar siempre presente cuando te he necesitado y sobre todo por ser un gran padre.

A MI HIJA

Gracias, por que me has enseñado que a través de la perseverancia se logran grandes objetivos, observando a la vida de diferente manera.

A MIS GRANDES ANGELES QUE ESTAN EN EL CIELO

Que Dios los bendiga, con su ejemplo y persistencia me enseñaron a ver la vida de diferente manera, gracias por sus consejos y enseñanzas, su confianza comprensión y cariño.
A MI ANGELITO DE LA GUARDA

A G R A D E C I M I E N T O S

profesores donde sus conocimientos y enseñanza dejaron huella en mí, para tomar decisiones y poder resolver problemas que se presentan a través de mi carrera profesional.
Por todos aquellos momentos doy gracias de ser PUMA.

A LA FES-C

Los mejores momentos que recordaré con cariño, será mi estancia en la FESC-Cuautitlán Campo 1, donde conviví con mis amigos, aprendiendo a trabajar en equipo y bajo presión, con mis

A MIS PROFESORES



Agradezco a la Dra. Susana E. Mendoza por todo su apoyo, comprensión, confianza, motivación y sobre todo por su amistad.

Agradezco a los Profr. David Tujillo y Abel Ciprian por su amistad y apoyo,

A Sr. Gabino por su ayuda técnica y amistad.
A Dr. Eliso por su orientación en este trabajo.
A MC. Nathalié Soto por las muestras.

A MC. Sofía por su orientación y apoyo durante el transcurso de esta tesis.

A MIS SINODALES

gracias por darme su apoyo y orientación para que esta tesis se concluyera, gracias por el tiempo que invirtieron en este trabajo.

Gracias a todos aquellos que participaron en la realización de este Proyecto de Tesis, sin su valiosa ayuda esto no sería posible.



R E C U E R D O S

Un recuerdo anuncia la llegada de alguien,

A quien que posiblemente nos tendió la mano,

A quien que posiblemente nos hizo sentir mal,

A quien que posiblemente nos hizo reír

A quien que posiblemente nos hizo llorar

Tal vez sea un recuerdo triste

Tal vez sea un recuerdo alegre

O quizá sea un recuerdo confuso

Lo importante, es que no importa

cual haya sido ese recuerdo

tenemos la dicha de poder recordar

a esa persona

que hoy día ha formado parte de nuestra vida,

de nuestro caminar, de nuestro vivir.

Por que gracias a que nos hicieron llorar,

aprendimos que somos sensibles y vulnerables.



INDICE

i.	INDICE DE FIGURAS	
ii.	INDICE DE TABLAS	
iii.	ABREVIATURAS	
iv.	RESUMEN	
1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Historia del Agua	2
1.1.1	La calidad del agua y la salud	4
1.1.2	Características de las enfermedades	5
1.1.3	Patógenos Bacterianos y Enfermedades Relacionadas con el Agua	5
1.2	Modo de transmisión	8
1.2.1	Aislamiento e identificación de microorganismos patógenos	10
1.2.2	Determinación del número de bacterias en una muestra de agua	11
1.3	Normas Oficiales Mexicanas	15
1.3.1	Estándares revisados por la Organización Mundial de la Salud (OMS)	15
1.3.2	Norma Oficial Mexicana NOM-181-SSA1-1008, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Requisitos sanitarios que deben cumplir las sustancias germicidas para el tratamiento del agua, tipo doméstico	17
1.3.3	Principales Características del Agua Potable	19
1.4	Desinfección y Métodos de Desinfección	19
1.4.1	Factores que influyen en la Desinfección	21
1.4.2	Desinfectantes iónicos (ácidos orgánicos)	22
1.4.3	Mecanismo de acción de los ácidos orgánicos	25
1.5	Microscopia Electrónica	26
1.5.1	Microscopio electrónico de transmisión (MET)	30
1.5.2	Tinción Negativa	30
1.6	JUSTIFICACIÓN	32
1.7	HIPOTESIS	32



INDICE

2.	OBJETIVOS	
2.1	Objetivo general	33
2.2	Objetivos particulares	33
3.	METODOLOGIA	34
3.1	Determinación de la actividad antimicrobiana	34
3.1.1	Microorganismos de prueba	34
3.1.2	Identificación de los microorganismos de prueba	34
3.1.3	Conservación de los microorganismos de prueba	34
3.1.4	Preparación del cultivo de referencia	34
3.1.5	Preparación del subcultivo	35
3.1.6	Preparación de la suspensión de los microorganismos de prueba	35
3.1.7	Determinación de la Cuenta Viable Inicial	35
3.1.8	Determinación de las Células Sobrevivientes	36
3.1.8.1	Preparación del agua de prueba	36
3.1.8.2	Inoculación de la muestra	36
3.1.9	Procedimiento para el recuento en placa	36
3.2	Evaluación de la eficacia	38
3.2.1	Microorganismos de prueba	38
3.2.2	Identificación de los microorganismos de prueba	38
3.2.3	Conservación de los microorganismos de prueba	38
3.2.4	Preparación del cultivo de referencia	38
3.2.5	Preparación del subcultivo	39
3.2.6	Preparación de la suspensión de los microorganismos de prueba	39
3.2.7	Preparación e inoculación del agua de prueba	40
3.2.8	Desarrollo de la prueba	40
3.2.9	Recuento en placa	41
3.2.10	Determinación de microorganismos coliformes totales	42



3.3	Microscopia electrónica (tinción negativa)	44
3.3.1	Microorganismos de prueba	44
3.3.2	Preparación de la muestra	44
3.3.3	Preparación de las rejillas con membrana de fomvar	44
3.3.4	Técnica de tinción negativa	45
4.	RESULTADOS	50
4.1	Identificación bacteriana	50
4.2	Método para la determinación de la actividad antimicrobiana	53
4.3	Método para la determinación de la eficacia antimicrobiana	55
4.5	Microscopia electrónica de transmisión	59
5.	DISCUSIÓN	61
6.	CONCLUSIONES	64
7.	BIBLIOGRAFIA	65
	APÉNDICES	69



i. INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de los microscopios, óptico electrónico de transmisión y electrónico de barrido	27
Figura 2.	Cañón del Microscopio electrónico	28
Figura 3.	Microscopio electrónico	29
Figura 4.	Preparación de membranas plásticas	44
Figura 5.	Técnicas de tinción negativa	45
Figura 6.	Determinación de la actividad antimicrobiana	46
Figura 7.	Evaluación de la eficacia	47
Figura 8.	Microscopia electrónica	49
Figura 9.	Resultados obtenidos en la Determinación de la Actividad Antimicrobiana de Desfan-100 y Rubigen Forte	54
Figura 10.	Resultados obtenidos a través de la Determinación de la Eficacia Antimicrobiana de Desfan-100 y Rubigen Forte	56
Figura 11.	Resultados obtenidos en la Determinación del Número Más Probable (MNP) de Desfan-100 y Rubigen Forte	59
Figura 12.	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229, Sin tratamiento	60
Figura 13.	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229, Tratada con Desfan 100	60
Figura 14.	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229, Tratada con Rubigen Forte	60
Figura 15.	<i>P. multocida</i> tipo A, Sin tratamiento	60
Figura 16.	<i>P. multocida</i> tipo A, Tratada con Desfan 100	60
Figura 17.	<i>P. multocida</i> tipo A, Tratada con Rubigen Forte	60



ii. INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Principales enfermedades relacionadas con el agua	7
Tabla 2.	Agentes patógenos causantes de las principales enfermedades bacterianas	9
Tabla 3.	Valores guía revisados del agua potable de la OMS para la calidad bacteriológica del agua potable	17
Tabla 4.	Método Espectrofotométrico	35
Tabla 5.	Método Nefelométrico	39
Tabla 6.	Resultados de identificación y pruebas bioquímicas de <i>Escherichia coli</i>	50
Tabla 7.	Resultados de identificación y pruebas bioquímicas de <i>S. aureus</i>	51
Tabla 8.	Resultados de identificación y pruebas bioquímicas de <i>Pasteurella multocida</i> tipo A	52
Tabla 9.	Resultados obtenidos a través de la Determinación de la Actividad Antimicrobiana de Desfan 100	53
Tabla 10.	Resultados obtenidos a través de la Determinación de la Actividad Antimicrobiana de Rubigen Forte	53
Tabla 11.	Resultados obtenidos a través de la Determinación de la Eficacia Antimicrobiana de Desfan 100	55
Tabla 12.	Resultados obtenidos a través de la Determinación de la Eficacia Antimicrobiana de Rubigen Forte	55
Tabla 13.	Resultados obtenidos de Coliformes Totales (NMP/100 mL) de Desfan 100 a los 30 segundos	57
Tabla 14.	Resultados obtenidos de Coliformes Totales (NMP/100 mL) de Desfan 100 a los 60 segundos	57
Tabla 15.	Resultados obtenidos de Coliformes Totales (NMP/100 mL) de Desfan 100	57
Tabla 16.	Resultados obtenidos de Coliformes Totales (NMP/100 mL) de Rubigen Forte a los 30 segundos	58
Tabla 17.	Resultados obtenidos de Coliformes Totales (NMP/100 mL) de Rubigen Forte a los 60 segundos	58
Tabla 18.	Resultados obtenidos de Coliformes Totales (NMP/100 mL) de Rubigen Forte	58



iii. ABREVIATURAS

NOM	:	Norma Oficial Mexicana
NMX	:	
<i>E. coli</i>	:	<i>Escherichia coli</i>
NMP	:	Número Más Probable
OMS	:	Organización Mundial de la Salud
° C	:	Grados Centígrados
LDL	:	Lipoproteínas de baja densidad
TEM	:	Microscopio Electrónico de Transmisión
SEM	:	Microscopio Electrónico de Barrido
µm	:	Micrómetros
UFC/mL	:	Unidad Formadora de Colonias por mililitro
ATCC	:	Colección de cultivos tipo americanos (American Type Culture Collection)
<i>S. aureus</i>	:	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>P. multocilla</i>	:	<i>Pasteurella multocida</i>
mL	:	Mililitros
Nm	:	Nanómetros
µL	:	Microlitros
%	:	Por ciento
MUG	:	4-metilumbiferil-β-D-glucurónido
PM	:	Peso molecular
pH	:	Concentración de iones hidrógeno
“	:	Segundos
RBMA	:	Reducción bacteriana de organismos mesofílicos aerobios



ii. RESUMEN

En el presente trabajo, se evaluó el efecto bactericida de los desinfectantes orgánicos (Desfan-100 y Rubigen Forte) según las Normas Oficiales Mexicanas, mediante la determinación de la actividad y la eficiencia antimicrobiana de las sustancias germicidas.

Se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* ATCC 11229, *Escherichia coli* de caso clínico, *Staphylococcus aureus* ATCC 5538 y *Pasteurella multocida* tipo A.

Los resultados de este trabajo mostraron que los desinfectantes orgánicos, Desfan-100 y Rubigen Forte no son buenos desinfectantes de agua.

En la determinación de la actividad antimicrobiana, se utilizó un promedio de 86×10^8 UFC/ml y se comprobó la capacidad que tiene la actividad antimicrobiana de inhibir o matar a los microorganismos. Los ácidos orgánicos mostraron una reducción bacteriana del 97.92% para Desfan-100 y del 99.16% para Rubigen Forte. La normatividad dice, que para ser aceptado el producto, este debe de matar al 99.99% de las bacterias en 30 segundos de contacto, de acuerdo a las especificaciones de la NMX-BB-040-SCFI-1999.

La determinación de la eficiencia antimicrobiana, se realizó a través del método de conteo en placa y se utilizó un promedio de 5 000 a 10 000 UFC/ml de *Escherichia coli* ATCC 11229, *Escherichia coli* de caso clínico. Los resultados obtenidos de los ácidos orgánicos mostraron una reducción bacteriana del 96% para Desfan-100 y del 100% para Rubigen Forte. Con esto, se demostró la capacidad desinfectante que presentan estos productos y la normatividad nos dice que para ser aceptado este debe de matar al 95% de las bacterias de acuerdo con las especificaciones de la NOM-181-SSA1-1998.

Con la Microscopía electrónica observamos un efecto deformante en todas las bacterias.



1. INTRODUCCIÓN

Debido a la gran importancia que tiene el agua en la vida del hombre, si está contaminada, se convierte en un medio con gran potencial para la transmisión de enfermedades que ponen en peligro la salud y la vida.

Los microorganismos patógenos que se propagan con gran frecuencia por este conducto son los que causan infecciones intestinales como fiebre tifoidea y paratifoidea, disentería y cólera. Estos microorganismos se encuentran en el aparato intestinal del hombre y los animales y cuando se eliminan pueden llegar a contaminar aguas que pueden ser utilizadas como agua potable.

El objetivo de las plantas de tratamiento de agua, es la producción de agua química, bacteriológica y estéticamente agradable, es decir, en buen estado para beber (libre de microorganismos patógenos) sin acompañamiento de características indeseables como mal olor o sabor.

En la práctica no ha sido posible matar todos los microorganismos presentes en el agua, por lo que un elevado número de usuarios recurre a métodos intradomiciliarios para subsanar deficiencias de la calidad del agua suministrada a nivel municipal. Los métodos intradomiciliarios o domésticos para purificar el agua de consumo humano, consiste en la aplicación de equipos potabilizadores y sustancias germicidas, orientadas fundamentalmente al aspecto bacteriológico, considerado como riesgo inmediato a la salud.

Dentro de las sustancias germicidas se encuentran los ácidos cítricos, compuestos iónicos de los ácidos orgánicos. Sus componentes naturales son producidos por el metabolismo natural de las frutas y legumbres, tienen un amplio espectro germicida, ya que eliminan microorganismos aún en altas concentraciones. Desfan-100 y Rubigen forte son desinfectantes orgánicos que se comportan como poderosos bactericidas, fungicidas, algicidas y virucidas. No son tóxicos, no causan problemas de acumulación en el hombre ni los animales y son biodegradables.



1. INTRODUCCIÓN

Debido a la gran importancia que tiene el agua en la vida del hombre, si está contaminada, se convierte en un medio con gran potencial para la transmisión de enfermedades que ponen en peligro la salud y la vida.

Los microorganismos patógenos que se propagan con gran frecuencia por este conducto son los que causan infecciones intestinales como fiebre tifoidea y paratifoidea, disentería y cólera. Estos microorganismos se encuentran en el aparato intestinal del hombre y los animales y cuando se eliminan pueden llegar a contaminar aguas que pueden ser utilizadas como agua potable.

El objetivo de las plantas de tratamiento de agua, es la producción de agua química, bacteriológica y estéticamente agradable, es decir, en buen estado para beber (libre de microorganismos patógenos) sin acompañamiento de características indeseables como mal olor o sabor.

En la práctica no ha sido posible matar todos los microorganismos presentes en el agua, por lo que un elevado número de usuarios recurre a métodos intradomiciliarios para subsanar deficiencias de la calidad del agua suministrada a nivel municipal. Los métodos intradomiciliarios o domésticos para purificar el agua de consumo humano, consiste en la aplicación de equipos potabilizadores y sustancias germicidas, orientadas fundamentalmente al aspecto bacteriológico, considerado como riesgo inmediato a la salud.

Dentro de las sustancias germicidas se encuentran los ácidos cítricos, compuestos iónicos de los ácidos orgánicos. Sus componentes naturales son producidos por el metabolismo natural de las frutas y legumbres, tienen un amplio espectro germicida, ya que eliminan microorganismos aún en altas concentraciones. Desfan-100 y Rubigen forte son desinfectantes orgánicos que se comportan como poderosos bactericidas, fungicidas, algicidas y virucidas. No son tóxicos, no causan problemas de acumulación en el hombre ni los animales y son biodegradables.



1.1 Historia del Agua

En un principio, la Tierra era una enorme bola en constante fusión con cientos de volcanes activos en su superficie, con el tiempo la corteza se secó y se volvió sólida. Dicha actividad generó una gran cantidad de gases que acabaron formando una capa sobre la corteza, permitiendo así la aparición de la atmósfera. ^{1,2}

En las erupciones, a partir del oxígeno y del hidrógeno se generaba vapor de agua, que al ascender por la atmósfera se condensaba dando origen a las primeras lluvias. Al cabo del tiempo, con la corteza más fría, el agua de las precipitaciones se pudo mantener líquida en las zonas más profundas de la corteza, formando así mares y océanos. ^{1,2}

Tanto el agua como el aire, son imprescindibles para la vida en nuestro planeta, pues los seres vivos dependen de estos elementos para subsistir. A través de la historia, el hombre ha tenido la necesidad de estar cerca de los lugares donde se encuentra el agua, lo que procedió al nacimiento de las primeras grandes civilizaciones y a su desarrollo cultural y tecnológico, sin embargo, a medida que el tiempo transcurrió y los pueblos se extendieron, la necesidad del agua fue mayor y su abastecimiento se hizo más complejo. ³

En la Tierra hay 1,400 millones de kilómetros cúbicos de agua, de los cuales el 97.5% es de agua salada y por lo tanto inadecuada para su consumo, el otro 2.5% de agua dulce; de este porcentaje, 2/3 partes corresponden a agua congelada en los polos o recursos a los cuales no podemos tener acceso, por lo tanto el total del agua en la Tierra para usar es el 1.0% y de ahí que es necesario apreciarlo, conservarlo y usarla adecuadamente. ³

El agua es el elemento fundamental, prácticamente fuente de toda vida, constituye la parte integral de todos los tejidos animales y vegetales, siendo necesaria como vehículo fundamental para el proceso de las funciones orgánicas, pero además, es indispensable para toda una serie de usos humanos que comportan un mayor bienestar, desde la salud y la alimentación, a la industria y al esparcimiento. ⁴



El agua se encuentra en la naturaleza con diversas formas y características y cada una de ellas tiene su función dentro del ecosistema del planeta. Es la única sustancia que existe a temperaturas ordinarias en los tres estados de la materia sólida, líquida y gaseosa.^{4, 5}

Proviene del latín *aqua*, está compuesta por un átomo de oxígeno y dos de hidrógeno. A temperatura ambiente es líquida, inodora, insípida e incolora. Se consideraba fundamental para la existencia de la vida. Su fórmula química es H₂O.⁶

El agua químicamente pura es un líquido incoloro, inodoro e insípido, pero en la naturaleza no se encuentra como tal, ya que el agua de los manantiales, ríos, mares y océanos contienen sustancias disueltas y sólidos en suspensión (contaminación).

Fisiológicamente, el agua es necesaria para la supervivencia humana y de cualquier ente vivo. Ingresa al organismo a través de alimentos y bebidas y deja el cuerpo por medio de la orina, la transpiración y en una porción menor, en las heces y el vapor de agua exhalado por los pulmones además debe existir un equilibrio entre la ingestión y la pérdida de agua.⁷

El agua absorbe rápidamente tanto las sustancias naturales como las producidas por el hombre, generalmente convirtiéndola en inadecuada para su consumo sin algún tipo de tratamiento. Los grupos importantes de sustancias que pueden considerarse indeseables en exceso son: color, materia suspendida, turbidez, patógenos (pueden ser virus, bacterias, protozoos u otro tipo de organismos patógenos que pueden afectar negativamente a la salud del consumidor), dureza, sabor y olor, además de productos químicos nocivos.^{9,10}

Es por ello, que los consumidores esperan tener en sus grifos agua limpia y saludable las 24 horas del día, cada día. Por ejemplo, el agua antiestética debido al color o la turbidez, puede ser perfectamente sana para beber, sin embargo, los consumidores la considerarán no apta para beber y probablemente peligrosa para la salud. Los problemas no se originan solamente en los propios recursos, sino también durante el tratamiento, distribución y en el hogar de los consumidores.⁹



Motivo por el cual, el objetivo del tratamiento del agua es producir un adecuado y continuo suministro de agua química, bacteriológica y estéticamente agradable. Más específicamente, la potabilización del agua debe producir agua que sea: grata (sin sabores desagradables), saludable (sin ningún organismo patógeno o producto químico nocivo para el consumidor), limpia (libre de materia suspendida y turbidez), sin color y sin olor, razonablemente blanda, no corrosiva y con bajo contenido de materia orgánica.⁹

Las plantas de tratamiento de aguas, deben ser capaces de tener una producción final de alta calidad independientemente de cual sea la demanda, con la excepción de las aguas subterráneas puras, debido a que todas las aguas suministradas requieren una purificación. Aunque en teoría, el agua más sucia se puede purificar hasta calidad de agua potable, en la práctica el tratamiento de agua relativamente pura para producir un agua final de una calidad estable y en suficiente volumen, es técnicamente más difícil. El tratamiento del agua consiste en una serie de pasos los cuales operan generalmente en serie. Cuanto más limpia sea el agua bruta menores son los pasos o los procesos que se requieren, y por lo tanto el costo total del agua es menor.⁹

En México, se han publicado en el Diario Oficial de la Federación un gran número de Normas Oficiales Mexicanas (NOM) en donde, algunas detallan que el agua debe cumplir con ciertos parámetros establecidos por medio de un sin número de pruebas de laboratorio. La normatividad también exige que las compañías de suministro de agua potable brinden agua agradable a los consumidores y define claramente que significa este término.^{9, 22}

1.1.1 La calidad del agua y la salud.

Debido, a la gran 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. En el mundo desarrollado, las enfermedades hídricas son raras, lo que se debe a la presencia de sistemas eficientes de abastecimiento de agua y eliminación del agua residual. Sin embargo, en el mundo en vías de desarrollo, tal vez cerca de 2000 millones de



personas no cuentan con abastecimiento de agua seguro y saneamiento adecuado. Como resultado, las enfermedades hídricas en estas áreas alcanzan cifras escalofriantes. ¹¹

En el mundo desarrollado hay preocupación por los posibles riesgos para la salud que pueden surgir a largo plazo por la presencia de pequeñas concentraciones de impurezas en el agua para beber y de varios contaminantes de origen natural o producidos por el hombre, que tienen efectos conocidos en la salud de quienes los consumen. ¹¹

1.1.2 Características de las enfermedades.

Todas las enfermedades requieren para su diseminación un foco de infección, una ruta de transmisión y la exposición de un organismo vivo susceptible a la enfermedad. Así el control de la enfermedad se basa en curar los pacientes, romper la ruta de transmisión y proteger a la población. ¹¹

Las enfermedades contagiosas humanas, son aquellas en las que el patógeno pasa su vida en el hombre y sólo puede vivir corto tiempo fuera del cuerpo, donde el ambiente le es desfavorable. Este tipo de enfermedad se trasmite por contacto directo. ¹¹

En las enfermedades no contagiosas, el patógeno pasa parte de su ciclo de vida fuera del cuerpo humano, de modo que el contacto directo no es de gran importancia. Las enfermedades no contagiosas, tienen rutas de transmisión simples en las que el desarrollo extracorpóreo del organismo infectante tiene lugar en el suelo o en el agua. ¹¹

1.1.3 Patógenos Bacterianos y Enfermedades Relacionadas con el Agua.

La materia fecal contiene más de 10^9 bacterias/gramo. El contenido bacteriano de las heces representa aproximadamente el 30% del peso húmedo. Las bacterias se han caracterizado y pertenecen a los siguientes grupos:



1. Bacterias Gram negativas anaerobias facultativas (por ejemplo, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Shigella*).
2. Bacterias Gram negativas aerobias (por ejemplo, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*).
3. Bacterias Gram positivas formadores de esporas (por ejemplo *Bacillus spp*).
4. Bacterias Gram positivas no formadoras de esporas (por ejemplo, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*).¹²

Hay una serie de enfermedades infecciosas, como se muestran en la Tabla 1, en cuya incidencia puede influir el agua. La causa de estas enfermedades puede tener su origen en bacterias, protozoarios o gusanos. Su control y detección tiene como fundamento determinar la naturaleza del agente causante, aunque es más útil tomar en consideración los aspectos relacionados con el agua en la diseminación de la infección.¹¹

Las enfermedades transmitidas por el agua, son aquellas que cuando esta se contamina con material biológico, como heces u orina humana o animal; la infección ocurre cuando el microorganismo patógeno llega al agua que consume una persona no inmune a la enfermedad. La mayoría de las enfermedades hídricas tales como el cólera, la tifoidea, la disentería bacilar, etc, siguen una ruta clásica de transmisión fecal-oral y los brotes se caracterizan porque enferman simultáneamente varias personas que toman de la misma fuente de agua.¹¹



Tabla 1. Principales enfermedades relacionadas con el agua ^{11, 14}

Enfermedad	Tipo de relación con el agua
Cólera Hepatitis infecciosa Leptospirosis Paratifoidea Tularemia Tifoidea	Transmitida por el agua
Disentería amibiana Disentería bacilar Gastroenteritis	Por el agua o por el agua para el aseo personal
Ascariasis Conjuntivitis Enfermedades diarreicas Lepra Sarna Sepsis y úlcera de la piel Tiña Tracoma	Por el agua para aseo
Gusano de Guinea Esquistosomiasis	Desarrolladas en el agua
Paludismo Oncocercosis Enfermedad del sueño Fiebre amarilla	Insectos vectores relacionados con el agua

Algunas de estas enfermedades son de gran importancia en la ciudad de México, debido a que el requerimiento fisiológico básico de agua de una persona es de 2.5 L/día, aunque la carga de trabajo y las condiciones climáticas pueden aumentar bastante esta cifra, debido a la necesidad de reemplazar el agua perdida por la transpiración. A medida que el nivel de vida aumenta también aumenta el uso del agua, con ello se consume agua contaminada con algún microorganismo patógeno en donde el consumidor esta expuesto a contraer alguna enfermedad, principalmente gastrointestinal (Tabla 2). ¹¹

Así, la calidad del agua potable para uso público es lo más importante. Los sistemas de distribución del agua municipal y rural contaminadas pueden transmitir enfermedades humanas tales como cólera (*Vibrio cholerae*), fiebre tifoidea (*Salmonella typhi*), shigelosis (*Shigella spp*), salmonelosis (*Salmonella spp*) y gastroenteritis (*Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*), (Tabla 1 y 2). La amenaza de la transmisión de tales enfermedades es más seria cuando la densidad poblacional crece y consigo los desechos de los habitantes de las ciudades que acarrean patógenos humanos intestinales. ¹⁴



La transmisión de todos ellos se realiza por vía fecal-oral y se producen principalmente por la contaminación tanto directa como indirecta, de los recursos de agua por las aguas residuales o en ocasiones por desechos de animales. Es teóricamente posible, pero improbable, que otros organismos patógenos tales como nematodos (lombrices y anquilostomas) y cestodos (tenia) se pueden transmitir a través de agua potable.⁹

Aunque estas enfermedades pueden ser transmitidas por el agua, también se difunden por cualquier otra ruta que permita la ingestión de la materia fecal de una persona enferma.

1.2 Modo de transmisión.

El agua contiene suficientes sustancias nutritivas para permitir el desarrollo de diferentes microorganismos. Muchas de las bacterias del agua provienen del contacto con el aire, el suelo, animales, o plantas vivas o en descomposición, fuentes minerales y materia fecal. La transmisión de microorganismos patógenos a través del agua ha sido la fuente más grave de epidemias de algunas enfermedades. Entre las bacterias patógenas más importantes causante de enfermedades para el humano y transmitidas a través del agua contaminada, se muestran en la Tabla 2.^{11, 12, 13}



Tabla 2. Agentes patógenos causantes de las principales enfermedades bacterianas ^{11, 12, 13}

Agente bacterial	Enfermedad	Reservorio	Sitio principalmente afectado
Salmonella typhi Salmonella paratyphi Shigella Vibrio cholerae Escherichia coli enteropatógena	Fiebre tifoidea Fiebre paratifoidea Disentería bacilar Cólera Gastroenteritis	Heces humanas	Tracto gastrointestinal
Yersinia enterocolítica Campylobacter jejuni Legionella pneumophila	Gastroenteritis Gastroenteritis Tuberculosis	Heces humanas/animales	Tracto gastrointestinal
Legionella pneumophila Mycobacterium tuberculosis	Enfermedad aguda respiratoria (enfermedad de legionnaire)	Aguas termales	Pulmones
Leptospira	Leptospirosis (enfermedad de Weil)	Exudados respiratorios humanos Heces animales y orina	Generalizado
Bacterias oportunistas	Variable	Agua natural	Principalmente tracto gastrointestinal

En 1546 el científico italiano Fracasoro, investigador de las muertes por plaga bubónica llega a una conclusión en el modo de transmisión de las infecciones, expresando que la transmisión involucra el transporte de un agente infeccioso de un reservorio a un hospedero, este es el más importante eslabón en la cadena de la infección. En 1850, el Dr. Snow estableció la transmisión de enfermedades microbianas a través del agua como el cólera. ⁹

Así, se llega a la conclusión de que la transmisión de todas ellas, involucra el transporte de un agente infeccioso de un reservorio a un hospedero. Este, es el eslabón más importante en la cadena de la infección. Los patógenos pueden ser transmitidos de un reservorio a un hospedero susceptible por varias rutas: de persona a persona (mano-mano, fecal-oral, sexual), agua, alimentos, aire, vectores, etc. ^{12, 15}

En resumen, las bacterias son el grupo más importante en cuanto a frecuencia de detección en el agua y de epidemias de enfermedades registradas. Las enfermedades por bacterias más importantes están comúnmente asociadas con la contaminación fecal del agua. Por ejemplo, en regiones templadas éstas incluyen *Salmonella* (tifoidea y paratifoidea),



Campylobacter, *Shigella* (disentería bacteriana), *Vibrio cholerae* (cólera), *Escherichia coli* (gastroenteritis) y *Mycobacterium* (tuberculosis).⁹

1.2.1 Aislamiento e identificación de microorganismos patógenos.

El aislamiento y la identificación de los microorganismos patógenos es complejo, siendo diferente para cada especie y extremadamente lento. Estos microorganismos patógenos pueden no estar presentes en el agua todo el tiempo y estar presentes solamente en un número muy pequeño. Por tanto, no se acostumbra examinar todas las muestras de agua de modo rutinario para determinar la presencia o ausencia de todos los patógenos. También, la selección de un patógeno en concreto puede ser engañoso debido a que cada especie puede tolerar diferentes condiciones ambientales. Para examinar rutinariamente los suministros de agua se requiere una prueba rápida y preferiblemente sencilla. Es mucho más importante, examinar los suministros de agua por medio de una sencilla prueba general que por una serie de pruebas más complicadas, ya que la mayoría de los casos de contaminación de los suministros de agua ocurre raramente. Esto, ha llevado al desarrollo de la utilización de microorganismos indicadores para determinar la probabilidad de contaminación por heces. Idealmente un microorganismo indicador debería:

1. Ser fácilmente detectado e identificado.
2. Ser del mismo origen que los patógenos (por ejemplo del intestino).
3. Estar presente en mucho mayor número que los patógenos.
4. Ser no patógeno por sí mismo.^{9, 12}

Así, la protección de la salud pública requiere un indicador de población fecal, ya que las heces son la principal causa de contaminación del agua por bacterias causantes de enfermedades gastrointestinales. En el año 1890, Theobald Smith propone a *Escherichia coli* como el indicador biológico de seguridad de los tratamientos del agua, ya que forma parte de la flora de mamíferos, sustituyendo a otras pruebas para detectar “coliformes” que fueron desarrolladas y formaban parte de las regulaciones del agua potable.¹⁵



Los microorganismos no patógenos están siempre presentes en el intestino de los humanos y animales se excretan junto con los patógenos, pero en mucho mayor número. Varios de estos son fácilmente aislados y son ideales para utilizarlos como indicadores de contaminación fecal. Los más ampliamente utilizadas son las bacterias no patógenas, en particular los coliformes, estreptococos fecales y los clostridios sulfato reductores. Estos tres grupos con capaces de sobrevivir durante diferentes periodos de tiempo en el medio acuático. Los estreptococos fecales mueren rápidamente fuera del hospedero y su presencia es un indicador de una contaminación reciente. *Escherichia coli* (coliformes fecales) puede sobrevivir durante varias semanas bajo condiciones ideales y es detectada más fácilmente que la otra bacteria indicadora. Debido a esto, es la prueba de microorganismos más utilizada, aunque otros son utilizados para confirmar la contaminación fecal si no se detecta *Escherichia coli*.^{9,15}

Los coliformes incluyendo *Escherichia coli*, son miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, se definen como bacterias aerobias y anaerobias facultativas, son bacilos Gram negativos, no esporulados, fermentan la lactosa con formación de ácido y gas en un período de 48 horas a 35 °C (ó 37 °C). Suelen encontrarse en el aparato intestinal del hombre y los animales. Incluyen a los géneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*.^{13, 15, 25}

Los coliformes no siempre provienen de las heces humanas, sino también pueden originarse en animales de sangre caliente, animales de sangre fría y en el suelo. Los coliformes totales, incluyen un amplio rango de microorganismos que pueden no tener su fuente primaria en el tracto intestinal. Esto es razonado sí, muchos coliformes están presentes en una muestra de agua dada, entonces, esto puede enmascarar a los patógenos entéricos que también pueden estar presentes.^{15, 19}

1.2.2 Determinación del número de bacterias en una muestra de agua.

El número de microorganismos coliformes en las heces humanas varía entre 125×10^9 y 400×10^9 . Su presencia en el agua, es considerada como un índice de contaminación fecal y por tanto de contaminación con microorganismos patógenos. Por lo que, el análisis



bacteriológico del agua es vital en la prevención de epidemias, como resultado de la contaminación del agua.¹³

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

Los coliformes son analizados en el agua potable, por medio de dos técnicas diferentes:

- a) Cualitativa, en el que el Número Más Probable (NMP) de coliformes es determinado por el uso de caldo lactosado o caldo lauril triptosa en tubos de fermentación.
- b) Cuantitativa, filtración por membrana, técnica estándar utilizada para medir la densidad de coliformes en el agua.

Ambas técnicas, siguen las recomendaciones de la American Public Health Association en sus Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater.^{12, 13}

La cuenta de coliformes totales es una medida de todos los coliformes presentes, es decir, el conteo total de coliformes es un índice de población. Las *Escherichias coli* son exclusivamente fecales en origen y están presentes en las heces frescas en un número superior a 10^9 /gramo. La presencia de coliformes en el agua potable no implica haya contaminación fecal, aunque en la práctica se asume que los coliformes son de origen fecal a no ser se pruebe de otra manera. Por tanto es importante confirmar si *Escherichia coli* está presente. Esto se hace conjuntamente con la cuenta de coliformes. En la práctica se informa de la cuenta de coliformes totales y la cuenta de coliformes fecales (*E. coli*).^{9, 15}

Se ha resumido la interpretación de los resultados de coliformes como sigue:

- Donde está presente *Escherichia coli* en gran número, la conclusión es; ha ocurrido una fuerte y reciente contaminación por aguas residuales humanas o animales.
- Si el número de *Escherichia coli* es bajo, esto se interpreta como; la contaminación del mismo origen es tanto reciente o menos severa.



- Si se observan coliformes sin *Escherichia coli* la indicación es; la contaminación es tanto reciente y de origen no fecal o remota y de origen fecal tal que los coliformes fecales no han sobrevivido.
- No obstante, si se encuentra cualquier coliforme en un suministro de agua potable tratada, seguida de cloración, se debe concluir que se está aplicando un tratamiento inadecuado o que la contaminación se ha introducido durante la distribución del agua, o en la toma y/o manejo de la muestra.^{9, 15}

Cualquier indicación de contaminación, por ligera que sea, debe ser considerada como materia grave y las circunstancias investigadas inmediatamente.⁹

En muchas situaciones, es necesario calcular la cantidad de microorganismos presentes en una muestra de agua, así la estimación del número de bacterias vivas (recuento celular viable) en una muestra de agua se obtiene con un conteo de placa y con el uso de un medio nutriente de agar. Una muestra de agua (si es necesario diluida), se mezcla con agar a 40°C en una caja Petri. El agar se solidifica como gelatina y fija las células bacterianas en posición. Entonces la placa se incuba en condiciones apropiadas a 24 horas a 37°C para bacterias que provienen del hombre o de animales. Al final del periodo de incubación las bacterias habrán producido colonias visibles a simple vista y supone que el número de colonias es una función de las células viables en la muestra original. En la práctica, los recuentos en placa no dan la población total de una muestra, ya que ninguna combinación de medio y temperatura permitirá que todas las bacterias se reproduzcan.⁹

El método de conteo en placa es usado en las plantas de tratamiento de agua de acuerdo a las siguientes indicaciones:

1. Medición de la eficacia de los diferentes procesos del tratamiento. Incluyendo la desinfección, en una planta de tratamiento de agua.
2. Monitoreo de la calidad bacteriológica del agua final durante el almacenaje y distribución.
3. Determinar el crecimiento bacteriano en la superficie de materiales usados en el tratamiento y los sistemas de distribución.
4. Determinación del potencial de desarrollo o crecimiento posterior en el agua tratada en los sistemas de distribución.¹²



Para determinar la presencia de un género particular o especie de bacteria, es necesario observar como se comporta en un medio especial o en condiciones óptimas de incubación, y sean adecuados únicamente para las bacterias que se investigan. Muchas enfermedades graves están relacionadas con la contaminación microbiológica del agua, contaminación debida en su mayoría a bacterias patógenas excretadas por gente que sufre o porta la enfermedad. Aún cuando es posible examinar el agua para detectar la presencia de un patógeno específico, una prueba más sensible emplea como microorganismo indicador la bacteria *Escherichia coli*, un habitante normal del intestino humano el cual se excreta en grandes cantidades. Su presencia en el agua, indica contaminación por excreta y la muestra se clasifica como potencialmente peligrosa pues también podrían estar presentes bacterias fecales patógenas. Las bacterias coliformes, en general tienen la capacidad de fermentar la lactosa, fermentación que produce ácido y gas. La detección de coliformes se efectúa en un medio lactosado con diluciones de la muestra. La aparición de ácido y gas después de 24 horas de incubación a 37 °C, se toma como indicación positiva de la presencia de bacterias coliformes; con la ayuda de tablas estadísticas el resultado se expresa como el Número Más Probable (NMP/100 mL). Para comprobar positivamente la presencia de *Escherichia coli*, se subcultivan tubos positivos en un medio caldo lauril por 24 horas a 44°C, en cuyas condiciones sólo crece la *Escherichia coli* para producir ácido y gas.^{11, 12, 13, 14}

Así, los métodos para la detección de *Escherichia coli* en el agua y otras muestras ambientales, han cambiado poco en muchos años, principalmente basándose en la fermentación de la lactosa y la habilidad de muchas cepas de *Escherichia coli* para crecer a 44 °C. Pero existen otros métodos para la detección de esta bacteria más rápidos, sensibles y específicos, por ejemplo los métodos enzimáticos en los cuales se usa la enzima β -D-glucoronidasa, característica de estar presente en el 95% de todas las *Escherichia coli* aisladas, o el uso de la PCR para identificar *Escherichia coli* basándonos en el gen *uidA* el cual codifica la β -D-glucoronidasa.^{15, 16}

Para detectar la enzima β -D-glucoronidasa, se utiliza un sustrato fluorogénico como el 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido (MUG), el medio de cultivo caldo lauril triptosa con MUG se inocula con la muestra y se incuba por 24 horas a 35 \pm 0.5°C. La enzima β -D-glucoronidasa hidroliza el sustrato, produciendo fluorescencia cuando el líquido se expone a



luz ultravioleta a una longitud de onda de 366 nm. La presencia de fluorescencia indica una respuesta positiva para *Escherichia coli*.

1.3 Normas Oficiales Mexicanas.

En México, se han publicado en el Diario Oficial de la Federación un gran número de Normas Oficiales Mexicanas (NOM) en donde, algunas detallan aspectos importantes que el agua debe cumplir con ciertos parámetros establecidos por medio de un sin número de pruebas de laboratorio. Dichas Normas, exigen a las compañías de suministro de agua potable brinden agua para uso y consumo humano libre de microorganismos patógenos a los consumidores y define claramente que significa este y otros términos.¹⁷

La Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-201-SSA-2000 tiene un grupo de estándares para el agua potable, las sustancias y equipos utilizados en la desinfección del agua deben lograr como mínimo un porcentaje de reducción de organismos coliformes totales de 99.99% y donde las especificaciones sanitarias del agua potable expresen se considera de buena calidad cuando no se detecten coliformes totales ni fecales.¹⁷

Deben existir procedimientos escritos para la realización de las operaciones de limpieza y desinfección que especifiquen como mínimo productos usados, concentraciones, tiempos de contacto, enjuagues y medidas para evitar la contaminación de los equipos, utensilios o productos.

1.3.1 Estándares revisados por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Las normas de la OMS para el agua potable, son quizá los estándares más importantes relacionados a la calidad del agua. Las normas incluyen parámetros microbiológicos, químicos y radiológicos. Las normas microbiológicas todavía están basadas en *E. coli* o en coliformes termorresistentes como indicadores de la contaminación fecal. Se recomienda coliformes totales solamente como indicadores de la eficiencia del tratamiento y la integridad del sistema de distribución, no como indicador de la presencia o ausencia de patógenos. No



se han establecido valores guía para virus, protozoos o bacterias patógenas específicas debido a la ausencia de métodos analíticos adecuados para el trabajo rutinario.⁹

Las normas de la OMS, se usan universalmente. Las normas originales se publicaron en dos volúmenes en 1984. El Volumen 1 es el de las normas, mientras que el Volumen 2 contiene las evidencias científicas sobre las cuales se basan las recomendaciones del Volumen 1. Las normas existentes se basan en las evidencias toxicológicas disponibles hasta 1987, normas añadidas en Ginebra en septiembre de 1992. Las nuevas normas incluyen parámetros microbiológicos, químicos y radiológicos. Los parámetros químicos incluyen 17 inorgánicos, 27 orgánicos, 33 pesticidas y 17 desinfectantes y subproductos asociados. Las normas revisadas se incluyen en la Tabla 3.⁹



Tabla 3. Valores guía revisados del agua potable de la OMS para la calidad bacteriológica del agua potable. ⁹

Organismos	Norma
Todas las aguas destinadas para consumo <i>Escherichia coli</i> o bacterias coliformes termorresistentes	No deben ser detectables en ninguna muestra de 100 mL
Agua tratada entrando en el sistema de distribución <i>Escherichia coli</i> o bacterias coliformes termorresistentes Bacterias coliformes totales	No deben ser detectables en ninguna muestra de 100 mL No deben ser detectables en ninguna muestra de 100 mL
Agua tratada en el sistema de distribución <i>Escherichia coli</i> o bacterias coliformes termorresistentes Bacterias coliformes totales	No deben ser detectables en ninguna muestra de 100 mL No deben ser detectables en ninguna muestra de 100 mL. En el caso de grandes suministros donde se examinan suficientes muestras, no deben estar presentes en los 95% de la muestra tomadas durante cualquier periodo de 12 meses.
Agua embotellada Bacterias coliformes fecales Bacterias coliformes	No detectables en ninguna muestra de 100 mL No detectables en ninguna muestra de 100 mL

1.3.2 Norma Oficial Mexicana NOM-181-SSA1-1008, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Requisitos sanitarios que deben cumplir las sustancias germicidas para el tratamiento del agua, tipo doméstico. ²⁰

El objetivo de los programas de abastecimiento de agua para uso y consumo humano, es asegurar que toda la población alcance una dotación adecuada de agua de buena calidad. Sin embargo en México, en la práctica no se han alcanzado estas metas, por lo que un elevado número de usuarios recurre a métodos intradomiciliarios para subsanar



deficiencias de la calidad del agua suministrada a nivel municipal. Los métodos intradomiciliarios o domésticos para purificar el agua de consumo humano, consiste en la aplicación de equipos potabilizadores y sustancias germicidas, orientadas fundamentalmente al aspecto bacteriológico, considerado como riesgo inmediato a la salud y en casos específicos a la depuración de características físicas y/o químicas.²⁰

Esta norma oficial mexicana establece las características que deben cumplir las sustancias germicidas para el tratamiento de agua, de tipo doméstico. Las personas físicas y morales que se dediquen al proceso e importación de sustancias germicidas para el tratamiento de agua, de tipo doméstico, deben tener a disposición de la autoridad sanitaria competente, un informe de resultados de laboratorio sobre prueba de potabilidad, de cada sustancia en particular, de conformidad con el método de prueba de eficiencia antimicrobiana de sustancias germicidas miscibles en agua, descrito en el apéndice de esta Norma. El laboratorio que efectuó la prueba debe ser acreditado o tercero autorizado.²⁰

La prueba de potabilidad es aceptable, cuando el porcentaje de reducción bacteriana es igual o mayor a 95% para organismos mesofílicos aerobios e igual o mayor a 99.99% para organismos coliformes totales. La eficiencia de una sustancia germicida está dada por su capacidad para destruir o matar una carga bacteriana presente en el agua. Esta eficiencia está basada en su poder germicida a través de sus componentes químicos y su efecto sobre las bacterias de acuerdo con su concentración y tiempo de contacto.²⁰

Para probar la eficiencia de la sustancia germicida, se inocula una fuente de agua con un número conocido de colonias del microorganismo seleccionado. Posteriormente, el agua se somete a la acción de dicha sustancia germicida, bajo las condiciones indicadas en el instructivo proporcionado por el fabricante.²⁰

Se toman muestras del agua de prueba, antes y después de haberse sometido al tratamiento, de acuerdo con la NOM-014-SSA-1993, Procedimientos sanitarios para el muestreo de agua para uso y consumo humano distribuida por sistemas de abastecimiento públicos y privados. A continuación, se determinan en dichas muestras la concentración de organismos mesofílicos aerobios y coliformes totales.²⁰



1.3.3 Principales Características del Agua Potable.

El agua potable es aquella que puede beberse sin peligro alguno, es limpia, fresca, sin sabores u olores desagradables o que causen rechazo de quien las consumen, pues no provoca ningún daño a la salud y a la vez es útil para el desarrollo de las diversas actividades humanas (domésticas, sociales, industriales, etc.). Comprende parámetros físicos, químicos, bacteriológicos y radiológicos del agua en el origen y de la distribución después de someterla a procesos de tratamiento y desinfección. ^{19, 24, 41}

De acuerdo a lo establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el agua potable debe cumplir con los siguientes requisitos:

1. No debe contener sustancias nocivas para la salud, es decir, carecer de contaminantes: biológicos, (microbios y/o gérmenes patógenos), químicos, tóxicos, (orgánicos e inorgánicos) y radioactivos.
2. Poseer una proporción determinada tanto de gases (O_2 y CO_2) como de sales inorgánicas disueltas.
3. Debe ser incolora o translúcida, inodora y de sabor agradable. ¹⁹

En el caso de agua potable, es común evaluar principalmente los parámetros microbiológicos, en la mayor parte del mundo éstos son importantes para determinar la calidad del agua potable. Las normas de calidad microbiológicas se basan en la necesidad de asegurar la ausencia de bacterias indicadoras de contaminación fecal. ¹³

1.4 Desinfección y Métodos de Desinfección.

Debido a lo pequeño de muchos microorganismos, no es posible garantizar la remoción completa con los tratamientos de desinfección. Por esta razón es necesario desinfectar el agua, pues se elimina a microorganismos infecciosos de un medio dado mediante el uso de agentes físicos y químicos que reciben el nombre de desinfectante. La desinfección es la



barrera contra la exposición humana ante microorganismos patogénicos que causan enfermedades, incluyendo virus, bacterias y parásitos. ^{11, 12, 31}

La cloración fue y ha sido usada por siglos para proveer una seguridad adicional contra microorganismos patogénicos. La destrucción de patógenos y parásitos por desinfección, ayuda considerablemente en la reducción de enfermedades. En años recientes, se ha encontrado que la cloración puede causar la formación de productos que pueden ser tóxicos o genotóxicos para humanos y animales. Algunos de los desinfectantes usados para la destrucción de patógenos y parásitos son el ozono y el dióxido de cloro, también empleados para la oxidación de materia orgánica, hierro y manganeso y para controlar los problemas de sabor, olor y crecimiento de algas. ^{11, 12}

Uno de los procesos de purificación del agua comprende la filtración, los filtros lentos de arena son muy eficaces para eliminar bacterias y el proceso de coagulación es bueno para eliminar virus, no es posible garantizar que su remoción sea completa por dichos tratamientos debido a lo pequeño de muchos microorganismos, así el agua obtenida contiene patógenos y bacterias que necesitan ser eliminados o destruidos. ^{9, 11, 12}

En la práctica, es imposible esterilizar el agua para matar todos los microorganismos presentes y debido a la alta concentración de productos químicos requeridos para su esterilización, harían el agua muy desagradable y posiblemente peligrosa para beber. Por lo tanto, el agua se desinfecta en lugar de esterilizarla, utilizando uno de los métodos de desinfección como la cloración, ozono o la radiación ultravioleta para asegurar que los patógenos potencialmente dañinos se mantengan en un nivel de seguridad en las aguas potables. ⁹

Es importante observar la diferencia entre esterilización (muerte de todos los microorganismos), que rara vez se necesita y la desinfección (muerte de organismos potencialmente dañinos) que es el requerimiento normal. ^{11, 13}

La eficacia del tratamiento del agua en eliminar microorganismos patógenos varía de mes a mes, e incluso cuando la planta de tratamiento está logrando un 99.9% de eliminación habrá siempre algunos patógenos residuales en el agua. Esto significa que la desinfección



es absolutamente vital para asegurar que todos los microorganismos provenientes de una contaminación fecal del agua bruta sean destruidos. ⁹

Desde el punto de vista de los programas de control sanitario y de campo, la desinfección representa una manera de limitar la transmisión de enfermedades animales. Por si solo, el uso de desinfectantes no puede eliminar una infección si las poblaciones sensibles se ponen continuamente en contacto con animales portadores de agentes patógenos. Ello exige que las autoridades de control deban de examinar cada paso de la compleja red epidemiológica, o lo que es lo mismo, seguir la evolución de los agentes de la enfermedad, desde los reservorios hasta los nuevos hospedadores sensibles. ³¹

En su mayoría, los desinfectantes utilizados en el campo de la salud animal son productos químicos antimicrobianos o biocidas relativamente potentes, que se aplican sobre las superficies contaminadas. Los desinfectantes modernos se componen de formulaciones complejas de sustancias químicas, jabones, detergentes y productos que favorecen la penetración de las sustancias activas. ³¹

1.4.1 Factores que influyen en la Desinfección.

Se consideran dos puntos importantes de los factores que influyen en la desinfección:

- a) Tipo de desinfectante: El proceso de desinfección no es instantáneo, si no que ocurre gradualmente; él número de microorganismos muertos por unidad de tiempo es mayor al principio y va siendo cada vez más pequeño conforme aumenta el tiempo de exposición. La eficacia de la desinfección depende del tipo de químico utilizado. Algunos desinfectantes, por ejemplo, el ozono, la plata coloidal y el dióxido de cloro son fuertes oxidantes y es como liberan oxígeno interfieren en la anaerobiosis, en comparación con otros como el cloro.
- b) Tipo de microorganismo: Existe una exagerada variación en la resistencia de varios microorganismos patógenos a la desinfección. Las bacterias formadoras de esporas son generalmente más resistentes a los desinfectantes que las bacterias vegetativas. La



resistencia a los desinfectantes varía de acuerdo a la cantidad de bacterias y a la cepa perteneciente. En general, la resistencia a la desinfección lleva el siguiente orden: bacteria vegetativa, virus entéricos, bacterias formadoras de esporas, quistes de protozoarios.¹²

Además un desinfectante debe de carecer de acción corrosiva, sofocante o tóxica para los seres vivos.³¹

1.4.2 Desinfectantes iónicos (ácidos orgánicos).

Dentro de las sustancias germicidas, se encuentran los ácidos cítricos, son compuestos iónicos de los ácidos orgánicos. Sus componentes naturales son producidos por el metabolismo natural de las frutas y legumbres que las protegen de la putrefacción, debido a que este actúa como un mecanismo de defensa, tienen un amplio espectro germicida, ya que eliminan microorganismos aún en altas concentraciones.^{26, 27, 31}

Los extractos cítricos son aceites esenciales obtenidos de las semillas de diferentes variedades de cítricos como la toronja, naranja, limón y otros cítricos. Por ejemplo, el ácido acético, cítrico, succínico, málico, tartárico, benzoico y sórbico son los principales ácidos orgánicos que existen en forma natural en los productos frescos.^{26, 27, 28, 29}

Los extractos cítricos son sustancias multicomponentes, dentro del fruto tienen funciones biológicas específicas, al extraerse se modifican para encontrar diversos usos en la industria, siendo uno de los más recientes, el de agente bactericida y fungicida.²⁶

Los mecanismos de acción de los extractos cítricos son:

1. El rompimiento de la pared celular en enlaces β 1-4,
2. Precipitación de proteínas,
3. Oxidación de protoplasma,
4. Inactivación enzimática,



lo que les proporciona un amplio espectro de acción. Estos mecanismos se activan por contacto entre el producto a tratar y el extracto cítrico, lo que los hace seguros ya que generan un mínimo de resistencia bacteriana.²⁶

En virtud de lo anterior, se han encontrado amplias ventajas en el uso de estos compuestos en comparación con los productos de síntesis química. Las principales son su inocuidad y biodegradabilidad, ya que la mayoría de los productos tratados con desinfectantes químicos se han convertido en compuestos tóxicos y de alto riesgo para la salud humana; del mismo modo, el ambiente sufre grandes y severos impactos al ser enfrentados ante productos sintéticamente creados y que no pueden ser incluidos como parte del ecosistema. La industria está aceptando productos naturales y biodegradables, gracias a que estos generan un mínimo de corrosión a los equipos sin daño al personal que los emplea y su efecto residual es fácilmente controlable.²⁶

Entre los usos que se le dan en la agroindustria, está la disminución o eliminación de riesgos microbiológicos ya que al ser productos que actúan por contacto pueden aplicarse a través de aspersiones, inmersiones, nebulizaciones y mezclas con otros productos afines, asegurando la eficiencia de éstos. Dada su versatilidad, los extractos cítricos han encontrado en el ambiente agrícola, pecuario e industria de proceso sustituyendo a los agentes químicos de uso común en las contaminaciones fúngicas y bacterianas, pero sin afectar a la materia prima y/o a los consumidores finales. De lo anterior, surge una nueva denominación de origen que especifica que el producto a consumir es seguro y sano pues fue tratado con agentes orgánicos donde los extractos cítricos juegan un papel importante.²⁶

Los sistemas de control de calidad, sanitización, desinfección, purificación de agua y formulación de alimentos, tienen a Desfan 100 y Rubigen forte, como desinfectantes orgánicos, los cuales se comportan como poderosos bactericidas, fungicidas, algicidas y viricidas, preservantes y antioxidantes, extraídos de las semillas de la naranja, toronja, limón y otros cítricos.^{28, 29}

Desfan 100 es un compuesto orgánico complejo, proveniente de la extracción de cítricos, como las semillas de la naranja y toronja, contiene fracciones de glucosa, fructosa y



ácido ascórbico. Dicho ingrediente activo, está estabilizado físicamente e integrado por pequeñas trazas de elementos químicos naturales como: ácido ascórbico (vitamina C), ácido palmítico, aminoácidos, fracciones de glucosa, grupo metil, hidroxil, etc. La acción no tóxica y no irritante del desfan 100 en humanos y animales garantiza un amplio manipuleo para uso a nivel de industria.²⁸

Desfan 100 es soluble en agua ya que no produce contaminación del medio ambiente, los estudios han demostrado que es efectivo a mínimas concentraciones. Es 100% biodegradable. No produce problemas de oxidación y de acumulación en el hombre y los animales por ser inocuo. No es afectado por temperatura de congelación y soporta hasta 400 °C. No es corrosivo ni volátil.²⁸

Rubigen Forte es un producto de origen natural, orgánico y ecológico, extraído de las semillas de la toronja, naranja, limón y otros cítricos. El extracto cítrico está compuesto por ácido ascórbico, ácido cítrico, fracciones de glucosa y fructuosa, proteínas, lípidos y compuestos no nitrogenados. Es seguro, ya que no deja residuos contaminantes, es 100% biodegradable y los estudios revelan que no es mutagénico ni carcinogénico.²⁹

Rubigen Forte puede ser utilizado en el alimento de los animales hasta el sacrificio, debido a que no altera el sabor natural y olor de los alimentos. No es irritante, ni tóxico, ni corrosivo. Es estable a variaciones de pH, luz, a altas temperaturas (hasta 120° C) y es activo en presencia de materia orgánica.²⁹

Rubigen tiene actividad *in vitro* frente a bacterias y hongos, gracias a su poderosa acción antioxidante, favorece la inmunidad natural de los animales y reduce el stress, no es un antibiótico, no crea resistencias, tiene una excelente acción prolongada y es compatible con los productos de uso habitual en sanidad animal.²⁹

El uso continuado de Rubigen en los alimentos de los animales favorece la reducción del uso de Antibióticos y Quimioterápicos, que pueden dar lugar a la aparición de residuos tóxicos en las canales de dichos animales. En el ámbito zootécnico, Rubigen maximiza la productividad de los animales, colabora en la reducción de patologías digestivas, mortalidad, stress y costos, Rubigen permite reducir el uso de antibióticos como preventivos de procesos



entéricos, mejorando de esta forma su actividad como terapéuticos al evitar la aparición de resistencias.²⁹

1.4.3 Mecanismo de acción de los ácidos orgánicos.

Desfan 100 actúa por contacto, a través del sistema de citoplasmosis exterminando los microorganismos patógenos al romper y explotar su pared celular y su citoplasma. En cambio, Rubigen forte actúa por contacto causando el rompimiento de las membranas celulares de los microorganismos.^{28, 29}

Esto permite observar, el mecanismo de acción de los desinfectantes orgánicos, cual se lleva a cabo a través del rompimiento de las membranas celulares en los microorganismos de prueba, dañando así el ciclo vital de la célula e interrumpiendo su multiplicación.^{28, 29}

Las propiedades de Rubigen se deben, fundamentalmente, a la acción sinérgica del ácido ascórbico unido a los bioflavonoides cítricos. El resto de las sustancias, presentes de forma natural, son coadyuvantes y complementan su actividad. Rubigen actúa progresivamente consiguiendo un efecto prolongado beneficioso. En el animal trabaja a dos niveles: Por un lado, tiene acción en el tracto gastrointestinal y por otro lado, acción sistémica gracias a la actividad individual de algunas sustancias, una vez absorbidas en el intestino. La alta potencia como antioxidante de Rubigen se debe a la acción sinérgica entre ácido ascórbico, bioflavonoides y ácido cítrico. Esto hace que Rubigen tenga, añadida a su eficacia nutricional, una muy beneficiosa acción antioxidante como poderoso captador de radicales libres y mejorador de la calidad de la carne y huevos.²⁹

Sinergismo entre ácido ascórbico (vitamina C) y bioflavonoides

Los bioflavonoides protegen al ácido ascórbico (vitamina C) contra la degradación y oxidación natural causadas por la humedad, el aire y la luz. Por el proceso especial de fabricación, el ácido ascórbico de Rubigen posee una excelente estabilidad y un elevado nivel de biodisponibilidad. Este nivel de biodisponibilidad, hace que su uso sea más interesante que el del simple ácido ascórbico debido a la baja efectividad de éste por causa



de su degradación y oxidación. El ácido ascórbico de Rubigen trabaja mejor en procesos redox (reducción y oxidación) en el organismo animal, convirtiéndose en ácido dehidroascórbico, a través de una reacción reversible por la liberación de un hidrógeno, el cual es capaz de oxidar (deshidrogenar) otros productos metabólicos por su acción captadora de iones hidrógeno.²⁹

El alto poder reductor del ácido ascórbico le proporciona su carácter estabilizador de sustancias potencialmente oxidables (por ejemplo adrenalina). Existen importantes relaciones metabólicas entre la vitamina C y otras vitaminas y enzimas, manifestándose en diferentes acciones (sinergismos o inhibiciones). La actividad antiinfecciosa, basada principalmente en la capacidad de inhibición de toxinas, está posiblemente conectada con estas reacciones.²⁹

Los bioflavonoides (vitamina P) son potentísimos antioxidantes y captadores de radicales libres. Así son citoprotectores en situaciones donde sustancias oxidantes o radicales libres resultan dañinos para las células. La acción antioxidante de los bioflavonoides es cinco veces superior que la del ácido ascórbico y los tocoferoles (vitamina E).²⁹

Los bioflavonoides inhiben *in vitro* la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos y reduce la citotoxicidad de la LDL oxidada. Los bioflavonoides, en combinación con derivados de la vitamina C, muestran efectos sinérgicos como conservadores de aromas en alimentos y bebidas.²⁹

1.5 Microscopia Electrónica

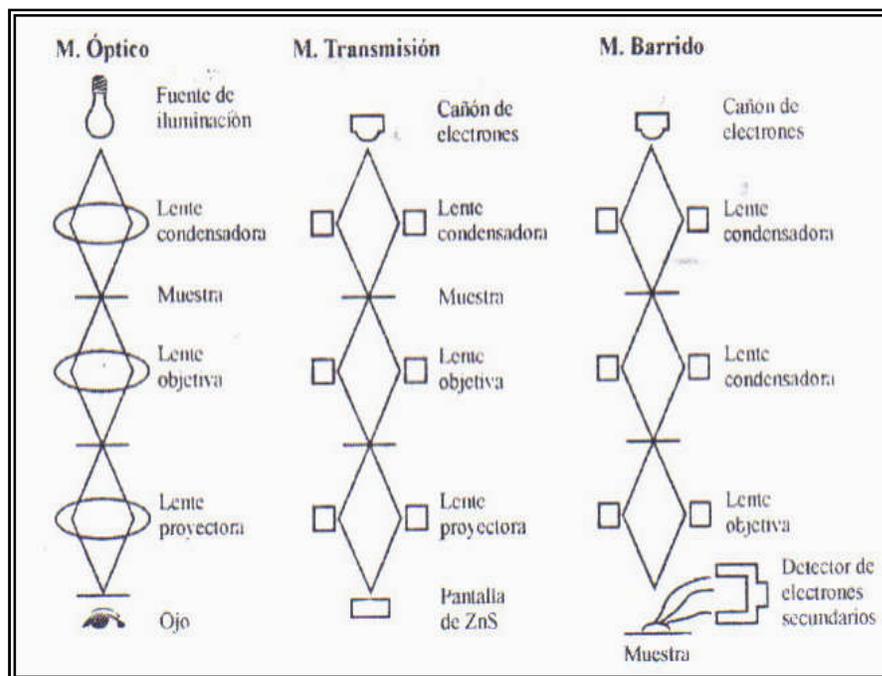
La microscopia tiene un campo de aplicación muy grande, con ella se obtienen imágenes detalladas de estructuras que no son posibles observar a simple vista, es capaz de transformar un objeto en una imagen, la cual amplifica (magnifica) los detalles característicos del objeto.³²



Dentro de la familia de microscopios electrónicos, se encuentran el microscopio electrónico de transmisión (TEM) y el microscopio electrónico de barrido (SEM). Cada uno de ellos, permite el estudio de diferentes características de una muestra. El SEM provee información sobre morfología y características de la superficie, mientras que con el TEM podemos observar la estructura interna y detalles ultraestructurales.³²

En cuanto a construcción, el microscopio electrónico y el microscopio óptico, presentan un diseño casi idéntico; la diferencia fundamental entre ambos es la fuente de iluminación, el microscopio electrónico usa un haz de electrones que permite tener una mayor resolución, en tanto que el óptico utiliza un haz de luz (incluyendo un haz ultravioleta) para ese propósito (ver figura 1).^{32, 33}

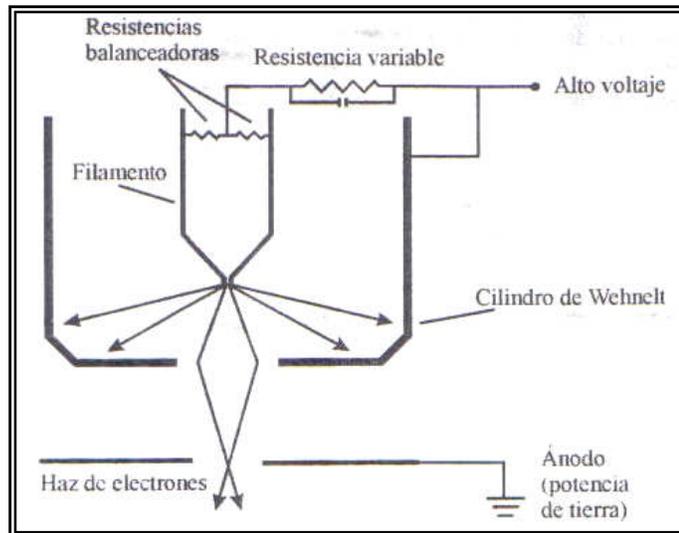
Figura 1. Esquema de los microscopios óptico, electrónico de transmisión y electrónico de barrido³²



La fuente de iluminación de un microscopio electrónico es un haz de electrones de alta energía obtenido por la aceleración de los electrones de una fuente (un filamento de tungsteno) con un campo eléctrico (ver figura 2).³³



Figura 2. Cañón del Microscopio electrónico



El haz de electrones generado en el filamento sale por el orificio interior del cilindro de Wehnelt y por diferencia del potencial del ánodo que tiene carga contraria al haz de electrones emitirá este hacia la luz de las partes electromagnéticas.³³

El voltaje de aceleración y el número de electrones que escapan del cañón electrónico (corriente emisora de electrones) están directamente relacionados, de manera que cuanto menor sea el voltaje menor será la emisión de electrones.³³

Los electrones son partículas cargadas eléctricamente; su trayectoria puede modificarse por un campo magnético, por lo que las lentes magnéticas del microscopio electrónico están diseñadas para este propósito. La intensidad del campo magnético depende de la intensidad de la corriente eléctrica que pasa por el hilo metálico de la pieza polar de la lente magnética.³³

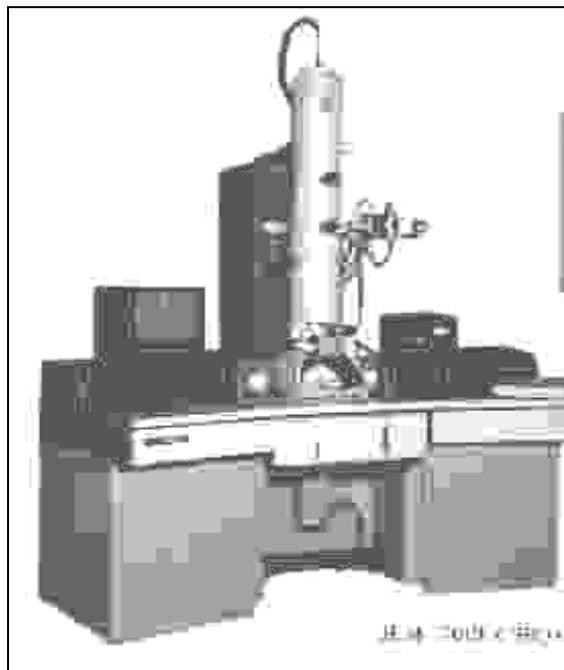
Como la fuente de iluminación en el microscopio electrónico es un haz de electrones en un sistema al vacío existen ciertas limitaciones; por ello las muestras no deben contener agua, sino estar perfectamente secas, por lo que no es posible observar ningún material biológico vivo, además las muestra deben protegerse de la alta energía generada por el haz de electrones. Sin embargo, debido a la gran cantidad de accesorios con los que cuenta el microscopio, su uso presenta diversas ventajas, sobre todo cuando combina pantallas de



imágenes obtenidas por barrido, análisis de difracción de electrones y rayos X. La terminología de los componentes del microscopio electrónico básicamente es similar a la del óptico.³³

Los microscopios electrónicos de transmisión y de barrido son muy útiles para el estudio de las diferentes muestras tanto biológicas como no biológicas. El de transmisión proporciona información referente a la ultraestructura celular o, en su caso, de partículas muy pequeñas (de menos de 150 nm de grosor), mientras el electrónico de barrido informa sobre la ultraestructura de superficie de la muestra. Ambos presentan el mismo principio en su diseño; la diferencia básica es que el electrónico de transmisión da una imagen proporcionada por electrones primarios o transmitidos en una pantalla fluorescente de sulfato de zinc, en donde la imagen está en un solo plano, mientras el electrónico de barrido cuenta con un sistema detector de electrones secundarios los cuales pasan al fotomultiplicador, y posteriormente presenta una imagen tridimensional de la superficie de la muestra en una pantalla tipo televisión. Dicha imagen está dada por la formación de electrones secundarios que se producen en la interacción del haz de electrones y la muestra. Todo el sistema de la columna del microscopio de barrido es igual al de transmisión.^{32, 33}

Figura 2.1 *Microscopio electrónico*





1.5.1 MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN (MET)

El microscopio electrónico de transmisión, es un equipo complejo que funciona al alto vacío, en donde la imagen está dada por los electrones transmitidos a través de la muestra, por ello se requiere que sea de un grosor menor a 100 nm para obtener una buena resolución. Sin embargo, debido a la interacción de los electrones de alta energía, la muestra requiere estar protegida con metales pesados para soportar dicha interacción. Las muestras que requieren ser observadas deben cumplir con las siguientes características: no puede ser observado al microscopio, ningún material vivo o que contenga agua, porque el sistema funciona al alto vacío, además, se debe proteger contra el haz de electrones. Las muestras deben tener un grosor adecuado para permitir que los electrones sean transmitidos y así poder tener una imagen con buena resolución.³³

Para la preparación de las muestras en MET, es necesario tener una serie de cuidados como: el tipo de fijador, amortiguador, posfijador, solventes para la deshidratación, el tipo de membranas y resinas para la inclusión, esto es dependiendo de las características propias de la muestra, debido a que se requiere de gran precisión para que los resultados sean correctos.³³

1.5.2 Tinción Negativa

La finalidad de la tinción negativa es la de incluir partículas completas en un medio denso de electrones, de manera que la muestra sea observada como un objeto luminoso sobre un fondo oscuro. La tinción negativa constituye una técnica simple y rápida; el tiempo requerido para recibir la muestra hasta su visualización en el microscopio electrónico es de 15 minutos. Solo se requiere un volumen pequeño de muestra y es recompensado con buena preservación, contraste elevado y frecuentemente mayor resolución del tamaño molecular con la tinción positiva.³⁴

Algunas desventajas de esta técnica se encuentran en su limitación para las partículas aisladas, la alta concentración de partículas que se necesita y la reacción posible de la tinción para medio denso en electrones con la muestra. El mecanismo de la tinción negativa



no está completamente entendido, pero se supone que el material en medio denso de electrones se seca rápidamente alrededor de la muestra con el mínimo de artefactos.³⁴

Como se trata de observar una imagen de los tejidos en el microscopio electrónico con un buen contraste, se puede conseguir tratando los tejidos con los colorantes electrónicos; el ácido fosfotúngstico es un buen colorante electrónico de tipo general que resalta las estructuras proteicas.

El elemento activo del ácido fosfotúngstico es el tungsteno (P.M. 183.92), con la especial característica de que este compuesto se asocia en cada molécula con 24 átomos de carbono del mismo. Por el gran peso molecular de este ácido las tinciones electrónicas denotan una gran resistencia al bombardeo del haz de electrones en el microscopio electrónico.

La técnica de tinción negativa, constituye la principal metodología para un rápido diagnóstico de virus, debido a que los virus son identificados principalmente por su morfología. Entre las muestras clínicas recibidas para la identificación se encuentran exudados, secreciones o excreciones en los cuales los virus están suspendidos. Aunque la tinción negativa prevé ser el método más rápido y simple para detectar virus en muestras clínicas, únicamente una pequeña porción de la muestra es examinada sobre la rejilla y aproximadamente 10⁶ a 10⁷ partículas/mL pueden estar en la muestra original en el orden de ser detectados por microscopía electrónica.³³

Las rejillas cubiertas con membranas Formvar o Parlodión, ofrecen un soporte estable para las muestras teñidas negativamente. La máxima estabilidad de los soportes plásticos es aumentada por una capa de carbón evaporado, lo cual provee una capa fina para obtener una alta resolución.³³

La tinción negativa no está limitada a muestras biológicas, también puede ser aplicada al estudio de materiales industriales, algunos como papeles y plásticos. Los materiales que se emplean para las tinciones negativas deben tener una densidad electrónica alta y ser estables al haz de electrones.³³



1.6 JUSTIFICACIÓN

El agua es un trasmisor de enfermedades como el cólera, la tifoidea, la salmonelosis y la gastroenteritis, debido a ello, el objetivo de los abastecimientos de agua para uso y consumo humano, es asegurar que todo aquel que utilice esta agua, tenga una dotación adecuada de agua de buena calidad.

Para ellos los métodos para purificar el agua de consumo, consiste en la utilización de equipos potabilizadores y/o a la adición de sustancias germicidas, orientados fundamentalmente al aspecto bacteriológico, considerado como de riesgo inmediato a la salud, debido a que provocan numerosas enfermedades gastrointestinales. La Secretaria de Salud, presenta las Normas Oficiales Mexicanas, en donde se detallan las pruebas y las disposiciones sanitarias que deben cumplir las sustancias germicidas y los equipos para poder salir al mercado.

Este trabajo pretende evaluar el efecto bactericida y la actividad antimicrobiana de los productos elaborados con extractos cítricos (ácidos orgánicos) que requieren ser introducidos al mercado como desinfectantes de agua en granjas porcinas, debido a esto se requiere tener estudios en bacterias que provoquen problemas de salud animal, como bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Escherichia coli*). *Escherichia coli* esta asocia con una gran variedad de enfermedades gastrointestinales, *Staphylococcus aureus* produce una variedad de procesos infecciosos que van desde infecciones cutáneas hasta enfermedades sistémicas potencialmente fatales y *Pasteurella multocida* causa en el ganado porcino rinitis atrófica y en el ser humano es responsable de diversas infecciones.

1.7 HIPOTESIS

Si se utilizan como desinfectantes de agua los productos elaborados a base de extractos cítricos entonces se podrán emplear como métodos efectivos de desinfección de agua utilizada en granjas porcinas y por medio de la microscopia electrónica observar el efecto causado sobre las bacterias *Escherichia coli* y *Pasteurella multocida*.



2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- ⇒ Evaluar el efecto bactericida y la actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos contra *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida* y *Staphylococcus aureus* a través de métodos generales de análisis para comprobar que los productos cumplen con las especificaciones recomendadas por los fabricantes.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ⇒ Evaluar la actividad antimicrobiana de dos productos germicidas Desfan-100 y Rubigen Forte por métodos ya establecidos.
- ⇒ Evaluar la eficiencia antimicrobiana de los extractos cítricos Desfan-100 y Rubigen Forte en función de su concentración y tiempo de contacto.
- ⇒ Comparar la acción bactericida de ambos desinfectantes y determinar el que presenta mayor eficacia.
- ⇒ Demostrar si los productos cumplen con las propiedades atribuidas por el fabricante, bajo las condiciones de operación descritas por el mismo.
- ⇒ Evaluar por microscopia electrónica el daño de los ácidos orgánicos en *Escherichia coli* y *Pasteurella multocida*.



3. METODOLOGIA

3.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA¹⁸

3.1.1 Microorganismos de prueba¹⁸

Los microorganismos utilizados fueron *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 5538P, *Pasteurella multocida* tipo A y *Escherichia coli* de caso clínico, proporcionadas por el Departamento de Bacteriología y Virología del Área de Microbiología de la Unidad de Postgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM.

3.1.2 Identificación de los microorganismos de prueba¹⁸

Las bacterias fueron identificadas realizando tinción de Gram y pruebas bioquímicas, para ello fue necesario obtener cultivos bacterianos en medios selectivos, debido a que cada microorganismo necesita de diferentes fuentes nutricionales para crecer.

- *E. coli* ATCC 11229 y *E. coli* de caso clínico, se sembraron por dilución en agar Mac Conkey, se incubaron a 37 ± 2 °C por 24 horas.
- *S. aureus* ATCC 5538P, se sembró por dilución en Agar Sales Manitol y se incubó a 37 ± 2 °C por 24 horas.
- *P. multocida* tipo A se sembró en agar sangre por dilución y se incubó en las condiciones anteriormente señaladas.

3.1.3 Conservación de los microorganismos de prueba¹⁸

Las bacterianas se sembraron en tubos de ensaye con Agar Nutritivo y se incubaron a 35 ± 2 °C durante 24 horas. Después de este período, se realizaron resiembras semanalmente conservándose las cepas en refrigeración.

3.1.4 Preparación del cultivo de referencia¹⁸

Los cultivos de referencia se prepararon sembrando las cepas en cajas Petri con Agar Nutritivo, posteriormente se incubaron a 37 ± 2 °C durante 24 horas.



3.1.5 Preparación del subcultivo ¹⁸

De cada cultivo de referencia, se tomó una colonia y se realizó un pase por duplicado en cajas Petri con Agar Nutritivo y se incubaron en las condiciones señaladas.

3.1.6 Preparación de la suspensión de los microorganismos de prueba ^{18, 20}

La suspensión de los microorganismos de *E. coli*, *S. aureus* y *P. multocida*, se preparó adicionando a los subcultivos 3 mL de solución salina fisiológica con pipeta estéril, se removió el crecimiento bacteriano agitando suavemente las cajas y el sobrenadante se transfirió a un tubo de ensayo estéril.

La concentración bacteriana se determinó utilizando el método espectrofotométrico, en donde, el sobrenadante se continuó diluyendo con solución salina, hasta que se obtuvo una suspensión que leída a una longitud de onda de 580 nm diera una lectura del 10% de transmitancia para tener 86×10^8 UFC/mL (Ver Tabla 4). La Norma Oficial Mexicana menciona que es posible trabajar entre las lecturas del 8 al 12 % de transmitancia, para obtener una suspensión entre 75 a 125×10^8 UFC/mL.

Tabla 4. Método Espectrofotométrico

% Transmitancia	UFC/mL x 10^8
7	130
8	115
9	102
10	86
12	77
13	67

3.1.7 Determinación de la Cuenta Viable Inicial ¹⁸

Una vez ajustada la suspensión de cada microorganismo se realizaron diluciones dobles seriadas, se transfirió 1 mL a un matraz Erlenmeyer con 99 mL de solución amortiguadora de fosfatos diluida estéril (10^{-2}). Agitar cuidadosamente cada matraz para distribuir uniformemente la bacteria, de esta dilución se tomó 1 mL y se transfirió a otro matraz con las mismas condiciones (10^{-4}). También se realizaron las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y las placas de estas diluciones se rotularon como a, b, c.



3.1.8 *Determinación de las Células Sobrevivientes*¹⁸

3.1.8.1 *Preparación del agua de prueba*¹⁸

Se preparó 1 litro de agua de prueba libre de bactericidas y bacteriostáticos para cada desinfectante y se le adicionó por separado Desfan 100 y Rubigen Forte. Para Desfan 100 se adicionó 100 µl/Lt de agua y de Rubigen Forte 200 µl/Lt de agua (concentración de uso indicada por el fabricante). De esta solución, se tomó una alícuota de 99 mL y se transfirió a un matraz Erlenmeyer estériles.

3.1.8.2. *Inoculación de la muestra*¹⁸

El matraz del agua de prueba fue inoculado cuidadosamente con 1 mL del microorganismo de la suspensión original (86×10^8 UFC/mL), por el centro de la superficie del líquido, evitando tocar con la punta de la micropipeta las paredes o el cuello del matraz (10^{-2}). Enseguida, se agitó cada matraz y a los 30 ó 60 segundos después de la inoculación, se transfirió 1 mL de la misma a un matraz Erlenmeyer con 99 mL de solución neutralizante diluida estéril y se mezcló (10^{-4}). Se realizaron diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} con solución amortiguadora de fosfatos diluida estéril.

3.1.9. *Procedimiento para el recuento en placa*^{18, 30}

1. Se marcaron 2 cajas Petri estériles para cada una de las siguientes diluciones: 0, 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} .
2. Una vez preparadas las diluciones de la muestra, se procedió a realizar la técnica de vaciado en placa, para determinar la cantidad de bacterias viables presentes en la muestra. Para esto, se tomó 1 mL de la muestra original y se colocó en la caja Petri marcada como 0 (muestra sin diluir). Para las diluciones de la muestra, se realizó el mismo procedimiento, se colocó 1 mL de cada una de las diluciones en sus respectivas



cajas marcadas. Este procedimiento se realizó por duplicado, teniendo así 2 cajas para cada dilución.

3. Enseguida se agregó a cada placa agar para métodos estándar y se homogenizó para incorporar el inóculo en el medio.
4. Se dejó solidificar el medio, se invirtieron las cajas y se incubaron durante 48 horas de $35 \pm 2^\circ \text{C}$.
5. Después del periodo de incubación, se contaron las colonias contenidas en cada una de las cajas y se seleccionaron aquellas que se encontraron en el intervalo de 25 a 250 colonias.

Sin embargo, las placas con más de 250 colonias no pueden ser contadas y son designadas como "Incontables" y las placas que tienen menos de 25 colonias, se designan con la leyenda de "Valor estimado", de acuerdo a la norma oficial NOM-092-SSA1-1994.

6. Posteriormente, se promediaron las colonias obtenidas en base a cada dilución y se multiplicaron por el inverso de la dilución correspondiente, para obtener el número de UFC/mL de la muestra.

Es importante mencionar, que el tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorporó al diluyente hasta que finalmente se adicionó el medio de cultivo, no excedió de 20 minutos. Además se incluyó una caja sin inóculo por cada lote de medio de cultivo y diluyente preparado como testigos de esterilidad.

7. Se realizó el cálculo del porcentaje de reducción bacteriana, para poder reportar si la potabilidad es aceptable se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción bacteriana} = 100 - \frac{(\text{Células sobrevivientes UFC/mL}) (100)}{\text{Cuenta viable inicial}}$$



8. La interpretación de los resultados obtenidos, se realizó de acuerdo al porcentaje de reducción bacteriana, se reportaron en base en que un producto etiquetado como germicida, debe tener un porcentaje de reducción de la cuenta viable de 99.999% en 30 segundos de contacto a la concentración de uso recomendada, cuando la cuenta viable inicial se encuentra entre 75 y 125×10^8 UFC/mL.

Sin embargo, como el porcentaje de reducción bacteriana fue bajo (97.92 y 99.16) de acuerdo a las especificaciones anteriores, fue necesario modificar el tiempo de contacto a 60 segundos para verificar, si el porcentaje de reducción bacteriana aumentaba.

3.2 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA²⁰

3.2.1. Microorganismos de prueba²⁰

Los microorganismos utilizados fueron *E. coli* ATCC 11229 y *E. coli* de caso clínico.

3.2.2. Identificación de los microorganismos de prueba²⁰

La identificación de las cepas se llevó a cabo a través de la tinción de Gram y pruebas bioquímicas.

3.2.3. Conservación de los microorganismos de prueba²⁰

Las cepas se sembraron en tubos de ensaye con Agar Nutritivo incubándose a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Después del período de incubación se conservaron en refrigeración y se resembraron semanalmente.

3.2.4. Preparación del cultivo de referencia²⁰

Los cultivos de referencia se prepararon, sembrando los microorganismos en cajas Petri con Agar Nutritivo B (ver apéndice B).



3.2.5. Preparación del subcultivo ²⁰

De cada cultivo de referencia, se realizaron resiembras por duplicado en cajas Petri con Agar Nutritivo A, de esta manera se tenían a los microorganismos listos para cosecharse y emplearse en el análisis (ver apéndice B).

3.2.6. Preparación de la suspensión de los microorganismos de prueba ²⁰

La suspensión de los microorganismos se preparó adicionándoles a los subcultivos 5 mL de solución salina estéril, se agitaron las cajas suavemente para remover el crecimiento bacteriano y el sobrenadante se transfirió a un tubo de ensaye estéril.

El sobrenadante se continuó diluyendo con solución salina hasta igualarla con el tubo No. 2 del Nefelómetro de Mc Farland, es decir, tener la concentración de 6×10^8 UFC/mL de organismos mesófilos aerobios de dicha suspensión (ver tabla 5).

Tabla 5. Método Nefelométrico

Tubo No.	UFC/mL x 10 ⁸
1	3
2	6
3	9
4	12
5	15
6	18
7	21
8	24
9	27
10	30

De esta dilución, se tomó 1 mL y se diluyó en un matraz Erlenmeyer con 99 mL de solución salina fisiológica estéril, para obtener una concentración de 6×10^6 UFC/mL.



3.2.7. *Preparación e inoculación del agua de prueba*^{20, 30, 35}

Se preparó un litro de agua libre de agentes bactericidas para cada microorganismo. Este volumen se inoculó por separado con 1 mL de la suspensión de cada bacteria, para obtener una carga bacteriana de 6×10^3 UFC/mL, la Norma oficial mexicana NOM-181-SSA1-1998 indica que es posible trabajar a una concentración de 5×10^3 a 10×10^3 UFC/mL y una concentración de organismos coliformes totales mayor o igual a 240 NMP/100 mL. Después de inocular el agua de prueba, se agitó cada matraz por 30 segundos.

La concentración de microorganismos mesófilos aerobios en UFC/mL, se determinó por el método de cuenta en placa de bacterias aerobias. Y la determinación de *E. coli*, se estimó por el método del sustrato fluorogénico usando caldo lauril sulfato con 4-metilumberiferil- β -D-glucurónido (MUG) determinando el NMP/100 mL por el método de tubos.

3.2.8. *Desarrollo de la prueba*

Una vez inoculada el agua de prueba se realizaron las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} con solución salina. Posteriormente, se transfirieron 4 alícuotas de 100 mL a vasos de precipitado estériles previamente rotulados como Control positivo, Control negativo, Desfan 100, Rubigen Forte:

Al vaso marcado como Control negativo, no fue tratado con ninguna solución.

Al vaso marcado como Control positivo, se le adicionó 10 μ L de cloro.

Al vaso marcado como Desfan 100, se le adicionó 10 μ L de este producto.

Al vaso marcado como Rubigen forte, se le adicionó 20 μ L de este producto.

Se procedió a agitar cada vaso, a los 30 ó 60 segundos después, se transfirió una alícuota de 1 mL de cada solución a un tubo de ensaye con 9 mL de solución salina fisiológica estéril agitando cuidadosamente para homogenizar la muestra, también se rotularon placas Petri de acuerdo al tratamiento de cada muestra.



3.2.9. Recuento en placa^{20, 30}

El procedimiento para determinar la concentración de mesófilos aerobios, se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Se marcaron 2 cajas Petri vacías con las siguientes diluciones: 0, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , control positivo, control negativo, desfan, rubigen.
2. Una vez preparadas las diluciones de la muestra, se colocó por duplicado 1 mL de cada dilución en las cajas Petri correspondientes, la muestra original (muestra sin diluir) se colocó en la caja Petri marcada como 0.
3. Enseguida se agregó a cada placa agar para métodos estándar y se homogenizó la mezcla para incorporar el inóculo en el medio.
4. Se dejó solidificar el medio, después se invirtieron las cajas y se incubaron durante 48 horas de 35 ± 2 ° C.
5. Después del periodo de incubación, se contaron las colonias contenidas en cada una de las cajas y se seleccionaron aquellas que se encontraron en el intervalo de 25 a 250 colonias.
6. Posteriormente, se promediaron las colonias obtenidas en base a cada dilución y se multiplicaron por el inverso de la dilución correspondiente, para obtener el número de UFC/mL de la muestra.
Es importante mencionar, que el tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorporó al diluyente hasta que finalmente se adicionó el medio de cultivo, no excedió de 20 minutos. Además se incluyó una caja sin inóculo por cada lote de medio de cultivo y diluyente preparado como testigos de esterilidad.
7. Se determinó la cuenta de microorganismos mesofílicos aerobios (*E. coli*) presentes en las muestras de agua, mediante la siguiente fórmula:



$$\% \text{ RBMA} = \frac{\text{Organismos mesofílicos aerobios de agua sin tratar} - \text{Organismos mesofílicos aerobios de agua tratada}}{\text{Organismos mesofílicos aerobios de agua sin tratar}} \times 100$$

% RBMA: Porcentaje de reducción bacteriana de organismos mesofílicos aerobios.

8. La interpretación de resultados se realizó de acuerdo al porcentaje de reducción bacteriana, obtenida para cada microorganismo de prueba, la prueba de potabilidad es aceptable cuando la reducción bacteriana es mayor a 95% para organismos mesofílicos aerobios.

3.2.10. *Determinación de microorganismos coliformes totales* ^{12, 14, 20, 35, 36}

El número de coliformes presentes en una muestra de agua, fue determinado por una estimación estadística llamada “Prueba del número más probable (NMP)”. Esta prueba, involucra una serie múltiple de tubos de fermentación Durham, donde las muestras problema son adicionadas a los tubos de fermentación.

La prueba del número más probables fluorogénico está basado en la actividad de la enzima β -glucuronidasa, enzima producida por *E. coli* y usada para su detección. La prueba consiste en incubar las muestras problema con caldo lauril sulfato con MUG y observar el desarrollo de la fluorescencia a las 24 horas a 35°C. Como el medio de cultivo contiene lauril sulfato, detergente que inhibe el crecimiento de organismos gram positivos, hace que el medio sea selectivo para bacterias Gram negativas.

Para la determinación del NMP, se realizó el siguiente procedimiento:

1. Se prepararon para cada muestra, 5 tubos de ensaye con 20 mL de caldo lauril sulfato con MUG de concentración doble y 10 tubos con 10 mL de concentración sencilla, previamente esterilizado de acuerdo a las indicaciones del marbete del frasco.
2. Se marcaron 15 tubos con las muestras respectivas (Control positivo, Control negativo, Desfan y Rubigen Forte).



3. Los 5 tubos de fermentación de concentración doble se inocularon con 10 mL de la muestra (10^{-1}), 5 tubos de concentración sencilla con 1 mL (10^{-2}) y los 5 tubos restantes con 0.1 mL (10^{-3}).
4. Posteriormente, se agitaron todos los tubos para homogenizar el medio con el inóculo, de tal manera que se evitó la entrada de aire a las campanas de fermentación Durham.
5. Todos los tubos se incubaron a 35 ± 2 °C durante 24 horas. Después del periodo de incubación se examinaron los tubos para observar la formación de gas. La formación de gas fue indicativo de una prueba positiva.
6. Además de la formación de gas, se pudo detectar la presencia de la enzima β -glucuronidasa que hidrolizó el sustrato MUG y produjo fluorescencia cuando el líquido se expuso a la lámpara de luz ultravioleta de longitud de onda larga (366 nm). La evidencia de fluorescencia indicó una respuesta positiva y por tanto la presencia de *E. coli*. Esta técnica se utilizó para detectar la cantidad de coliformes presentes tanto en las muestras de agua sin tratar como en las tratadas.
7. La interpretación de resultados se realizó a través de la respuesta de fluorescencia en los tubos. La fluorescencia, se pudo observar a través de un color azul al ser expuesta a luz ultravioleta, esto es indicativo de un resultado positivo para coliformes fecales.
8. Para determinar el número de coliformes presentes en las muestras de agua de prueba, fue necesario consultar la tabla desarrollada por la American Public Health Association, de acuerdo a los tubos de fermentación positivos que presentaron formación de gas en las campanas Durham y la presencia de fluorescencia en los mismos (Apéndice C).



3.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (TINCION NEGATIVA)

3.3.1 Microorganismos de prueba

Se utilizaron como microorganismos de prueba las bacterias *Escherichia coli* de caso clínico y *Pasteurella multocida* tipo A.

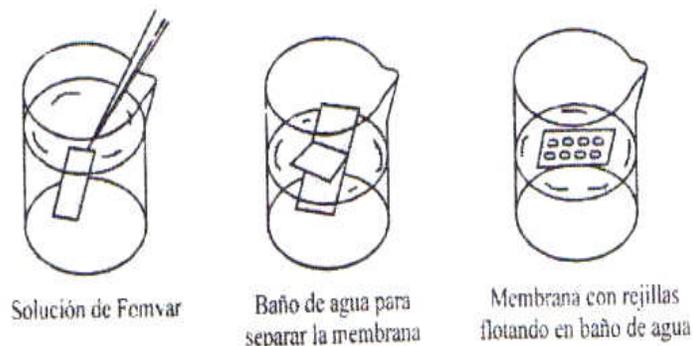
3.3.2 Preparación de la muestra

Las muestras fueron lavadas con buffer o solución salina fisiológica, para eliminar cualquier residuo proteico y posteriormente fijadas con glutaraldehído al 1%.

3.3.3 Preparación de rejillas con membrana fomvar

- Las rejillas se lavaron con acetona y se secaron.
- Se preparó una solución de fomvar al 0.1% en cloroformo, (si se hacen con parlodión se prepara una solución 0.1% de parlodión en acetato de amilo).
- Se colocó en un vaso de precipitado bien limpio, un litro de agua destilada.
- Un porta objetos se impregnó con fomvar al 0.1% y se dejó en reposo hasta que secó la película, después se cortaron con las uñas las cuatro orillas del portaobjetos y sobre el baño de agua destilada se sumergió poco a poco el porta objetos hasta separar la película plástica.
- Las rejillas fueron colocadas sobre la membrana y posteriormente recogidas con papel filtro. Las rejillas se secaron perfectamente antes de usarse.

Figura 4. Preparación de membranas plásticas





3.3.4 Técnica de tinción negativa

Se tomó una gota de suspensión bacteriana, se depositó sobre un papel parafilm, y se colocaron dos rejillas con membrana para que se adsorbiera la muestra durante un tiempo de 30 minutos; posteriormente se tomaron las rejillas y el exceso se absorbió con papel filtro, enseguida se tiñeron con una gota de ácido fosfotúngstico (con pH=7.07) durante un período de un minuto; las rejillas se recogieron y se absorbió el exceso de colorante, y se secaron a temperatura ambiente. Las muestras fueron observadas y fotografiadas en el microscopio de transmisión.

Figura 5. Técnicas de tinción negativa

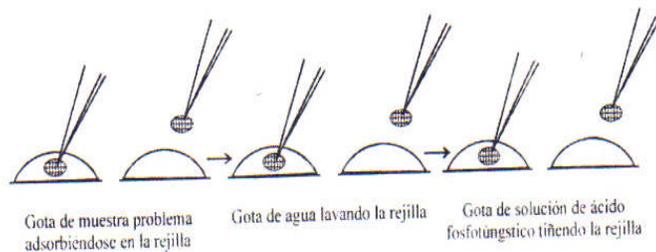




Figura 6. Diagrama de flujo sobre la metodología experimental de la Determinación de la Actividad Antimicrobiana

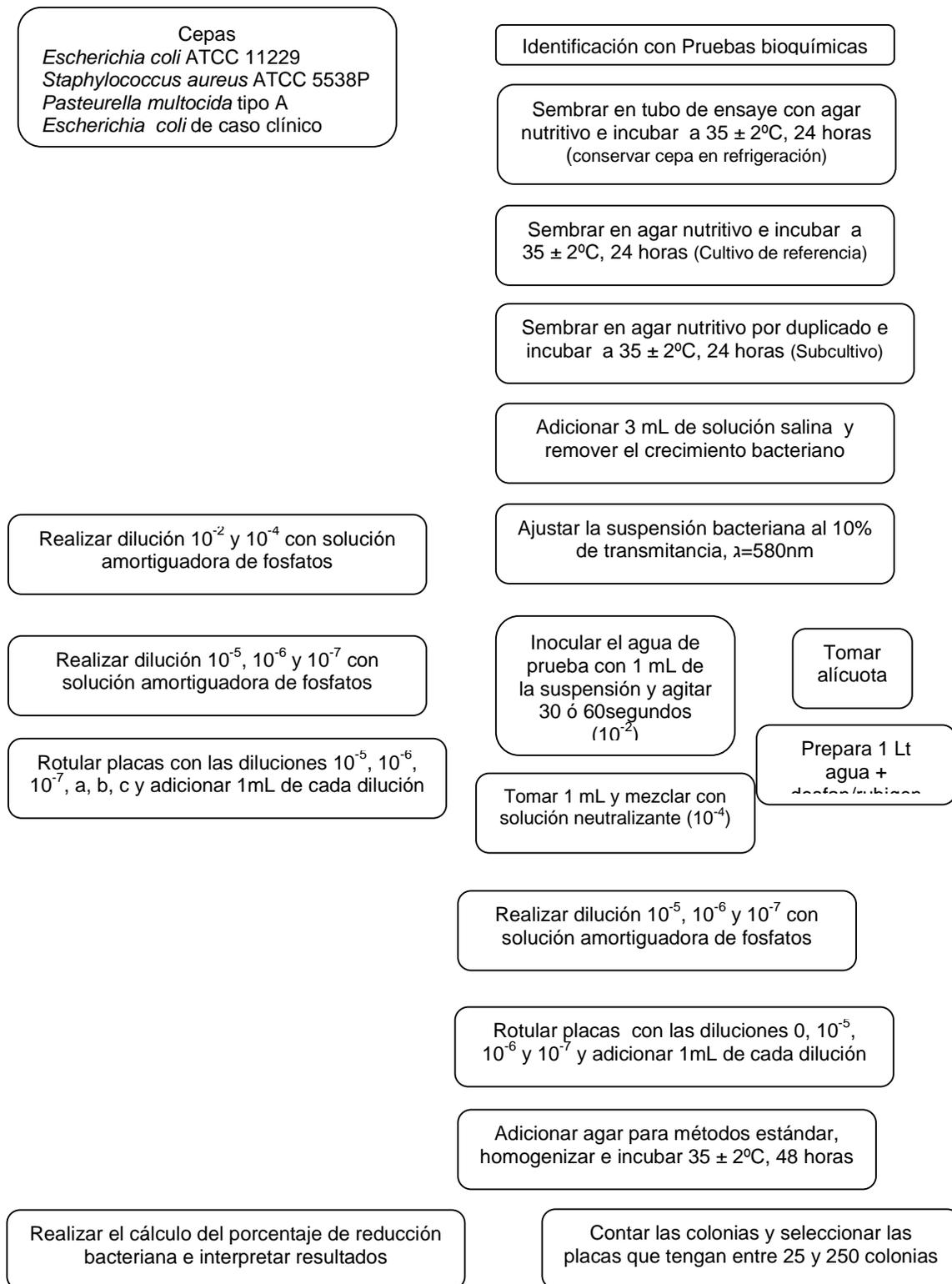




Figura 7. Diagrama de flujo sobre la metodología experimental de la Evaluación de la Eficacia (segunda parte)

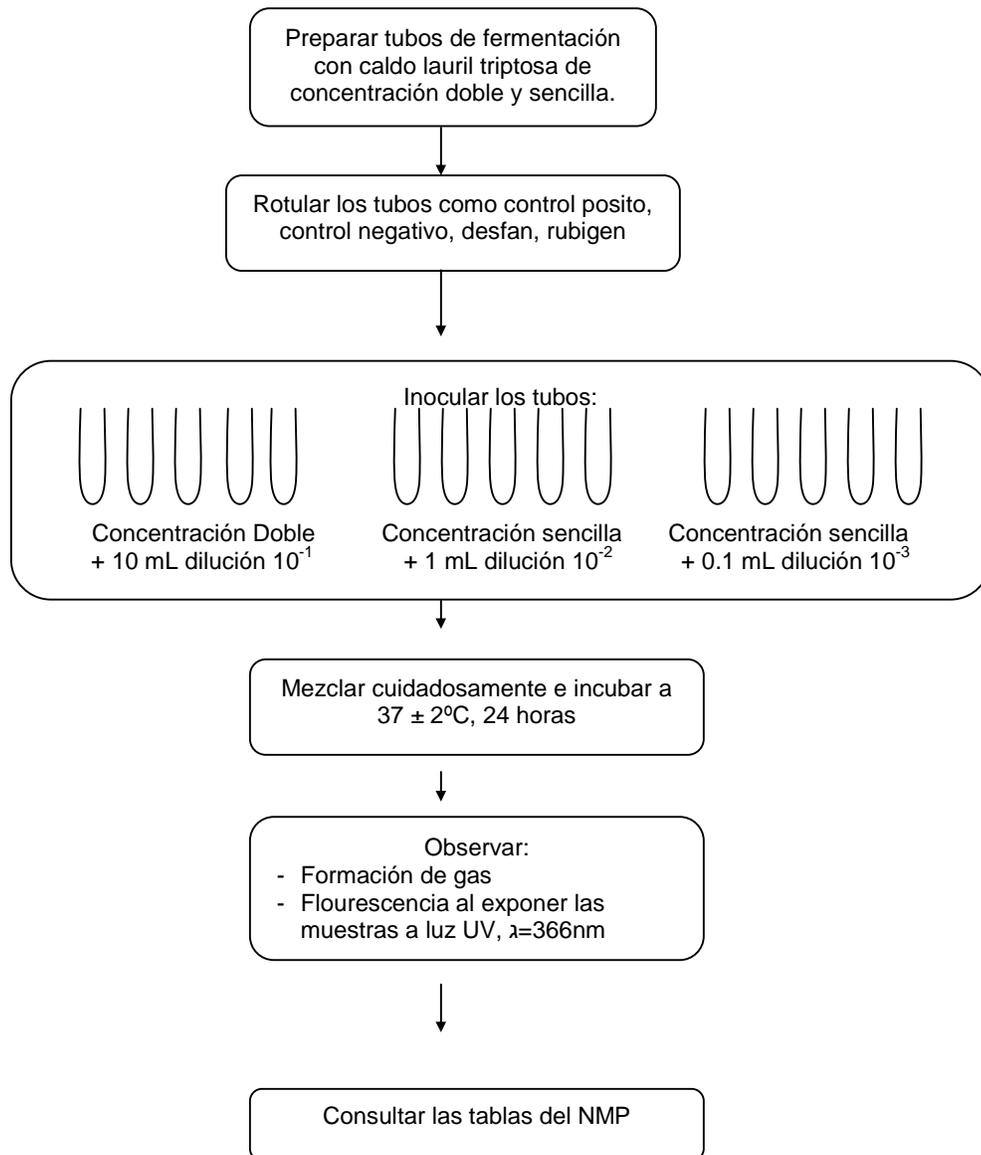
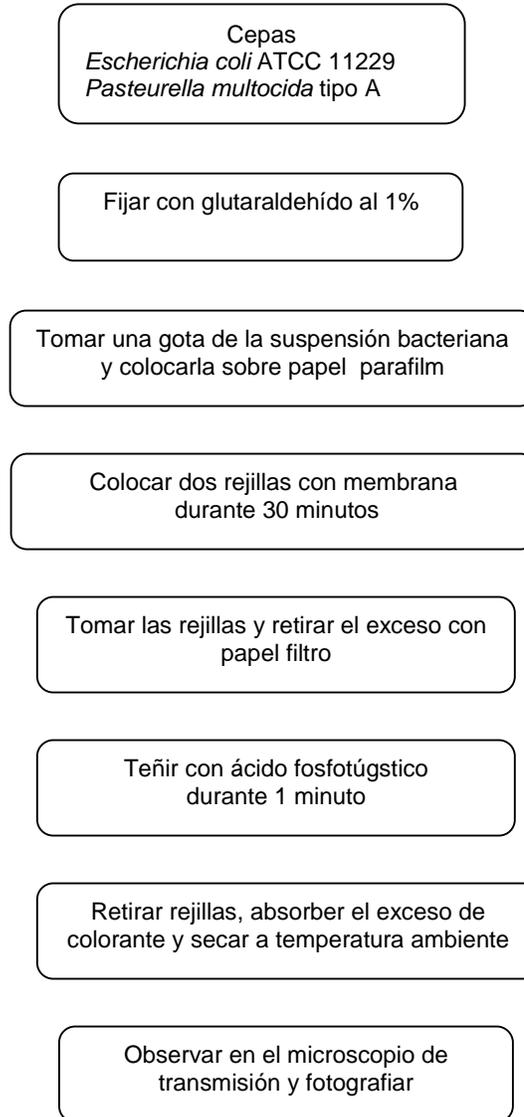




Figura 8. Diagrama de flujo sobre la metodología experimental de la Microscopia Electrónica





4. RESULTADOS

4.1 IDENTIFICACION BACTERIANA

Caracterización de *E. coli*

La primera prueba para la identificación de *E. coli*, fue la morfología colonial se observaron colonias rosadas con una zona de precipitación en el centro (agar Mac Conkey), en la tinción de Gram se observaron cocobacilos Gram negativos. Los resultados de las pruebas bioquímicas de los diferentes microorganismos, se presentan en la tabla 6 (Apéndice A y B).

Tabla 6. Resultados de identificación y pruebas bioquímicas de *Escherichia coli*^{37,38}

Prueba bioquímica	<i>E. Coli</i> ATCC 11229	<i>E. Coli</i> (C. Clínico)
Morfología colonial	Colonias rosadas son una zona de precipitación en el centro	Colonias rosadas son una zona de precipitación en el centro
Tinción de gram	Cocobacilos Gram negativos	Cocobacilos Gram negativos
Catalasa	+	+
Citrato de Simmons	-	-
Motilidad	+	+
Indol	+	+
Ornitina	+	+
Agar hierro Kigler	Acido/Acido	Acido/Acido
Producción de H ₂ S	-	-
Ureasa	-	-
Glucosa	+*	+*
Sacarosa	+	+
Lactosa	+*	+*
OF	Fermentadora	Fermentadora

* Acidifica y produce gas



Caracterización de *S. aureus*

La identificación de *S. aureus*, fue la morfología colonial, en donde se observaron colonias amarillo-naranja, redondas, lisas, brillosas, con una elevación convexa y bordes enteros (Agar Sales Manitol). En la tinción de Gram, se observaron cocos en racimos Gram positivos y los resultados de las pruebas bioquímicas del microorganismo, se presenta en la tabla 7.

Tabla 7. Resultados de identificación y pruebas bioquímicas de *S. aureus*³⁸

Pruebas bioquímicas	<i>S. aureus</i> ATCC 5538
Morfología colonial	Colonias de color amarillo-naranja, redondas y lisas, lleva a cabo la fermentación del manitol
Tinción de gram	Cocos en racimos Gram positivos
Catalasa	+
Glucosa	Acido
Coagulasa	+



Caracterización de *P. multocida* tipo A

Las pruebas para la identificación de *P. multocida*, fue la morfología colonial en donde se observaron colonias de aspecto mantequilloso con un olor a rancio (agar sangre). En la tinción de Gram se observó un cocobacilo Gram negativo y la catalasa fue positiva, los resultados de las pruebas bioquímicas se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Resultados de identificación y pruebas bioquímicas de *Pasteurella multocida* tipo A ^{37,38}

Pruebas bioquímicas	<i>P. multocida</i>
Morfología	Colonias de aspecto mantequilloso con un olor a rancio
Tinción de gram	Cocobacilo Gram negativo
Catalasa	+
Oxidasa	+
Citrato de Simmons	-
Motilidad	-
Indol	+
Agar hierro Kigler	Acido/acido
Producción de H ₂ S	-
Ureasa	-
Sacarosa	+
Lactosa	-



4.2 METODO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

En esta prueba se evaluó la actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos (Desfan-100 y Rubigen Forte), es decir, se evaluó la propiedad que tienen de inhibir o matar a los microorganismos. Está basado en determinar el porcentaje de reducción de un número de microorganismos cuando se ponen en contacto con un producto desinfectante. El análisis, se realizó a una concentración bacteriana de 86×10^8 UFC/mL. Las UFC del agua de prueba, fueron contadas antes y después del tratamiento con los desinfectantes orgánicos, se calculó el porcentaje de reducción bacteriana para comprobar la actividad de estos (ver tabla 9 y 10).

Tabla 9. Resultados obtenidos a través de la Determinación de la Actividad Antimicrobiana de Desfan 100.

DESFAN – 100					
Microorganismo	<i>E. Coli</i> ATCC 11229	<i>E. Coli</i> ATCC 11229	<i>E. Coli</i> (C. Clínico)	<i>S. aureus</i> ATCC 5538	<i>P. multocida</i>
Cuenta Viable Inicial (UFC/mL)	24×10^4	21×10^4	4×10^4	7×10^3	5.4×10^4
Células Sobrevivientes (UFC/mL)	50×10^2	1×10^2	4×10^2	0	60
Tiempo de Exposición	30"	60"	60"	60"	60"
% de Reducción	97.92 %	99.95 %	99.00 %	100.00 %	99.81

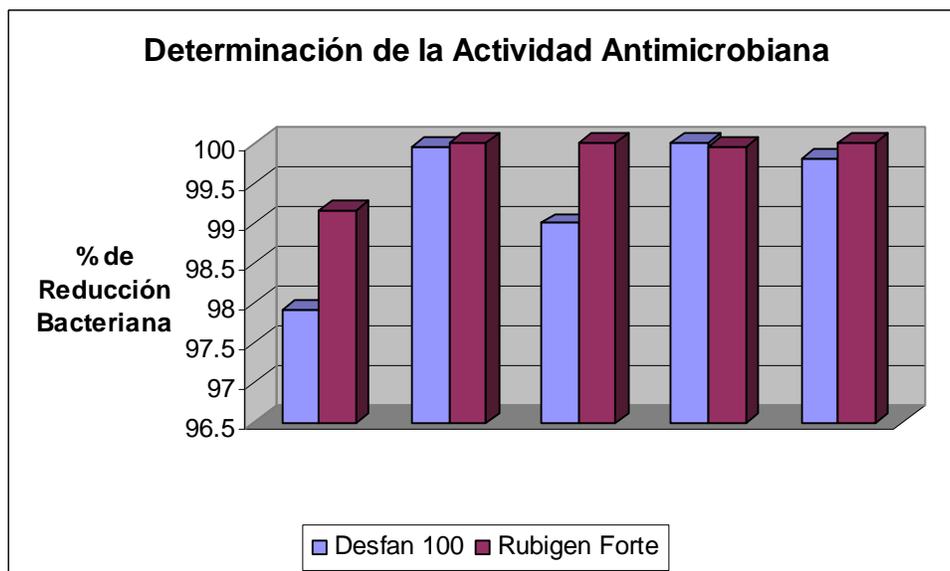
Tabla 10. Resultados obtenidos a través de la Determinación de la Actividad Antimicrobiana de Rubigen Forte.

RUBIGEN FORTE					
Microorganismo	<i>E. Coli</i> ATCC 11229	<i>E. Coli</i> ATCC 11229	<i>E. Coli</i> (C. Clínico)	<i>S. aureus</i> ATCC 5538	<i>P. multocida</i>
Cuenta Viable Inicial (UFC/mL)	18×10^4	16×10^4	17×10^4	6×10^4	4.4×10^4
Células Sobrevivientes (UFC/mL)	15×10^2	0	0	0	20
Tiempo de Exposición	30"	60"	60"	60"	60"
% de Reducción	99.16 %	100.00%	100.00 %	100.00 %	99.95 %



En la figura 9, se muestran los resultados mencionados en las tablas 9 y 10. En ella, se puede observar claramente el porcentaje de reducción bacteriana que presentaron los diferentes microorganismos (*E. coli* ATCC 11229, *E. coli* de caso clínico, *S. aureus*, *P. multocida*).

Figura 9. Resultados obtenidos en la Determinación de la Actividad Antimicrobiana de Desfan-100 y Rubigen Forte



La norma NMX-BB-040-SCFI-1999, indica que un producto que tenga la capacidad de inhibir o matar una amplia variedad de microorganismos debe tener un porcentaje de reducción del 99.99% en 30 segundos de contacto a la concentración recomendada por el fabricante cuando la cuenta viable inicial se encuentra entre 75 y 125×10^8 UFC/mL.

Como los resultados obtenidos para *E. coli* ATCC 11229, a los 30 segundos de contacto con Desfan 100 fue del 97.92% y para Rubigen Forte del 99.16%, fue necesario modificar el tiempo de contacto a 60 segundos. Los resultados obtenidos fueron mejores para Rubigen debido a que mató al 100% a casi todos los microorganismos de prueba (*E. coli* ATCC 11229, *E. coli* de caso clínico y *S. aureus*) y para *P. multocida* se obtuvo un resultado del 99.95%. En cambio, para Desfan el porcentaje obtenido para *E. coli* de caso clínico fue del 99.00%, *P. multocida* del 99.81%, *E. coli* ATCC 11229 de 99.95% y mata al 100% solo un microorganismo de prueba (*S. aureus*).



4.3 METODO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA ANTIMICROBIANA

En esta prueba se evaluó la capacidad que tiene Desfan 100 y Rubigen Forte en matar a los microorganismos. La prueba se realizó con una concentración bacteriana de 6×10^6 UFC/mL. Se contaron las UFC/mL obtenidas, antes y después del tratamiento con Desfan-100 y Rubigen Forte, se calculó el porcentaje de reducción bacteria y se comprobó la efectividad de estos.

Tabla 11. Resultados obtenidos a través de la Determinación de la Eficacia Antimicrobiana de Desfan 100

DESFAN 100			
Microorganismo	<i>E. Coli</i> ATCC 11229	<i>E. Coli</i> ATCC 11229	<i>E. Coli</i> (C. Clínico)
Organismos Mesofílicos Aerobios UFC/mL (H ₂ O sin Tratar)	20×10^3	11×10^3	8×10^3
Organismos Mesofílicos Aerobios UFC/mL (H ₂ O Tratada)	8×10^2	7.2×10^2	0
Tiempo de Exposición	30"	60"	60"
% de Reducción	96.00 %	93.45 %	100.00 %

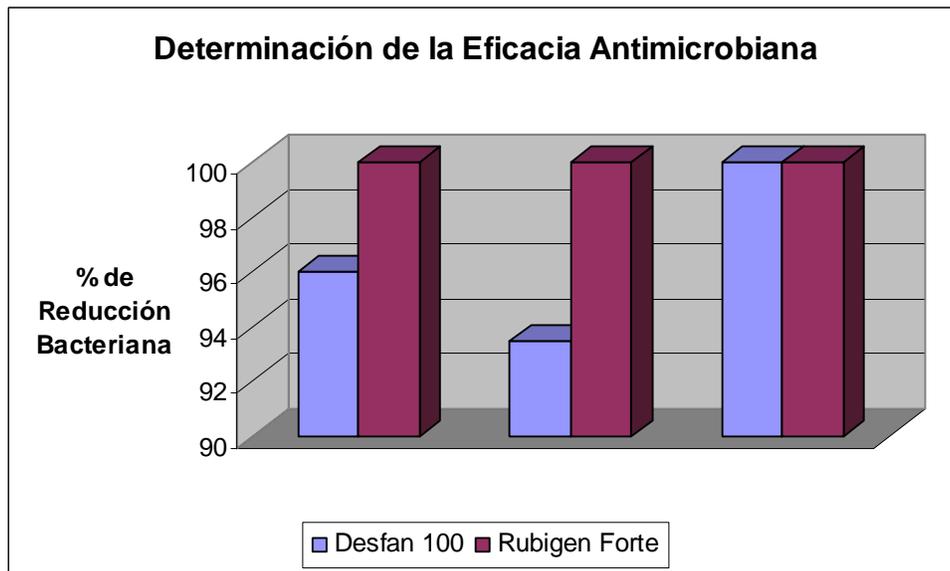
Tabla 12. Resultados obtenidos a través de la Determinación de la Eficacia Antimicrobiana de Rubigen Forte

RUBIGEN FORTE			
Microorganismo	<i>E. Coli</i> ATCC 11229	<i>E. Coli</i> ATCC 11229	<i>E. Coli</i> (C. Clínico)
Organismos Mesofílicos Aerobios UFC/mL (H ₂ O sin Tratar)	6.3×10^3	17×10^3	8×10^2
Organismos Mesofílicos Aerobios UFC/mL (H ₂ O Tratada)	0	0	0
Tiempo de Exposición	30"	60"	60"
% de Reducción	100.00 %	100.00 %	100.00 %



En la figura 10, se muestran los resultados mencionados en las tablas 11 y 12. En ella, se puede observar el porcentaje de reducción bacteriana que presentaron los diferentes microorganismos (*E. coli* ATCC 11229, *E. coli* de caso clínico).

Figura 10. Resultados obtenidos en la Determinación de la Eficacia Antimicrobiana de Desfan-100 y Rubigen Forte



La norma NOM-181-SSA1-1998, indica que la prueba de potabilidad es aceptable si el porcentaje de reducción bacteriana es mayor o igual al 95% para organismos mesofílicos aerobios. De acuerdo a los resultados obtenidos, Desfan 100 y Rubigen Forte cumplen con esta especificación debido a que se obtuvo el 96% para Desfan y el 100% para Rubigen a los 30 segundos de contacto. En cambio, cuando se modificó el tiempo a 60 segundos Rubigen cumplió con la especificación obteniendo el 100% de reducción bacteriana en los diferentes microorganismos de prueba (*E. coli* ATCC 11229 y *E. coli* de caso clínico) y Desfan dependiendo del microorganismo presentó una variación en el porcentaje de reducción del 93.45% para *E. coli* ATCC 11229 y del 100% para *E. coli* de caso clínico.

Otra prueba realizada, fue la determinación de microorganismos coliformes totales (NMP/100 mL) por el método de tubos múltiples.



En las tablas 13, 14, 15 se puede observar la reducción que presentaron los microorganismos al estar en contacto con Desfan 100 a los 30 y 60 segundos.

Tabla 13. Resultados obtenidos de Coliformes Totales de Desfan 100 a los 30 segundos

DESFAN 100						
	No. de tubos positivos con formación de gas		No. de tubos que presentan fluorescencia		NMP/100 mL	
Dilución	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento
10 ⁻¹	5	4	5	0	≥240	13
10 ⁻²	5	0	5	0		
10 ⁻³	5	0	5	0		
E. Coli ATCC 11229		30 segundos de contacto				

Tabla 14. Resultados obtenidos de Coliformes Totales de Desfan 100 a los 60 segundos

DESFAN 100						
	No. de tubos positivos con formación de gas		No. de tubos que presentan fluorescencia		NMP/100 mL	
Dilución	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento
10 ⁻¹	5	3	4	3	≥240	8
10 ⁻²	5	0	4	0		
10 ⁻³	5	0	5	0		
E. Coli ATCC 11229		60 segundos de contacto				

Tabla 15. Resultados obtenidos de Coliformes Totales de Desfan 100

DESFAN 100						
	No. de tubos positivos con formación de gas		No. de tubos que presentan fluorescencia		NMP/100 mL	
Dilución	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento
10 ⁻¹	5	0	5	0	≥240	≤ 2
10 ⁻²	5	0	5	0		
10 ⁻³	5	0	5	0		
E. Coli caso clínico		60 segundos de contacto				



Las tablas 16, 17, 18 muestran la reducción que presentaron los microorganismos al estar en contacto con Rubigen Forte a los 30 y 60 segundos.

Tabla 16. Resultados obtenidos de Coliformes Totales de Rubigen Forte 30 segundos

RUBIGEN FORTE						
	No. de tubos positivos con formación de gas		No. de tubos que presentan fluorescencia		NMP/100 mL	
Dilución	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento
10 ⁻¹	5	0	5	0	≥240	≤ 2
10 ⁻²	5	0	5	0		
10 ⁻³	5	0	5	0		
E. Coli ATCC 11229		30 segundos de contacto				

Tabla 17. Resultados obtenidos de Coliformes Totales de Rubigen Forte 60 segundos

RUBIGEN FORTE						
	No. de tubos positivos con formación de gas		No. de tubos que presentan fluorescencia		NMP/100 mL	
Dilución	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento
10 ⁻¹	5	0	4	0	≥240	≤ 2
10 ⁻²	5	0	4	0		
10 ⁻³	5	0	5	0		
E. Coli ATCC 11229		60 segundos de contacto				

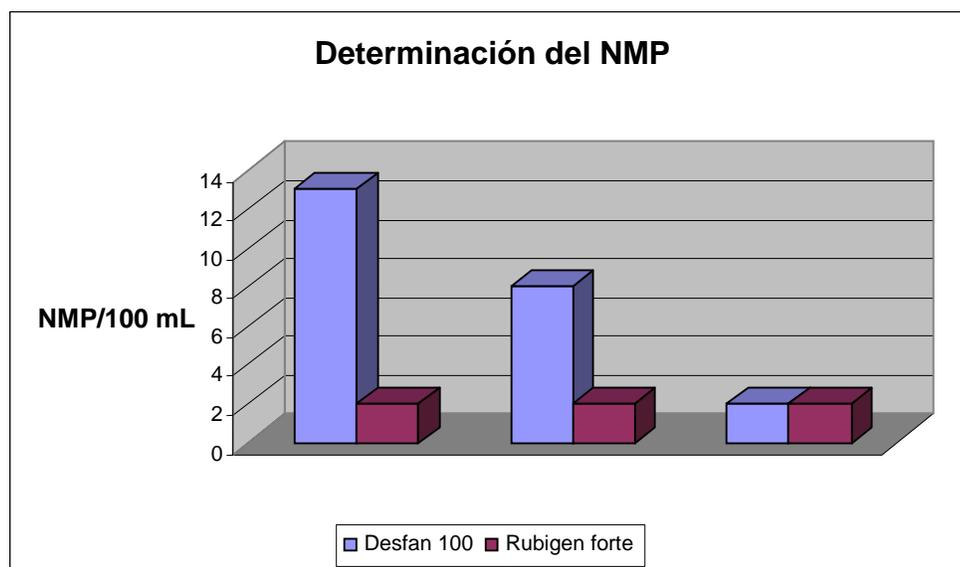
Tabla 18. Resultados obtenidos de Coliformes Totales de Rubigen Forte

RUBIGEN FORTE						
	No. de tubos positivos con formación de gas		No. de tubos que presentan fluorescencia		NMP/100 mL	
Dilución	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Antes del tratamiento	Después del tratamiento
10 ⁻¹	5	0	5	0	≥240	≤ 2
10 ⁻²	5	0	5	0		
10 ⁻³	5	0	5	0		
E. Coli (caso clínico)		60 segundos de contacto				



En la figura 11, se muestran los resultados mencionados en las tablas de la 13 a la 18. En ella, se puede observar el número más probable obtenidos que presentaron los diferentes microorganismos (*E. coli* ATCC 11229, *E. coli* de caso clínico) después del tratamiento con desfan y rubigen.

Figura 11. Resultados obtenidos en la Determinación del Número Más Probable (MNP) de Desfan-100 y Rubigen Forte



Los resultados obtenidos a los 30 segundos de contacto con *E. coli* ATCC 11229, fue de 13 NMP/100 mL para Desfan y menos de 2 NMP/100 mL para Rubigen. En cambio, a los 60 segundos de contacto, para Desfan se puede observar una reducción de 8 NMP/100 mL en *E. coli* ATCC 11229 y menos de 2 NMP/100 mL en *E. coli* de caso clínico esto depende del microorganismo de prueba y para Rubigen se obtuvieron menos de 2 NMP/100 mL independientemente del microorganismo de prueba (*E. coli* ATCC 11229 y *E. coli* de caso clínico).

4.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Los resultados que se muestran a continuación, indican el efecto causado por los diferentes productos (Desfan 100 y Rubigen Forte), así como la resistencia de cada uno de



los microorganismos empleados en este experimento a los mismos, con esto podemos observar el comportamiento de los productos y evaluar su efecto germicida en el agua potable para poder hacerla de consumo.

Escherichia coli ATCC 11229

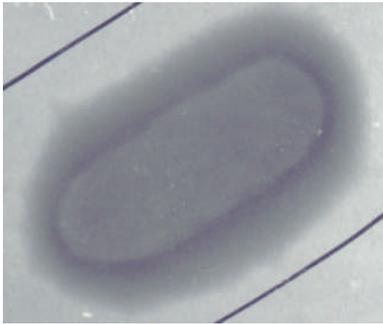


Figura 12

Sin tratamiento
Vista a 10 000 aumentos
Se observa una bacteria con forma y aspecto normal sin flagelos

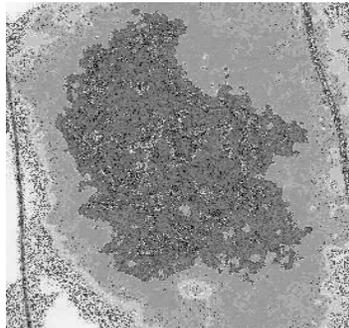


Figura 13

Tratada con Desfan 100
Vista a 10 000 aumentos
El contorno de la bacteria, se encuentra deformada por la ruptura de la pared celular



Figura 14

Tratada con Rubigen Forte
Vista a 10 000 aumentos
Esta bacteria da la apariencia de que el citoplasma se ha coagulado

P. multocida tipo A

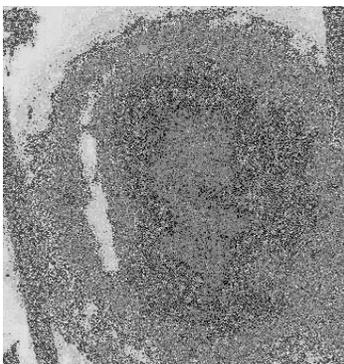


Figura 15

Sin tratamiento
Vista a 10 000 aumentos
Se observa una bacteria con forma y aspecto normal

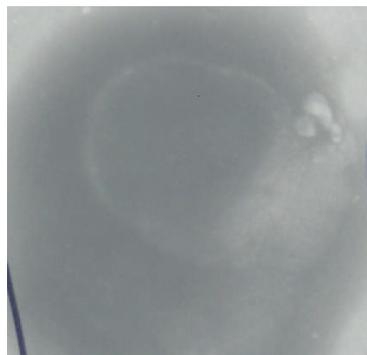


Figura 16

Tratada con Desfan 100
Vista a 10 000 aumentos
La bacteria se observa acortada e hinchada, sin haber reventado todavía

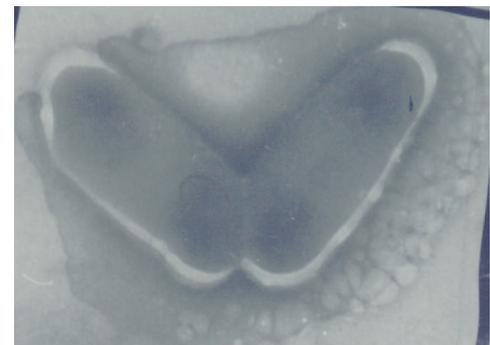


Figura 17

Tratada con Rubigen Forte
Vista a 10 000 aumentos
La deformación de las dos bacterias, revela la ruptura de la membrana y la salida del citoplasma



5. DISCUSIÓN

El objetivo de los programas de abastecimiento de agua para uso y consumo humano es asegurar que la población alcance una dotación adecuada de agua de buena calidad. En México no se han alcanzado estas metas, por eso gran parte de la población recurre a métodos domésticos en el hogar para resolver las deficiencias que puede presentar el agua suministrada.

Los métodos en el hogar para purificar el agua de consumo humano, consisten en la utilización de equipos de tratamiento o la adición de sustancias germicidas, orientados fundamentalmente al aspecto bacteriológico, considerado como de riesgo inmediato a la salud por las numerosas enfermedades gastrointestinales que estas ocasionan. Por esto, la Secretaria de Salud presenta las llamadas Normas Oficiales Mexicanas, en donde se detallan pruebas y disposiciones sanitarias y así evaluar ciertas características que deben cumplir los equipos de tratamientos para poder salir al mercado y así evaluar la calidad del agua destinada al uso y consumo humano, además de estas normas se detallan conceptos importantes y valores de referencia que deben cumplir dichas sustancias cuando son evaluados.

Este trabajo muestra, las evaluaciones de actividad y eficacia antimicrobiana realizadas a los desinfectantes orgánicos, determinándose el porcentaje de reducción bacteriana.

Las bacterias de *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 5538P, *Pasteurella multocida* tipo A y *Escherichia coli* de caso clínico, fueron proporcionadas por el Departamento de Bacteriología y Virología, del Área de Microbiología de la Unidad de Postgrado de la FES Cuautitlán Campo 1, las cuales se encontraban en Nitrógeno líquido para su conservación y sobrevivencia, se prosiguió a sembrar en placas como se menciona en el procedimiento para su identificación.

Se realizaron las pruebas bioquímicas primarias y secundarias para cada microorganismo y los resultados se pueden observar en las tablas 6, 7 y 8.



Posteriormente, se realizó la determinación de la Actividad Antimicrobiana de las sustancias germicidas, esta evaluación se basó en el cálculo del porcentaje de reducción de un número determinado de microorganismos cuando se pusieron en contacto con las sustancias germicidas bajo condiciones de prueba específicas y así determinar la potabilidad del agua y comprobar la efectividad de estos productos.

El estudio se realizó, ajustando el agua de prueba a una concentración bacteriana de 8.6×10^9 UFC/mL, la NMX-BB-040-SCFI-1999 menciona que la concentración podía estar entre 75 a 12.5×10^9 UFC/mL, y el porcentaje de reducción bacteriana del 99.99% a los 30 segundos de contacto.

Analizando las tablas 9 y 10 de resultados, se puede observar que a los 30 segundos de contacto se obtiene un porcentaje de reducción de *E. coli* ATCC 11229, del 97.92% para Desfan-100 y del 99.16% para Rubigen Forte. Para mejorar los resultados se modificó el tiempo de contacto a 60 segundos, obteniendo los resultados para el mismo microorganismo del 99.95% para Desfan-100 y del 100% para Rubigen Forte. Para los siguientes microorganismos *E. coli* de caso clínico, *S. aureus*, y *P. multocida* tipo A, se obtuvo un porcentaje de reducción del 99 al 100%. Con esto, podemos decir que los productos germicidas no cumplen con las especificaciones de la Norma.

También se realizó, la determinación de la eficacia antimicrobiana, la cual esta dada por la capacidad de destruir o matar una carga bacteriana presente en el agua, está basada en su poder germicida a través de sus componentes químicos y su efecto sobre las bacterias de acuerdo con su concentración y tiempo de contacto. Para esto, se ajustó el agua de prueba a una concentración de 6 000 UFC/mL, la NOM- 181-SSA1-1998 menciona que se requiere de una suspensión de *E. coli* de 5000 a 10 000 UFC/mL y un porcentaje de reducción de 95% para organismos mesófilos aerobios e igual o mayor a 99.99% para organismos coliformes totales.

Al analizar las tablas de resultados 11 y 12, se observa a los 30 segundos de contacto se obtiene un porcentaje de reducción de *E. coli* ATCC 11229, del 96% para Desfan-100 y del 100% para Rubigen Forte. Para poder obtener mejores resultados se modificó el tiempo de



contacto a 60 segundos, obteniendo resultados para el mismo microorganismo del 93.45% para Desfan-100 y del 100% para Rubigen Forte. Para *E. coli* de caso clínico, se obtuvo un porcentaje de reducción del 100% para ambos desinfectantes. Con esto, se puede decir que el producto Desfan-100 no cumple con las especificaciones de la Norma a los 30 segundos de contacto mientras que Rubigen Forte si las cumple. Las pruebas realizadas a los 60 segundos de contacto para los microorganismos *E. coli* ATCC 11229 y *E. coli* de caso clínico no cumplieron con la especificación.

En la determinación de organismos coliforme totales, se utilizó el método del sustrato cromogénico. Este método, es una alternativa selectiva en la identificación de *Escherichia coli* utilizándose en la determinación del NMP, obteniendo resultados más rápidos y precisos, debido a que el medio presentó fluorescencia, la muestra contenía *Escherichia coli*, porque esta bacteria tiene la enzima β -D-glucuronidasa capaz de hidrolizar el sustrato produciendo fluorescencia cuando el medio líquido es expuesto a la luz UV a una longitud de 366 nm.

Al analizar las tablas de resultados 13 y 16, podemos observar que antes del tratamiento se tenía una cantidad de coliformes superior a 2400 UFC/100 mL y después del tratamiento esta cantidad disminuyó a 13 UFC para *E. coli* ATCC 11229, con Desfan-100 y de menos de 2 UFC para Rubigen Forte a los 30 segundos de contacto. Para tratar de optimizar, se modificó el tiempo de contacto a 60 segundos los resultados obtenidos para el mismo microorganismo después del tratamiento fue de 8 UFC para Desfan-100 y de menos de 2 para Rubigen Forte (tabla 14 y 17). Para *E. coli* de caso clínico, se obtuvieron menos de 2 UFC/100 mL para ambos desinfectantes (tabla 15 y 18). Con esto se puede decir que los desinfectantes se pueden utilizar para potabilizar el agua para consumo, debido a que pueden reducir más del 95% de organismos mesófilos aerobios

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede decir, los productos germicidas no matan las bacterias, lo que se pudo deber a la concentración que tal vez no fue la óptima, tiempo de contacto, la temperatura de la solución y la susceptibilidad de los microorganismos.



6. CONCLUSIONES

1. Al evaluar el efecto bactericida y la actividad antimicrobiana de Desfan 100 y Rubigen forte contra *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida* y *Staphylococcus aureus*, se demostró que Rubigen forte presenta características para matar a los microorganismos mencionados con altos porcentajes de reducción bacteriana.
2. Se determinó la actividad antimicrobiana de Desfan 100 y Rubigen forte, de acuerdo a los porcentajes obtenidos de reducción bacteriana los productos no cumplen con la especificación, debido a que no son capaces de reducir el 99.99% de microorganismos en 30 segundos de contacto cuando la cuenta viable se encuentra entre 75 y 125×10^8 UFC/mL.
3. Al determinar la eficacia de las sustancias germicidas se observó que los productos son capaces de reducir más del 95% de microorganismos mesofílicos aerobios presentes en una muestra de agua e igual o mayor al 99.99% para organismos coliformes totales en 30 segundos de contacto. Los porcentajes de reducción de bacteriana indican que la prueba de potabilidad no es aceptable.
4. Se comparó la acción bactericida de ambos desinfectantes y se determinó que Rubigen Forte presenta mayor eficacia que Desfan-100.
5. Se demostró que Rubigen Forte cumple con las propiedades que les son atribuidas por el fabricante, bajo las condiciones de operación descritas por el mismo.
6. Se demostró por microscopia electrónica el efecto bactericida de los ácidos orgánicos en *Escherichia coli* y *Pasteurella multocida*.



7. BIBLIOGRAFIA

1. Garrido, Margarita, Hojean, Roberto, Montenegro, Gloria (2005). El ciclo del agua, [En línea] octubre 1997 <<http://www.explora.cl/otros/agua/ciclo2.html>>consulta 17 may. 2005
2. Astronomía educativa, tierra, sistema solar y universo (2005). El origen de la tierra, [En línea] 2005 <<http://www.astronomia.com/tierraluna/origentierra.htm>>consulta 17 may. 2005
3. Castañeda, S, Rosales, E. (2002), Cultura del agua, Toluca de Lerdo, Gobierno del Estado de México, 106p
4. García, Manuel (2005). Agua, distribución y desarrollo, [En línea] <<http://www.mgar.net/mar/agua.htm>>consulta 17 may. 2005
5. Astronomía educativa, tierra, sistema solar y universo (2005). El agua de la superficie terrestre, [En línea] 2005 <<http://www.astronomia.com/tierraluna/agua.htm>>consulta 25 may. 2005
6. Enciclopedia Libre (2005). Agua, [En línea] 23 mar 2005 <<http://es.wikipedia.org/wiki/Agua>>consulta 17 may. 2005
7. Reyes Ruvalcaba, David (2005). Agua y contaminación, [En línea] 1997 <<http://www.>>consulta 14 jun. 2005 Castillo, Jorge L (2005).
8. El agua, [En línea] 1997 <<http://www.monografias.com/trabajos5/elagu/elagu.shtml>>consulta 17 may. 2005
9. Gray, NF (1994), Calidad del agua potable. Problemas y soluciones, Madrid, Acribia, pp. 40, 41, 51, 99, 100, 101,109, 110, 183, 189, 215-218, 221, 222.
10. Frits van der Leeden and Fred L. Troise (1991), The water encyclopedia, 2. ed., Lewis



Publishers, USA.

11. Tebbutt, T.H.Y, (1999), Fundamentos del control de calidad del agua, 3 ed., México, Limusa, pp 50, 51,55-58 97, 177, 181, 182.
12. Britton, Gabriel (1994), Wastewater microbiology, Wiley-Liss, USA, pp. 77-83, 101-110, 113-121.
13. Romero, Rojas, Jairo, Alberto (1999.), Calidad del agua, 2 ed., México, Alfa omega. pp. 154-156, 160, 162, 195, 216, 217.
14. Harley, John P. & Prescott, Lausing M, (1990), Laboratory exercises in microbiology, WM.C. Brown Publishers, USA, pp. 141-145, 36-38.
15. Edberg, SC., Rice, E. W, (2000) *Escherichia coli. The best drinking water indicator for public health protection*, Journal of Applied Microbiology, No. 8, pp. 106S-116S.
16. Frick, C.R., (2000) Methods for the detection of Escherichia coli in environmental samples, Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement, No. 88, pp 10S-11S.
17. Proyecto de Norma Oficial Mexicana, PROY-NOM-201-SSA1-2000. "Bienes y servicios. Agua y hielo para consumo humano, preenvasados y a granel. Especificaciones sanitarias". Diario Oficial de la Federación. Secretaria de Salud. México, DF.
18. Norma Oficial Mexicana, NMX-BB-040-SCFI-1999, Métodos Generales de análisis - Determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas.
19. Día mundial del agua, [En línea] <<http://www.> >consulta 9 jul. 2005
20. Norma Oficial Mexicana NOM-181-SSA1-1998, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Requisitos sanitarios que deben cumplir las sustancias germicidas para tratamiento de agua, de tipo doméstico.



21. Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA1-1993. Procedimientos sanitarios para el muestreo de agua para uso y consumo humano de agua públicos y privados.
22. Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA1-1993, Bienes y servicios. Agua purificada envasada.
23. Buenas prácticas para la manipulación, embalaje, almacenamiento y transporte de productos frescos. Sección III
24. Castillo, Jorge L. (2005). Determinación de microorganismos, [En línea] 1997 <<http://www.monografias.com/trabajos15/determ-microorganismms/determ-microorganismms.shtml>>consulta 25 may. 2005
25. Castillo, Jorge L. (2005). Análisis microbiológico del agua, [En línea] 1997 <<http://www.monografias.com/trabajos15/analisis-agua/analisis-agua.shtml>>consulta 17 may. 2005
26. Certificaciones FDA., EPA., IFOAM. Productos hechos para la industria agrícola, agropecuaria, porcina, avícola, pesquera y empresas con conciencia ecológica. (2006). Extractos cítricos, [En línea] 2000 <<http://www.solusan-mexico.com/Organicos.html>>consulta 13 mar. 2006
27. <http://www.viresi.com>
28. Mijares Fernández, Carlos (2003). Desfan100, [En línea] agosto 2003 <<http://www.citropower.com.mx/desfan100.html>>consulta 14 oct. 2003
29. (2003). Rubigen Forte, [En línea] <<http://www.>>consulta 14 oct. 2003
30. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.



31. Rodríguez Ferri, Elias (2004). La desinfección como práctica útil en la lucha contra las infecciones animales. [En línea]
<http://ourworld.compuserve.com/homepages/Academia_veterinaria/news26htm> consulta 22 ene. 2004
32. Yáñez, Ma. Julia, Servicio de microscopia electrónica, Universidad de Zaragoza [En línea] <<http://www.criba.edu.ar/cribabb/servicios/secegrin/microscopia/jem.gif>> consulta 28 oct. 2005
33. González, Sofía, Ruiz, Ma. Rosario, Hernández, Eliseo (2003). Guía de Microscopia Electrónica. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.
34. Grimstone, A.U (1981), El microscopio electrónico en biología, Barcelona, Omega, S.A.
35. Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Determinación de Bacterias Coliformes. Técnica del Número más Probable.
36. Kelley, Susan G., Ph. D. & Post, Frederick J., (1991), Microbiology Techniques, Edit. Publishing Company. United States of America.
37. Koneman, Elmer W. (1999), Diagnóstico microbiológico, 5. ed., Madrid, Edit. Médica Panamericana.
38. Mac Faddin, Jean F. (1990), Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, México, Edit. Médica Panamericana.
39. Rompre, Annie, Servais, Pierre, Baudart, Julia (2002), Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches". Journal of Microbiological Methods 49, pp 31-54
40. Spellman Frank R., (2000), Manual del agua potable", Zaragoza, Acribia, S.A.



APENDICES

APENDICE A

MATERIAL Y EQUIPO

- Productos germicidas (Desfan-100 y Rubigen Forte).
- Nefelómetro de Macfarlan
- Autoclave con temperatura de esterilización de 121 ± 2 °C. Industrias Steele de México, SA. de CV.
- Horno con temperatura de 160 – 180 °C
- Campana de flujo laminar. Veco
- Incubadora que opere a 35 ± 2 °C. Blue M electronic company
- Lámpara de luz UV con longitud de 254/366 nm. Model Uval-25
- Espectrofotómetro Cary UV-Visible. Varían
- Contador manual
- Mechero bunsen
- Tubos de ensaye con tapa rosca
- Asa de platino
- Pipetas estériles de 1, 2, 5 y 10 mL de capacidad
- Cajas de Petri estériles de 100 x 15 mm
- Portaobjetos
- Matraz Erlenmeyer 1000mL
- Probeta 100mL



APENDICE B

REACTIVOS Y SOLUCIONES

- Cristal violeta. Hycel de México, SA de CV.
- Alcohol-acetona. Hycel de México, SA de CV.
- Lugol. Hycel de México, SA de CV.
- Safranina. Hycel de México, SA de CV.
- Cloruro de sodio. JT. Baker, SA de CV.
- Etanol

MEDIOS DE CULTIVO Y PRUEBAS BIOQUIMICAS

- Agar nutritivo A. Bioxon de México, SA de CV.
- Agar nutritivo B. Bioxon de México, SA de CV.
- Agar de Mac Conkey. Bioxon de México, SA de CV.
- Agar sal y manitol. Bioxon de México, SA de CV.
- Agar para métodos estándar. Bidico SA de CV.
- Caldo lauril sulfato con MUG. Acumedia Manufacturers, inc.
- Medio SIM. Bioxon de México, SA de CV.
- Agar Citrato de Simmons. Bioxon de México, SA de CV.
- Agar de Hierro Kigler. Bioxon de México, SA de CV.
- Caldo urea. Bioxon de México, SA de CV.
- Caldo rojo de fenol y sacarosa. Bioxon de México, SA de CV.
- Agar sangre (base). Merck México, SA de CV.
- OF
- Medio indol. Bioxon de México, SA de CV.
- Bilis esculina
- Suero descomplementado
- Catalasa
- Oxidasa
- Peroxido de hidrógeno al 3%



APENDICE C

Índice del NMP para varias combinaciones de resultado positivo y negativo

No. de tubos que dan reacción positiva en:				No. de tubos que dan reacción positiva en:			
5 tubos de 10 mL cada uno	5 tubos de 1 mL cada uno	5 tubos de 0.1 mL cada uno	Índice del NMP/100 mL	5 tubos de 10 mL cada uno	5 tubos de 1 mL cada uno	5 tubos de 0.1 mL cada uno	Índice del NMP/100 mL
0	0	0	≤ 2	4	2	1	26
0	0	1	2	4	3	0	27
0	1	0	2	4	3	1	33
0	2	0	4	4	4	0	34
1	0	0	2	5	0	0	23
1	0	1	4	5	0	1	31
1	1	0	4	5	0	2	43
1	1	1	6	5	1	0	33
1	2	0	6	5	1	1	46
2	0	0	5	5	1	2	63
2	0	1	7	5	2	0	49
2	1	0	7	5	2	1	70
2	1	1	9	5	2	2	94
2	2	0	9	5	3	0	79
2	3	0	12	5	3	1	110
3	0	0	8	5	3	2	140
3	0	1	11	5	3	3	180
3	1	0	11	5	4	0	130
3	1	1	14	5	4	1	170
3	2	0	14	5	4	2	220
3	2	1	17	5	4	3	280
3	3	0	17	5	4	4	350
4	0	0	13	5	5	0	240
4	0	1	17	5	5	1	350
4	1	0	17	5	5	2	540
4	1	1	21	5	5	3	920
4	1	2	26	5	5	4	1600
4	2	0	22	5	5	5	≥ 2400