



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO.

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN DEL EFECTO GERMICIDA DE  
PRODUCTOS A BASE DE PLATA COLOIDAL EN LA  
DESINFECCION DEL AGUA PARA CONSUMO  
HUMANO

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A :  
RICARDO TREJO BARRAGÁN

ASESORES: DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA  
DR. ABEL CIPRIAN CARRAZCO  
M.EN C. 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.

## **DEDICATORIAS.**

*Dedico este trabajo a mis padres por darme el mejor regalo que unos padres te pueden dar, el don divino de la vida, por su apoyo y sus consejos para llegar hasta donde me encuentro en este momento, por el gran ejemplo que como pareja me han dado para ser una mejor persona y sobre todo por la honestidad que me han inculcado desde siempre; pero principalmente por ser el motivo por el cual debo superarme día a día.*

*A mis hermanos por darme el cariño y el apoyo que solo un hermano te puede ofrecer, pero sobre todo por ser otro motivo para mantenerme siempre fuerte y en superación constante para darles un ejemplo a seguir y mostrarles que cuando quieres hacer algo lo puedes conseguir, no importando lo difícil que pueda ser.*

## **AGRADECIMIENTOS.**

Quiero agradecer este trabajo:

A dios por bendecir nuestro hogar; por iluminar nuestro camino y no dejar que las adversidades nos detengan.

A mi pato que ha estado conmigo durante muchos años apoyándome en todas las decisiones que he tomado, no importando si son buenas o malas, sino ayudándome a que sean mejores.

A la Doctora Susana E. Mendoza (Susy) y al Doctor Abel Ciprián por sus enseñanzas, por haberme dado la oportunidad de realizar el presente trabajo, por todo el apoyo que he recibido de su parte desde tiempo antes de ingresar a la universidad y principalmente por brindarme su amistad.

Al MVZ David Trujillo, por la amistad y el cariño que siempre me ha otorgado además de todos los conocimientos que me ha aportado para poder desempeñarme en mis actividades tanto personales como laborales.

Al señor Gabino Sánchez Galindo por su apoyo durante la elaboración del presente trabajo y su cariño incondicional el cual siempre agradeceré y tendré presente. Gracias por sus consejos.

A Minis por toda su ayuda para la culminación del presente documento, su orientación en cosas tal vez simples pero importantes para poder cerrar este ciclo.

A todos mis amigos, porque con ellos disfruté una gran etapa de mi vida y con su compañerismo salimos adelante para terminar un ciclo más en nuestra preparación y de esta forma estar en posibilidad de enfrentar el mañana.

Este trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Virología y Microbiología de las Enfermedades Respiratorias de los Cerdos en la Unidad de Posgrado e Investigación en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Y con apoyo de la cátedra PACIVE CONS-112

# INDICE.

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>i</b>
<b>INDICE DE CUADROS</b> .....	<b>ii</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>INDICE DE GRAFICAS</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>v</b>
<b>1.- MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>1</b>
1.1 Historia de agua.....	1
1.2 La plata como elemento.....	6
1.3 Normatividad.....	8
1.4 Justificación.....	9
1.5 Hipótesis.....	9
<b>2.- OBJETIVO</b> .....	<b>10</b>
2.1 Objetivo General.....	10
2.2 Objetivo particular.....	10
<b>3.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>11</b>
3.1 Preparación de los productos a base de plata coloidal.....	11
3.2 Preparación del agua de prueba.....	11
3.3 Mantenimiento y resiembra de cepas.....	11
3.4 Preparación de soluciones.....	12
3.5 Diagramas de flujo.....	13
<b>4.-RESULTADOS</b> .....	<b>16</b>
<b>5.- DISCUSIÓN</b> .....	<b>35</b>
<b>6.- CONCLUSIONES</b> .....	<b>42</b>
<b>7.- REFERENCIAS</b> .....	<b>44</b>
<b>8.- ANEXOS</b> .....	<b>47</b>

## INDICE DE CUADROS.

	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 1.-</b> Resultados obtenidos mediante el reto de <i>E.coli</i> ATCC 11229 al producto Colargol. Se observa una ligera sensibilidad de este microorganismo a dicho producto...	20
<b>Cuadro 2.-</b> Resultados obtenidos mediante el reto de <i>E.coli</i> C. Clínico al producto Colargol, se observa una sensibilidad moderada del microorganismo a dicho producto...	20
<b>Cuadro 3.-</b> Resultados obtenidos mediante el reto de <i>S. aureus</i> <i>cowan</i> I al producto Colargol, se observa una resistencia del microorganismo a dicho producto.....	20
<b>Cuadro 4.-</b> Resultados obtenidos mediante el reto de <i>V. cholerae</i> al producto Colargol, se observa una resistencia del microorganismo a dicho producto.....	21
<b>Cuadro 5.-</b> Resultados obtenidos mediante el reto de <i>P. multocida</i> al producto Colargol, se observa una marcada sensibilidad del microorganismo a dicho producto.....	21
<b>Cuadro 6.-</b> Resultados obtenidos mediante el reto de <i>E. coli</i> ATCC 11229 al producto Argyrol, se observa una resistencia del microorganismo a dicho producto.....	22
<b>Cuadro 7.-</b> Resultados obtenidos mediante el reto de <i>E. coli</i> C. clínico al producto Argyrol, se observa una marcada sensibilidad del microorganismo a dicho producto.....	22
<b>Cuadro 8.-</b> Resultados obtenidos mediante el reto de <i>S. aureus</i> <i>cowan</i> I al producto Argyrol, se observa una sensibilidad del microorganismo a dicho producto.....	22
<b>Cuadro 9.-</b> Resultados obtenidos mediante el reto de <i>V. cholerae</i> al producto Argyrol, se observa una marcada sensibilidad del microorganismo a dicho producto.....	23
<b>Cuadro 10.-</b> Resultados obtenidos mediante el reto de <i>P. multocida</i> al producto Argyrol, se observa una resistencia del microorganismo a dicho producto.....	23

	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 11.-</b> Resultados obtenidos mediante el reto de <i>E. Coli</i> ATCC 11229 al producto Protargol, se observa una resistencia del microorganismo a dicho producto.....	24
<b>Cuadro 12.-</b> Resultados obtenidos mediante el reto de <i>E. Coli</i> C. Clínico al producto Protargol, se observa una sensibilidad del microorganismo a dicho producto.....	24
<b>Cuadro 13.-</b> Resultados obtenidos mediante el reto de <i>S. aureus</i> al producto Protargol, se observa una resistencia del microorganismo a dicho producto.....	24
<b>Cuadro 14.-</b> Resultados obtenidos mediante el reto de <i>V. cholerae</i> al producto Protargol, se observa una sensibilidad del microorganismo a dicho producto.....	25
<b>Cuadro 15.-</b> Resultados obtenidos mediante el reto de <i>P. multocida</i> al producto Protargol, se observa una resistencia del microorganismo a dicho producto.....	25
<b>Cuadro 16.</b> Resumen de los datos promedio obtenidos mediante el reto microbiano al producto Colargol.....	26
<b>Cuadro 17.</b> Resumen de los datos promedio obtenidos mediante el reto microbiano al producto Argyrol.....	28
<b>Cuadro 18.</b> Resumen de los datos promedio obtenidos mediante el reto microbiano al producto Protargol.....	30
<b>Cuadro 19.</b> Resultados comparativos obtenidos en UFC's por mililitro de agua de prueba.....	32
<b>Cuadro 20.</b> Representación comparativa del porcentaje de reducción de cada microorganismo referida al respectivo germicida empleado.....	33

## INDICE DE FIGURAS.

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Preparación de las suspensiones bacterianas.....	13
<b>Figura 2.</b> Preparación de las soluciones a base de plata coloidal.....	14
<b>Figura 3.</b> Reto microbiano de los productos a base de plata coloidal.....	15
<b>Figura 4.-</b> efecto del agente bactericida contra la <i>E. coli</i> ATCC 11229 (cepa de referencia).....	16
<b>Figura 5.-</b> efecto bactericida contra la <i>E. coli</i> ATCC 11229 (cepa de referencia) en la menor dilución (1:1000).....	17
<b>Figura 6.-</b> Efecto bactericida contra la <i>E. coli</i> ATCC 11229 (cepa de referencia), tanto en las diluciones 1:100 como 1:1000 a las 24 horas.....	17
<b>Figura 7.-</b> Control positivo a las 24 horas de crecimiento.....	18
<b>Figura 8.-</b> Control negativo para la prueba de NMP a las 24 horas de incubación.....	18
<b>Figura 9.-</b> Efecto de un producto comercial a base de plata coloidal.....	19

## INDICE DE GRAFICAS.

	<b>Pág.</b>
<b>Gráfica 1.</b> Representación comparativa del resumen de los datos promedio obtenidos mediante el reto microbiano al producto Colargol.....	27
<b>Gráfica 2.</b> Representación comparativa del resumen de los datos promedio obtenidos mediante el reto microbiano al producto Argyrol.....	29
<b>Gráfica 3.</b> Representación comparativa del resumen de los datos promedio obtenidos mediante el reto microbiano al producto Argyrol.....	31
<b>Gráfica 4.</b> Gráfica comparativa, en la cual se observa la marcada sensibilidad de la <i>E. coli</i> caso clínico, a diferencia de los demás microorganismos evaluados. ....	34

## ABREVIATURAS.

ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
Ag	Plata.
ATCC	American Type Culture Collection.
ATP	Adenosin trifosfato.
C. Clínico	Caso Clínico.
CNA	Comisión Nacional del Agua.
<i>E. coli</i>	Escherichia coli.
g/mol	gramos por mol
NMP	Número Más Probable.
NOM's	Normas Oficiales Mexicanas.
pH	Potencial (concentración) de iones H <sup>+</sup> en solución.
<i>P. multocida</i>	Pasteurella multocida.
<i>S. aureus</i>	Staphylococcus aureus.
UFC's	Unidades Formadoras de Colonias.
UV	Ultra violeta.
<i>V. cholerae</i>	Vibrio cholerae.

## RESUMEN.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad bactericida de productos a base de plata coloidal en la desinfección del agua para consumo humano. Se evaluaron tres productos a base de plata coloidal para determinar si presentan el efecto microbicida especificado en la NORMA OFICIAL MEXICANA PROY-NOM-181-SSA1-1998 (ver anexo 6), salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Requisitos sanitarios que deben cumplir las sustancias germicidas para el tratamiento de agua de tipo domestico, y poder así ser distribuidos para su comercialización.

Se realizaron retos microbianos a concentraciones estandarizadas de UFC's, tanto al microorganismo especificado en la norma citada (*E. coli* ATCC 11229) como a microorganismos causantes de enfermedades gastrointestinales en humanos (*S. aureus* y *V. cholerae*) y del tracto respiratorio en cerdos (*P. multocida*), empleando la técnica de vaciado en placa y del número más probable (NMP) para cuantificar el porcentaje de reducción de crecimiento microbiano producido por los productos a base de plata coloidal.

Con los resultados obtenidos podemos concluir que los productos empleados a base de plata coloidal no aprueban la NORMA OFICIAL MEXICANA PROY-NOM-181-SSA1-1998 (ver anexo 6), salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Requisitos sanitarios que deben cumplir las sustancias germicidas para el tratamiento de agua de tipo domestico y que los microorganismos que producen enfermedades gastrointestinales presentan una sensibilidad diversa dependiendo del producto al cual fueron confrontado. De la misma forma se observó que estos productos a base de plata coloidal pueden ser empleados para la sanitización de superficies a nivel veterinario debido a que *P. multocida* y *E. coli* caso clínico presentaron mayor sensibilidad a estos productos. Por otra parte, se recomienda que el uso de estos productos debe realizarse mediante las indicaciones descritas en los marbetes ya que el uso indebido induce a los microorganismos a producir resistencia a este tipo de compuestos. En caso de emplearse como sanitizantes de superficies se deben elaborar programas de rotación con diferentes productos de sanitización para que los microorganismos no generen resistencia a los diversos sanitizantes empleados en la actualidad.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 Historia del agua

En un principio nuestro planeta era una bola de masa en fusión, con cientos de volcanes activos, estos gases con vapores de agua emergieron a la superficie en continuas erupciones, formando así la atmósfera. Después, la tierra se enfrió, el vapor de agua se condensó y se precipitó en forma de lluvia, nieve o granizo, comenzando así un importantísimo ciclo de nuestra vida, el ciclo hidrológico del agua, dando origen a todos los seres vivos <sup>2</sup>

El agua es el nombre que se aplica al estado líquido de un compuesto formado por dos átomos de Hidrógeno y uno de Oxígeno con la fórmula  $H_2O$ . A una temperatura ordinaria es un líquido insípido, inodoro e incoloro en cantidades pequeñas; en grandes cantidades retiene las radiaciones del rango de longitud de onda que compete al color rojo dentro del espectro luz visible, por lo que a nuestros ojos adquiere un color azul. <sup>5</sup>

Las grandes civilizaciones se establecieron a orillas de grandes ríos y lagos. Los antiguos filósofos consideraban al agua como un elemento básico que representaba a todas las sustancias líquidas. Los científicos no descartaron esta idea sino hasta la última mitad del siglo XVIII. En 1781 el químico británico Henry Cavendish sintetizó agua detonando una mezcla de hidrógeno y aire. Sin embargo, los resultados de este experimento no fueron interpretados claramente hasta dos años más tarde, cuando el químico francés Antoine Laurent de Lavoisier propuso que el agua no era un elemento sino un compuesto de oxígeno e hidrógeno. En un documento científico presentado en 1804, el químico francés Joseph Louis Gay-Lussac y el naturalista alemán Alexander von Humboldt demostraron conjuntamente que el agua consistía en dos volúmenes de hidrógeno y uno de oxígeno, tal como se expresa en la fórmula actual  $H_2O$ . <sup>3</sup>

El agua es requerida en una gran cantidad de funciones, entre las cuales destacan su importancia para los organismos vivos. Según la bioquímica, el agua tiene una importancia esencial en la biología, debido a que es el medio en el cual se realizan los procesos vitales. Todos los organismos vivientes contienen agua, en donde las cantidades de dicho compuesto varían tanto en animales como en plantas, mostrándose unos límites comprendidos entre la mitad y 9/10 del peso total del organismo. El cuerpo

humano está constituido también por agua siendo según un porcentaje en peso que es máximo en los primeros meses de vida embrionaria (cerca del 97%), y disminuye con la edad. <sup>4</sup>

En el ser humano, la absorción del agua se encuentra regulada por el mecanismo de la sed. Las membranas celulares son permeables, por lo que es importante que las concentraciones de las sustancias disueltas permanezcan en equilibrio intracelular y extracelular; esto se consigue mediante la regulación del aporte y eliminación del agua por el cuerpo. Como ya se mencionó anteriormente, el mecanismo fisiológico de la sed regula el suministro por medio del líquido ingerido, el cual a su vez será eliminado por el sistema renal. <sup>4</sup>

Cuando el nivel de agua intracelular disminuye, es enviado un impulso nervioso al cerebro, el cual, mediante los receptores neuronales detectan el desequilibrio hidrológico y ordenan disminuir la eliminación de la misma por el sistema renal y la secreción de saliva, que a su vez, provoca sequedad bucal y deseos de beber. <sup>4</sup>

Una privación prolongada de agua provoca, además de una sed intensa, la sequedad de la piel y las mucosas, así como fiebre, colapso cardíaco y, en casos más graves, un estado de coma y muerte. Pero también la ingestión excesiva de agua provoca trastornos que, en casos extremos, resultan mortales. <sup>4</sup>

De la misma forma en que el agua nos ayuda a una innumerable cantidad de procesos vitales, también puede perjudicar nuestra salud, debido a que podría fungir como un vehículo para diversos microorganismos patógenos, los cuales son por lo general, los agentes causales de las enfermedades en todos los seres vivos. Hipócrates, el padre de la medicina, (400 a.C.) sugirió que el agua fuera hervida y colada a través de una pieza de la tela para remover partículas dañinas y así proteger la salud, de la misma manera en que los Chinos hervían el agua para purificarla. <sup>2</sup>

A mediados del siglo XIX (hacia 1850), los científicos comenzaron a sospechar que algunas enfermedades podían ser transmitidas por el agua. El descubrimiento del

microscopio y el conocimiento sobre las bacterias ayudaron a identificar los microorganismos causantes de enfermedades provenientes del agua.<sup>2</sup> Muchas de las enfermedades transmitidas por el agua son denominadas infecciones entéricas, o sea que se presentan en diferentes porciones del tracto gastrointestinal, dependiendo del tipo de microorganismos y el micro ambiente reinante en la porción del tracto. El tracto gastrointestinal inicia en la cavidad bucal y termina en el ano, pasando, en orden descendiente, por la laringe, faringe, tráquea, esófago, estómago, intestino delgado (el cual se subdivide en duodeno, yeyuno e íleon), intestino grueso y finalmente el ano<sup>1</sup>.

El género bacteriano Enterobacteriaceae provoca diversos tipos de enfermedades siendo las más concurrentes las enfermedades del tracto urinario, seguido de las septicemias y por último –de manera menos significativa- las enfermedades gastrointestinales. Dicho género presenta diversas propiedades como: son Gram negativos, presentan forma bacilar; son móviles debido a un flagelo peritrico, o en su defecto son inmóviles, no forman esporas, crecen en un medio peptonado o de extracto de carne sin la adición de cloruro de sodio u otros suplementos, presentan un crecimiento óptimo en el medio de agar MacConkey, son aerobios y anaerobios facultativos, fermenta la D-glucosa, con la consecuente producción de gas; son catalasa positivos y oxidasa negativos y reducen los nitratos a nitritos.<sup>7</sup>

La contaminación del agua se debe a diversas causas entre las cuales destacan las aguas residuales y otros residuos que demandan oxígeno (en su mayor parte materia orgánica, cuya descomposición produce la desoxigenación del agua). A continuación se hace una mención de los principales agentes contaminantes del agua.<sup>3</sup>

- Agentes patógenos: bacterias, virus, protozoarios, parásitos que entran en el agua provenientes de desechos orgánicos
- Nutrientes vegetales que pueden estimular el crecimiento de las plantas acuáticas. Estas, a su vez, interfieren con los usos a los que se le destina el agua y al descomponerse, agota el oxígeno disuelto y produce olores desagradables.

- Productos químicos, incluyendo los pesticidas, diversos productos industriales, las sustancias tensoactivas contenidas en los detergentes, y los productos de la descomposición de otros compuestos orgánicos.
- El petróleo, especialmente el que proviene de los derrames accidentales.
- Minerales inorgánicos y compuestos químicos.
- Sedimentos formados por partículas del suelo y minerales arrastrados por las tormentas desde las tierras de cultivo, los suelos sin protección, las explotaciones mineras, las carreteras y las demoliciones urbanas.
- Sustancias radioactivas procedentes de los residuos producidos por la minería y el refinado del uranio y el torio, las centrales nucleares y el uso industrial, médico y científico de materiales radiactivos.
- El calor también puede ser considerado un contaminante cuando el derrame de agua empleada para la refrigeración de las fábricas y las centrales energéticas hace subir la temperatura del agua de la que se abastecen, provocando así una disminución del contenido de oxígeno, haciendo muy vulnerables a los organismos acuáticos.

El agua se considera contaminada cuando su composición o estado no reúne las condiciones requeridas para los usos a los que se hubiera destinado en su estado natural. Esta misma presenta una doble acción sobre la salud; en condiciones normales disminuye la posibilidad de contraer enfermedades como el cólera, la fiebre tifoidea, la disentería y las enfermedades diarreicas; esta última es la principal causa de mortalidad

de los niños de 1 a 4 años de edad. Por otra parte aleja los materiales fecales y residuales (aguas cloacales).<sup>4</sup>

El crecimiento de la industrialización, de la urbanización y de la población humana acrecienta los problemas de contaminación y en consecuencia el suministro de agua potable y el tratamiento de las aguas cloacales.<sup>4</sup>

Las fuentes de agua de que disponemos para consumo son: el agua de lluvia, de ríos, de lagos, de mares y aguas subterráneas (mantos freáticos), debido a que son consideradas como aguas dulces por su bajo contenido de sales, a diferencia del agua de los océanos, las cuales contiene una gran cantidad de sales por lo que no es apta para su consumo. Las aguas dulces se encuentran en muchas rocas y piedras durísimas así como en la atmósfera en forma de nubes o niebla. El agua potable, para que pueda ser utilizada para fines alimenticios debe estar totalmente limpia, ser insípida, inodora e incolora y tener una temperatura aproximada a los 15° C; no debe contener bacterias, virus, parásitos u otros gérmenes que provoquen enfermedades, tales como fiebre tifoidea, fiebre paratifoidea, diarreas, hepatitis, etc., además el agua potable no debe exceder en cantidades de sustancias minerales mayores de los límites establecidos.<sup>4</sup>

El agua de consumo humano es sometida a un proceso de potabilización en donde se le agregan algunos químicos, de tal forma que no cause enfermedades. Dentro de los procesos de potabilización tenemos el de desinfección. Dicho proceso se realiza a la mayor parte de las aguas aún en el caso de que sean totalmente claras o que se hayan sometido a un tratamiento previo, ya que se encuentran generalmente contaminadas por microorganismos nocivos para el organismo humano; esta depuración bacteriológica se efectúa realizando una desinfección o esterilización. Los principales agentes desinfectantes son:

- El cloro y sus derivados.
- Ozono.
- Radiación Ultravioleta.
- Plata (muy escaso).
- Bromo (muy escaso).

El más utilizado es el cloro, debido a su gran eficacia y su facilidad de empleo, posee un poder oxidante muy elevado, su acción microbicida puede explicarse por la destrucción de proteínas indispensables para la vida de los microorganismos.<sup>4</sup>

En las plantas potabilizadoras se siguen dos procesos de desinfección del agua, uno en la precloración la cual consiste en agregar el cloro al inicio de la llegada de aguas crudas al proceso de tratamiento de la planta, la otra es la postcloración inyectándolo al término del tratamiento (salida del agua filtrada o en las cámaras de contacto con cloro). El agua potabilizada en los sistemas de tratamiento debe cumplir con las normas de calidad que establecen la Secretaría de Salubridad y Asistencia, así como otras que son determinadas por la Comisión Nacional del Agua (CNA).

## **1.2 La Plata como elemento**

La plata es un mineral que pertenece a la familia de los metales, es blanca brillante, dúctil y maleable, más pesada que el cobre y menos que el plomo. Es uno de los metales preciosos con los cuales se fabrican un gran número de productos como son la fabricación de monedas, aleaciones dentales, joyería, en la industria fotográfica, etc. Su símbolo en la tabla periódica de los elementos es Ag, presenta un número atómico 47, un peso atómico de 107.88 g/mol. A la plata se le caracteriza por su ductilidad y maleabilidad, así como por el hecho de ser el metal con una mejor conductividad eléctrica y térmica. Tiene un peso específico de 10.5 y su punto de fusión se encuentra a una temperatura de 960.8° C. su dureza se encuentra entre 2.5 y 3.0 y su red cristalina corresponde al sistema regular. Es inalterable al aire y en una atmósfera rica en ozono se ennegrece a causa de la formación de un peróxido ( $\text{Ag}_2\text{O}_2$ ).<sup>6</sup>

Dicho mineral ha presentado una actividad germicida desde épocas muy remotas, 4000 años a.C. los Persas mencionan en sus escritos el empleo de recipientes de plata para la conservación del agua. De la misma manera, las civilizaciones Babilonias y Griegas empleaban este mineral como un desinfectante. La plata coloidal como tal fue empleada como un remedio casero por los antiguos Egipcios y esta practica se siguió realizando como un tratamiento efectivo hasta la Edad Media. Los romanos reportaron el uso de compuestos de plata en tratamientos médicos; también empleaban recipientes o monedas de plata para conservar durante algunos días el agua y la leche, evitando su

contaminación y descomposición de esta última.<sup>8,23</sup> Los antiguos colonos americanos observaron que manteniendo sus cubiertos de plata dentro de los barriles de agua tapados, “no iría el agua malo” como se le conocía a la contaminación del agua por microorganismos patógenos.<sup>9</sup> El empleo de la plata fue decreciendo a partir del descubrimiento de los antibióticos, principalmente desde el descubrimiento de la penicilina.

El término coloide fue implementado en el periodo de los 1800's por un químico inglés llamado Thomas Graham. Para el término coloidal se entiende los siguientes atributos: sustancias que difunden en el agua en una muy baja proporción en comparación con otras sustancias cristalinas como son el cloruro de sodio, azúcar y glicerol; además de que como las sustancias cristalinas traspasan fácilmente una membrana de papel porosa, el septo fue prácticamente imposible de traspasar para los cuerpos amorfos del material así como de la membrana de papel. Los cuerpos amorfos fueron designados como coloides, y son referidos a su peculiar forma de agregación.

Los minerales que se encuentran en un estado coloidal tienden a formar un núcleo de cristal líquido, de esa manera los minerales coloidales pueden fácilmente entrar y salir por las membranas de los animales; este atributo es semejante al realizado por cristaloides (no amorfos) de materiales que se emplean usualmente cuando se habla de un coloide.<sup>10</sup> La **plata coloidal** es una suspensión de partículas de plata metálicas submicroscópicas (de 0.01 a 0.001 micras de diámetro) suspendida en un medio diferente, ya que es un sólido dentro de un líquido<sup>24</sup>. Cada partícula contiene aproximadamente 15 átomos de plata; estas partículas son cargadas eléctricamente para activar la calidad germicida de la plata y permitir que las mismas permanezcan suspendidas en agua desionizada. Algunos fabricantes agregan un “estabilizador” el cual es típicamente una proteína, aunque recientemente se han empleado agentes surfactantes como Polivinilpirrolidona (PVP), Lauril sulfato de sodio (Na-LS), Naftalensulfonato de sodio (Na-NS) y Docedilbencensulfonato de sodio (SDBS)<sup>24</sup>. El uso de un estabilizador tiende a interrumpir la carga de las partículas de plata, obstruyendo su acción y disminuyendo su efectividad.<sup>11</sup>

La plata coloidal por lo general se toma oralmente, pero también puede ser empleada directamente a cortaduras, laceraciones, úlceras sin cicatrizar, verrugas o

usado como un enjuague para el acné, eccema y otras irritaciones de la piel. También pueden hacerse gárgaras, aplicarse como gotas para los ojos y los oídos, usarse vaginalmente, ser inhalado o atomizado por la nariz.

### **1.3 Normatividad.**

Para la obtención de agua de consumo humano se han establecido programas de potabilización, a fin de abastecer a la población del vital líquido. Dichos programas tienen el objetivo de que la población sea dotada de una cantidad de agua adecuada y de buena calidad. Aún con todo esto, no hemos logrado alcanzar estas metas en la práctica, por lo que un elevado número de usuarios recurre a métodos intradomiciliarios para subsanar las deficiencias de la calidad del agua suministrada a nivel municipal.

Los métodos intradomiciliarios o domésticos para purificar el agua de consumo humano, consisten en la aplicación de líquidos potabilizadores como los que se mencionaron anteriormente y sustancias germicidas, orientados fundamentalmente al aspecto bacteriológico, considerado como de riesgo inmediato a la salud.<sup>12</sup>

Por tal motivo se han implementado diversas Normas Oficiales Mexicanas (NOM's) para regular el tipo y aplicación de dichas sustancias germicidas, a fin de preservar la salud de la población. Para la realización de dichas normas son empleadas diversas técnicas en el área de la microbiología, a fin de poder determinar tanto la cantidad como el tipo de microorganismos presentes en el agua, y de esta manera alertar a la población de la veracidad y eficiencia de los productos disponibles en el mercado. Las técnicas empleadas mayormente son la de Vaciado en Placa<sup>13</sup> para determinar el número de microorganismos presentes y la del Número Más Probable<sup>14</sup>, presentando métodos alternativos como son la técnica de filtración por membrana y la del empleo de medios con compuestos cromogénicos, las cuales han sido implementadas por más NOM's con el propósito de estandarizar el estudio de dichos desinfectantes.<sup>12</sup>

## **1.4 Justificación**

El presente trabajo se realizó debido a la importancia que ha tomado el uso de desinfectantes y/o sanitizantes para el agua. La gran desconfianza que se ha generado entre el público por los sistemas de potabilización del agua provocó que el uso de agente sanitizantes a base de plata coloidal u otros activos tuvieran un auge a su favor.

En este sentido, las enfermedades gastrointestinales han sido un tema importante en el temas de salud pública, principalmente en las zonas mas pobres y en temporada de lluvias, donde se desbordan ríos y también n algunas ciudades donde se desbordan las aguas negras. Este tipo de problemas ha incrementa el número de casos de infecciones gastrointestinales, motivo por el cual el público ha optado por sistemas que le aseguren o por lo menos le den la confianza de obtener agua de mejor calidad para su consumo.

También, el mal uso de agentes sanitizantes para superficies ha provocado que un gran número de microorganismos genere resistencia estos. Desafortunadamente, cuando un agente sanitizante funciona de buena manera, tiende a utilizarse de manera constante y sin precaución, omitiendo programas de sanitización donde se incluyan otros agentes que, al irse alternando eviten generar dicha resistencia y aporten una limpieza adecuada para mantener limpias las áreas de agentes patógenos.

Por estos motivos, realizaremos el estudio de tres agentes a base de plata coloidal para su uso como desinfectantes para el agua de uso y consumo humano, evaluándolos mediante la normatividad vigente en el país.

## **1.5 Hipótesis.**

- Si la plata presenta un efecto microbicida, entonces los compuestos a base de plata coloidal serán efectivos como desinfectantes para productos de consumo humano.
- Si los compuestos a base de plata son efectivos para desinfectar productos de consumo humano, entonces podrán ser aplicados a nivel veterinario.

## **2. OBJETIVO.**

### **2.1. GENERAL:**

- Evaluar la capacidad bactericida de productos a base de plata coloidal en la desinfección del agua para consumo humano

### **2.2. PARTICULARES:**

- Realizar un reto microbiano de los productos a base de plata coloidal según la NORMA OFICIAL MEXICANA PROY-NOM-181-SSA1-1998 (ver anexo 6), salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Requisitos sanitarios que deben cumplir las sustancias germicidas para el tratamiento de agua de tipo domestico.

- Realizar retos microbianos a microorganismos que provocan enfermedades gastrointestinales de interés humano, según la NORMA OFICIAL MEXICANA PROY-NOM-181-SSA1-1998 (ver anexo 6), salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Requisitos sanitarios que deben cumplir las sustancias germicidas para el tratamiento de agua de tipo domestico.

- Realizar retos microbianos a microorganismos de interés veterinario, específicamente de interés porcino.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1 Preparación de los productos a base de plata coloidal.**

Se pesó la cantidad determinada de cada uno de los productos según los cálculos obtenidos, los cuales se muestran en el anexo 1, y se disolvieron en agua desmineralizada protegiéndose de la luz; posteriormente se almacenaron las soluciones en frascos color ámbar y/o azul cobalto a 4° C para su posterior empleo.

#### **3.2 Preparación del agua de prueba.**

Se adicionó a un contenedor de vidrio de marca Pairex® la cantidad de 10 litros de agua destilada, protegiendo la boca con una torunda y periódico para cubrir por último con papel aluminio; posteriormente se esterilizó en una autoclave marca AESA Modelo CV300 a las condiciones de 121° C, 15 minutos y 15 libras de presión.

#### **3.3 Mantenimiento y resiembra de cepas.**

Los microorganismos especificados en la NORMA OFICIAL MEXICANA PROY-NOM-181-SSA1-1998 es la *Escherichia coli* ATCC 11229, la cual fue proporcionada por el cepario del Instituto Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Las bacterias como son *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Pasteurella multocida* y *Escherichia coli* fueron proporcionadas por el departamento de Bacteriología y Virología del Área de Microbiología de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán –UNAM.

Los microorganismos se resembraron en medios selectivos para su identificación; para las *E. coli* se empleó agar EMB marca BIOXON y Mac Conkey marca BIOXON además de realizársele el IMViC; para el *S. aureus* se empleó agar sales y manitol

marca MERCK; para el *V. cholerae* se empleo agar TCBS marca DIBICO; para la *P. multocida* se empleo agar base sangre marca DIBICO suplementado con sangre desfibrinada de carnero al 5%.

Después de la identificación, los microorganismos fueron resembrados en agar nutritivo B el cual se encuentra especificado en la PROY-NOM-181-SSA1-1998 (ver composición en anexo 2); cada uno de los pases fue de 48 horas de incubación y finalmente un pase en agar nutritivo A, especificado en la PROY-NOM-181-SSA1-1998 (ver composición en anexo 2) teniendo así al microorganismo listo para cosecharse y emplearse. La resiembra se realizó por duplicado para también cosechar los microorganismos y conservarlos por el método de liofilización para subsecuentes análisis.

### **3.4 Preparación de soluciones.**

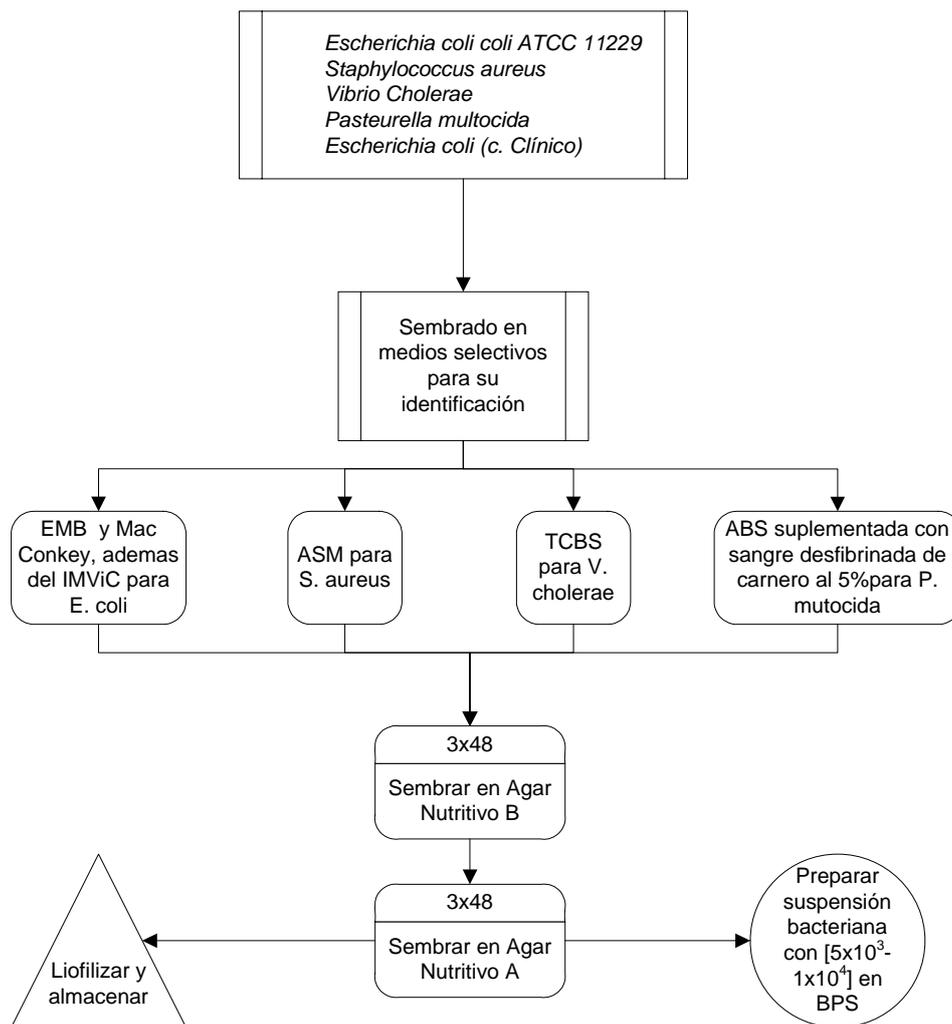
Se preparó una solución isotónica y con un pH regulado a base de fosfatos para conservar vivos los microorganismos al realizar las suspensiones bacterianas, las cuales deberán presentar una concentración entre  $5 \times 10^3$  y  $1 \times 10^4$  UFCs por ml. Dicha solución se prepara mezclando dos soluciones stock de fosfatos de diferente composición para obtener un pH de 7.2<sup>15</sup> (ver anexo 3)

Se preparó una escala de tubos conteniendo diferentes concentraciones de cloruro de bario, llamada Nefelómetro de McFarland. Para preparar dicha escala se prepararon dos soluciones primarias, una de cloruro de bario al 1% (m/v) y otra de ácido sulfúrico al 1% (v/v) para finalmente mezclarlos en diferentes proporciones según el número de tubo correspondiente<sup>16</sup> (dichas proporciones se indican en el anexo 4)

Para la obtención de la concentración de células bacterianas se posee de dos métodos, uno semicuantitativo y otro cuantitativo. El primero se realiza con la escala de tubos llamada Nefelómetro de Macfarland, en donde cada tubo representa una determinada concentración bacteriana (ver anexo 4) mediante la turbidez manifestada. El segundo es mediante la medición cuantitativa de la concentración de células bacterianas la cual presenta una determinada transmitancia, misma que indica mediante una curva patrón, la cantidad presentes en suspensión.

### 3.5 Diagramas de flujo.

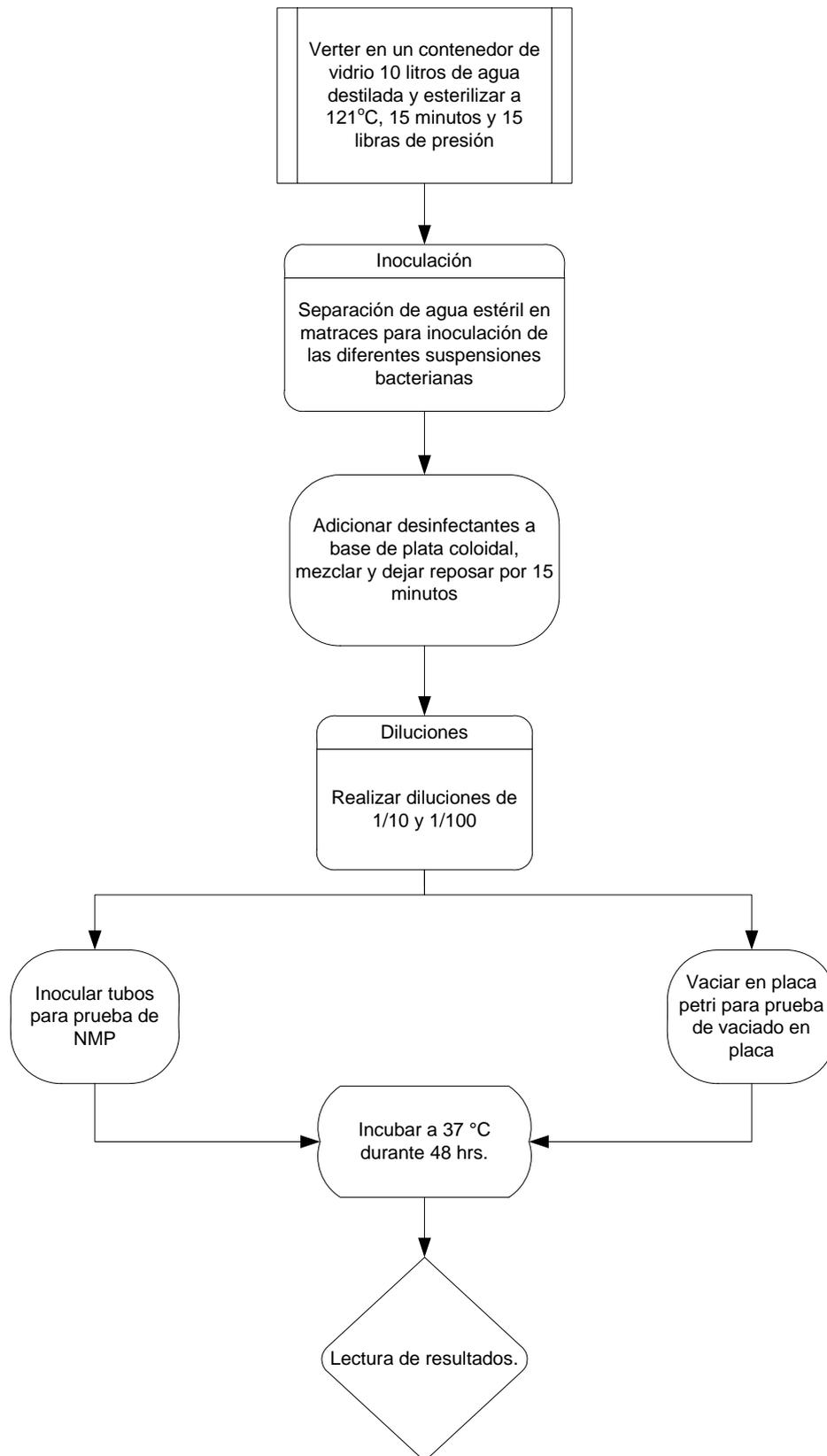
**Figura 1.** Preparación de las suspensiones bacterianas. Promoción de crecimiento y pruebas de confirmación de los microorganismos empleados en la evaluación de los sanitizantes a base de plata coloidal.



**Figura 2.** Preparación de las soluciones a base de plata coloidal. Preparación y conservación de los sanitizantes para realizar la prueba de reto microbiano.



**Figura 3.** Reto microbiano de los productos a base de plata coloidal. Procedimiento y lectura de resultados.

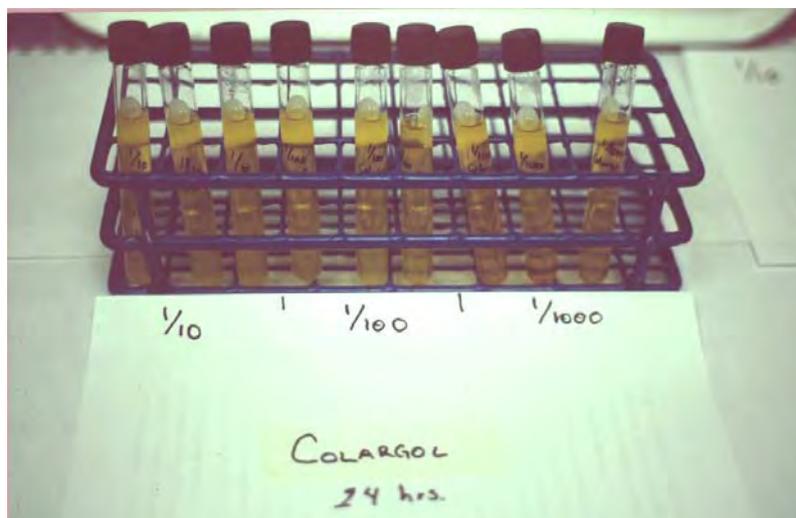


## 4. RESULTADOS

Los resultados que se muestran a continuación indican el efecto producido por los diferentes productos a base de plata coloidal, 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 de plata coloidal y evaluar su efecto germicida en el agua potable para poder hacerla de consumo humano.

Dentro de lo que corresponde al número más probable se obtuvieron los siguientes resultados con su respectiva imagen:

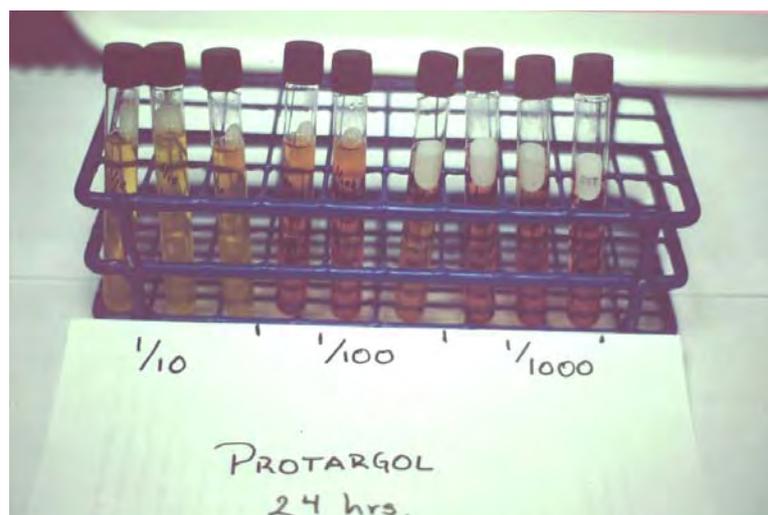
**Figura 4.-** en esta imagen se puede apreciar el nulo efecto del agente bactericida contra la *E. coli* ATCC 11229 (cepa de referencia), ya que a las 24 horas de inocularlo hubo un crecimiento del 100%, además de que la prueba marca que se debe dejar incubando 48 horas, por lo cual no cumple con la norma.



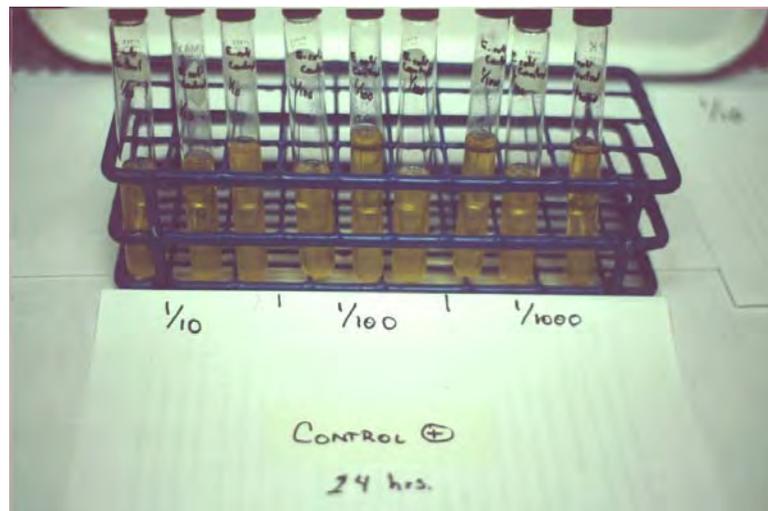
**Figura 5.-** En esta imagen se puede observar un ligero efecto bactericida contra la *E. coli* ATCC 11229 (cepa de referencia) en la menor dilución (1:1000) a las 24 horas, pero al dejarlas incubadas las 48 horas correspondientes nuevamente se presentó un crecimiento del 100% por lo cual no cumple con la norma.



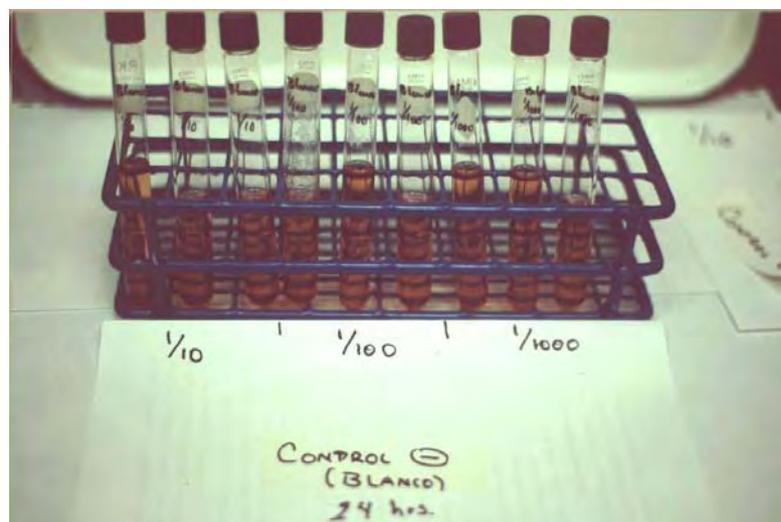
**Figura 6.-** En esta imagen observamos un efecto bactericida contra la *E. coli* ATCC 11229 (cepa de referencia), tanto en las diluciones 1:100 como 1:1000 a las 24 horas, pero nuevamente al continuar incubando las 48 horas correspondientes presenta un crecimiento del 100% por lo cual se considera que no cumple con la norma.



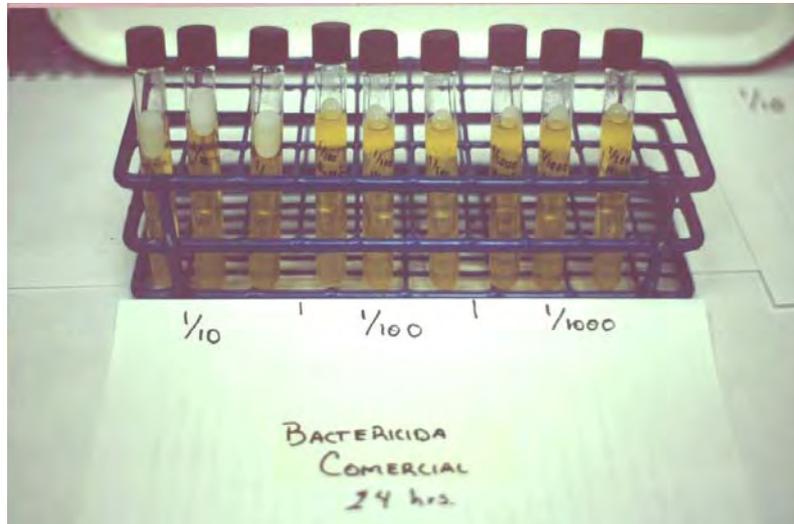
**Figura 7.-** Esta imagen representa el control positivo a las 24 horas de crecimiento, manteniendo las mismas características a las 48 horas de incubación. La prueba del NMP se realizó con la cepa mencionada en la norma oficial, la cual fue *E.coli* ATCC 11229.



**Figura 8.-** Este recuadro representa el control negativo para la prueba de NMP a las 24 horas de incubación, y de la misma forma preservó sus características de esterilidad a las 48 horas de incubación, considerándolo como un buen control negativo; con esto podemos reafirmar que los resultados mostrados en las imágenes anteriores son congruentes.



**Figura 9.-** Esta imagen nos deja ver que el uso de algunos agentes comerciales a base de plata coloidal no proporcionan el efecto esperado en la desinfección del agua y tal vez, como lo mencionan en sus etiquetas, de verduras y frutas.



## Colargol

Cuadro 1.- Resultados obtenidos mediante el reto de *E.coli* ATCC 11229 al producto Colargol. Se observa una ligera sensibilidad de este microorganismo a dicho producto.

*E. coli* ATCC11229 Control Positivo

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	∞	∞	
1/100	103	126	114.5

∞ Incontables

*E. coli* ATCC 11229 Problema

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	∞	∞	
1/100	56	52	54

Cuadro 2.- Resultados obtenidos mediante el reto de *E.coli* C. Clínico al producto Colargol, se observa una sensibilidad moderada del microorganismo a dicho producto.

*E. coli* (C. Clínico) Control positivo

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	205	240	222.5
1/100	27	30	28.5

∞ Incontables

*E. coli* (C. Clínico) Problema

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	17	21	19
1/100	0	2	1

Cuadro 3.- Resultados obtenidos mediante el reto de *S. aureus* cowan I al producto Colargol, se observa una resistencia del microorganismo a dicho producto.

*S. aureus* cowan I Control positivo

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	∞	∞	
1/100	42	57	49.5

∞ Incontables

*S. aureus* cowan I Problema

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	∞	∞	
1/100	52	48	50

Cuadro 4.- Resultados obtenidos mediante el reto de *V. cholerae* al producto Colargol, se observa una resistencia del microorganismo a dicho producto.

<i>V. cholerae</i>	Control positivo		
	Placa		Promedio
Dilución:	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	∞	∞	
1/100	57	60	58.5

∞ Incontables

<i>V. cholerae</i>	Problema		
	Placa		Promedio
Dilución:	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	∞	∞	
1/100	50	52	51

Cuadro 5.- Resultados obtenidos mediante el reto de *P. multocida* al producto Colargol, se observa una marcada sensibilidad del microorganismo a dicho producto.

<i>P. multocida</i> (C. Clínico)	Control positivo		
	Placa		Promedio
Dilución:	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	∞	∞	
1/100	50	57	53.5

∞ Incontables

<i>P. multocida</i> (C. Clínico)	Problema		
	Placa		Promedio
Dilución:	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	184	195	189.5
1/100	24	8	16

## Argyrol

Cuadro 6.- Resultados obtenidos mediante el reto de *E. coli* ATCC 11229 al producto Argyrol, se observa una resistencia del microorganismo a dicho producto.

*E. Coli* ATCC11229 Control positivo

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	∞	∞	
1/100	102	122	112

∞ Incontables

*E. coli* ATCC 11229 Problema

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	∞	∞	
1/100	101	107	104

Cuadro 7.- Resultados obtenidos mediante el reto de *E. coli* C. clínico al producto Argyrol, se observa una marcada sensibilidad del microorganismo a dicho producto.

*E. Coli* (C. Clínico) Control positivo

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	∞	∞	
1/100	53	41	47

∞ Incontables

*E. Coli* (C. Clínico) Problema

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	2	7	4.5
1/10	13	5	9
1/100	2	4	3

Cuadro 8.- Resultados obtenidos mediante el reto de *S. aureus* cowan I al producto Argyrol, se observa una sensibilidad del microorganismo a dicho producto.

*S. Aureus* cowan I Control positivo

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	∞	∞	
1/100	63	66	64.5

∞ Incontables

*S. Aureus* cowan I Problema

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	158	185	171.5
1/100	19	14	16.5

Cuadro 9.- Resultados obtenidos mediante el reto de *V. cholerae* al producto Argyrol, se observa una marcada sensibilidad del microorganismo a dicho producto.

*V. cholerae* Control positivo

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	∞	∞	
1/100	47	43	45

∞ Incontables

*V. cholerae* Problema

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	135	44	89.5
1/10	60	66	63
1/100	30	38	34

Cuadro 10.- Resultados obtenidos mediante el reto de *P. multocida* al producto Argyrol, se observa una resistencia del microorganismo a dicho producto.

*P. multocida* (C. Clínico) Control positivo

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	∞	∞	
1/100	46	52	49

∞ Incontables

*P. multocida* (C. Clínico) Problema

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	∞	∞	
1/100	51	70	60.5

## Protargol

Cuadro 11.- Resultados obtenidos mediante el reto de *E. Coli* ATCC 11229 al producto Protargol, se observa una resistencia del microorganismo a dicho producto.

*E. Coli* ATCC11229 Control positivo

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	∞	∞	
1/100	132	119	125.5

∞ Incontables

*E. coli* ATCC 11229 Problema

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	∞	∞	
1/100	95	121	108

Cuadro 12.- Resultados obtenidos mediante el reto de *E. Coli* C. Clínico al producto Protargol, se observa una sensibilidad del microorganismo a dicho producto.

*E. Coli* (C. Clínico) Control positivo

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	∞	∞	
1/100	54	54	54

∞ Incontables

*E. Coli* (C. Clínico) Problema

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	176	149	162.5
1/100	21	17	19

Cuadro 13.- Resultados obtenidos mediante el reto de *S. aureus* al producto Protargol, se observa una resistencia del microorganismo a dicho producto.

*S. Aureus* cowan I Control positivo

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	∞	∞	
1/100	70	68	69

∞ Incontables

*S. Aureus* cowan I Problema

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	∞	∞	
1/100	47	32	39.5

Cuadro 14.- Resultados obtenidos mediante el reto de *V. cholerae* al producto Protargol, se observa una sensibilidad del microorganismo a dicho producto.

*V. cholerae* Control positivo

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	∞	∞	
1/100	100	100	100

∞ Incontables

*V. cholerae* Problema

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	228	∞	
1/10	116	101	108.5
1/100	18	16	17

Cuadro 15.- Resultados obtenidos mediante el reto de *P. multocida* al producto Protargol, se observa una resistencia del microorganismo a dicho producto.

*P. multocida* (C. Clínico) Control positivo

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	∞	∞	
1/100	43	47	45

∞ Incontables

*P. multocida* (C. Clínico) Problema

Dilución:	Placa		Promedio
	1	2	
Matraz	∞	∞	
1/10	∞	∞	
1/100	26	27	26.5

Cuadro 16. Resumen de los datos promedio obtenidos mediante el reto microbiano al producto Colargol. Se observa claramente una resistencia notable al producto excepto el caso de la *E. coli* caso clínico la cual muestra una gran sensibilidad al producto, seguido de *P. multocida*.

UFC'S PROMEDIO DE CADA MICROORGANISMO

PRODUCTO:

Conteo en Placa

Colargol

Control positivo

Microorganismo	Matraz	1/10	1/100
<i>E. coli</i> ATCC 11229	☒	☒	115
<i>E. coli</i> caso clínico	☒	223	29
<i>Staphylococcus aureus</i> cowan I	☒	☒	50
<i>Vibrio cholerae</i>	☒	☒	59
<i>Pasteurella multocida</i>	☒	☒	54

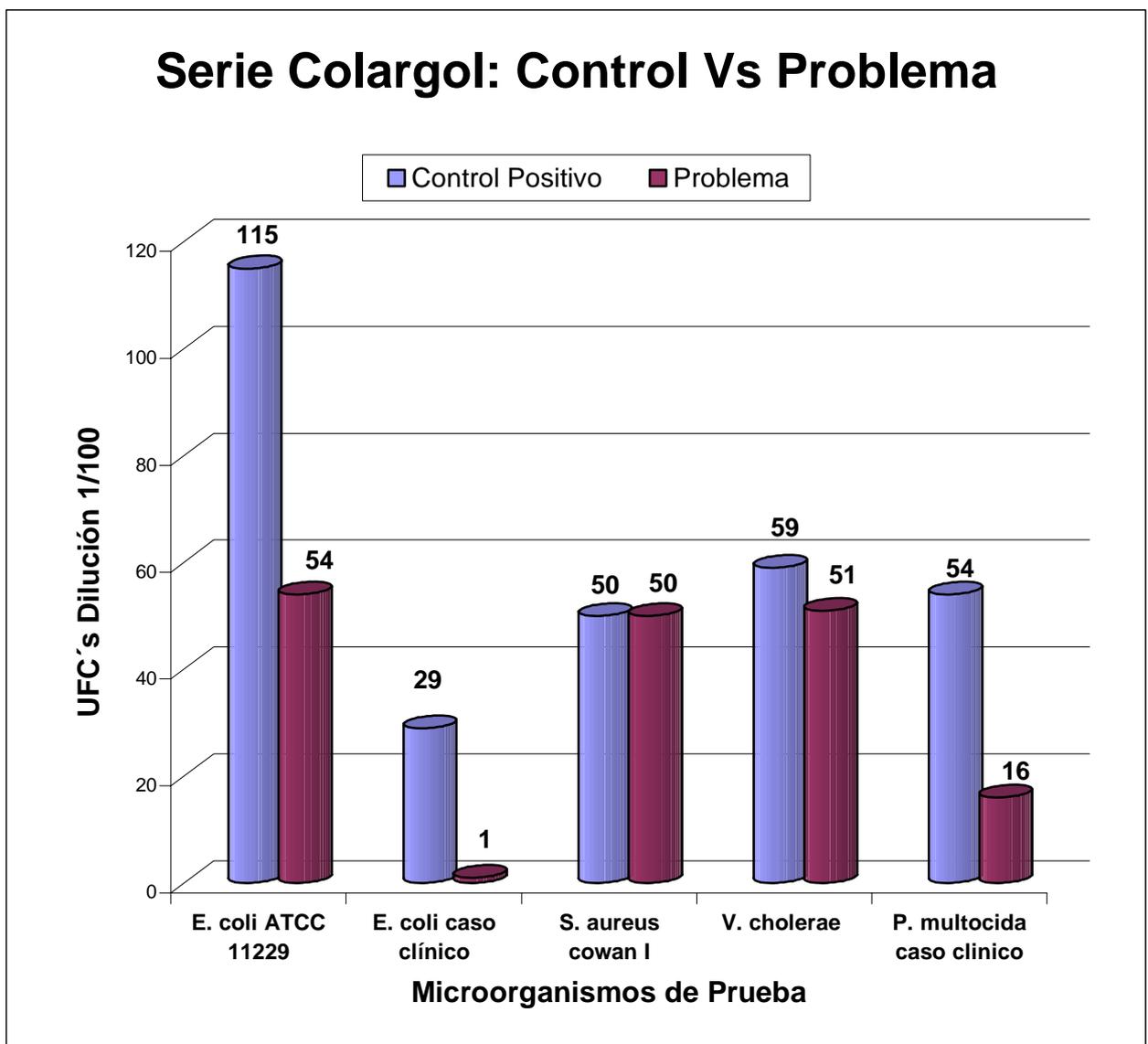
☒ Incontables

Problema

Microorganismo	Matraz	1/10	1/100
<i>E. coli</i> ATCC 11229	☒	☒	54
<i>E. coli</i> caso clínico	☒	19	1
<i>Staphylococcus aureus</i> cowan I	☒	☒	50
<i>Vibrio cholerae</i>	☒	☒	51
<i>Pasteurella multocida</i>	☒	190	16

☒ Incontables

Gráfica 1. Representación comparativa del resumen de los datos promedio obtenidos mediante el reto microbiano al producto Colargol. En esta gráfica se observa con mayor claridad la sensibilidad de la *E. coli* caso clínico al producto. Cada barra presenta el valor promedio obtenido de UFC's.



Cuadro 17. Resumen de los datos promedio obtenidos mediante el reto microbiano al producto Argyrol. Se observa claramente una resistencia notable al producto excepto el caso de la *E. coli* caso clínico la cual muestra una gran sensibilidad al producto, seguido de *V. cholerae* y *S. aureus* cowan I respectivamente.

#### UFC'S PROMEDIO DE CADA MICROORGANISMO

PRODUCTO:

Conteo en Placa

Argyrol

Control positivo

Microorganismo	Matraz	1/10	1/100
<i>E. coli</i> ATCC 11229	∞	∞	112
<i>E. coli</i> caso clínico	∞	∞	47
<i>Staphylococcus aureus</i> cowan I	∞	∞	65
<i>Vibrio cholerae</i>	∞	∞	45
<i>Pasteurella multocida</i>	∞	∞	49

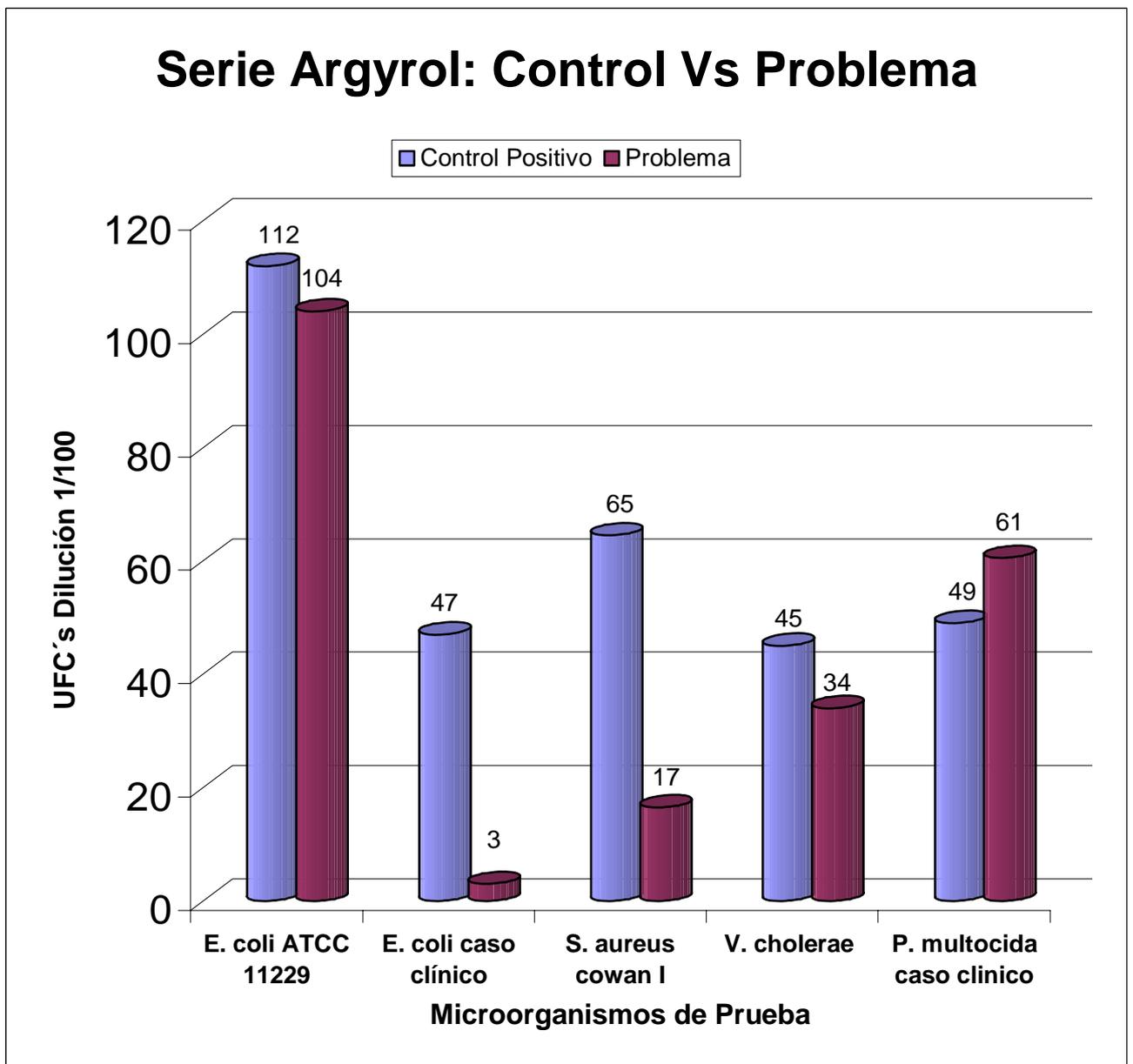
∞ Incontables

Problema

Microorganismo	Matraz	1/10	1/100
<i>E. coli</i> ATCC 11229	∞	∞	104
<i>E. coli</i> caso clínico	5	9	3
<i>Staphylococcus aureus</i> cowan I	∞	172	17
<i>Vibrio cholerae</i>	90	63	34
<i>Pasteurella multocida</i>	∞	∞	61

∞ Incontables

Gráfica 2. Representación comparativa del resumen de los datos promedio obtenidos mediante el reto microbiano al producto Argyrol. En esta gráfica se observa con mayor claridad la sensibilidad de la *E. coli* caso clínico al producto. Cada barra presenta el valor promedio obtenido de UFC's.



Cuadro 18. Resumen de los datos promedio obtenidos mediante el reto microbiano al producto Protargol. Se observa claramente una resistencia notable al producto excepto el caso de *Vibrio cholerae* el cual muestra una gran sensibilidad al producto seguido de *E. Coli* C. Clínico.

UFC'S PROMEDIO DE CADA MICROORGANISMO

PRODUCTO:

Conteo en Placa

Protargol

Control positivo

Microorganismo	Matraz	1/10	1/100
<i>E. coli</i> ATCC 11229	☒	☒	126
<i>E. coli</i> caso clínico	☒	☒	54
<i>Staphylococcus aureus</i> cowan I	☒	☒	69
<i>Vibrio cholerae</i>	☒	☒	100
<i>Pasteurella multocida</i>	☒	☒	45

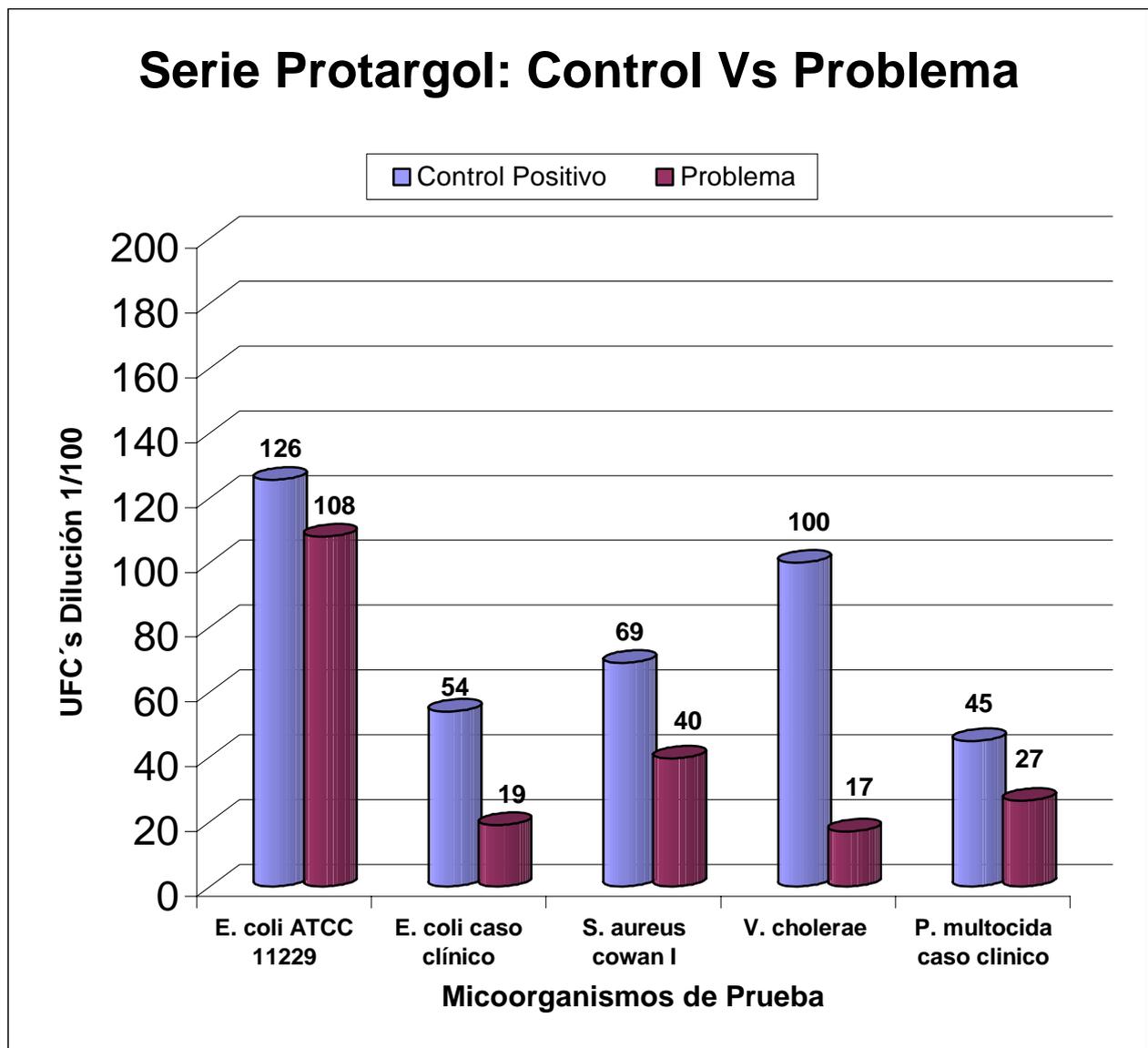
☒ Incontables

Problema

Microorganismo	Matraz	1/10	1/100
<i>E. coli</i> ATCC 11229	☒	☒	108
<i>E. coli</i> caso clínico	☒	163	19
<i>Staphylococcus aureus</i> cowan I	☒	☒	40
<i>Vibrio cholerae</i>	☒	109	17
<i>Pasteurella multocida</i>	☒	☒	27

☒ Incontables

Gráfica 3. Representación comparativa del resumen de los datos promedio obtenidos mediante el reto microbiano al producto Argylol. En esta gráfica se observa con mayor claridad la sensibilidad de *Vibrio cholerae* al producto. Cada barra presenta el valor promedio obtenido de UFC's.



Cuadro 19. Resultados comparativos obtenidos en UFC's por mililitro de agua de prueba, estos nos ayudarán a calcular el porcentaje de reducción bacteriana por efecto del agente germicida correspondiente.

UFC's/ml Promedio de cada microorganismo

PRODUCTO:

Conteo en Placa

Colargol

Microorganismo	Control Positivo ufc/ml	Problema ufc/ml
<i>E. coli</i> ATCC 11229	$11.5 \times 10^3$	$5.4 \times 10^3$
<i>E. coli</i> caso clínico	$2.9 \times 10^3$	$1.0 \times 10^2$
<i>Staphylococcus aureus</i> cowan I	$5.0 \times 10^3$	$5.0 \times 10^3$
<i>Vibrio cholerae</i>	$5.9 \times 10^3$	$5.1 \times 10^3$
<i>Pasteurella multocida</i>	$5.4 \times 10^3$	$1.6 \times 10^3$

UFC's/ml Promedio de cada microorganismo

Conteo en Placa

PRODUCTO: Argyrol

Microorganismo	Control Positivo ufc/ml	Problema ufc/ml
<i>E. coli</i> ATCC 11229	$11.2 \times 10^3$	$10.4 \times 10^3$
<i>E. coli</i> caso clínico	$4.7 \times 10^3$	$3.0 \times 10^2$
<i>Staphylococcus aureus</i> cowan I	$6.45 \times 10^3$	$1.65 \times 10^3$
<i>Vibrio cholerae</i>	$4.5 \times 10^3$	$3.4 \times 10^3$
<i>Pasteurella multocida</i>	$4.9 \times 10^3$	$6.05 \times 10^3$

UFC's/ml Promedio de cada microorganismo

PRODUCTO:

Conteo en Placa

Protargol

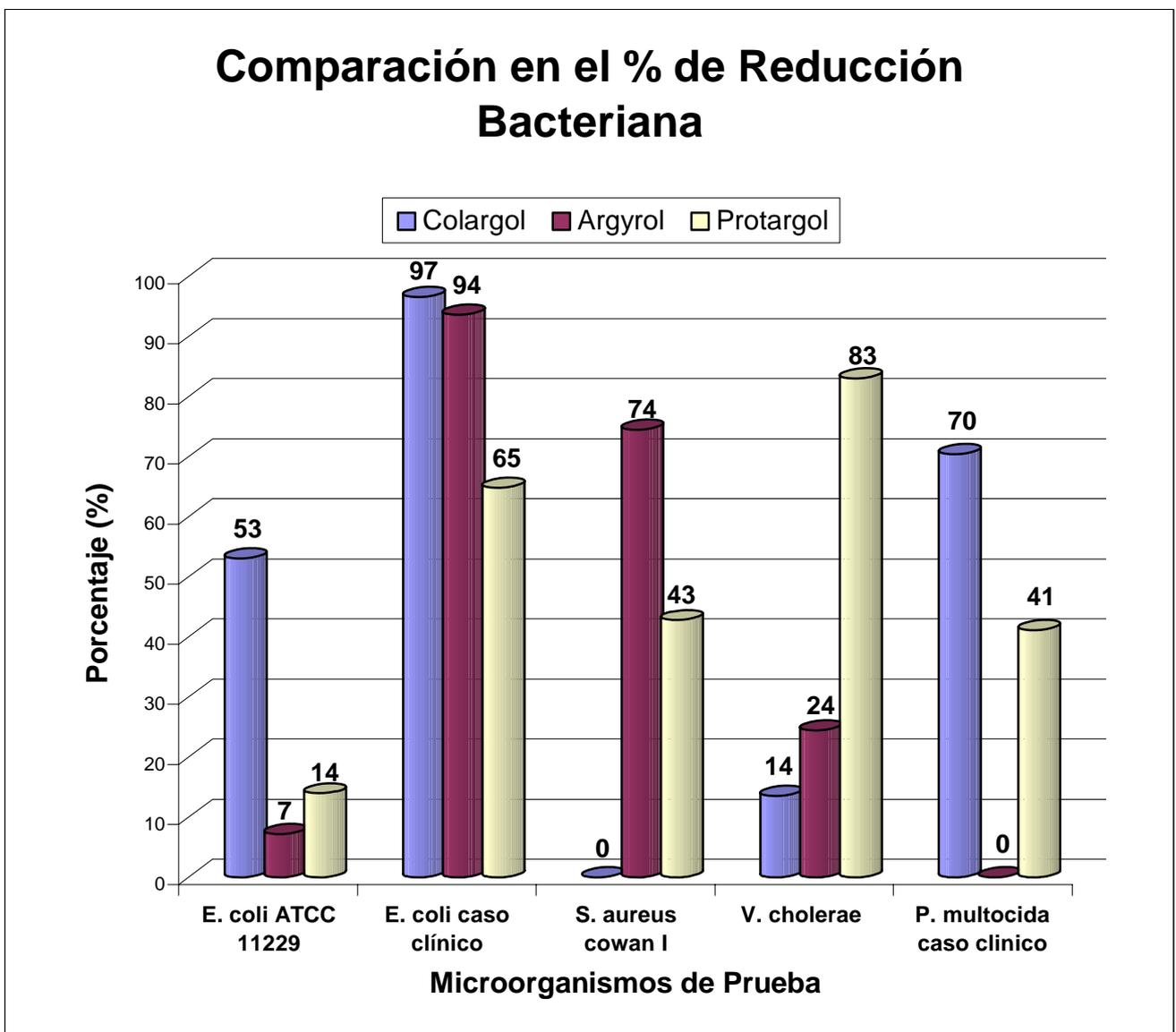
Microorganismo	Control Positivo ufc/ml	Problema ufc/ml
<i>E. coli</i> ATCC 11229	$12.55 \times 10^3$	$10.8 \times 10^3$
<i>E. coli</i> caso clínico	$5.4 \times 10^3$	$1.9 \times 10^3$
<i>Staphylococcus aureus</i> cowan I	$6.9 \times 10^3$	$3.95 \times 10^3$
<i>Vibrio cholerae</i>	$1.0 \times 10^4$	$1.7 \times 10^3$
<i>Pasteurella multocida</i>	$4.5 \times 10^3$	$2.65 \times 10^3$

Cuadro 20. Tabla que representa de manera comparativa el porcentaje de reducción de cada microorganismo referida al respectivo germicida empleado, observando una mayor eficiencia del poder germicida para la *E. coli* caso clínico. En el caso de la *E. coli* ATCC 11229 se observa una gran resistencia a los tres productos germicidas.

$$\% \text{ de Reducción} = 100 - \left[ \left( \frac{\text{Promedio de UFC's/ml Problema}}{\text{Promedio de UFC's/ml Control}} \right) \times 100 \right]$$

<b>% de Reducción Bacteriana</b>			
	<b>Colargol</b>	<b>Argyrol</b>	<b>Protargol</b>
<i>E. coli</i> ATCC 11229	53	7	14
<i>E. coli</i> caso clínico	97	94	65
<i>S. aureus</i> cowan I	0	74	43
<i>V. cholerae</i>	14	24	98
<i>P. multocida</i> caso clínico	70	0	41

Gráfica 4. Gráfica comparativa, en la cual se observa la marcada sensibilidad de la *E. coli* caso clínico, a diferencia de los demás microorganismos evaluados. Esto nos deja como resultado que los productos evaluados presentan deficiencias en su poder germicida ya que al microorganismo referido por la NORMA OFICIAL MEXICANA PROY-NOM-181-SSA1-1998, salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Requisitos sanitarios que deben cumplir las sustancias germicidas para el tratamiento de agua de tipo domestico. Como es la *E. coli* ATCC 11229 presenta una gran resistencia a los productos.



## 5. DISCUSION

Los resultados antes mostrados nos indican que:

- El efecto germicida más importante que presentan los compuestos a base de plata coloidal es sobre determinados microorganismos y no con todos. Dependiendo del producto es el efecto sobre cierto microorganismo, a lo cual podemos observarlo en las gráficas mostradas anteriormente.
- La cepa de referencia (*E. coli* ATCC 11229) presenta una gran resistencia al germicida, por lo cual no cumple en ninguno de los casos con lo establecido en la NORMA OFICIAL MEXICANA PROY-NOM-181-SSA1-1998, salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Requisitos sanitarios que deben cumplir las sustancias germicidas para el tratamiento de agua de tipo domestico.
- La cepa que presento mayor susceptibilidad a los diferentes productos germicidas fue la *E. coli* caso clínico, con sus limitaciones.

La NORMA OFICIAL MEXICANA PROY-NOM-181-SSA1-1998, salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Requisitos sanitarios que deben cumplir las sustancias germicidas para el tratamiento de agua de tipo domestico, nos menciona que una prueba de potabilidad es aceptable, si el porcentaje en reducción bacteriana es igual o mayor a 95% para organismos mesófilos aerobios e igual o mayor a 99,99% para organismos coliformes totales.

Los resultados obtenidos pueden deberse a diversas situaciones como lo es el uso de albúmina como estabilizador del coloide de plata. Dicha albúmina se encuentra presente en cada uno de los productos estudiados en una proporción diferente en cada uno; la albúmina además de ser un estabilizador para el coloide se emplea como un vehículo transportador de la plata al interior del microorganismo, pero su principal desventaja es que la proteína también provoca un efecto de enmascaramiento del metal al unirse tres

moles de iones plata a una mol de albúmina, como lo reveló Williams and Williams mostrándolo en una microautoradiografía.<sup>17</sup>

También la presencia de iones cloro minimiza el efecto germicida de la plata coloidal debido a que este se enlaza a la plata y forma un complejo insoluble por lo que la plata pierde su poder germicida.<sup>18</sup> La plata presenta un poder germicida el cual es directamente proporcional a la concentración de iones plata presentes en solución, actuando típicamente contra múltiples microorganismos blanco.<sup>18</sup>

Los mecanismos por los cuales la plata coloidal ejerce su acción germicida son tres<sup>20, 25</sup>, Oxidación Catalítica, Reacción con la Membrana Celular Bacteriana y unión con el ADN, los cuales se mencionan a continuación:

- La Oxidación Catalítica se da debido a que la plata, en su estado atómico, tiene la capacidad de absorber oxígeno actuando como catalizador y esto trae como consecuencia la oxidación. El oxígeno absorbido sobre la superficie de los iones de plata en solución reacciona rápidamente con los grupos sulfhidrilo (-S-H) alrededor de la superficie bacteriana, removiendo los átomos de hidrógeno (como agua), provocando que los átomos de azufre formen en laces disulfuro (R-S-S-R); bloqueando la respiración y causando la muerte bacteriana. Empleando una simple reacción de óxido-reducción catalítica, la plata coloidal reacciona con cualquier carga negativa presentada por las proteínas de membrana y/o transporte de los microorganismos inactivándolas.<sup>19, 20, 24, 25</sup>

- La reacción con membranas celulares bacterianas se presenta por la evidencia de que los iones de plata se unen a los radicales de la superficie membranal de la bacteria, impidiendo la respiración celular y bloqueando el sistema de transferencia de energía. Una explicación de este punto está basado en la naturaleza de la formación de las enzimas:

- Enzimas específicas son requeridas para dar una actividad bioquímica en determinado lugar. Las enzimas usualmente requieren de determinados cofactores, en la mayoría de los casos metales, como parte de la matriz molecular en el orden de función. Un metal de mayor valencia

(estado de oxidación) puede reemplazar a un metal de menor valencia en el complejo enzimático, impidiendo a la enzima su funcionamiento normal. La plata con una valencia de 1+, puede reemplazar muchos metales con igual valencia que presenten una débil propiedad atómica de enlace.<sup>19,20,25</sup> En adición a los efectos sobre las enzimas, los iones de plata producen cambios en los microorganismos, causando inhibición de crecimiento y su precipitación en vacuolas y pared celular como gránulos, así como también inhibe la división celular y daña la envoltura celular y su contenido citoplasmático.<sup>20</sup>

- Finalmente, los iones plata interactúan con los ácidos nucleicos; esta interacción se da principalmente con las bases en el ADN mas que con los grupos fosfato, aunque el significado de esto en términos de esta acción letal no a sido bien esclarecido.<sup>20, 24, 25</sup>

Ahora bien, como todos sabemos, los microorganismos, al igual que nosotros, desarrollan sistemas de defensa con los cuales puedan asegurar su sobrevivencia, de esta forma dichos microorganismos generan mecanismos de resistencia tanto a antibióticos como a los diferentes productos germicidas. La plata no esta exenta de este proceso de resistencia el cual mencionamos a continuación:

El primer mecanismo de defensa contra los iones plata se presenta a nivel de la membrana, mediante una pequeña proteína (SilE), la cual enlaza los iones plata debido a que esta contiene diez residuos de histidina los cuales enlazan a cinco cationes de plata. Al unirse a los iones plata esta proteína trae consigo un gran cambio en su plegamiento, de un desorden esencial a una estructura de alfa hélice predominantemente.<sup>21</sup>

Otro mecanismo de defensa es el que se presenta controlado transcripcionalmente mediante el producto de dos genes, el gen SilS que codifica para un censor auto-cinasa a nivel de membrana el cual contiene histidina y el segundo gen SilR que codifica para una proteína citoplasmática unida a un activador de ADN conteniendo un residuo de aspartato el cual es transfosforilado mediante SilS. SilRS es homólogo en secuencia a

miembros de una larga familia de reguladores transcripcionales de dos componentes sensor / activador que responden a señales extracelulares.<sup>21</sup>

Por último, otro mecanismo de defensa es el que se presenta mediante los productos de codificación de otros genes como el gen *SilP* el cual es una ATPasa a nivel de membrana la cual bombea los iones plata fuera de la célula de una manera muy similar que otras ATPasas lo hacen con el cobre y el cadmio.<sup>22</sup> El gen *SilCBA* (probablemente junto con el producto del ORF96) forman un segundo canal de bombeo de la plata dirigido por el potencial de membrana y no por ATP. Este bombeo consiste de tres proteínas, una en la membrana interna (*SiLA*), otra en la membrana externa (*SiLC*), y la tercera como puente en el espacio periplásmico (*SiLB*). Estas tres proteínas membranales dirigen el potencial de intercambio protón / catión.<sup>21</sup>

El uso excesivo de productos a base de plata coloidal, además de su mal uso nos puede llevar a que estos microorganismos desarrollen los sistemas de defensa antes mencionados, para lo cual al momento de ser requeridos por su efecto germicida no cumplan con su función, con lo que no podremos garantizar la buena higiene y por lo tanto la potabilidad del agua a consumir. Los microorganismos empleados en este experimento son de gran interés ya que son los responsables de causar una gran número de trastornos gastrointestinales. El ingerir agua contaminada es un mecanismo de auto inoculación de gran importancia, por lo cual debemos asegurar la calidad de los productos que consumimos y no confiar solamente en el uso de germicidas para su desinfección.

Por otra parte, con los resultados obtenidos referentes a la *P. multocida* podemos mencionar que al provocar una reducción de la carga bacteriana de un 70% en el caso del Colargol, se puede emplear como un desinfectante de superficies para evitar la contaminación y/o diseminación de microorganismos de interés veterinario como es el caso de esta bacteria, la cual produce trastornos a nivel del tracto respiratorio de los cerdos, provocando pérdidas importantes a las granjas criadoras de cerdos. Con esto no se asegura que las superficies queden bien desinfectadas, ya que esto debe ser parte de un programa en el cual se presente un rol de desinfectantes; en dicho rol puede estar incluida la plata coloidal para que estos microorganismos no desarrollen resistencia a estos productos.

Con los resultados obtenidos podemos observar el no cumplimiento a la norma, con lo que se descarta su uso como agente desinfectante para agua, pero de la misma forma hay que tomar en cuenta que el empleo de otras cepas diferentes a la marcada en la norma (*E. coli* ATCC 11229 y que también provoquen trastornos de tipo gastrointestinal), pueden presentar mayor sensibilidad a la plata, pensando en que no tienen aún los mecanismos de defensa con los cuales sean capaces de sobrevivir.

Debemos considerar también que los microorganismos empleados en el presente experimento no son comunes en el agua, como es el caso de *V. cholerae*, *S aureus* cowan I y *P. multocida* pero que si nos provocan trastornos gastrointestinales en los humanos en el caso de *V. cholerae* y, *S aureus* cowan I, así como trastornos a nivel del tracto respiratorio en los cerdos en el caso de *P. multocida*, es por eso que a pesar de no encontrarse en el agua de manera común podemos encontrarlos en diversos tipos de alimentos o superficies, para lo cual podemos desinfectarlos sumergiéndolos previamente en una solución de agua con desinfectante comercial, en este caso los productos a base de plata coloidal, y en el caso de los cerdos podemos desinfectar áreas empleando soluciones a base de estos productos y aplicando sobre las superficies para que así no se conviertan los lugares de crianza de cerdos en un foco de infección ya que esto devendría en importantes pérdidas de tipo económico y a su vez, dependiendo del grado de diseminación de la infección, en una reducción de la oferta de dicho insumo por parte de los productores nacionales.

Por otra parte tenemos otras alternativas además del uso de productos a base de plata coloidal, como son:

- Productos a base de cítricos
- Productos a base de cloro
- Productos a base de Yodo

Algunos de estos productos son ampliamente utilizados de manera tradicional como el cloro, ya que además de desinfectar el agua se emplea como desinfectante de áreas en

las labores domésticas, así como desinfectante y/o inactivante de sustancias o fluidos corporales en laboratorios clínicos. También, en el caso del yodo, se emplea como agente aséptico en procesos quirúrgicos y curaciones. Con esto podemos observar el amplio espectro de acción que presentan estos compuestos y de esta manera ofrecemos alternativas para poder alternar el empleo de agentes desinfectantes.

Estos productos trabajan en formas diferentes para ejercer un efecto bactericida y lograr desinfectar tanto el agua como las frutas y vegetales, pero de la misma forma como en el caso de la plata coloidal el mal uso de estos productos puede tener repercusiones a la larga, debido a que presentan mecanismos de acción susceptibles a generar resistencia por parte de los microorganismos.

Para esto debemos considerar programas de desinfección en los cuales no se emplee un solo producto, debido a que es una de las principales causas con las que generan resistencia. El realizar un programa en el cual se utilicen diferentes productos germicidas y de diferentes propiedades puede ayudar a controlar de una mejor manera la funcionalidad de estos productos. De esta forma debemos primero observar el grado de funcionalidad de los mismos y con esto establecer un rol en el cual se incluyan por lo menos tres productos diferentes.

El uso combinado de diferentes agentes desinfectantes no es recomendado ya que en ocasiones puede resultar contraproducente como en el caso de productos a base de plata coloidal y cloro, ya que como se mencionó con anterioridad el cloro reacciona con la plata formando un compuesto conocido como cloruro de plata, el cual resulta ser muy insoluble en agua y con esto no presentaría ningún efecto germicida.

Otra forma de potabilizar el agua es empleando uno de los métodos tradicionales como es el hervir el agua, con esto podemos tener una alternativa más de desinfección del agua sin emplear ningún tipo de agente químico, lo cual es lo más adecuado ya que al adicionar plata al agua de consumo estamos a final de cuentas ingiriendo un metal, el cual toma tiempo poder desecharlo del organismo, lo importante en este caso es que la cantidad adicionada en el agua es muy pequeña, siempre y cuando se respeten las cantidades indicadas en el marbete, con esto aseguramos no correr ningún tipo de riesgo. En realidad la plata no produce grandes estragos a la salud, manifestándolo en

una enfermedad de la piel conocida como Argyria, la cual es solo de tipo estético, comparándose como un tatuaje, esto debido al acumulo del metal en el tejido adiposo y subsecuentemente externándolo hacia la piel, observándose manchas grisáceas. La cantidad de plata requerida para producirnos una intoxicación es muy elevada con lo cual este producto presenta un margen de seguridad considerable. Así que se recomienda seguir las indicaciones de los marbetes y de la misma forma cualquier producto que en su composición presente al elemento plata, como lo son algunos tipos de medicamentos por ejemplo la sulfadiazida de plata, ya que el uso prolongado en bajas cantidades puede provocar de la misma forma el acumulo del metal y presentarse lo antes mencionado.

Actualmente se están produciendo pequeños aparatos productores de ozono; este es otro de los métodos empleados para la desinfección del agua. Algunas grandes compañías purificadoras de agua emplean este método debido a la rapidez y seguridad que representa.

Otro método es el uso de pequeñas lámparas de luz ultravioleta (UV) las cuales se conectan a la salida de la toma de agua y durante el paso de esta misma a través de la lámpara se ejerce el efecto germicida provocando mutaciones a los microorganismos presentes y su irremediable muerte; el inconveniente de este método no es la adquisición de la lámpara sino el verificar periódicamente que la lámpara presente una longitud de onda determinada y de esta forma asegure su buen funcionamiento como agente desinfectante.

## 6. CONCLUSIONES

- Los productos a base de plata coloidal evaluados durante este proyecto no cumplen con las especificaciones indicadas en la NORMA OFICIAL MEXICANA PROY-NOM-181-SSA1-1998, salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Requisitos sanitarios que deben cumplir las sustancias germicidas para el tratamiento de agua de tipo domestico. Por lo cual no pueden ser empleados como agentes germicidas.

- Los microorganismos empleados en los retos microbianos para la evaluación del efecto germicida de los productos a base de plata coloidal resultaron ser resistentes, salvo algunas excepciones y con algunos productos como el caso de la *E. coli* caso clínico la cual es de procedencia veterinaria al ser aislada de un lechón.

- La bacteria mas sensible a los productos a base de plata coloidal fue la *E. coli* caso clínico, a su vez le bacteria *P. multocida* caso clínico, también aislada de un lechón presento cierta sensibilidad a los productos empleados. Con esto podemos concluir que los productos a base de plata coloidal pueden fungir como agentes desinfectantes a nivel veterinario.

- Los productos a base de plata coloidal siguen siendo efectivos para aquellos microorganismos que aún no han logrado activar sus sistemas de defensa a este elemento.

- El consumo excesivo y el mal uso de estos productos ha llevado a que un muy buen agente bactericida como lo es la plata decremente su espectro de aplicación debido a la resistencia desarrollada por los microorganismos.

- Es importante el no solo basarnos a los productos a base de plata coloidal, ya que además de nos ser totalmente seguro; como pudimos observar, el consumo excesivo pude provocarnos un trastorno epidérmico llamado

Argyria, la cual es el acumulo de plata en la epidermis manifestándose como manchas grises en la piel. Esta enfermedad no disminuye ninguna función de nuestro cuerpo, sino es más que nada de tipo estético y podemos compararlo como si fuese un tatuaje.

- En el mercado existen otro tipo de alternativas para desinfectar el agua como son productos germicidas a base de compuestos cítricos, a los cuales también se debe realizar evaluaciones periódicas para determinar su eficacia, también tenemos aparatos de tipo doméstico para desinfectar con Ozono, los cuales son bastante efectivos.

## 7. REFERENCIAS.

1. Gerard J. Tortora, Nicholas P. Anagnostakos. 1984. “Principios de Anatomía y Fisiología”. Editorial Harla, 3ª edición, pp. 726-780.
2. [www.monografias.com](http://www.monografias.com). “Historia del Agua”.
3. [www.monografias.com](http://www.monografias.com). “Análisis del Agua”
4. [www.monografias.com](http://www.monografias.com). “El Agua”
5. Diccionario Enciclopédico Ilustrado Ed. NORMA, 1991, México, Pág. 33.
6. Diccionario Enciclopédico Ilustrado Ed. NORMA, 1991, México, Pág.1201.
7. ALBERT Balows, “Manual of Clinical Microbiology”. 5<sup>th</sup> Edition, 1991, Ed. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, USA, Page. 360.
8. [www.educate-yourself.com](http://www.educate-yourself.com). “Suppressed Miracle Drug Re-Discovered”
9. [www.helpinghandconsulting.com](http://www.helpinghandconsulting.com). “Plata Coloidal, el Antibiótico Universal Natural”.
10. BECHER Paul. “Dictionary of Colloidal and Surface Science”, 1990, Ed. Marcel Decker Inc. USA.
11. Jörg Michael Schienholz, Dietmar-Pierre König, 1999 “Letters to the Editor: Silver-Containing Polymers”. Antimicrobial. Agents Chemotherapy. **43**:11(2819-2821).
12. DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN. SECRETARIA DE SALUD. NORMA OFICIAL MEXICANA PROY-NOM-181-SSA1-1998, Salud Ambiental, Agua Para Uso Y Consumo Humano. Requisitos Sanitarios Que Deben Cumplir Las Sustancias Germicidas Para El Tratamiento De Agua De Tipo Domestico.

13. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método Para La Cuenta De Bacterias Aerobias En Placa.
14. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-112-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Determinación De Bacterias Coniformes. Técnica Del Número Más Probable.
15. ALBERT Balows, “Manual of Clinical Microbiology”. 5<sup>th</sup> Edition, 1991, Ed. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, USA, Page. 1299.
16. ALBERT Balows, “Manual of Clinical Microbiology”. 5<sup>th</sup> Edition, 1991, Ed. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, USA, Page. 1296.
17. Williams, R. L., and D. F. Williams. 1988. “albumin adsorption on metal surfaces”. Biomaterials 98:206.
18. Letters to the Editor. 1999. “Silver-Containing Polymers”. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Nov. p.2819-2821 43:11.
19. <http://educate-yourself.org/csfaq.html> “Silver Water (Colloidal Silver) Frequently Asked Questions”.
20. Gerald McDonnell, and Denver Russell. 1999. “Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance”. Clinical Microbiology Reviews. Jan. p. 147-179 12:1.
21. Simon Silver, Jeng-Fan Lo, Amit Gupta. “Silver Cations as an Antimicrobial Agent: Clinical Uses and Bacterial Resistance”. Department of Microbiology and Immunology, University of Illinois, Chicago, Illinois.
22. Simon Silver. 1996. “Bacterial Heavy Metal Resistance: New Surprises”. Annual Reviews of Microbiology. 50:753-789
23. D.-C. Tien, et al. J. Alloys Compd. (2008), doi:10.1016/j.jallcom.2008.05.063

24. A. Petica, S. Gavrilu, M. Lungu, N Buruntea, C. Panzaru. “Colloidal Silver solutions with antimicrobial properties”. Materials Science and Engineering B. 152 (2008) 22-27.
25. Sumin Kim , Hyun-Joong Kim. “Anti-bacterial performance of colloidal silver-treated laminate Wood flooring”. International Biodeterioration & Biodegradation 57 (2006) 155-162.

## 8.- ANEXOS

### ANEXO 1.

#### CALCULOS DE PLATA COLOIDAL PARA 250 ml

##### COLLARGOL (70-75% de plata)

100g Producto ---- 73.8g plata	0.555g ----- 100 ml
X ---- 0.41g plata	X ----- 250 ml

X = 0.555g Producto

“X = 1.388g Producto”

##### ARGYROL (19-23% de plata)

100g Producto ---- 22.95g plata	1.786g ----- 100 ml
X ---- 0.41g plata	X ----- 250 ml

X = 1.786g Producto

“X = 4.460g Producto”

##### PROTARGOL (7.5-8.5% de plata)

100g Producto ---- 8.17g plata	5.018g ----- 100 ml
X ---- 0.41g plata	X ----- 250 ml

X = 5.018g Producto

“X = 12.54g Producto”

## ANEXO 2.

### Agar Nutritivo A (composición)

- Extracto de carne 3.0 g
- Peptona 5.0 g
- Agar libre de sales 15.0 g
- Agua destilada 1000.0 ml

Poner a ebullición durante tres minutos el extracto de carne y la peptona; agregar el agar y calentar, agitando continuamente hasta disolver.

### Agar Nutritivo B. (Composición)

- Extracto de carne 3.0 g
- Peptona 5.0 g
- Agar libre de sales 30.0 g
- Agua destilada 1000.0 ml

Poner a ebullición durante tres minutos el extracto de carne y la peptona; agregar el agar y calentar, agitando continuamente hasta disolver.

### ANEXO 3.

#### BUFFER DE FOSFATOS.

Preparación de soluciones Stock.

Solución stock A 0.2 M.: solución de fosfato monobásico de sodio (27.8 g en 1000 ml de agua destilada)

Solución stock B 0.2 M.: solución de fosfato bibásico de sodio (53.65 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  o 71.7 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  en 1000 ml de agua destilada)

Para preparar el pH correcto, mezclar  $x$  ml de la solución stock A (monobásico) con  $x$  ml de la solución stock B (bibásico) de acuerdo a la siguiente tabla:

Stock A	Stock B	pH		Stock A	Stock B	pH
93.5	6.5	5.7		45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8		39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9		33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0		28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1		23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2		19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3		16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4		13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5		10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6		8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7		7.0	93.0	7.9
51.0	40.0	6.8		5.3	94.7	8.0

#### ANEXO 4.

Protocolo de preparación de los tubos de prueba para el Nefelómetro de McFarland.

Tubo No.	Contenido (ml)		Correspondiente a la suspensión Bacteriana / ml (10 <sup>8</sup> )
	Cloruro de Bario (1 %)	Ácido Sulfúrico (1 %)	
0.5	0.05	9.95	1.5
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1.0	9.0	30

## ANEXO 5

### Equipos Y Materiales

- Autoclave capaz de alcanzar la temperatura de esterilización de  $121 \pm 2^\circ$  C
- Espectrofotómetro con escala de transmitancia.
- Nefelómetro de McFarland.
- Horno para esterilizar a  $160-180^\circ$  C.
- Incubadora a  $35 \pm 2^\circ$  C.
- Baño de agua a  $44 \pm 2^\circ$  C.
- Potenciómetro.
- Pipetas sexológicas estériles de 1, 2, 5, 10 ml de capacidad con graduación de 1/10.
- Tubos de cultivo de 22 x 175 mm, 20 x 200 mm, 16 x 160 mm, 10 x 100 mm, con tapa metálica o de rosca.
- Botellas de Roux.
- Asa de platino.
- Contador manual.
- Contador de colonias.
- Cajas Petri estériles de 100 x 15 mm.
- Mecheros Fisher o Bunsen.

### Soluciones Y Reactivos.

- Productos a base de plata coloidal (protargol, colargol y argyrol)
- Solución salina estéril al 0.85% (8.5 g de cloruro de sodio en 1000 ml de agua).
- Solución reguladora de fosfatos pH  $7.2 \pm 0.2$
- Fosfato monobásico de sodio.
- Fosfato bibásico de sodio.
- Ácido clorhídrico 1.0 N.
- Hidróxido de sodio 1.0 N.

- Alcohol etílico.
- Ácido sulfúrico.
- Cloruro de bario.
- Cristal violeta.
- Lugol.
- Alcohol-Acetona.
- Safranina.
- Sangre desfibrinada de carnero.

### **Medios De Cultivo.**

- Agar nutritivo A.
- Agar nutritivo B.
- Agar Mac Conkey.
- Agar TCBS.
- Agar BHI.
- Agar Base Sangre.
- Agar Sales y Manitol.
- Agar SIM.
- Agar Citrato de Simmons.
- Agar Kigler
- Ureasa de Christensen.
- Caldo lactosado.
- Sacarosa.
- Manitol.
- Ornitina.
- OF
- Indol.
- Esculina
- Catalasa.
- Oxidasa.

## ANEXO 6

**PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-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.**

---

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud.- Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario

PROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA PROY-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 DOMESTICO.

GUSTAVO OLAIZ FERNANDEZ, Director General de Salud Ambiental, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 3o., fracciones XIII, XIV, 116, 117, 118, fracciones II y VII, 119 fracción II y 215, fracción II de la Ley General de Salud; 40, fracciones I y V, 45, 46, fracción II, y 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28, 30, 33, primer párrafo, 60, fracción II y 61 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; y 22, fracciones IV y VI, del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, me permito ordenar la publicación en el **Diario Oficial de la Federación** del Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-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.

El presente proyecto de norma oficial mexicana se publica a efecto de que los interesados, dentro de los siguientes 60 días naturales contados a partir de la fecha de su publicación, presenten sus comentarios ante el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, sito en Lieja No. 7, 1er. piso, colonia Juárez, Código Postal 06696, México, D.F. teléfono y fax 5.53.73.74.

Durante el plazo mencionado, los análisis que sirvieron de base para la elaboración del proyecto de norma estarán a disposición del público para su consulta en el domicilio del Comité.

México, D.F., a 16 de noviembre de 1999.- El Director General de Salud Ambiental, **Gustavo Olaiz Fernández**.- Rúbrica.

### PREFACIO

En la elaboración de esta Norma Oficial Mexicana participaron las unidades administrativas e instituciones siguientes:

SECRETARIA DE SALUD.

Dirección General de Salud Ambiental.

Laboratorio Nacional de Salud Pública.

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL.

Centro de Investigación y Estudios Avanzados.

PROCURADURIA FEDERAL DEL CONSUMIDOR.

Dirección de Investigaciones Físico Tecnológicas.

DISTRIBUIDORA "LA FUENTE".

G.V. PRODUCTOS.

ORVIC DE MEXICO, S.A. DE C.V.

ROLAND DE MEXICO, S.A. DE C.V.

COMERCIALIZADORA JUMBO, S.A. de C.V.

AMERICAN QUALITY LAB.

## INDICE

- 0. Introducción
- 1. Objetivo
- 2. Campo de aplicación
- 3. Referencias
- 4. Definiciones
- 5. Símbolos y abreviaturas
- 6. Especificaciones
- 7. Concordancia con normas internacionales y mexicanas
- 8. Bibliografía
- 9. Observancia de la norma
- APENDICE NORMATIVO A
- APENDICE INFORMATIVO A
- APENDICE INFORMATIVO B

### 0. Introducción

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. 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, consisten en la aplicación de equipos potabilizadores y sustancias germicidas, orientados fundamentalmente al aspecto bacteriológico, considerado como de riesgo inmediato a la salud y en casos específicos a la depuración de características físicas y/o químicas.

#### 1. Objetivo y campo de aplicación

1.1. Esta Norma Oficial Mexicana establece las características que deben cumplir las sustancias germicidas para tratamiento de agua, de tipo doméstico.

1.2. Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas o morales que se dediquen al proceso e importación de las sustancias germicidas tipo doméstico para el tratamiento de agua.

#### 3. Referencias

Para la correcta aplicación de esta Norma, es necesario consultar las siguientes normas oficiales mexicanas:

- |                       |   |
|-----------------------|---|
| 3.1 NOM-014-SSA1-1993 | Procedimientos sanitarios para el muestreo de agua para uso y consumo humano distribuida por sistemas de abastecimiento públicos y privados.        |
| 3.2 NOM-041-SSA1-1993 | Agua purificada envasada. Especificaciones sanitarias.  |
| 3.3 NOM-092-SSA1-1994 | Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.   |
| 3.4 NOM-110-SSA1-1993 | Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis bacteriológico.  |
| 3.5 NOM-112-SSA1-1994 | Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.   |
| 3.6 NOM-127-SSA1-1994 | Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.                  |
| 3.7 NOM-127-SSA1-1994 | Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. |
| 3.8 NOM-008-SCFI-1993 | Sistema general de unidades de medida.  |

#### **4. Definiciones**

Para efectos de esta Norma Oficial Mexicana se entiende por:

**4.1** Bactericida, a la sustancia o medio que mata o destruye bacterias.

**4.2** Bacteriostático, a la sustancia o medio que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias, sin matarlas o destruirlas.

**4.3** Germicida, al agente químico que destruye microorganismos especialmente patógenos, lo que no necesariamente incluye la capacidad de destrucción de esporas.

**4.4** Método de prueba, al procedimiento analítico utilizado en el laboratorio para comprobar que un producto satisface las especificaciones que establece la norma.

#### **5. Símbolos y abreviaturas**

El significado de los símbolos y abreviaturas utilizados en esta Norma es el siguiente:

<b>5.1</b> °C	grado Celsius
<b>5.2</b> g	gramo
<b>5.3</b> l	litro
<b>5.4</b> ml	mililitro
<b>5.5</b> mm	milímetro
<b>5.6</b> nm	nanómetro
<b>5.7</b> NMP	número más probable
<b>5.8</b> pH	potencial de hidrógeno
<b>5.9</b> UFC	unidades formadoras de colonias
<b>5.10</b> %	por ciento

#### **6. Especificaciones**

**6.1** Las personas físicas o 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 normativo A de esta norma.

**6.2** La Secretaría de Salud determinará de acuerdo con el dictamen correspondiente, o a solicitud fundamentada técnicamente de dependencias, organismos oficiales y empresas privadas, o por queja, cuando el agua tratada por medio de una sustancia germicida para el tratamiento de agua, de tipo doméstico, complementariamente a la prueba de eficiencia antimicrobiana, deba ser sometida a análisis de sustancias tóxicas provenientes de los ingredientes que componen dicha sustancia.

**6.3** Las sustancias germicidas para el tratamiento de agua, de tipo doméstico, deben ostentar en la etiqueta o contraetiqueta, la siguiente leyenda: Utilizar con agua de abastecimiento público.

**6.4** La etiqueta o contraetiqueta del producto, debe contener cuando menos la siguiente información en español:

**6.4.1** Finalidad de uso.

**6.4.2** Instrucciones de uso.

**6.5** Las personas físicas o morales referidas en el punto 6.1 de este apartado, deben tener a disposición de la autoridad sanitaria cuando ésta la requiera, la siguiente información:

**6.5.1** Ingredientes activos del producto.

**6.5.2** País de origen de los ingredientes activos del producto, o en su caso, indicar si es en su totalidad de importación; para este último caso, se debe señalar la fracción arancelaria comprendida en la tarifa de la Ley del Impuesto General de Importación.

**6.5.3** Etiqueta del producto en español.

#### **7. Concordancia con normas internacionales y mexicanas**

Esta Norma Oficial Mexicana no es equivalente a ninguna norma internacional pero sí es equivalente en parte con la NMX-CC-1-1993, Sistemas de calidad-Vocabulario.

## 8. Bibliografía

- 8.1** Bacteriological Analytical Manual C. 5th. Edition. Food and Drug Administration. Division of Microbiology. 1978.
- 8.2** Manual de Técnicas y Procedimientos de Laboratorio para Análisis Microbiológicos de Agua Potable. Secretaría de Salud. Subsecretaría de Servicios de Salud D.G.E. Laboratorio Nacional de Salud. Pública. Reimpresión. México, D.F. 1989.
- 8.3** Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Thirteen Ed., 1980. Washington D.C.
- 8.4** Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 1995. Washington D.C.
- 8.5** Procedimiento Normalizado de Operación PNO-RMPM-001 para la Evaluación de Germicidas. Laboratorio Nacional de Salud Pública. Departamento de Evaluación de Riesgos Microbianos y Parasitarios. S.S.A. México, D.F. 1995.
- 8.6** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association. 14th Ed. Washington D.C. 1975 pp. 875-880
- 8.7** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association. 17th Ed. Washington D.C. 1992.
- 8.8** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association. 18th Ed. Washington D.C. 1995.

## 9. Observancia de la norma

La vigilancia en el cumplimiento de la presente norma corresponde a la Secretaría de Salud y a los gobiernos de las entidades federativas, en sus respectivos ámbitos de competencia.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 16 de noviembre de 1999.- El Director General de Salud Ambiental, **Gustavo Olaiz Fernández**.- Rúbrica.

## APENDICE NORMATIVO A

METODO DE PRUEBA DE EFICIENCIA ANTIMICROBIANA DE SUSTANCIAS GERMICIDAS MISCIBLES EN AGUA

**1.** Introducción.- La eficiencia de una sustancia germicida está dada por su capacidad para destruir o matar una carga microbiana 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.

**2.** Objetivo.- Determinar si la sustancia germicida cumple con las propiedades que le son atribuidas por el fabricante, bajo las condiciones de aplicación, indicadas por el mismo.

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

Se toman muestras del agua de prueba antes y después de haberse sometido al tratamiento, de acuerdo con la NOM-014-SSA1-1993, procedimientos sanitarios para el muestreo de agua para uso y consumo humano distribuida por sistemas de abastecimiento públicos y privados. A continuación se determina en dichas muestras la concentración de organismos mesófilos aerobios y coliformes totales.

**4.** Material y equipo

**4.1** Autoclave provisto de termómetro y/o manómetro, capaz de alcanzar temperatura de esterilización de  $121 \pm 2^\circ\text{C}$ , probado con termómetro de máximas.

**4.2** Espectrofotómetro con escala de Transmitancia o Nefelómetro de Mc. Farland.

**4.3** Horno para esterilizar a  $160-180^\circ\text{C}$ .

**4.4** Incubadora de aire, con circulación mecánica, para operar a una temperatura de  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

**4.5** Baño de agua, con circulación mecánica y mezcla de agua, para operar a una temperatura de  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ .

**4.6** Potenciómetro

**4.7** Pipetas serológicas estériles de 1 y 10 ml de capacidad, con graduación de una décima de su volumen total (Se recomienda contar complementariamente con pipetas de 2, 5 y 11 ml de capacidad).

**4.8** Tubos de cultivo de 22 x 175 mm, 20 x 200 mm, 16 x 160 mm y 10 x 100 mm, con tapa metálica o de rosca.

**4.9** Botellas de Roux.

**4.10** Asa de platino o micromel.

**4.11** Contador manual.

**4.12** Contador de colonias.

**4.13** Cajas de Petri estériles de 100 X 15 mm.

**4.14** Mecheros Fisher o Bunsen.

**4.15** Solución salina estéril al 0.85% (8.5 g de cloruro de sodio, grado analítico en 1000 ml de agua).

## **5. Medios de cultivo**

### **5.1** Agar nutritivo A.

- Extracto de carne	3.0 g
- Peptona	5.0 g
- Agar libre de sales	15.0 g
- Agua destilada	1000.0 ml

Poner a ebullición durante tres minutos el extracto de carne y la peptona (Bacto o equivalente); agregar el agar y calentar, agitando continuamente hasta disolver.

Distribuir en tubos de 10 x 100 mm y esterilizar 20 minutos a 121°C (el medio no debe sufrir sobrecalentamiento, lo que se evita por un precalentamiento del autoclave).

Utilizar este medio para efectuar los subcultivos.

### **5.2** Agar nutritivo B.

Preparar del mismo modo que el Agar nutritivo A, descrito en el punto 5.1 de este apéndice, pero agregando 30 g de agar libre de sales en lugar de los 15 g especificados.

Distribuir 20 ml del medio en cada botella de Roux.

Utilizar este medio para preparar el cultivo de referencia.

## **6. Microorganismo de prueba**

Cepa de *Escherichia coli* ATCC 11229

### **7. Preparación del cultivo de referencia.**

Tomar una asada de la cepa de *Escherichia coli* y sembrar en una botella de Roux con agar nutritivo B; incubar 20-24 horas a una temperatura de  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Hacer por lo menos tres siembras.

### **8. Preparación del subcultivo.**

Tomar una asada de cada cultivo de referencia y resembrar en tubos independientes con agar nutritivo A; incubar 20-24 horas a una temperatura de  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### **9. Preparación de la suspensión de *Escherichia coli*.**

**9.1** A partir del subcultivo en tubo ya desarrollado, adicionar 5 ml de solución salina al 0.85% estéril y agitar suavemente en forma manual, rotando verticalmente el tubo entre las dos manos, para obtener una suspensión bacteriana, la cual se transfiere a un tubo estéril.

**9.2** Determinación de la concentración de mesófilos aerobios en la suspensión de *Escherichia coli*, utilizando uno de los dos métodos que se presentan en los puntos 9.2.1 y 9.2.2 de este apéndice.

#### **9.2.1** Método espectrofotométrico.

Determinar la concentración de bacterias en UFC/ml, utilizando la Tabla 1.

**Tabla 1**

370	420	490	530	550	580	650	LONGITUD DE ONDA EN nm
% TRANSMITANCIA CON FILTROS							UFC/ml x 10 <sup>9</sup>
7.0	4.0	6.0	6.0	6.0	7.0	8.0	13.0
8.0	5.0	7.0	7.0	7.0	8.0	9.0	11.5
9.0	6.0	8.0	8.0	8.0	9.0	10.0	10.2
10.0	7.0	9.0	9.0	9.0	10.0	11.0	8.6
11.0	8.0	10.0	10.0	10.0	12.0	13.0	7.7
13.0	9.0	12.0	12.0	12.0	13.0	15.0	6.7

**Nota.-** La calibración del aparato debe realizarse con solución salina estéril.

### 9.2.2 Método nefelométrico.

Determinar la concentración de bacterias en UFC/ml, utilizando la Tabla 2.

**Tabla 2**

Solución de BaCl <sub>2</sub> al 1.0% ml	Solución de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 1.0% ml	Escala de Mc. Farland	UFC Millones/ml
0.1	9.9	4.0	300
0.2	9.8	3.7	600
0.3	9.7	3.5	900
0.4	9.6	3.4	1,200
0.5	9.5	3.3	1,500
0.6	9.4	3.2	1,800
0.7	9.3	3.15	2,100
0.8	9.2	3.10	2,400
0.9	9.1	3.04	2,700
1.0	9.0	3.00	3,000

**9.3** Diluir la suspensión bacteriana con solución salina estéril al 0.85%, a la transmitancia o turbiedad elegida, de acuerdo con la concentración de bacterias establecida.

### 10. Preparación de agua de prueba.

**10.1** El agua de prueba se debe preparar con agua de sistema de abastecimiento público, debiendo cumplir con los límites permisibles de la NOM-127-SSA1-1994. Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización, en los parámetros que incidan o afecten la eficiencia del producto germicida, conforme al contenido de la etiqueta o instructivo respectivo, proporcionado por el fabricante o distribuidor al laboratorio acreditado que efectúe la prueba.

**10.2** Preparar un litro de agua de prueba, libre de bactericidas y bacteriostáticos, inoculando el volumen de suspensión de *Escherichia coli* requerido, para alcanzar una carga total de bacterias de 5,000 a 10,000 UFC/ml y una concentración de organismos coliformes totales mayor o igual a 240 NMP/100 ml o UFC/100 ml.

**10.3** Determinar para el agua de prueba la concentración real de mesófilos aerobios en UFC/ml de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, método para la cuenta de bacterias aerobias en placa y la concentración real de organismos coliformes totales de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable o con los métodos alternativos presentados en los Apéndices Informativos A y B.

### 11. Desarrollo de la prueba.

**11.1** Agregar la sustancia germicida al agua de prueba, de acuerdo con las instrucciones del fabricante o distribuidor, especificadas en la etiqueta o instructivo del producto.

**11.2** Después de transcurrido el tiempo de contacto especificado en la etiqueta o instructivo del producto, tomar tres muestras de agua de prueba sin tratar y, a continuación, tres muestras de agua tratada; determinar la concentración de mesófilos aerobios en UFC/ml de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994 y la concentración de organismos coliformes totales de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994 o con los métodos alternativos presentados en los Apéndices Informativos A y B.

## 12. Cálculos

Con los resultados de cuenta de mesófilos aerobios y la concentración de organismos coliformes totales en agua de prueba sin tratar y tratada (media aritmética), calcular los porcentajes en la reducción bacteriana de acuerdo con las fórmulas especificadas en los puntos 12.1 y 12.2 de este apéndice.

**12.1** Porcentaje en reducción bacteriana de mesófilos aerobios:

$$\% \text{ RBMA} = \frac{(\text{mesófilos aerobios})_{\text{APST}} - (\text{mesófilo aerobios})_{\text{APT}}}{(\text{mesófilos aerobios})_{\text{APST}}} \times 100$$

En donde:

% RBMA.- Porcentaje en reducción bacteriana de mesófilos aerobios.

(mesófilos aerobios)<sub>APST</sub>.- Cuenta de mesófilos aerobios en UFC/ml de agua de prueba sin tratar.

(mesófilos aerobios)<sub>APT</sub>.- Cuenta de mesófilos aerobios en UFC/ml de agua de prueba tratada.

**12.2** Porcentaje en reducción bacteriana de organismos coliformes totales.

$$\% \text{ RBCT} = \frac{(\text{coliformes totales})_{\text{APST}} - (\text{coliformes totales})_{\text{APT}}}{(\text{coliformes totales})_{\text{APST}}} \times 100$$

En donde:

% RBCT.- Porcentaje en reducción bacteriana de organismos coliformes totales.

(coliformes totales)<sub>APST</sub>.- Cuenta de organismos coliformes totales en NMP/100 ml o UFC/100 ml de agua de prueba sin tratar.

(coliformes totales)<sub>APT</sub>.- Cuenta de organismos coliformes totales en NMP/100 ml o UFC/100 ml de agua de prueba tratada.

## 13. Reporte

Prueba de potabilidad aceptable, si el porcentaje en reducción bacteriana es igual o mayor a 95%, tanto para mesófilos aerobios como para organismos coliformes totales.

### APENDICE INFORMATIVO A

DETERMINACION DE ORGANISMOS COLIFORMES TOTALES. METODO DEL SUSTRATO CROMOGENICO<sup>1</sup>

#### 1. Introducción

La determinación de organismos coliformes por medio del sustrato cromogénico, se fundamenta en el uso de sustratos cromogénicos hidrolizables para la detección de enzimas de bacterias coliformes. Cuando se utiliza esta técnica, el grupo se define como todas las bacterias que poseen la enzima β-D-galactosidasa y capaces de romper el sustrato cromogénico, dando como resultado una liberación del cromógeno. A diferencia del método de fermentación de lactosa que permite el crecimiento de muchos organismos aeróbicos y elimina o suprime algunos no-coliformes con inhibidores químicos, esta técnica provee nutrientes que son más selectivos y específicos para el crecimiento de coliformes. La prueba puede usarse tanto en tubos múltiples como en formato presencia-ausencia (muestras individuales de 100 ml). La obtención de resultados válidos requiere la aplicación estricta de los procedimientos de control de calidad.

#### 2. Principio

El sustrato cromogénico tal como el orto-nitrofenil-β-D galactopiranósido (ONPG) u otro equivalente, es empleado para detectar la enzima β-D-galactosidasa, la cual es producida por bacterias coliformes

---

<sup>1</sup> Aprobado por el Comité of Standard Methods, 1992.

totales.

La enzima  $\beta$ -D-galactosidasa hidroliza al sustrato y provoca un cambio de color, el cual indica y sustenta una prueba positiva después de 24 a 28 horas sin procedimientos adicionales. Las bacterias no coliformes, tales como las especies del género *Aeromonas* y *Pseudomonas*, que producen pequeñas cantidades de la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa, son suprimidas y no pueden producir una respuesta positiva durante las 28 horas a menos de que más de  $10^4$  unidades formadoras de colonias (UFC) por ml ( $10^6$  UFC/100 ml) estén presentes.

### 3. Aplicaciones

La prueba de coliformes con sustrato cromogénico se recomienda para el análisis de muestras de agua potable o agua limpia proveniente de cualquier fuente. Inicialmente, los laboratorios planearon usar este procedimiento conduciendo pruebas paralelas con una de las pruebas de coliformes estándar por un periodo de varios meses para evaluar la efectividad de la prueba para el tipo específico de agua analizada y para determinar el número relativo de pruebas positivas obtenido por las dos técnicas.

Las muestras de agua conteniendo materiales húmicos o de otro tipo, pueden estar coloreadas. Si hay color de fondo, se comparan los tubos inoculados con un tubo de control conteniendo únicamente muestra de agua. Ciertas aguas con alto contenido de sales de calcio pueden causar precipitación, pero ésta no debe afectar la reacción.

La prueba del sustrato cromogénico no se usa para verificar siembras presuntivas de coliformes o colonias de filtración con membrana, porque el sustrato puede ser sobrecargado por el inóculo pesado de  $\beta$ -D-galactosidasa débil producido por no-coliformes, causando resultados falsos positivos.

En lo que se refiere a *Echerichia Coli*, un sustrato fluorogénico como el 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucoronido (MUG) es utilizado para detectar la enzima  $\beta$ -glucoronidasa, la cual es producida por E. Coli. La enzima  $\beta$ -glucoronidasa hidroliza el sustrato, produciendo fluorescencia cuando el líquido es expuesto a la luz ultravioleta de onda larga (366 nm). La presencia de fluorescencia indica una respuesta positiva para E. coli. Algunas *Shigella* spp también pueden producir una respuesta positiva. Debido a que *Shigella* spp son reconocidas como patógenas humanas, no están consideradas como perjudiciales para probar la calidad sanitaria del agua.

### 4. Formulación del sustrato

Las formulaciones del sustrato se presentan comercialmente en tubos para el procedimiento de tubos múltiples o en recipientes para muestras de 100 ml, para la determinación de presencia/ausencia. También son aprovechables porciones pre-pesadas del reactivo para mezclar y dosificar en tubos múltiples para pruebas de 10 ml u otros recipientes para muestras de 100 ml. Se requiere de un proveedor confiable para el aseguramiento de calidad y uniformidad del sustrato comercial. Se debe evitar la exposición prolongada del sustrato a la luz directa del sol.

La formulación en polvo contiene los siguientes compuestos anhidros (por litro de sustrato preparado)<sup>2</sup>:

Sulfato de amonio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.00 g
Sulfato de manganeso, $\text{MnSO}_4$	0.0005 g
Sulfato de zinc, $\text{ZnSO}_4$	0.0005 g
Sulfato de magnesio, $\text{MgSO}_4$	0.10 g
Cloruro de sodio, NaCl	10.0 g
Cloruro de calcio, $\text{CaCl}_2$	0.05 g
Sulfito de sodio, $\text{Na}_2\text{SO}_3$	0.04 g
Amfotericina B	0.001 g
O-Nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido	0.50 g
4-Metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucoronido	0.075 g
Solanio <sup>3</sup>	0.50 g
Buffer Hepes de sal de sodio	5.3 g
Buffer Hepes de ac. orgánicos <sup>4</sup>	6.9 g

<sup>2</sup> Alternativamente se pueden utilizar productos con diferentes formulaciones, debidamente acreditados.

<sup>3</sup> Solanio es una mezcla de diversos químicos incluyendo antibióticos. Es propiedad de Environetics, Branford Conn.

<sup>4</sup> N-2-hidroxiethylpiperazina-N-2-ácido etano sulfónico.

## 5. Procedimiento

**5.1** Procedimiento de tubos múltiples. Seleccione el número apropiado de tubos por muestra con medio predosificado para la prueba de tubos múltiples y rotule. Siga las instrucciones del fabricante para preparar la serie de diluciones. Asépticamente, adicione 10 ml de muestra a cada tubo, tape herméticamente y agite vigorosamente para disolver. La mezcla resultante es incolora. Algunas partículas pueden resultar insolubles durante la prueba, esto no afectará su desarrollo.

El procedimiento también puede ser desarrollado con la adición de cantidades apropiadas del sustrato reactivo a la muestra, mezclando vigorosamente y dosificando en cinco o diez tubos estériles. Incube a  $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$  por 24 horas.

**5.2** Procedimiento de presencia/ausencia. Adicione asépticamente sustrato enzimático pre-pesado a 100 ml de muestra en un vaso, estéril, transparente, no fluorescente de borosilicato o en una botella o recipiente equivalente. Opcionalmente, adicionar 100 ml de muestra al sustrato enzimático en un recipiente provisto por el fabricante. Tape asépticamente y mezcle vigorosamente para disolver. Incube a  $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$  por 24 horas.

## 6. Interpretación

Después de 24 horas de incubación examine si existe cambio de color en los tubos o recipientes. Cuando el sustrato es orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) es hidrolizado por la enzima de la bacteria para producir orthonitrofenol amarillo; algunos sustratos usados en otras formulaciones pueden producir respuestas de diferente color. La respuesta cromogénica descrita es una reacción positiva para coliformes totales. Si el cambio de color no es uniforme en todo el tubo, mezcle por inversión antes de la lectura. Comparar cada tubo nuevamente con el comparador de color disponible de la fuente comercial del sustrato. Si la intensidad del color es mayor o igual a la del comparador, los coliformes totales están presentes. Las muestras son negativas para coliformes totales si no se observa color. Si la respuesta cromogénica es cuestionable después de 24 horas, incube 4 horas más. Si se intensifica el cromógeno, la muestra es positiva para coliformes totales; si no sucede esto, la muestra es negativa.

## 7. Reporte

Si se desarrolló el procedimiento de NMP, calcular el valor de NMP del número de tubos o celdas positivos, de acuerdo con las tablas de número más probable, correspondientes al sistema utilizado.

Si se utiliza el procedimiento de presencia/ausencia, reportar resultados de coliformes totales presentes a ausentes en 100 ml de muestra.

## 8. Control de calidad

Pruebe cada lote de sustrato comercial desarrollando la prueba por inoculación con tres bacterias de control; *Escherichia coli*, otra coliforme total diferente a *E. coli* (por ejemplo *Enterobacter cloacae*) y una no coliforme. Evite el uso de inóculos pesados. Si se usan *Pseudomonas* como el no coliforme representativo, seleccione una especie no fluorescente. Incube estos controles a  $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$  por 24 horas. Lea y registre los resultados.

## 9. Bibliografía

Edberg, S.C., M.J. Allen, D.B. Smith & the National Collaborative Study, 1988. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: Comparison with the standard multiple tube fermentation method. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1595.

Edberg, S.C. & M.M. Edberg, 1988. A defined substrate technology for the enumeration of microbial indicators of environmental pollution. *Yale J. Biol. Med.* 61:389.

Covert, T.C., L.C. Shadix, E.W. Rice, J.R. Haines & R.W. Frey Berg, 1989. Evaluation of the autoanalysis Colilert test for detection and enumeration of total coliforms. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2443.

Edberg, S.C. & D.B. Smith, 1989. Absence of association between total heterotrophic and total coliform bacteria from a public water supply. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:380.

Edberg S.C., M.J. Allen, D.B. Smith & the National Collaborative Study, 1989. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: Comparison with presence-absence techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1003.

Edberg S.C., M.J. Allen, D.B. Smith & N.J. Kaiz, 1990. Enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from source water by the defined substrate technology. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:366.

Edberg S.C., M.J. Allen, D.B. Smith, 1991. Defined substrate technology method for rapid and simultaneous enumeration of total coliforms and Escherichia coli from water: Collaborative study. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 74:526.

Edberg, S.C., F. Ludwig & D.B. Smith, 1991. The Colilert System for total coliforms and Escherichia coli. American Water Works Research Foundation, Denver, Colo.

## **APENDICE INFORMATIVO B**

Determinación de bacterias coliformes totales y coliformes fecales. Método de filtración por membrana.

### **1. Fundamento**

Este método se basa en la filtración de una muestra para concentrar células viables sobre la superficie de una membrana y transferirlas a un medio de cultivo apropiado, para posteriormente contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) desarrolladas después de la incubación.

### **2. Material**

- 2.1** Autoclave con termómetro y manómetro, capaz de alcanzar temperaturas de esterilización.
- 2.2** Material para envolver esterilizable (papel kraft, bolsas de polímero resistentes al calor, otros).
- 2.3** Membranas para filtración estériles con poro de 0.45 micrómetros y cojinetes absorbente de 47 mm de diámetro.
- 2.4** Sistema de filtración.
- 2.5** Bomba de vacío (20-27 pulgadas Hg), tubería y aditamentos herméticos para mantener el vacío.
- 2.6** Matraz Kitazato.
- 2.7** Cajas Petri desechables o de vidrio estériles de 50 x 90 mm.
- 2.8** Marcador indeleble o equivalente.
- 2.9** Pinzas de acero inoxidable.
- 2.10** Propipeta de 50 ml de capacidad.
- 2.11** Botellas de borosilicato con capacidad de 150 ml y tapa de rosca.
- 2.12** Pipetas bacteriológicas de 1, 2, 5, 10 y 25 ml de capacidad, estériles y protegidas con tapón de algodón.
- 2.13** Utensilios estériles como: cucharas, cucharones, picahielos, destapadores, abrelatas, otros.
- 2.14** Microscopio estereoscópico, óptico o equivalente.
- 2.15** Incubadora ajustada a temperatura de  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
- 2.16** Contador mecánico o manual de Tally.
- 2.17** Recipientes estériles para muestras (frascos, botellas, jarras, bolsas, otros).
- 2.18** Balanza granataria con sensibilidad de 0.1 g.
- 2.19** Portaasa y asa bacteriológica.
- 2.20** Portaobjetos.

### **3. Reactivos y medios de cultivo**

#### **3.1 Agar cuenta estándar**

Preparar de acuerdo con instrucciones del fabricante o por ingredientes:

El pH final debe ser de  $7.0 \pm 0.2$  después de esterilizar a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

#### **3.2 Agar ENDO LES**

Ingredientes	Cantidad (g)
Extracto de levadura	1.2
Casitona o tripticasa	3.7
Tiopeptona o tiotona	3.7
Triptosa	7.5
Lactosa	9.4

Fosfato ácido de potasio - $K_2HPO_4$	3.3
Fosfato de potasio - $K_3PO_4$	1.0
Cloruro de sodio - NaCl	3.7
Desoxicolato de sodio	0.1
Lauril sulfato de sodio	0.05
Sulfito de sodio - $Na_2SO_3$	1.6
Fucsina básica	0.8
Agar	15.0
Agua grado reactivo	1000.0 ml

### 3.2.1. Preparación

Rehidratar el medio en un litro de agua que contenga 20 ml de etanol al 95% no desnaturalizado (lo cual reduce el crecimiento Background y el tamaño de la colonia). Llevar hasta ebullición para disolver el agar, retirar del calor y enfriar a 45-50°C. No esterilizar en autoclave. El pH final debe ser  $7.0 \pm 0.2$ . Distribuir en cantidades de 5 a 7 ml dentro de cajas de Petri de 60 mm de vidrio o plástico. Si se utilizan placas de otro tamaño, ajustar la cantidad de medio. No exponer las placas a la luz directa del sol. Almacenar en la obscuridad de 4 a 8°C, preferiblemente en bolsas de plástico selladas u otros recipientes para reducir la pérdida de humedad. Descartar el medio que no se utilizó después de 2 semanas.

### 3.3 Medio ENDO

Ingredientes	Cantidad (g)
Triptosa o polipeptona	10.0
Tiopeptona o tiotona	5.0
Casitona o tripticasa	5.0
Extracto de levadura	1.5
Lactosa	12.5
Cloruro de sodio-NaCl	5.0
Fosfato ácido dipotásico- $K_2HPO_4$	4.375
Fosfato dihidrógeno potásico- $KH_2PO_4$	1.375
Lauril sulfato de sodio	0.05
Desoxicolato de sodio	0.10
Sulfito de sodio- $Na_2SO_3$	2.1
Fuscina básica	1.05
Agar (opcional)	15,0
Agua grado reactivo	1000.0 ml

Rehidratar el medio en un litro de agua que contenga 20 ml de etanol al 95%, calentar hasta ebullición para disolver el agar, retirar del calor y enfriar entre 45-50°C. Distribuir en cantidades de 5 a 7 ml a cajas de Petri desechables o de vidrio de 60 mm de diámetro. No esterilizar en autoclave. El pH final debe ser de 7.1-7.3.

Almacenar el medio (Caldo o Agar) en la oscuridad de 4 a 8°C y descarte cualquier caldo de medio sin usar después de 96 horas y el agar sin usar después de 2 semanas.

Medio líquido: 2 ml por placa, sin agar; se puede usar un cojinete absorbente si está certificado, libre de sulfito u otro agente tóxico a una concentración que pueda inhibir el desarrollo bacteriano.

## 4. Procedimiento

Generalmente, el enriquecimiento del medio de cultivo puede mejorar la valoración de la calidad del agua para beber. Sin embargo, este paso puede eliminarse en el análisis de rutina de este tipo de agua, ya que varios estudios mostraron que se obtienen resultados adecuados por la técnica simple de filtración por membrana, en un solo paso. Sin embargo, se recomienda que, en lo posible, se verifiquen todas las muestras de agua que den resultados positivos.

### 4.1 Selección del tamaño de muestra

El tamaño de muestra lo determina la densidad bacteriana, lo cual en muestras de agua para beber estará limitado sólo por el grado de turbiedad o por el crecimiento de bacterias no coliformes sobre el medio.

El volumen de muestra sugerida para prueba de coliformes totales y coliformes fecales por esta técnica es de 100 ml.

#### **4.2 Filtración de la muestra**

Utilizando pinzas estériles, colocar una membrana estéril (cuadrulado hacia arriba) sobre el porta filtro poroso. Cuidadosamente coloque el embudo sobre el receptáculo y asegúrelo en su lugar. Filtre la muestra bajo vacío parcial, con el filtro aún en su lugar, enjuague el embudo mediante la filtración de tres porciones de 20 a 30 ml de solución buffer estéril. Una vez complementado el enjuague final y que el proceso de filtración haya concluido, quitar el embudo e inmediatamente después retire la membrana con pinzas estériles y colóquela sobre el medio selectivo con un movimiento circular, a fin de evitar la entrada de aire. Meter un control de 100 ml de solución buffer estéril cada 10 muestras para checar posible contaminación cruzada o buffer contaminado. Incubar el control bajo las mismas condiciones de la muestra.

Usar unidades de filtración estériles al principio de cada serie de filtraciones, como precaución mínima para prevenir contaminación accidental. Una serie de filtraciones se considera cuando hay un intervalo de interrupción de 30 minutos o más entre cada filtración de muestras. Después de tales interrupciones, tratar cualquier muestra como una serie de filtración y se debe esterilizar toda la unidad de filtración en uso. Descontaminar este equipo entre filtraciones sucesivas, ya sea por medio de luz ultravioleta (UV) o esterilizando 2 minutos con vapor o durante 5 minutos con agua hirviendo. No exponer la preparación de cultivo con el filtro de membrana al rango de radiación UV que pueda salir de la cabina de esterilización. Se recomienda protegerse los ojos, pueden usarse lentes de seguridad o de vidrio prescritos para la adecuada protección contra la luz UV de la columna de esterilización que no se aisle durante el tiempo de exposición. Limpie el tubo de UV regularmente y cheque periódicamente su efectividad para asegurar que haya un 99,99% de muerte bacteriana en 2 minutos de exposición.

#### **4.3 Técnica de enriquecimiento**

Colocar un cojinete absorbente en una caja de Petri estéril y pipetear 1.8 a 2.0 ml de caldo lauril triptosa para saturar el cojinete. Cuidadosamente remueva cualquier exceso de líquido del cojinete. Asépticamente colocar sobre el cojinete una membrana a través de la cual se haya filtrado una muestra de agua, incubar la membrana sin invertir la caja de 15 a 20 horas a  $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera de 90% de humedad relativa.

Si se usa el medio de agar base tipo ENDO, remover el enriquecimiento de la incubadora, separar la membrana del cojinete con el enriquecimiento y colocar sobre la superficie del agar. La colocación incorrecta de la membrana a su vez se pone de manifiesto, porque partes de la membrana no se tiñen, lo cual indica entrada de aire. Donde suceda esto, cuidadosamente resítue la membrana sobre la superficie de agar. Si se usa medio líquido, colocar un cojinete estéril nuevo en el fondo de la caja y saturar con 1.8-2.0 ml de medio M-ENDO. Separar la membrana del cojinete con el enriquecimiento y colocar sobre la superficie del M-ENDO, con las precauciones antes descritas. Descartar el cojinete de enriquecimiento utilizado.

A continuación, con el medio ya sea agar o líquido (con cojinete), invertir las placas e incubar de 20 a 22 horas a  $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.4 Técnica alternativa directa en paso simple**

Si se usa medio de agar base, colocar la membrana después de filtrar la muestra de agua, directamente sobre el agar como se describió anteriormente e incubar por  $24 \pm 2$  horas a  $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .

Si se usa medio líquido, colocar un cojinete sobre la placa y saturar con 1.8 a 2.0 ml de medio M-ENDO. Colocar la membrana después de filtrar la muestra de agua, directamente sobre el cojinete; invierta la caja e incube por  $24 \pm 2$  horas a  $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .

**4.5 Conteo:** Para determinar la cuenta de colonias sobre el filtro de membrana, usar un microscopio binocular de disección de bajo poder (10 a 15 aumentos) u otro aparato óptico similar, con lámpara fluorescente de luz blanca con rango perpendicular, tanto como sea posible al plano del filtro.

Las colonias típicas de coliformes totales tienen color rojo oscuro con brillo metálico. El área brillante puede variar de tamaño desde que sólo brille la parte superior de la colonia hasta que abarque la superficie total de la colonia, las colonias atípicas de coliformes pueden ser rojo oscuro o nucleadas sin brillo.

Las colonias que no tengan brillo pueden ser rosas, rojas, blancas o incoloras y se consideran no coliformes.

No existe correlación entre la cuenta de colonias (coliformes o no coliformes) sobre el medio tipo ENDO y el número total de bacterias presentes en la muestra original. Sin embargo una cuenta alta de bacterias no coliformes puede interferir con el máximo desarrollo de coliformes. La refrigeración de los cultivos (después de 22 horas de incubación) con alta densidad de colonias no coliformes de 0.5 a 1 hora antes de contar puede prevenir la dispersión y puede ayudar a discernir el brillo metálico. La incubación anaeróbica a 35°C por 24 horas de algunas muestras de agua subterránea, pueden suprimir el desarrollo de colonias de no coliformes, pero debe ser cuidadosamente evaluada para asegurar no perder la recuperación de los coliformes.

Las muestras de agua tratada, efluente o residual puede incluir bacterias estresadas que crecen relativamente lento y producen un máximo brillo en 22-24 horas. Los organismos de fuentes no tratadas pueden producir brillo a las 16-18 horas y el brillo puede, subsecuentemente disminuir después de 24-30 horas.

#### 4.6 Verificación de los coliformes

Ocasionalmente las colonias de no coliformes aparecen como colonias típicas con brillo. Las colonias atípicas (rojo oscuro, nucleadas son brillo metálico) ocasionalmente pueden ser coliformes. Es recomendable verificar ambos tipos de colonias, mediante una prueba de fermentación de lactosa o por el uso de procedimientos alternativos, que involucren ambos una prueba rápida (4 horas) o por reacciones bioquímicas típicas o un sistema multiprueba para especies.

##### 4.6.1 Fermentación de la lactosa.

Verificar colonias típicas y atípicas incluidas en la cuenta directa; probar un mínimo de 5 de tales colonias de muestras de agua potable, por transferencia del crecimiento de cada colonia en caldo lauril triptosa, incubar a 35 ± 0.5°C durante 48 horas.

La formación de gas en caldo lauril triptosa y su conformación en caldo lactosa con verde brillante dentro de las 48 horas, verifica a la colonia probada como coliforme.

##### 4.6.2 Verificación alternativa de coliformes.

Aplicar este procedimiento alternativo de verificación de coliformes para colonias aisladas sobre el filtro de membrana. Si no hay colonias aisladas o si la separación entre las colonias es de menos de 2 mm, estriar el crecimiento a medio M-ENDO para asegurar la pureza del cultivo y transferir al tubo de fermentación.

###### 4.6.2.1 Prueba rápida.

Una verificación rápida de las colonias es la prueba de citocromo oxidasa (CO) y Beta- galactoxidasa (ONPG). La reacción de los coliformes es de CO negativa y ONPG positiva con 4 horas de incubación del tubo de cultivo o procedimiento de microprueba.

###### 4.6.2.2 Sistema multiprueba comercial.

Verificar las colonias por estrías para su purificación, seleccionar colonias perfectamente aisladas e inocular dentro de un sistema multiprueba para enterobacterias que incluya reacciones de fermentación de lactosa, CO y ONPG.

### 5. Cálculos

Cálculos de la densidad de los coliformes

Hacer el conteo, usando filtros de membrana con 20 a 80 colonias de coliformes y no más de 200 colonias para cualquier tipo de colonia según la siguiente ecuación.

$$\text{Colonias de coliformes totales/100 ml} = \frac{\text{Colonias de coliformes contadas}}{\text{ml de muestra filtrados}} \times 100$$

#### 5.1 Agua de calidad potable

Con agua de buena calidad, la presencia general de coliformes es mínima. Por lo tanto, se deben contar todas las colonias de coliformes (cajas con 20 a 80 colonias) y usar la fórmula dada anteriormente para obtener la densidad de coliformes.

Si existe un crecimiento confluyente, que es un desarrollo que cubre el área de filtración completa de la membrana o una porción y las colonias no están bien distribuidas, reportar los resultados como "crecimiento confluyente con (sin) coliformes" y solicite un nuevo muestreo del mismo sitio. Si el número total de colonias bacterianas, coliformes o no coliformes excede las 200 por membrana o si las colonias

no son suficientemente distinguibles una de la otra para asegurar el conteo, reporte los resultados como "Demasiado numerosas para contar" (DNPC). La presencia de coliformes en tales cultivos, se verifica mediante la colocación del filtro de membrana completo dentro de un tubo estéril con caldo bilis verde brillante. Como alternativa arrastre la superficie completa del cultivo de la membrana con una asa estéril o con un isopo de algodón estéril e inocule a un tubo de caldo lactosado y a otro de caldo bilis verde brillante.

Si se produce gas de este cultivo dentro de las  $48 \pm 3$  horas a  $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , se concluye la presencia de coliformes.

Se recomienda reportar "Crecimiento confluyente" o "Demasiado numerosas para contar" con al menos una colonia de coliformes detectable (verificada) como una muestra positiva de coliforme total; no se recomienda reportar únicamente "Crecimiento confluyente" o "Demasiado numerosas para contar".

Cuando no se detectan coliformes, habiendo utilizado volúmenes de muestra pequeños, se requiere una nueva muestra y seleccionar volúmenes más apropiados para la filtración por membrana. Normalmente se requieren volúmenes de 25, 50 o 100 ml para agua potable.

Para reducir interferencia de sobrecrecimiento, en lugar de filtrar 100 ml, filtre porciones de 50 ml a través de 2 diferentes membranas, porciones de 25 ml a través de 4 diferentes membranas, y así sucesivamente.

La cuenta de coliformes totales observadas sobre todas las membranas se suma y se reporta el número total en 100 ml.