

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA



B0248,85
B67 8.2
30.240

DETERMINACION CUANTITATIVA DE Pseudomonas aeruginosa
EN AGUAS DE PISCINA, COMO POSIBLE INDICADOR DE LA
CALIDAD BACTERIOLOGICA DE ESTE TIPO DE AGUAS.

T E S I S

Que para obtener el Título de
B I O L O G O

p r e s e n t a

ADRIANA ROSELL VAZQUEZ

1 9 8 5



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MI ESPOSO

A MI HIJA

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A LA QFB ESPERANZA ROBLES V.

Por su valiosa asesoría en la
realización de este estudio.

A

DR. FERMIN RIVERA A.
M EN C. PEDRO RAMIREZ G.
BIOL. ELIZABETH RAMIREZ F.
BIOL. VICTOR RIVERA A.
BIOL. ELVIA GALLEGOS

Y a todas las personas del CyMA que colaboraron en este estudio.

A MI ESCUELA

A CONACYT

I N D I C E

Capítulo		Pag.
	RESUMEN	1
I	INTRODUCCION	3
II	ANTECEDENTES	
	1. Revisión Bibliográfica	5
	2. Generalidades de la bacteria	
	2.1 Principales características del Género	9
	2.2 Principales características de <u>Ps.aeruginosa</u>	10
III	OBJETIVOS	15
IV	METODOLOGIA	
	1. Primera etapa	16
	2. Segunda etapa	21
V	RESULTADOS	28
VI	EVALUACION DE RESULTADOS	48
VII	DISCUSION DE RESULTADOS	66
VIII	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	70
IX	BIBLIOGRAFIA	72
	ANEXO	79

I N D I C E D E T A B L A S

Tabla N°		Pag.
I	Medios mPa C, mPa B y mPa Agar de la Técnica de Filtro de Membrana	22
II	Medio mPa C modificado	23
III	Cuantificación de <u>Ps. aeruginosa</u> con los tres medios mPa.	32
IV	Cuantificación de <u>Ps. aeruginosa</u> con dos medios mPa.	34
V	Características morfológicas de <u>Ps. aeruginosa</u> en los medios mPa.	36
VI	Valores físicos, químicos y bacteriológicos de las piscinas muestreadas.	37
VII	Ordenación de datos para el 1er análisis de varianza.	50
VIII	1er análisis de varianza.	52
IX	Ordenación de datos para el 2º análisis de varianza.	53
X	2º análisis de varianza.	55
XI	Parámetros fisicoquímicos y <u>Ps. aeruginosa</u> (Promedio por piscina)	56
XII	Datos de parámetros fisicoquímicos y de las medianas de los triplicados de las pruebas bacteriológicas.	57

I N D I C E D E F I G U R A S

Figura N°		Pag.
1	Diagrama de la elaboración de los medios mPa C, mPa B y mPa Agar	24
2	Tipos de muestras.	25
3	Diagrama del procedimiento de muestreo para la 2ª etapa.	26
4	Ubicación de las estaciones en las piscinas.	27
5	Relación de <u>Ps. aeruginosa</u> vs la Temperatura del agua de las piscinas y a pH 6.5	60
6	Relación de <u>Ps. aeruginosa</u> vs la Temperatura del agua de las piscinas y a pH 7-7.8.	61
7	Relación de <u>Ps. aeruginosa</u> y coliformes totales a diferentes temperaturas y a pH 6.5	62
8	Relación de <u>Ps. aeruginosa</u> y coliformes totales a diferentes temperaturas y a pH 7-7.8	63
9	Relación de <u>Ps. aeruginosa</u> y coliformes fecales a diferentes temperaturas y a pH 6.5.	64
10	Relación de <u>Ps. aeruginosa</u> y coliformes fecales a diferentes temperaturas y a pH 7-7.8.	65

R E S U M E N

El presente estudio se realizó dada la importancia de la especie Pseudomonas aeruginosa en aguas recreacionales, ya que es un organismo que suele ocasionar serias enfermedades por ser un patógeno oportunista. Además de que aún no se ha determinado en México una técnica cuantitativa que sea lo suficientemente eficaz y que esté estandarizada por lo que se realizó una revisión bibliográfica referente a los métodos existentes, seleccionando así, la técnica de Filtro de Membrana y utilizando los medios referidos como mPa, que con las variaciones del medio basal resultaron ser mPa C, mPa B y mPa Agar.

Para probar los medios se analizaron inicialmente diluciones de una cepa pura, muestras de piscinas y muestras de piscinas inoculadas con la cepa pura, teniendo en total 46 muestras. Con base en los resultados de esos análisis se hizo un primer análisis de varianza donde se demostró la hipótesis nula de que no había diferencias significativas entre los medios, por lo que basándose en las desventajas que presentó uno de los medios y por el tiempo de incubación que este requería se procedió a descartarlo; una de las desventajas fué la lectura de colonias.

Con los dos medios restantes, mPa C y mPa Agar, se analizaron 46 muestras más para incrementar el grado de confianza de los resultados y poder realizar con los datos de las 92 muestras resultantes, un segundo análisis de varianza, volviéndose a confirmar la misma hipótesis, por lo que al no haber varianza significativa entre ellos, la selección del método se realizó a partir de las ventajas y desventajas que presentó cada uno de ellos.

El medio seleccionado fué el mPa C, por ser el que permite la lectura de las colonias a las 24 horas, por otro lado la contaminación del medio por otras bacterias se reduce, sobre todo en el tamaño colonial y por ser el menos complejo de elaborar.

En la segunda etapa de este estudio, se realizaron de manera paralela, el análisis de Pseudomonas aeruginosa, coliformes totales y fecales y los parámetros fisicoquímicos pH, Temperatura y Cloro libre residual.

Los resultados de los análisis realizados en 10 piscinas nos indican que la relación ~~existente~~ entre estos parámetros debe ser estudiada con mayor profundidad.

I INTRODUCCION

De un tiempo a la fecha, la calidad de las aguas recreacionales ha sido evaluada y regulada por pruebas bacteriológicas, las cuales están relacionadas a la presencia y densidades específicas de Enterobactereaceas como coliformes totales, fecales, Escherichia coli, y Estreptococos fecales.

La presencia de estos en el agua nos está indicando que existe un potencial contra la salud por su asociación con excretas y con una gran variedad de organismos patógenos como son: Salmonella, Shigella, Vibrio, Mycobacterium, Pasteurella, Leptospira, y virus entéricos (1).

Algunas enfermedades infecciosas pueden transmitirse a través de las aguas recreacionales, la mayoría de estas enfermedades son de tipo respiratorio más que de tipo gastrointestinal (1), entre estas se incluyen infecciones de la piel, boca y oído (2).

La limpieza y cloración de las piscinas debería controlar los organismos responsables de esas infecciones, pero en dicho ecosistema algunos microorganismos pueden ser relativamente protegidos de la desinfección por las características estructurales de la piscina. En particular, los patógenos de vida libre como Pseudomonas aeruginosa pueden multiplicarse en áreas que son menos accesibles a la desinfección, por lo tanto el nivel de cloro recomendado para las piscinas debería establecerse tomando ciertas consideraciones que pudieran evitar este tipo de problemas (2).

Varios investigadores han reportado el aislamiento de este organismo en aguas de piscina encontrando que la bacteria no se elimina fácilmente a través del cloro, además también se le ha detectado en algunas piscinas

que son desinfectadas con alguicidas de amonio cuaternario o cloro estabilizado con ácido cianúrico y en aguas que tienen menos de 0.3 mg/lt de cloro total residual (3).

Aunque no es un habitante normal de los canales auditivos sanos, frecuentemente ha sido aislado de oídos externos especialmente de los nadadores (3), pero a pesar de estar bastante implicada en esas infecciones no se ha demostrado que este directamente relacionada con los niveles de coliformes y por lo tanto no puede enlistarse en el Sistema Indicador Entérico comunmente usado para el análisis bacteriológico de ese tipo de aguas (1).

Otras investigaciones realizadas por Greer et al. (1928) y Taylor (1958) se refieren a la patogenicidad de la especie lo cual ha conducido a recomendaciones tales como efectuar análisis de Pseudomonas aeruginosa en aguas potables debido a la sospecha de su asociación con Escherichia coli (4).

La presencia de Pseudomonas aeruginosa en aguas de piscina y su asociación con enfermedades del oído medio, sugieren la realización de pruebas periódicas además de la examinación rutinaria de Staphylococcus aureus (4), ya que es un patógeno oportunista que inicia las infecciones en individuos cuya resistencia es baja, que han sufrido lesiones en la piel debido a quemaduras o cortadas; además es resistente a muchos antibióticos que se utilizan comunmente (4).

El incremento de la importancia de Pseudomonas aeruginosa como indicador de contaminación y como patógeno ha permitido el desarrollo de una gran variedad de métodos de enumeración y aislamiento para este organismo (1).

II. ANTECEDENTES

1. Revisión Bibliográfica.

② ↓ En un estudio realizado por el Departamento de Investigación y Asistencia Técnica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, se revisaron de manera cualitativa, 216 muestras que representaban 12 piscinas del Sur y Suroeste del Distrito Federal; se encontraron un 89.4% de Staphylococcus aureus y un 69.0% de Pseudomonas aeruginosa lo cual es una seria advertencia (5).

↑ Debido a los niveles de contaminación a los que ha llegado nuestro país, es importante tomar medidas que nos ayuden por lo menos a conocer con que tipo de contaminación nos enfrentamos para así poder actuar debidamente, por lo que se revisaron algunos estudios de la especie Pseudomonas aeruginosa, sobre su importancia, patogenicidad y las técnicas por medio de las cuales ésta es aislada y ennumerada. Además, a pesar de la importancia que esta especie representa, aún no se ha determinado en México una técnica cuantitativa que sea lo suficientemente eficaz.

↗ Muchos métodos han sido descritos para la enumeración selectiva de Pseudomonas aeruginosa en agua, pero ninguno ha sido ampliamente aceptado.

Los procedimientos son basicamente de dos tipos: 1) uno basado en la producción de un pigmento fluorescente, en un medio líquido o sobre un medio sólido, con o sin confirmación sobre una variedad de medios; y 2) otro basado en la morfología y color colonial, con o sin confirmación (1).

Dos procedimientos de filtro de membrana han mostrado grandes promesas para estimar las poblaciones de Pseudomonas aeruginosa. Uno de estos procedimientos está basado en la fluorescencia, y aunque están específicamente propuestos para estudios en piscinas pueden ser aplica-

dos en pruebas rutinarias de agua; el otro procedimiento está basado en la morfología colonial, propuesto por Levin y Cabelli y ha sido evaluado con agua dulce, salada y con muestras de desagüe (1).

La técnica del Número Más Probable (NMP) es laboriosa, no es fácil de adaptar para analizar grandes volúmenes de agua, y requiere de grandes períodos de incubación. La técnica del NMP para Pseudomonas aeruginosa es además complicada por la variedad de formulaciones de caldos de asparagina recomendados, por las condiciones de incubación, los métodos de interpretación de los tubos presuntivos positivos y los procedimientos confirmatorios (6).

La técnica de Filtro de Membrana (FM), en comparación a la Técnica del NMP está bien establecida y las únicas limitaciones que presenta es la variación entre las marcas de los filtros de membrana y cuando se cuenta con una alta turbiedad en el agua; con excepción del medio mPa, la especificidad del medio que se utiliza en FM para Pseudomonas aeruginosa ha sido pobre, especialmente cuando el agua contiene una pequeña población de esa bacteria y una gran flora bacteriana heterogénea..

El medio mPa original (anexo) descrito por Levin Cabelli, asemeja una formulación modificada del medio desoxicolato de xilosa-lisina hecho más selectivo por la adición de los antibióticos Kanamicina, Acido Nalidíxico, Sulfapiridina, y Actidione (Ciclohexamida). Cuando este medio fué incubado a 41.5°C durante 48 hrs, fué moderadamente selectivo para Ps. aeruginosa y hubo una diferenciación de las colonias de esta bacteria por su apariencia distinta a las demás (6).

La validez del medio mPa para la recuperación cuantitativa de Pseudomonas aeruginosa, procedente de una gran variedad de fuentes, por medio de la técnica de FM, fué confirmada por Carson et al. y Dutka y Kwan. Estos investigadores también notaron ciertos problemas con la preparación del medio basal y Carson sugirió que el pH fuera ajustado por arriba

de 6.2 antes de que este fuera esterilizado y reajustado después a 7.1 para promover el desarrollo de colonias típicas bien definidas (6).

Dutka y Kwan demostraron que se requerían 4 días de incubación sobre el medio mPa para la recuperación óptima de Pseudomonas aeruginosa que procede de un medio ambiente muy presionado. Ellos también modificaron la formulación original adicionando 0.15 g de sulfato de magnesio por cada 100 ml y redujeron el contenido de tiosulfato de sodio, de 0.68 a 0.5 g/100 ml para obtener una mejor recuperación y definición colonial, así este medio fué designado mPa-B (6, Tabla I).

La eficiencia de los dos procedimientos, FM y NMP, para recuperar y enumerar Pseudomonas aeruginosa ha sido comparada en dos temperaturas y se han variado los períodos de incubación. Los datos indican que el procedimiento de FM usando mPa o mPa-B es más eficiente que el procedimiento de NMP para la estimación de dicha bacteria. Se estableció que la especificidad del procedimiento de FM fué tal que de 92 al 90% de las colonias contadas como Pseudomonas aeruginosa fueron confirmadas, además se indicó que el medio mPa-B combinado con 3 a 4 días de incubación a 41.5°C es más específico que el medio mPa (1,3).

Brodsky y Ciebin, redujeron inadvertidamente la concentración final de la sulfapiridina de 176 a 1.76 g/ml en su evaluación final del medio mPa-B y observaron que las colonias de Pseudomonas aeruginosa eran contables a las 24 hrs de haberlas incubado a 41.5°C, mientras las colonias del medio mPa-B con la concentración normal de sulfapiridina fueron evidentes y optimamente contables hasta después de 48 hrs de incubación. Esta mejoría en la respuesta del crecimiento no fue observada al alterar las concentraciones de Kanamicina, Acido Nalidíxico, o Actidione, de tal manera que esta y otras modificaciones en la elaboración del medio basal dieron origen al medio llamado mPa-C (6, Tabla I).

En el manual de métodos estandarizados (Standart Methods, 1980) se menciona un método para la recuperación y enumeración de Pseudomonas aeruginosa, pero este es solo tentativo y es una combinación de los dos métodos mencionados anteriormente, de tal manera que la formula que propone cae en desventaja con respecto al mPa-C, ya que la elaboración del medio basal es más compleja, requiere de esterilización, de dos ajustes

de pH, y sobre todo de más tiempo de incubación, 48-72 hrs, sin embargo cabe mencionar que con respecto a los dos anteriores la caducidad del mismo es mayor y además la probabilidad de que crezcan colonias diferentes a Pseudomonas aeruginosa también se ve reducida (7,15,16).

En cuanto a los medio utilizados para la técnica de NMP, no se hizo revisión alguna, debido a las desventajas mencionadas que la técnica presenta con respecto a la de FM.

2. Generalidades de la Bacteria.

2.1 Principales características del Género.

Los miembros del género Pseudomonas se distribuyen ampliamente en la naturaleza y pueden encontrarse tanto en el agua como en el suelo ya que pueden adaptarse a diferentes condiciones ambientales (8). ✓

El género comprende un gran número de organismos, relacionados por su morfología, por su metabolismo y por sus requerimientos nutritivos. Su morfología celular es sencilla, ya que tienen forma de bacilos rectos y solo en ocasiones son ligeramente curvados en uno de sus extremos, el tamaño es generalmente de 0.5 a 1.0 μ por 1.5 a 4.0 μ , poseen movilidad mediante flagelos polares y no producen cápsulas ni esporas. El oxígeno es el aceptor de electrones, aunque algunas especies pueden utilizar los nitratos como aceptores alternos.

No presentan metabolismo anaerobio fermentativo (8,9).

Los pigmentos son muy característicos para algunas especies y generalmente es necesario emplear un medio especial para favorecer la producción de estos pigmentos uno de los cuales es fluorescente, pertenece al grupo de las pteridinas fluorescentes, aunque también producen pigmentos que son parte de las fenacinas y de los carotenoides (10).

En general son pocas las especies que son patógenas, entre las más importantes tenemos a Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas pseudomallei, y Pseudomonas mallei (8). ✓

Son relativamente resistentes a muchos desinfectantes como por ejemplo al amonio cuaternario, cloruro de benzalconio, hexaclorofeno y otros. Con respecto a los antibióticos suelen adquirir resistencia con cierta facilidad (8). ✓

2.2 Principales características de Pseudomonas aeruginosa.

Pseudomonas aeruginosa, es la especie que ha resultado ser la más representativa del género (Schroeter, 1872), Migula, 1900 (11).

En 1850 Sédillot y Fords en 1960, lograron aislar de la ropa de hospital una sustancia cristalina a la que denominaron piocianina y en 1882 Gessard fué el primero en aislar al microorganismos . Por diversos estudios realizados sobre la bacteria, esta ha recibido diferentes nombres (10) :

<u>Bacterium aeruginosum</u>	Schroeter, 1872
<u>Bacterium aerugineum</u>	Cohn, 1872
<u>Bacillus pyocyaneus</u>	Gessard, 1882
<u>Micrococcus pyocyaneus</u>	Zopf, 1884
<u>Bacillus aeruginosum</u>	(Schroeter) Trevisan, 1885
<u>Pseudomonas pyocyanea</u>	(Zopf) Lehman y Neumann, 1896
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	Migula, 1900

Taxonomía :

Reino	Vegetal
División	Esquizomicófitos
Clase	Esquizomicetes
Orden	Pseudomonadales
Suborden	Pseudomonadinaeae
Género	<u>Pseudomonas</u>
Especie	<u>aeruginosa</u>

Morfología.

Las bacterias de esta especie son de forma bacilar, miden aproximadamente 0.5μ por 1.0 a 3.0μ , el bacilo suele ser delgado con los extremos redondeados. Tiene movilidad por medio de un flagelo polar. Son Gram negativos, no producen ni cápsulas, ni esporas y se presentan aisladas, en pares o en cadenas pequeñas (10).

Hábitat.

Esta especie tiene una amplia distribución en la naturaleza debido a su gran adaptabilidad; pueden encontrarse en el suelo, en el agua y aún en aguas de desecho (10).

Pseudomonas aeruginosa, es capaz de crecer en condiciones de laboratorio hasta a 42°C , mientras otras especies de este género, que no son patógenas, solo pueden crecer a temperaturas más bajas (1,8,10).

Esta bacteria no es un parásito obligado, sino un parásito oportunista y puede aislarse de hábitats naturales y aún desarrollarse en ellos (10).

Nutrición.

Una de las características más sobresalientes de estas bacterias es la gran variedad de compuestos orgánicos que utilizan como fuentes de carbono y energía; algunas cepas utilizan más de 100 compuestos diferentes, y solo unas cuantas utilizan menos de 20. Suelen utilizar azúcares, ácidos grasos, ácidos dicarboxílicos, ácidos tricarboxílicos, alcoholes, polialcoholes, glicoles, compuestos aromáticos, aminoácidos y aminas (10).

Cultivo.

Es posible mantener en cultivo a esta bacteria en cualquier medio ordinario de laboratorio, de preferencia bajo condiciones aerobias ya que para crecer en condiciones anaerobias necesitan estar presentes los nitratos. Aquí cabe recordar que no son ácido-resistentes ni tampoco resisten temperaturas de más de 55°C, y de los azúcares solo utiliza la glucosa. Las colonias que crecen en agar son grandes, irregulares, translúcidas y verdosas con centro oscuro y borde entero o en ocasiones ondulado (8). En caldos se presenta un abundante crecimiento con la formación de una película gruesa, turbiedad densa y un poco de sedimento. Solo algunas cepas producen un pigmento azul-verde que se difunde en el medio. En general el medio en que crece se torna verde o azul y cambia de color conforme pasa el tiempo, ya que la piocianina continua oxidandose, el color del medio llega a ser café.

Como ya se mencionó, el pigmento responsable de la coloración azul, es la piocianina, esta es soluble en cloroformo y en agua, de donde puede obtenerse en forma de largos cristales azules. Para su formación no requiere de fosfatos ni sulfatos, aparece en los primeros estadios del desarrollo de estas bacterias y puede oxidarse dando un color vino que puede llegar a ser negro.

Otro de los pigmentos que es característico de la especie, es la fluoresceína, la cual es de color verde amarillento y fluorescente, es insoluble en cloroformo, pero no en agua; requieren de sulfatos y fosfatos para producirse y en los cultivos viejos suele oxidarse dando una coloración pardo-amarrillenta.

La piocianina es la sustancia que proporciona un olor especial a los cultivos, este pigmento solamente es producido por Pseudomonas aeruginosa, y la fluoresceína es producida también por otros microorganismos. Ambos pigmentos son producto de la oxidación de sustancias incoloras (10).

Patogenicidad.

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista que generalmente ataca individuos cuya resistencia es baja. En condiciones propicias es capaz de producir infecciones sistemáticas en individuos con previas lesiones en la piel, ya sean por heridas leves o quemaduras, las cuales una vez infectadas son difíciles de tratar. También puede producir otras infecciones a nivel de tracto urinario, intestino, ojos y oído, ocasionando enfermedades como otitis media, meningitis, endocarditis, neumonía necrosante, necrosis de la piel y ojos, conjuntivitis, abscesos cutáneos múltiples, septicemia, etc.

En pacientes quemados la infección de las heridas con Pseudomonas aeruginosa es capaz de producir la muerte ya que las áreas de la piel quemada brindan las condiciones propicias para la multiplicación de la bacteria debido a la humedad proporcionada por el exudado inflamatorio o por los apósitos. La infección puede tener su origen en la flora normal del enfermo o ser de procedencia exógena especialmente del ambiente hospitalario. A menudo la infección comienza durante la primera semana de la quemadura, y se extiende, por la vía linfática hacia el tejido subcutáneo local durante la segunda semana. Durante etapas tardías de la infección los microorganismos pueden llegar a la corriente sanguínea y producir septicemia y choque bacterianémico casi siempre mortal.

También es posible encontrarla como organismo saprófito de la piel, la boca, las fosas nasales y el tubo digestivo, constituyendo uno más de los gérmenes de la flora intestinal.

En muchas ocasiones se le encuentra infectando heridas de animales domésticos, cerdos, gallinas, bovinos, equinos, y conejos (10).

Prevención y Tratamiento.

La prevención es el mejor método para evitar las infecciones por Pseudomonas aeruginosa, los pacientes o personas expuestos a riesgo deben observarse y aumentarse las medidas asépticas, procurando utilizar lo menos posible antibióticos de amplio espectro. Actualmente se investiga en pacientes quemados, un método prometedor para prevenir la infección por este microorganismo.

La terapéutica antibiótica es difícil pero puede ser eficaz contra las infecciones por esta bacteria. Entre los antibióticos comunmente utilizados encontramos la carbecilina, colistina y gentamicina; la poliximina es efectiva, pero es importante usarla con mucha precaución, pues es muy tóxica y puede ocasionar efectos secundarios (10).

III OBJETIVOS

OBJETIVO MEDIATO :

Proponer, de ser posible, y en base a los resultados obtenidos, a Pseudomonas aeruginosa como posible índice de contaminación bacteriológico en las aguas de piscina.

OBJETIVOS INMEDIATOS :

- Buscar y probar técnicas cuantitativas apropiadas para la identificación de Pseudomonas aeruginosa en aguas de piscina.
- Seleccionar la técnica más apropiada para la determinación cuantitativa de Pseudomonas aeruginosa en aguas de piscina.
- Determinar la incidencia de Pseudomonas aeruginosa en las piscinas. *presencia*
- Analizar en las aguas de piscina los siguientes parámetros fisicoquímicos: cloro libre residual, temperatura y pH.
- Buscar si existe, una relación entre la presencia de Pseudomonas aeruginosa con coliformes totales y fecales, así como también con los parámetros fisicoquímicos determinados en este estudio.

IV M E T O D O L O G I A

1. Primera Etapa.

El objetivo de esta 1ª etapa fue el de seleccionar la técnica más idónea, para lo cual se efectuó una revisión bibliográfica de la información referente a los métodos de selección y cuantificación de Pseudomonas aeruginosa en aguas de piscina y otras, de tal manera que pudo conocerse como se ha venido realizando este tipo de análisis, el porque y su eficacia, sin embargo, basandose en el antecedente de que en nuestro país es mínimo lo que se ha hecho al respecto y debido a la importancia que esto representa, se hizo una selección de los métodos que pudieran acoplarse a las condiciones de México; de esta forma se escogieron los métodos de la técnica de Filtro de Membrana (Tabla I), ya que esta nos reduce bastante el tiempo de incubación, nos permite filtrar grandes volúmenes de agua y nos da oportunidad de proponer el método como parámetro bacteriológico de rutina al analizar la calidad del agua de piscinas, a diferencia de la técnica de NMP que como ya se mencionó en los antecedentes, tiene sus desventajas.

Inicialmente se seleccionaron tres fórmulas: la fórmula que fuera de las pioneras para este fin (con ciertas modificaciones al medio basal), la fórmula que lleva las consideraciones y los cambios de los trabajos más recientes, y la fórmula tentativamente estandarizada (Tabla I y Fig. 1).

Por otro lado se consiguió una cepa pura de Pseudomonas aeruginosa, la cual fué necesario resembrarla en Agar Cetrimida (anexo) o Pseudocel Agar cada 8 días, para mantenerla joven y poder utilizarla sin tener otras variaciones.

Con la cepa se probaron diferentes diluciones para determinar cual o cuales serían las más apropiadas en base a que el crecimiento de las colonias fueran cuantificables y bien definidas para poder familiarizarse con las características y comportamiento típico de la especie, tanto en Agar Cetrimida como en los medios que iban a estudiarse.

Las diluciones siempre se manejaron con solución amortiguadora y bajo condiciones de esterilidad (7,12).

En principio, se prepararon los medios mPa C, mPa B y mPa Agar, tal como lo mencionaba la bibliografía (Fig. 1), después se hicieron filtraciones de las diluciones elegidas, trabajando siempre con equipo Millipore estéril y filtros de membrana de 0.45μ de poro. Para cada una de las diluciones elegidas se tomaron volúmenes de 200 ml de solución amortiguadora, y se realizaron filtraciones por triplicado con el objeto de probar cada uno de los medios; después de cada filtración se realizaron dos enjuagues con solución amortiguadora, y las membranas se colocaron sobre los medios respectivos.

Por último, estas cajas fueron marcadas (fecha, medio, dilución, etc.) e incubadas el tiempo que cada medio indica para su posterior lectura (Fig. 2).

Lo anterior se llevó a cabo hasta detectar la dilución más óptima tratando de corregir y mejorar las condiciones en que esto era realizado y de este modo poder eliminar las variables de manejo que pudieran alterar los resultados.

Después de cumplidos los períodos de incubación de cada uno de los medios, se sembraron todas las colonias típicas de las cajas incubadas, de tal manera que pudiera reafirmarse que se trataba del crecimiento de una cepa pura y ver el comportamiento de la misma en dichos medios.

Las resiembras se realizaron en A de King, Agar Cetrimida y

en Infusión Cerebro-Corazón (anexo).

Ahora bien, no obstante que lo anterior representó el comportamiento de la especie en estudio, también era necesario conocer el comportamiento en presencia de otros microorganismos, como ocurre en la naturaleza; en una piscina en este caso, por lo tanto se realizó paralelamente una selección de piscinas en el área metropolitana que por sus características pudieran brindar las condiciones requeridas, pero sin tomar en cuenta aspectos tales como por ejemplo que fueran públicas o privadas, techadas o descubiertas, etc.

Con esta nueva modalidad se establecieron los siguientes tipos de muestras (Fig. 2):

- a) Muestra de agua de la piscina (200 ml)
- b) Muestra de agua de la piscina (200 ml) más inóculo de la dilución (conocida) de la cepa pura
- c) Muestra de solución amortiguadora (200 ml) estéril más la dilución (conocida) de la cepa pura

De esta forma se conocería en a) la densidad real de Pseudomonas aeruginosa en las piscinas, en b) conoceríamos el comportamiento de Pseudomonas aeruginosa con la presencia tanto de otros microorganismos como de los parámetros fisicoquímicos propios de la piscina, esto por si la especie esperada estuviera ausente en la muestra de la piscina. Y en c) verificaríamos primero la eficacia de la elaboración y la selectividad del medio, y segundo se cuantificarían las colonias provenientes del inóculo de la cepa pura.

Las muestras de agua de la piscina se tomaron con botellas de

tapón esmerilado de 1 lt de capacidad, estériles, la muestra se tomó aproximadamente a 30 cm abajo de la superficie del agua. La muestra fué refrigerada hasta su posterior análisis, el cual siempre se realizó antes de que transcurrieran 24 hrs después de haber sido tomadas . El frasco para la muestra fué preparado con 0.1 ml de tiosulfato de sodio para eliminar el cloro libre residual de la piscina y evitar la eliminación de los microorganismos de la muestra (12).

Las pruebas anteriores se hicieron con una serie de piscinas tanto públicas como privadas; se realizaron resiembras de las diferentes colonias que se fueron presentando en el desarrollo del análisis del agua, estas colonias fueron resemebradas en Agar Cetrimida para confirmar o descartar si se trataba de Pseudomonas aeruginosa, también se hicieron resiembras en Agar Nutritivo, A de King, etc. Todas las colonias que resultaron ser positivas en estas pruebas, se enlistaron, tomando en cuenta las diferentes características que cada una de ellas presentaba y según el medio en el que había crecido (ver capítulo V). Las colonias que no fueron positivas, se siguieron resemebrando hasta poder descartarlas totalmente.

Los resultados de los análisis de Pseudomonas aeruginosa en agua de piscina para cada uno de los medios probados se presentan en la Tabla III, representan el número de colonias presentes por cada 200 ml de muestra y fueron considerados suficientes para realizar un primer análisis estadístico.

El análisis estadístico que se utilizó para estos resultados fué un análisis de varianza (ver capítulo VI).

Debido a las observaciones y a los resultados del análisis de varianza se procedió a descartar uno de los medios (ver capítulo VII) y con los otros dos se siguieron haciendo filtraciones, hasta obtener un número de datos suficiente para realizar un segundo análisis estadístico, y así seleccionar el medio más conveniente.

Por otro lado también se observó que el medio mPa C que parecía tener más ventajas sobre el mPa Agar, presentaba una limitación importante, con relación a la caducidad del medio, pues este no se esterilizaba por lo que se probó que resultados daría el medio mPa C si era esterilizado para incrementar su duración, obteniéndose buenos resultados (ver capítulo VII) y por tanto quedándose para los siguientes muestreos el medio mPa C modificado (Tabla II).

2. Segunda Etapa.

El objetivo de esta etapa fué el de conocer la densidad real de Pseudomonas aeruginosa en las piscinas y al mismo tiempo la densidad de coliformes totales y coliformes fecales, así como también los parámetros fisicoquímicos Temperatura, Cloro libre residual y pH y tratar de ver si existía alguna relación entre ellos.

Para alcanzar esta etapa se procedió a muestrear un total de 10 piscinas con 4 estaciones para cada piscina (Fig. 4), en 2 diferentes períodos y analizando cada muestra por triplicado.

Para el análisis de Pseudomonas aeruginosa se siguió con el método mPa C, seleccionado en la 1ª etapa de acuerdo a los resultados del análisis estadístico efectuado y a las conveniencias del mismo.

El procedimiento y preparación de los medios de cultivo fué el presentado en esa 1ª etapa (Tabla II y Fig. 3)

Para la determinación de coliformes totales y fecales, se utilizaron las técnicas estandarizadas de Filtro de Membrana (ver anexo), filtrando volúmenes de 100 ml para cada muestra.

El pH y la Temperatura se determinaron "in situ" (12). El Cloro libre residual lamentablemente no pudo analizarse "in situ"; teniendo que hacerse al llegar al laboratorio, manteniendo las muestras en refrigeración mientras se hacía su determinación, utilizando la técnica que se presenta en el anexo (7)(Fig. 3).

T A B L A I

Medios mPa C, mPa B y mPa Agar de la técnica de Filtro de Membrana.

g/lt	mPa C	mPa B	mPa Agar
L-Lisina HCl	5.0	5.0	5.0
Cloruro de Sodio	5.0	5.0	5.0
Extracto de Levadura	2.0	2.0	2.0
Xilosa	1.25	1.25	1.25
Sacarosa	1.25	1.25	1.25
Lactosa	1.25	1.25	1.25
Rojo de Fenol	0.08	0.08	0.08
Citrato de Amonio Férrico	0.8	0.8	0.8
Tiosulfato de Sodio	5.0	5.0	5.0
Agar	12.0	12.0	15.0
Agua destilada	1000.0 ml	1000.0ml	1000.0 ml
Sulfato de Magnesio	1.5	1.5	1.5
pH	7.2	7.2	6.5-7.1
	no esterilizar	no esterilizar	esterilizar
Ciclohexamida	0.0	0.015	0.150
Sulfapiridina	0.0	0.00176	0.176
Acido Nalidixico	0.037	0.037	0.037
Kanamicina	0.0085	0.008	0.008
Incubación a 41.5°C	24hrs	48hrs	48-72hrs
Caducidad	8 días	8 días	30 días

T A B L A II

Medio mPa C modificado.

	g / lt
α-Lisina HCL	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Extracto de levadura	2.0
Xilosa	1.25
Sacarosa	1.25
Lactosa	1.25
Rojo de fenol	0.08
Citrato de amonio férrico	0.8
Tiosulfato de sodio	5.0
Agar	12.0
Agua destilada	1000.0 ml
Sulfato de magnesio	1.5

Llevar a ebullición moviendo constantemente, ajustar el pH entre 7.5-7.8, esterilizar 10 min. a 15 lb de presión. Enfriar a 55-60°C, agregar:

Acido nalidíxico	0.037
Kanamicina	0.0085
Incubación a 41°C	24 horas
Caducidad	30 días

FIGURA 1

Diagrama de la elaboración de los medios mPa C, mPa B y mPa Agar.

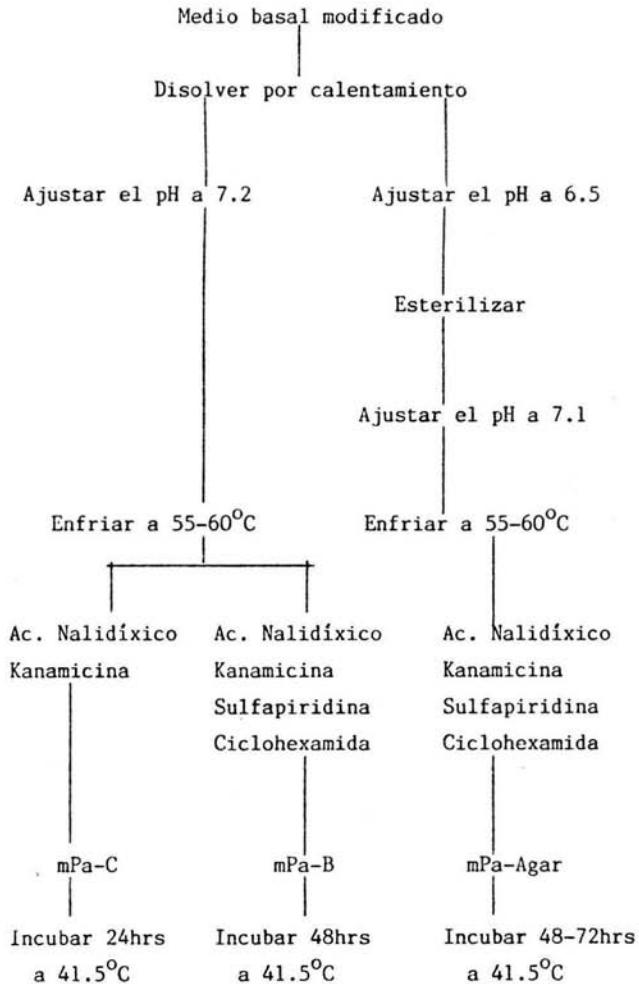
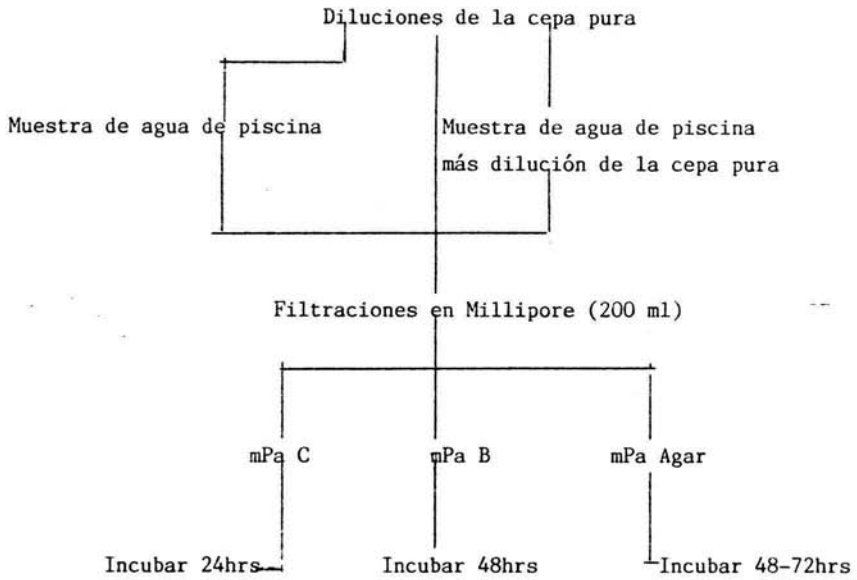


FIGURA 2

Tipos de muestras.



F I G U R A 3

Diagrama del procedimiento de muestreo para la 2ª etapa.

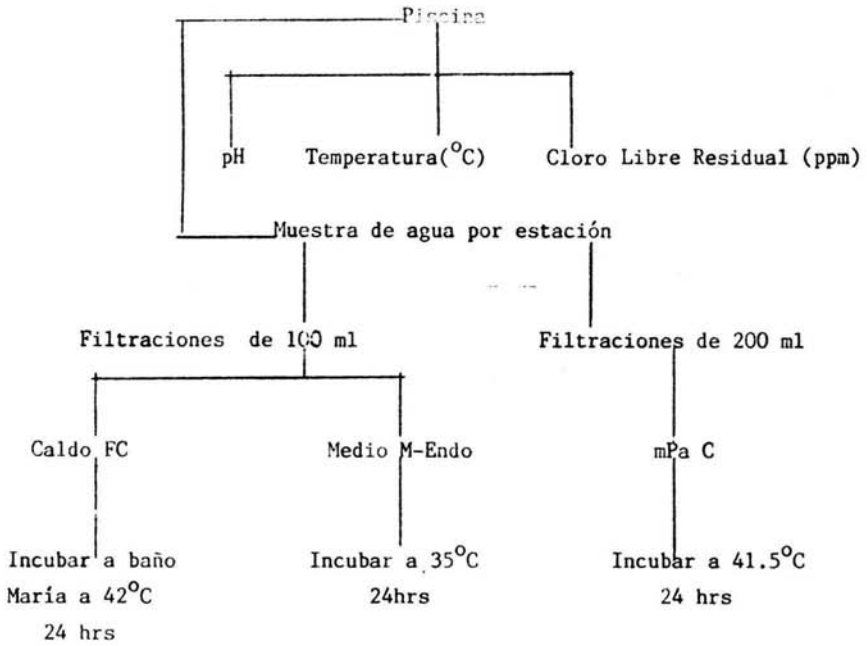
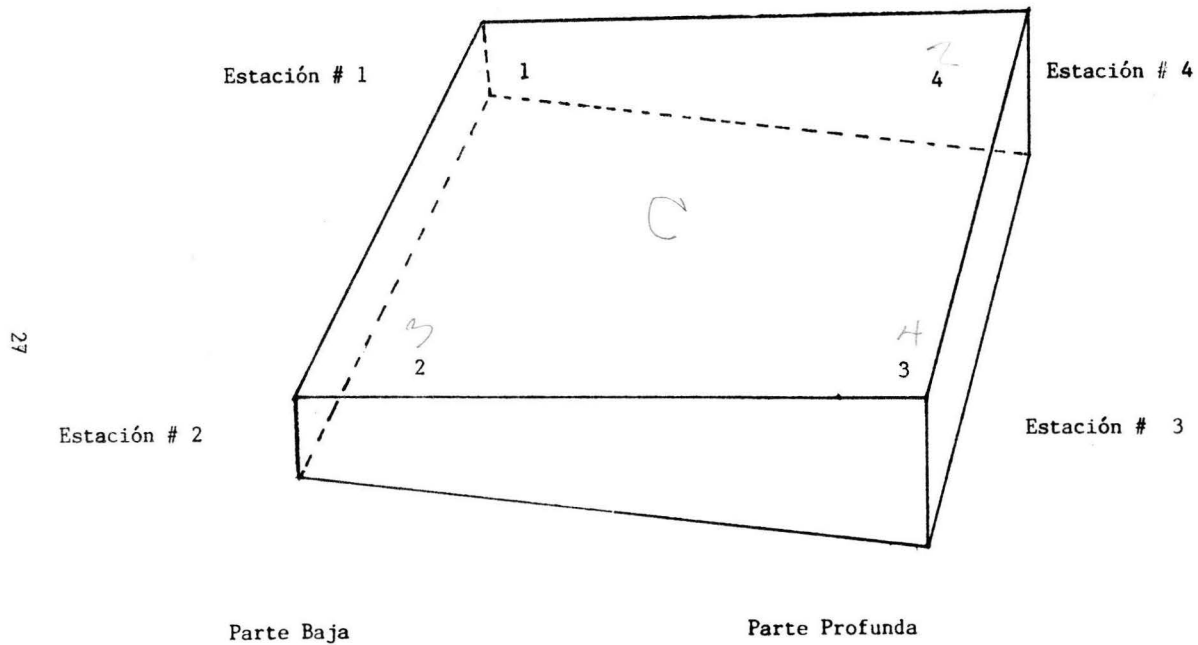


FIGURA 4

Ubicación de las estaciones en las piscinas



V R E S U L T A D O S

Durante la 1ª etapa se obtuvieron los resultados que se presentan en la Tabla III, con los cuales se procedió a eliminar uno de los medios (ver capítulo VII). Posteriormente se continuaron los análisis para poder seleccionar el medio más adecuado, los resultados de estos muestreos se en la Tabla IV.

Por otro lado también se observaron una serie de características morfológicas de las colonias de acuerdo al medio que se utilizaba, dichas características se presentan en la Tabla V.

De las diluciones de la cepa pura probadas, se seleccionaron 10^{-5} y 10^{-6} , las cuales dan un ámbito que varía entre 50 y 10 colonias.

Debido a lo complejo de la elaboración del medio basal y los ajustes para cada medio, los primeros resultados fueron descartados, ya que no se tenía seguridad de los mismos.

Se confirmó la pureza de la cepa pura, tanto en las filtraciones con los medios mPa (s) como con las resiembras de las colonias en agar Cetrimida, A de King, e Infusión de cerebro-corazón.

Al realizar las primeras filtraciones, reportadas en la Tabla III, se observó que es mejor la definición de la morfología colonial cuando se utilizan los medios mPa C y mPa B al poco tiempo de haber sido elaborados (el mismo día o un día después), y en el mPa Agar la morfología siempre es la misma aún cuando este por cumplirse la caducidad.

La coloración de las colonias que crecen en los tres medios va desde el rosa pálido hasta el café oscuro, conforme pasa más tiempo de incubación el color rosado tiende a hacerse café, esto siempre y cuando provengan de la cepa pura, ya que las colonias de Pseudomonas aeruginosa que crecieron de las filtraciones de piscinas, variaban de color en el centro de la colonia y aún toda la colonia (Tabla V).

El color de los medios mPa C y mPa B, es generalmente rojo y el color del mPa Agar es un poco más claro, tendiendo al naranja, pero entre mayor es la cantidad de Pseudomonas aeruginosa que crecen en el medio, mayor es la tonalidad del mismo, llegando incluso al color vino o púrpura para los tres medios.

El color de los medios mPa cambia cuando se presentan otras colonias diferentes a Ps. aeruginosa tornandose amarillo o naranja claro, según la cantidad de colonias que se presenten y entre menor sea la cantidad de colonias de Ps. aeruginosa presentes, mayor es la variedad de colonias negativas y el medio se torna más amarillo.

Cuando la cantidad de Ps. aeruginosa es mayor de 300, se forma una especie de velo rosa sobre el filtro, cubriendolo por completo, esto se presentó en los tres medios siendo de color más intenso en mPa Agar y menos intenso en mPa C. Lo anterior se observó cuando se probaron diluciones como 10^{-2} y 10^{-3} y también en algunas de las filtraciones de la piscina del Deportivo Reynosa y en algunas de Montesur.

Al mismo tiempo se pudo observar que cuando la cantidad de Ps. aeruginosa es muy alta, domina totalmente en el medio, inhibiendo el crecimiento de cualquier otro tipo de bacterias provenientes de la misma muestra. Cuando es un poco menor, las inhibe pero no en su totalidad, aunque si reduce el tamaño de las otras colonias.

Cuando la cantidad de Ps. aeruginosa es baja o menor que la cantidad del otro tipo de bacterias, las colonias de Pseudomonas aeruginosa que crecen en el medio son pocas pero no muy grandes, simulando manchas y se definen muy poco en mPa B, el color de los tres medios se mantiene y solo en la parte de atrás de la caja de Petri se observa alrededor de las colonias negativas se forma una decoloración amarilla del medio, estas colonias suelen ser muy pequeñas, sobre todo en el mPa C. Cuando esto ocurre, en los medios mPa B y mPa Agar se presentan más colonias de este tipo que en el medio mPa C, y también llegan a tener crecimientos de levaduras y hongos.

El crecimiento de la colonia de Pseudomonas aeruginosa, en general, es menor en los medios mPa C y mPa B que en mPa Agar, sin embargo las colonias en este medio llegan a ser tan grandes que se fusionan, perdiéndose la definición colonial de tal manera, que se hacen imposibles de contar.

También se pudo ver que los resultados obtenidos con el mPa C, eran muy parecidos, sino es que iguales a los obtenidos con el mPa B, pero con la diferencia de que las cajas de este último estaban un poco más contaminadas y se dudaba más de las colonias negativas.

Cuando se descartó el medio mPa B y se hicieron ciertas modificaciones a la elaboración del medio mPa C; se esterilizó el medio basal, pero haciéndose un sólo ajuste de pH antes de la esterilización, de tal manera que después de la misma, el pH se mantuviera por arriba de 7, esto mejoró la definición colonial y se eliminó la presencia de algunas levaduras y hongos que solían presentarse en las muestras donde el cloro libre residual estaba por abajo de 1 ppm.

Además, el medio pudo manejarse durante un mes incrementándose así su tiempo de almacenamiento.

Con las filtraciones de la cepa pura, se comprobó que en ambos medios, la definición colonial es mucho mejor cuando la cantidad de Ps. aeruginosa no es muy alta, ya que la colonia es más grande, más circular, de color rosa o café, según el medio, y con el centro muy remarcado y de color más oscuro. En ambos también se corroboró lo del cambio de color del medio según la cantidad de Pseudomonas aeruginosa.

Se realizaron algunas pruebas con las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} (Tabla IV) para ambos medios, y se hicieron lecturas a las 24, 48 y 72 horas; en el medio mPa Agar, se presentó un crecimiento demasiado marcado en la dilución 10^{-6} , de tal manera que las colonias parecían haberse descompuesto debido al color y la forma tan irregular que presentaban.

Las colonias que crecieron de la dilución 10^{-5} , para el mismo medio, fueron de mejor aspecto, mucho mejor definidas y con un crecimiento moderado. Las colonias de las dilución 10^{-4} fueron tantas y tan pequeñas que no podían contarse fácilmente.

En las lecturas de las cajas de mPa Agar que dieron los resultados anteriores, a las 24 horas, las colonias no eran muy visibles, a las 48 horas eran más, de mayor tamaño y de color más fuerte, y a las 72 horas se presentaron como ya se mencionó.

Las colonias de las cajas con mPa C incubadas 24 horas, se presentaron pequeñas, pero bien definidas, de color rosa pálido con centro marcado en color más fuerte, esto se presentó igual en las tres diluciones, las de la dilución 10^{-4} eran un poco más pequeñas.

Las cajas de mPa C, que se incubaron 24 horas más, se presentó contaminación por hongos en la dilución 10^{-5} , en 10^{-4} se mantuvo igual y en 10^{-6} las colonias crecieron tanto que perdieron su forma y pasaron a ser manchas verdosas muy planas, de forma irregular con centros más oscuros. La cantidad de colonias no cambió ni a las 48, ni a las 72 horas, solo el aspecto de las colonias, el color de las mismas, y la cantidad de hongos en el medio.

Cuando se realizaron filtraciones de agua de la misma piscina con los dos medios, se observó que las colonias negativas que crecen no son las mismas.

El análisis estadístico de los datos obtenidos con las filtraciones posteriores realizadas con ambos medios (Tabla IX y X), demostró que no existen diferencias significativas entre ellos.

Para la 2ª etapa se determinaron además de Pseudomonas aeruginosa, los coliformes totales, coliformes fecales y los parámetros fisicoquímicos, pH, Temperatura, Cloro Libre Residual.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla VI.

T A B L A III

Quantificación de *Ps. aeruginosa* con los tres medios mPa.

ALBERCA	FECHA	Nº	mPa C (nº de colonias / 200 ml)	mPa B	mPa Agar	PATRON
Sta. Mónica	030984	01	0	2	5	0
Sta. Mónica	030984	02	2	7	0	0
El Dorado	070984	03	1	0	0	0
El Dorado	070984	04	1	0	0	0
T l a l l i	070984	05	8	4	27	0
T l a l l i	070984	06	300	0	56	0
Montesur	290984	07	0	0	0	0
Montesur	290984	08	0	0	0	0
Mont. + Ino.	290984	09	300	300	300	0
Dilución	290984	10	300	300	300	0
Dilución	290984	11	300	300	300	0
Montesur	011084	12	0	0	0	0
Montesur	011084	13	0	0	0	0
Mont. + Ino.	011084	14	300	300	300	0
Dilución	011084	15	300	300	300	0
Dilución	011084	16	300	300	300	0
La Mansión	071084	17	0	0	0	0
La Mansión	071084	18	0	0	0	0
Reynosa	211084	19	250	300	0	0
Reynosa	211084	20	250	300	21	0
Rey. + Ino.	211084	21	0	1	0	0
Rey. + Ino.	211084	22	0	2	0	0
Dilución	211084	23	15	3	0	0
Dilución	211084	24	2	6	0	0

T A B L A III
(Continuación)

ALBERCA	FECHA	Nº	mPa C (nº de colonias / 200 ml)	mPa B	mPa Agar (nº col. / 200 ml)	PATRON
Reynosa	051184	25	7	0	0	0
Reynosa	051184	26	2	6	4	0
Rey. + Ino.	051184	27	300	2	3	0
Dilución	051184	28	250	250	250	0
Dilución	051184	29	250	250	100	0
Azteca	051184	30	0	0	0	0
Azteca	051184	31	0	0	0	0
Azteca + Ino.	051184	32	2	6	1	0
Dilución	051184	33	1	1	5	0
Dilución	051184	34	0	0	1	0
Reynosa	121184	35	1	0	0	0
Reynosa	121184	36	0	300	0	0
Rey. + Ino.	121184	37	1	1	3	0
Rey. + Ino.	121184	38	2	3	2	0
Dilución	121184	39	1	2	2	0
Dilución	121184	40	1	5	3	0
Reynosa	031284	41	0	1	0	0
Reynosa	031284	42	0	2	0	0
Rey. + Ino.	031284	43	1	1	1	0
Rey. + Ino.	031284	44	0	3	2	0
Dilución	031284	45	1	1	1	0
Dilución	031284	46	0	1	2	0

T A B L A IV

Quantificación de Ps. aeruginosa con dos medios mPa.

ALBERCA	FECHA	Nº	mPa C (nº col/200 ml)	mPa Agar (nº col. /200 ml)	PATRON
Dilución 10 ⁻⁴	210185	47	250	250	0
Dilución 10 ⁻⁴	210185	48	250	250	0
Dilución 10 ⁻⁵	210185	49	55	48	0
Dilución 10 ⁻⁵	210185	50	68	57	0
Dilución 10 ⁻⁶	210185	51	6	6	0
Dilución 10 ⁻⁶	210185	52	6	6	0
Dilución 10 ⁻⁶	290185	53	2	2	0
Dilución 10 ⁻⁶	290185	54	2	2	0
Dilución 10 ⁻⁶	290185	55	1	1	0
Dilución 10 ⁻⁶	290185	56	2	2	0
Dilución 10 ⁻⁶	290185	57	0	0	0
Dilución 10 ⁻⁶	290185	58	0	1	0
Dilución 10 ⁻⁶	290185	59	1	1	0
Dilución 10 ⁻⁶	290185	60	1	3	0
Dilución 10 ⁻⁶	290185	61	0	1	0
Dilución 10 ⁻⁶	290185	62	0	0	0
C. U.	060285	63	0	1	0
C. U.	060285	64	0	1	0
C. U. + Ino.	060285	65	1	5	0
C. U. + Ino.	060285	66	1	2	0
C. U. + Ino.	060285	67	0	0	0
C. U. + Ino.	060285	68	1	0	0
C. U. + Ino.	060285	69	1	0	0
C. U. + Ino.	060285	70	0	6	0
Dilución	060285	71	100	100	0
Dilución	060285	72	250	250	0

T A B L A I V
(Continuación)

ALBERCA	FECHA	Nº	mPa C (nº col./200 ml)	mPa Agar (nº col./200 ml)	PATRON
Montesur	110285	73	0	0	0
Montesur	110285	74	1	1	0
Mont. + Ino.	110285	75	250	250	0
Mont. + Ino.	110285	76	250	250	0
Dilución	110285	77	250	250	0
Dilución	110285	78	70	33	0
C. U.	180285	79	0	0	0
C. U.	180285	80	0	0	0
C. U. + Ino.	180285	81	6	7	0
C. U. + Ino.	180285	82	3	6	0
C. U. + Ino.	180285	83	5	11	0
Dilución	180285	84	19	10	0
Dilución	180285	85	9	54	0
Montesur	260285	85	300	300	0
Montesur	260285	86	300	300	0
Mont. + Ino.	260285	87	300	300	0
Mont. + Ino.	260285	88	300	300	0
Mont. + Ino.	260285	89	300	300	0
Mont. + Ino.	260285	90	300	300	0
Dilución	260285	91	300	300	0
Dilución	260285	92	300	300	0

T A B L A V

Características morfológicas de las colonias de Ps. aeruginosa en los medios
mPa

Medio	Características morfológicas de las colonias		Observaciones
mPa C, 24hrs	Cepa	Color rosa pálido, con o sin centro, pequeñas, circulares, de borde entero, convexas y opacas.	El tamaño fué según la cantidad de colonias presente, entre más, más pequeñas y el centro - nulo, por lo general formando una especie velo.
	Pura		
mPa B, 48hrs	Muestra	Color rosa pálido, a veces sin centro, o con centro café, pequeñas, circulares, borde entero. Convexas y opacas.	El tamaño fué según la cantidad de colonias presente, el color de centro varía según la cantidad de <u>Ps. aeruginosa</u> y cantidad de otras colonias. Dificil de distinguir.
	Piscina	Color café pálido o café rosado, con centro café o verde (según cantidad) circulares, pequeñas, borde entero, convexas y opacas.	
mPa Agar 72 hrs	Cepa	Color café obscuro, con centro café más obscuro, a veces circulares, a veces de forma irregular, convexas.	El tamaño, color y forma fué según la cantidad de colonias presente tanto de <u>Ps. aeruginosa</u> , como de otras.
	Pura		
	Muestra	Color desde café obscuro hasta verde grisáceo, a veces circulares a veces como platas planas (según cantidad)	
	Piscina		

T A B L A VI

Valores físicos, químicos y bacteriológicos de las piscinas muestreadas.

ALBERCA	FECHA	Estación#	pH	Temp. °C	Cl l.r.	Ps. aeruginosa	Col. tot.	Col. Fec.
C. U.	250285	1	7	18	8.0	0	0	0
C. U.	250285	1	7	18	8.0	0	0	0
C. U.	250285	1	7	18	8.0	1	0	0
C. U.	250285	2	7	18	8.0	0	0	0
C. U.	250285	2	7	18	8.0	0	0	0
C. U.	250285	2	7	18	8.0	0	0	0
C. U.	250285	3	7	18	8.0	0	0	0
C. U.	250285	3	7	18	8.0	0	0	0
C. U.	250285	3	7	18	8.0	0	0	0
C. U.	250285	4	7	18	8.0	0	0	0
C. U.	250285	4	7	18	8.0	0	0	0
C. U.	250285	4	7	18	8.0	0	0	0
T l a l l i	260285	1	6.5	18	0.335	0	0	0
T l a l l i	260285	1	6.5	18	0.335	0	0	0
T l a l l i	260285	1	6.5	18	0.335	0	0	0
T l a l l i	260285	2	6.5	18	0.335	0	0	0
T l a l l i	260285	2	6.5	18	0.335	0	0	0
T l a l l i	260285	2	6.5	18	0.335	0	0	0
T l a l l i	260285	3	6.5	18	0.335	0	0	0
T l a l l i	260285	3	6.5	18	0.335	0	0	0
T l a l l i	260285	3	6.5	18	0.335	0	0	0
T l a l l i	260285	4	6.5	18	0.335	0	0	0
T l a l l i	260285	4	6.5	18	0.335	0	0	0
T l a l l i	260285	4	6.5	18	0.335	0	0	0

T A B L A VI
(Continuación)

ALBERCA	FECHA	Estación#	pH	Temp.°C	Cl l.r.	Ps. aeruginosa	Col. Tot.	Col. Fec.
Montesur	040385	1	6.5	29	0.67	300	6	1
Montesur	040385	1	6.5	29	0.67	300	7	12
Montesur	040385	1	6.5	29	0.67	300	1	12
Montesur	040385	2	6.5	29	0.67	300	8	14
Montesur	040385	2	6.5	29	0.67	300	9	14
Montesur	040385	2	6.5	29	0.67	300	1	7
Montesur	040385	3	6.5	29	0.67	300	1	12
Montesur	040385	3	6.5	29	0.67	300	4	14
Montesur	040385	3	6.5	29	0.67	300	6	6
Montesur	040385	4	6.5	29	0.67	300	3	10
Montesur	040385	4	6.5	29	0.67	300	0	5
Montesur	040385	4	6.5	29	0.67	300	5	10
T l a l l i	040385	1	6.5	18	0.335	0	0	0
T l a l l i	040385	1	6.5	18	0.335	0	0	0
T l a l l i	040385	1	6.5	18	0.335	0	0	0
T l a l l i	040385	2	6.5	18	0.335	0	0	0
T l a l l i	040385	2	6.5	18	0.335	0	0	0
T l a l l i	040385	2	6.5	18	0.335	0	0	0
T l a l l i	040385	3	6.5	18	0.335	0	0	0
T l a l l i	040385	3	6.5	18	0.335	0	0	0
T l a l l i	040385	3	6.5	18	0.335	0	0	0
T l a l l i	040385	4	6.5	18	0.335	0	0	0
T l a l l i	040385	4	6.5	18	0.335	0	0	0
T l a l l i	040385	4	6.5	18	0.335	0	0	0

T A B L A VI
(Continución)

ALBERCA	FECHA	Estación#	pH	Temp°C	Cl	l.r. Ps. aeruginosa	Col. Tot.	Col. Fec.
Montesur	110385	1	6.5	28	5.03	300	5	14
Montesur	110385	1	6.5	28	5.03	300	5	14
Montesur	110385	1	6.5	28	5.03	300	0	1
Montesur	110385	2	6.5	28	5.03	300	6	20
Montesur	110385	2	6.5	28	5.03	300	8	22
Montesur	110385	2	6.5	28	5.03	300	10	18
Montesur	110385	3	6.5	28	5.03	300	2	12
Montesur	110385	3	6.5	28	5.03	300	5	18
Montesur	110385	3	6.5	28	5.03	300	6	10
Montesur	110385	4	6.5	28	5.03	300	4	14
Montesur	110385	4	6.5	28	5.03	300	4	14
Montesur	110385	4	6.5	28	5.03	300	1	3
Tlanepantla	110385	1	6.5	20	4.02	2	0	1
Tlanepantla	110385	1	6.5	20	4.02	4	0	1
Tlanepantla	110385	1	6.5	20	4.02	0	0	0
Tlanepantla	110385	2	6.5	20	4.02	6	0	0
Tlanepantla	110385	2	6.5	20	4.02	8	0	0
Tlanepantla	110385	2	6.5	20	4.02	6	0	0
Tlanepantla	110385	3	6.5	20	4.02	1	0	1
Tlanepantla	110385	3	6.5	20	4.02	0	0	1
Tlanepantla	110385	3	6.5	20	4.02	0	0	0
Tlanepantla	110385	4	6.5	20	4.02	0	0	0
Tlanepantla	110385	4	6.5	20	4.02	6	3	1
Tlanepantla	110385	4	6.5	20	4.02	4	3	0

T A B L A VI
(Continuación)

ALBERCA	FECHA	Estación#	pH	Temp. °C	Cl I. r.	Ps. aeruginosa	Col. Tot.	Col. Fec.
Tlanepantla	180385	1	6.5	21	4.0	0	0	0
Tlanepantla	180385	1	6.5	21	4.0	1	0	0
Tlanepantla	180385	1	6.5	21	4.0	0	0	0
Tlanepantla	180385	2	6.5	21	4.0	2	0	0
Tlanepantla	180385	2	6.5	21	4.0	1	0	0
Tlanepantla	180385	2	6.5	21	4.0	1	0	0
Tlanepantla	180385	3	6.5	21	4.0	0	0	0
Tlanepantla	180385	3	6.5	21	4.0	0	0	0
Tlanepantla	180385	3	6.5	21	4.0	0	0	0
Tlanepantla	180385	4	6.5	21	4.0	0	0	0
Tlanepantla	180385	4	6.5	21	4.0	0	0	0
Tlanepantla	180385	4	6.5	21	4.0	0	0	0
Parque Calles	250385	1	6.5	18	0.0	0	0	0
Parque Calles	250385	1	6.5	18	0.0	0	0	0
Parque Calles	250385	1	6.5	18	0.0	0	0	0
Parque Calles	250385	2	6.5	18	0.0	0	0	0
Parque Calles	250385	2	6.5	18	0.0	0	0	0
Parque Calles	250385	2	6.5	18	0.0	0	0	0
Parque Calles	250385	3	6.5	18	0.0	0	0	0
Parque Calles	250385	3	6.5	18	0.0	0	0	0
Parque Calles	250385	3	6.5	18	0.0	0	0	0
Parque Calles	250385	4	6.5	18	0.0	0	0	0
Parque Calles	250385	4	6.5	18	0.0	0	0	0
Parque Calles	250385	4	6.5	18	0.0	0	0	0

T A B L A VI
(Continuación)

ALBERCA	FECHA	Estación#	pH	Temp. °C	Cl l.r.	Ps. aeruginosa	Col. Tot.	Col. Fec.
C. U.	250385	1	7	18	0.2	9	0	0
C. U.	250385	1	7	18	0.2	11	0	0
C. U.	250385	1	7	18	0.2	20	0	0
C. U.	250385	2	7	18	0.2	60	0	0
C. U.	250385	2	7	18	0.2	45	0	0
C. U.	250385	2	7	18	0.2	39	0	0
C. U.	250385	3	7	18	0.2	56	0	0
C. U.	250385	3	7	18	0.2	60	0	0
C. U.	250385	3	7	18	0.2	28	0	0
C. U.	250385	4	7	18	0.2	15	0	0
C. U.	250385	4	7	18	0.2	5	0	0
C. U.	250385	4	7	18	0.2	15	0	0
Villas	230485	1	7.8	26	1.775	0	0	0
Villas	230485	1	7.8	26	1.775	0	0	0
Villas	230485	1	7.8	26	1.775	0	0	0
Villas	230485	2	7.8	26	1.775	0	0	0
Villas	230485	2	7.8	26	1.775	0	0	0
Villas	230485	2	7.8	26	1.775	0	0	0
Villas	230485	3	7.8	26	1.775	0	0	0
Villas	230485	3	7.8	26	1.775	0	0	0
Villas	230485	3	7.8	26	1.775	0	0	0
Villas	230485	4	7.8	26	1.775	0	5	0
Villas	230485	4	7.8	26	1.775	0	5	0
Villas	230485	4	7.8	26	1.775	0	0	1

T A B L A VI
(Continuación)

ALBERCA	FECHA	Estación#	pH	Temp. °C	CL l.r.	Ps. aeruginosa	Col. Tot.	Col. Fec.
San Angel	130585	1	7	26	4.9	0	7	6
San Angel	130585	1	7	26	4.9	0	3	1
San Angel	130585	1	7	26	4.9	0	10	8
San Angel	130585	2	7	26	4.9	0	8	11
San Angel	130585*	2	7	26	4.9	0	15	11
San Angel	130585	2	7	26	4.9	0	7	8
San Angel	130585	3	7	26	4.9	0	1	2
San Angel	130585	3	7	26	4.9	0	1	3
San Angel	130585	3	7	26	4.9	0	0	0
San Angel	130585	4	7	26	4.9	0	0	0
San Angel	130585	4	7	26	4.9	0	0	1
San Angel	130585	4	7	26	4.9	0	0	0
Sta. Mónica	290585	1	7	29	3.897	0	0	0
Sta. Mónica	290585	1	7	29	3.897	0	0	0
Sta. Mónica	290585	1	7	29	3.897	0	0	0
Sta. Mónica	290585	2	7	29	3.897	0	0	0
Sta. Mónica	290585	2	7	29	3.897	0	0	0
Sta. Mónica	290585	2	7	29	3.897	0	0	0
Sta. Mónica	290585	3	7	29	3.897	0	0	0
Sta. Mónica	290585	3	7	29	3.897	0	0	0
Sta. Mónica	290585	3	7	29	3.897	0	0	0
Sta. Mónica	290585	4	7	29	3.897	0	0	0
Sta. Mónica	290585	4	7	29	3.897	0	0	0
Sta. Mónica	290585	4	7	29	3.8970	0	0	0

T A B L A VI
(Continuación)

ALBERCA	FECHA	Estación#	pH	Temp. °C	Cl l.r.	Ps. aeruginosa	Col. tot.	Col. fec.
Reynosa	160685	1	6.5	25	0.0	0	300	32
Reynosa	160685	1	6.5	25	0.0	0	300	32
Reynosa	160685	1	6.5	25	0.0	1	300	27
Reynosa	160685	2	6.5	25	0.0	0	300	42
Reynosa	160685	2	6.5	25	0.0	0	300	40
Reynosa	160685	2	6.5	25	0.0	0	300	72
Reynosa	160685	3	6.5	25	0.0	0	300	8
Reynosa	160685	3	6.5	25	0.0	0	300	2
Reynosa	160685	3	6.5	25	0.0	1	300	15
Reynosa	160685	4	6.5	25	0.0	0	300	15
Reynosa	160685	4	6.5	25	0.0	0	300	0
Reynosa	160685	4	6.5	25	0.0	1	0	1
Villas	160685	1	7	27	1.366	0	0	0
Villas	160685	1	7	27	1.366	0	0	0
Villas	160685	1	7	27	1.366	0	0	0
Villas	160685	2	7	27	1.366	0	8	0
Villas	160685	2	7	27	1.366	0	5	0
Villas	160685	2	7	27	1.366	0	1	0
Villas	160685	3	7	27	1.366	0	4	0
Villas	160685	3	7	27	1.366	0	0	0
Villas	160685	3	7	27	1.366	0	4	0
Villas	160685	4	7	27	1.366	0	4	0
Villas	160685	4	7	27	1.366	0	0	0
Villas	160685	4	7	27	1.366	0	0	0

T A B L A VI
(Continuación)

ALBERCA	FECHA	Estación#	pH	Temp. °C	Cl	l.r.	Ps. aeruginosa	Col. Tot.	Col. Fec.
Reynosa	230685	1	7	16	0		7	7	6
Reynosa	230685	1	7	16	0		2	13	2
Reynosa	230685	1	7	16	0		9	15	1
Reynosa	230685	2	7	16	0		1	5	0
Reynosa	230685	2	7	16	0		0	7	0
Reynosa	230685	2	7	16	0		1	3	0
Reynosa	230685	3	7	16	0		2	5	4
Reynosa	230685	3	7	16	0		0	4	14
Reynosa	230685	3	7	16	0		2	11	2
Reynosa	230685	4	7	16	0		0	1	0
Reynosa	230685	4	7	16	0		0	0	0
Reynosa	230685	4	7	16	0		0	1	0
La Mansión	230685	1	7	22	1.5		0	0	3
La Mansión	230685	1	7	22	1.5		0	0	0
La Mansión	230685	1	7	22	1.5		0	0	0
La Mansión	230685	2	7	22	1.5		0	4	0
La Mansión	230685	2	7	22	1.5		0	0	0
La Mansión	230685	2	7	22	1.5		0	0	0
La Mansión	230685	3	7	22	1.5		0	0	0
La Mansión	230685	3	7	22	1.5		0	0	0
La Mansión	230685	3	7	22	1.5		0	0	0
La Mansión	230685	4	7	22	1.5		0	0	0
La Mansión	230685	4	7	22	1.5		0	1	1
La Mansión	230685	4	7	22	1.5		0	1	1

T A B L A VI
(Continuación)

ALBERCA	FECHA	Estación#	pH	Temp. °C	Cl l.r.	Ps. aeruginosa	Col. lot.	Col. Fec.
Parque Calles	160685	1	6.5	25	0.3415	0	300	13
Parque Calles	160685	1	6.5	25	0.3415	0	300	0
Parque Calles	160685	1	6.5	25	0.3415	0	300	7
Parque Calles	160685	2	6.5	25	0.3415	0	300	8
Parque Calles	160685	2	6.5	25	0.3415	0	300	0
Parque Calles	160685	2	6.5	25	0.3415	0	300	0
Parque Calles	160685	3	6.5	25	0.3415	0	300	0
Parque Calles	160685	3	6.5	25	0.3415	0	300	0
Parque Calles	160685	3	6.5	25	0.3415	0	300	0
Parque Calles	160685	4	6.5	25	0.3415	0	300	3
Parque Calles	160685	4	6.5	25	0.3415	0	300	0
Parque Calles	160685	4	6.5	25	0.3415	0	300	0
A z t e c a	230685	1	7	21	8.8	0	0	0
A z t e c a	230685	1	7	21	8.8	0	0	0
A z t e c a	230685	1	7	21	8.8	0	0	0
A z t e c a	230685	2	7	21	8.8	0	0	0
A z t e c a	230685	2	7	21	8.8	0	0	0
A z t e c a	230685	2	7	21	8.8	0	0	0
A z t e c a	230685	3	7	21	8.8	0	0	0
A z t e c a	230685	3	7	21	8.8	0	0	0
A z t e c a	230685	3	7	21	8.8	0	0	0
A z t e c a	230685	4	7	21	8.8	0	0	0
A z t e c a	230685	4	7	21	8.8	0	0	0
A z t e c a	230685	4	7	21	8.8	0	0	0

T A B L A VI
(Continuación)

ALBERCA	FECHA	Estación#	pH	Temp.°C	Cl l.r.	Ps. aeruginosa	Col. tot.	Col. Fec.
Sta. Mónica	300685	1	7	29	4	0	0	0
Sta. Mónica	300685	1	7	29	4	0	0	0
Sta. Mónica	300685	1	7	29	4	0	0	0
Sta. Mónica	300685	2	7	29	4	0	0	0
Sta. Mónica	300685	2	7	29	4	0	0	0
Sta. Mónica	300685	2	7	29	4	0	0	0
Sta. Mónica	300685	3	7	29	4	0	0	0
Sta. Mónica	300685	3	7	29	4	0	0	0
Sta. Mónica	300685	3	7	29	4	0	0	0
Sta. Mónica	300685	4	7	29	4	0	0	0
Sta. Mónica	300685	4	7	29	4	0	0	0
Sta. Mónica	300685	4	7	29	4	0	0	0
A z t e c a	300685	1	7	25	8.8	0	0	0
A z t e c a	300685	1	7	25	8.8	0	0	0
A z t e c a	300685	1	7	25	8.8	0	0	0
A z t e c a	300685	2	7	25	8.8	0	0	0
A z t e c a	300685	2	7	25	8.8	0	0	0
A z t e c a	300685	2	7	25	8.8	0	0	0
A z t e c a	300685	3	7	25	8.8	0	0	0
A z t e c a	300685	3	7	25	8.8	0	0	0
A z t e c a	300685	3	7	25	8.8	0	0	0
A z t e c a	300685	4	7	25	8.8	0	0	0
A z t e c a	300685	4	7	25	8.8	0	0	0
A z t e c a	300685	4	7	25	8.8	0	0	0

T A B L A VI
(Continuación)

ALBERCA	FECHA	Estación#	pH	Temp. °C	Cl l.r.	Ps. aeruginosa	Col. Tot.	Col. Fec.
La Mansión	300685	1	7	25	1.5	0	0	1
La Mansión	300685	1	7	25	1.5	0	0	0
La Mansión	300685	1	7	25	1.5	0	0	1
La Mansión	300685	2	7	25	1.5	0	0	0
La Mansión	300685	2	7	25	1.5	0	2	0
La Mansión	300685	2	7	25	1.5	0	3	0
La Mansión	300685	3	7	25	1.5	0	0	0
La Mansión	300685	3	7	25	1.5	0	0	0
La Mansión	300685	3	7	25	1.5	0	0	0
La Mansión	300685	4	7	25	1.5	0	0	0
La Mansión	300685	4	7	25	1.5	0	1	0
La Mansión	300685	4	7	25	1.5	0	1	0

Cl l.r. = Cloro libre residual

Ps.aeruginosa (nº de colonias por 200ml)

Col. Tot. = Coliformes Totales (nº de colonias por 100 ml)

Col. Fec. = Coliformes Fecales (nº de colonias por 100 ml)

VI EVALUACION DE RESULTADOS

Para la 1ª etapa, cuando se obtuvieron 46 análisis con los tres medios propuestos, se consideró suficiente la información como para efectuar un análisis de varianza para lo cual se planteó la Hipótesis nula de "No hay diferencias significativas entre los tres medios utilizados". Para esto, la ordenación de datos se presenta en la Tabla VII, incrementándosele un valor de 10 a cada resultado real, para fines estadísticos.

Los resultados obtenidos para los grados de libertad, suma de cuadrados, cuadrado medio y F, se presentan en la Tabla VIII, obteniéndose al final de los cálculos que la F experimental es menor que la F de Tablas para un nivel de confianza de 95% y por lo tanto se acepta la Hipótesis de que "No hay diferencias significativas entre los medios probados".

Con estos resultados se procedió a eliminar el método mPa B debido a que era el que presentaba algunas desventajas como las de leer las colonias (Tabla V), tiempo de incubación, etc. (ver capítulo VII).

Sin embargo de los dos medios restantes dada las ventajas que presentaba el mPa C sobre el propuesto tentativamente por los Métodos Estandar (7), se quiso tener una mayor confianza para su selección por lo que se siguió analizando más muestras, pero solo con los dos medios seleccionados, obteniéndose un total de 92 muestras (incluyendo las 46 primeras, de cuando se analizaron los tres medios).

Se volvió a efectuar un análisis de varianza, solo que ahora la Hipótesis nula fué "No hay diferencia significativa entre los dos medios usados".

Para fines estadísticos se procedió a sumarles un valor de 10 a los valores reales (Tabla IX), y se volvió a calcular los grados de libertad, suma de cuadrados, cuadrado medio y la F (Tabla X). Como

la F experimental fué menor que la F de Tablas para un nivel de confianza de 95% (14), se volvió a aceptar la Hipótesis de "No hay diferencias significativas entre los dos medios probados y por lo tanto ahora sí, se procedió a seleccionar el medio mPa C como el que se iba a utilizar en la 2ª parte del estudio.

En la 2ª etapa, se ordenaron los datos de Pseudomonas aeruginosa, pH, Temperatura y Cloro libre residual como se ve en la Tabla XI, y se procedió a graficar Pseudomonas aeruginosa vs Temperatura (Fig. 5 y 6) para tener una mejor visión de lo que sucedía. Lo mismo se hizo en el caso de los datos de Coliformes totales, fecales y Ps. aeruginosa y se graficó número de muestra vs Ps. aeruginosa y coliformes totales (Figs. 7, 8) y número de muestra vs Ps. aeruginosa y coliformes fecales (Figs. 9, 10) (Tabla XII), para los ámbitos de pH resultantes.

T A B L A VII
 Ordenación de datos para el 1er análisis de varianza.

Nº	mPa C	mPa B	mPa Agar	mPa C ²	mPa B ²	mPa Agar ²
1	47	91	10	2209	8281	100
2	105	33	10	11025	1089	100
3	12	33	10	144	1089	100
4	10	12	15	100	144	225
5	12	17	10	144	289	100
6	15	13	32	225	169	1024
7	18	14	37	324	196	1369
8	310	10	66	96100	100	4356
9	11	10	10	121	100	100
10	10	10	10	100	100	100
11	10	10	10	100	100	100
12	10	10	10	100	100	100
13	310	310	310	96100	96100	96100
14	310	310	310	96100	96100	96100
15	310	310	310	96100	96100	96100
16	10	10	10	100	100	100
17	10	10	10	100	100	100
18	260	310	10	67600	96100	100
19	260	310	41	67600	96100	1681
20	10	11	10	100	121	100
21	10	12	10	100	144	100
22	25	13	10	625	169	100
23	12	16	10	144	256	100
24	17	10	13	289	100	169
25	12	16	14	144	256	196
26	310	12	13	96100	144	169
27	260	250	260	67600	62500	67600
28	260	255	250	67600	65025	62500
29	260	260	110	67600	67600	12100
30	10	10	10	100	100	100
31	10	10	10	100	100	100

T A B L A VII
(Continuación)

Nº	mPa C	mPa B	mPa Agar	mPa C ²	mPa B ²	mPa Agar ²
32	12	16	11	144	256	121
33	11	11	15	121	121	225
34	10	10	11	100	100	121
35	11	10	10	121	100	100
36	10	310	10	100	96100	100
37	11	11	13	121	121	169
38	12	13	12	144	169	144
39	11	12	12	121	144	144
40	11	15	13	121	225	169
41	10	11	10	100	121	100
42	10	12	10	100	144	100
43	11	11	11	121	121	121
44	10	12	13	100	144	169
45	11	11	11	121	121	121
46	10	11	12	100	121	144
Σ	3397	3184	2125	836629	787080	443437

Nota: Para fines estadísticos, a todos los valores reales les ha sido sumado un valor de 10.

T A B L A VIII

1er. ANALISIS DE VARIANZA

Fuente	GL	SC	CM	F. exp.	95% N C F. de Tablas
Columna	2	20180.87	10090.435	0.90	3.00
Error	135	1497730.3	11094.298		
Total	137	1517911.2	11079.643		

GL = Grados de Libertad

SC = Suma de Cuadrados

CM = Cuadrado Medio

Como la F experimental es menor que la F de las tablas para un nivel de confianza de 95%, se acepta la hipótesis de que no hay diferencia significativa entre los medios probados (13,14).

T A B L A IX

Ordenación de datos para el 2º análisis de varianza.

Nº	mPa C	mPa Agar	mPa C ²	mPa Agar ²
47	260	260	67600	67600
48	260	260	67600	67600
49	65	58	4225	3364
50	78	67	6084	4489
51	16	16	256	256
52	16	16	256	256
53	12	12	144	144
54	12	12	144	144
55	11	11	121	121
56	12	12	144	144
57	10	10	100	100
58	10	11	100	121
59	11	11	121	121
60	11	13	121	169
61	10	11	100	121
62	10	11	100	121
63	10	11	100	121
64	10	11	100	121
65	110	110	12100	12100
66	260	260	67600	67600
67	11	15	121	225
68	11	12	121	144
69	10	10	100	100
70	11	10	121	100
71	11	10	121	100
72	10	16	100	256
73	10	10	100	100
74	11	11	121	121

T A B L A IX
(Continuación)
mPa Agar

Nº	mPa C	mPa Agar	mPa C ²	mPa Agar ²
75	260	260	67600	67600
76	80	43	6400	1849
77	260	260	67600	67600
78	260	260	67600	67600
79	10	10	100	100
80	10	10	100	100
81	29	20	841	400
82	19	64	361	4096
83	16	17	256	289
84	13	16	169	256
85	15	21	225	441
86	310	310	96100	96100
87	310	310	96100	96100
88	310	310	96100	96100
89	310	310	96100	96100
90	310	310	96100	96100
91	310	310	96100	96100
92	310	310	96100	96100
Σ	7828	6553	61277600	42941800

Nota: Para fines estadísticos a todos los valores reales les ha sido sumado un valor de 10.

T A B L A X
2º ANALISIS DE VARIANZA

Fuente	GL	SC	CM	F. exp.	95% N C F. de Tablas
Columna	1	8835.805	8835.805	0.68	3.84
Error	181	2368209.1	13084.028		
Total	183	2377045.4	12989.319		

GL = Grados de Libertad
 SC = Suma de Cuadrados
 CM = Cuadrado Medio

Como la F experimental es menor que la F de las tablas para un nivel de confianza de 95%, se acepta la hipótesis de que no hay diferencia significativa entre los medios probados (13,14).

T A B L A XI

Parámetros fisicoquímicos y *Ps.aeruginosa* (Promedio por alberca)

pH	Temp. °C	<i>Ps.aeruginosa</i>	Cl 1.r.
	18	0	0.335
	18	0	0.335
	18	0	0.0
	20	3	4.02
6.5	21	0.31	4
	25	0	0.3415
	25	0.25	0
	28	300	5.03
	29	300	0.67
	16	2.5	0
	18	0	8
	18	30.25	0.2
	21	0	8.8
	22	0	1.5
	25	0	8.8
7 - 7.8	25	0	1.5
	26	0	1.775
	27	0	1.366
	29	0	3.897
	29	0.87	4

— 87.5
 — 7.6
 — 8

21°
 22°
 20°

T A B L A XII

Datos de parámetros fisicoquímicos y de las medianas de los triplicados de las pruebas bacteriológicas

pH	Temp.°C	<u>Pa. aeruginosa</u> (medianas tripl.)	Cl.l.r (ppm)	Coliformes T. (medianas tripl.)	Coliformes F. (medianas tripl.)
6.5	18	0	0.335	0	0
6.5	18	0	0.335	0	0
6.5	18	0	0.335	0	0
6.5	18	0	0.335	0	0
6.5	18	0	0.335	0	0
6.5	18	0	0.335	0	0
6.5	18	0	0.335	0	0
6.5	18	0	0.335	0	0
6.5	18	0	0.0	0	0
6.5	18	0	0.0	0	0
6.5	18	0	0.0	0	0
6.5	18	0	0.0	0	0
6.5	20	1	4.02	0	1
6.5	20	2	4.02	0	1
6.5	20	4	4.02	3	0
6.5	20	6	4.02	0	0
6.5	21	0	4	0	0
6.5	21	0	4	0	0
6.5	21	1	4	0	0
6.5	21	1	4	0	0
6.5	25	0	0.3415	300	7
6.5	25	0	0.3415	300	0
6.5	25	0	0.3415	300	0
6.5	25	0	0.3415	300	0

T A B L A XII

(Continuación)

pH	Temp.°C	<u>Ps.aeruginosa</u> (medianas tripl.)	<u>Cl.l.r.</u> (ppm)	<u>Coliformes T.</u> (medianas tripl.)	<u>Coliformes F.</u> (medianas tripl.)
6.5	25	0	0	300	32
6.5	25	0	0	300	42
6.5	25	1	0	300	8
6.5	25	1	0	300	1
6.5	28	300	5.03	4	14
6.5	28	300	5.03	5	12
6.5	28	300	5.03	5	14
6.5	28	300	5.03	8	20
6.5	29	300	0.67	3	10
6.5	29	300	0.67	4	12
6.5	29	300	0.67	6	12
6.5	29	300	0.67	8	14
7.0	16	0	0	1	0
7.0	16	1	0	13	0
7.0	16	2	0	5	4
7.0	16	7	0	1	2
7.0	18	0	8	0	0
7.0	18	0	8	0	0
7.0	18	0	8	0	0
7.0	18	1	8	0	0
7.0	18	11	0.2	0	0
7.0	18	15	0.2	0	0
7.0	18	39	0.2	0	0
7.0	18	56	0.2	0	0
7.0	21	0	8.8	0	0
7.0	21	0	8.8	0	0
7.0	21	0	8.8	0	0
7.0	21	0	8.8	0	0
7.0	22	0	1.5	0	0
7.0	22	0	1.5	0	0

T A B L A XII
(Continuación)

pH	Temp. °C	<u>Ps.aeruginosa</u> (medianas tripl.)	Cl.l.r. (ppm)	Coliformes T. (medianas tripl.)	Coliformes F. (medianas tripl.)
7.0	22	0	1.5	0	0
7.0	22	0	1.5	1	1
7.0	25	0	8.8	0	0
7.0	25	0	8.8	0	0
7.0	25	0	8.8	0	0
7.0	25	0	8.8	0	0
7.0	25	0	1.5	0	0
7.0	25	0	1.5	0	1
7.0	25	0	1.5	1	0
7.0	25	0	1.5	2	0
7.0	27	0	1.366	0	0
7.0	27	0	1.366	4	0
7.0	27	0	1.366	4	0
7.0	27	0	1.366	5	0
7.0	29	0	3.897	0	0
7.0	29	0	3.897	0	0
7.0	29	0	3.897	0	0
7.0	29	0	3.897	0	0
7.0	29	0	4.0	0	0
7.0	29	0	4.0	0	0
7.0	29	1	4.0	0	0
7.0	29	2	4.0	0	0
7.8	26	0	1.775	0	0
7.8	26	0	1.775	0	0
7.8	26	0	1.775	0	0
7.8	26	0	1.775	5	0

(medianas tripl.) = medianas de los triplicados

Cl.l.r. = Cloro libre residual

FIGURA 5

Relación de *Ps. aeruginosa* vs la Temperatura del agua de las piscinas y a pH 6.5.

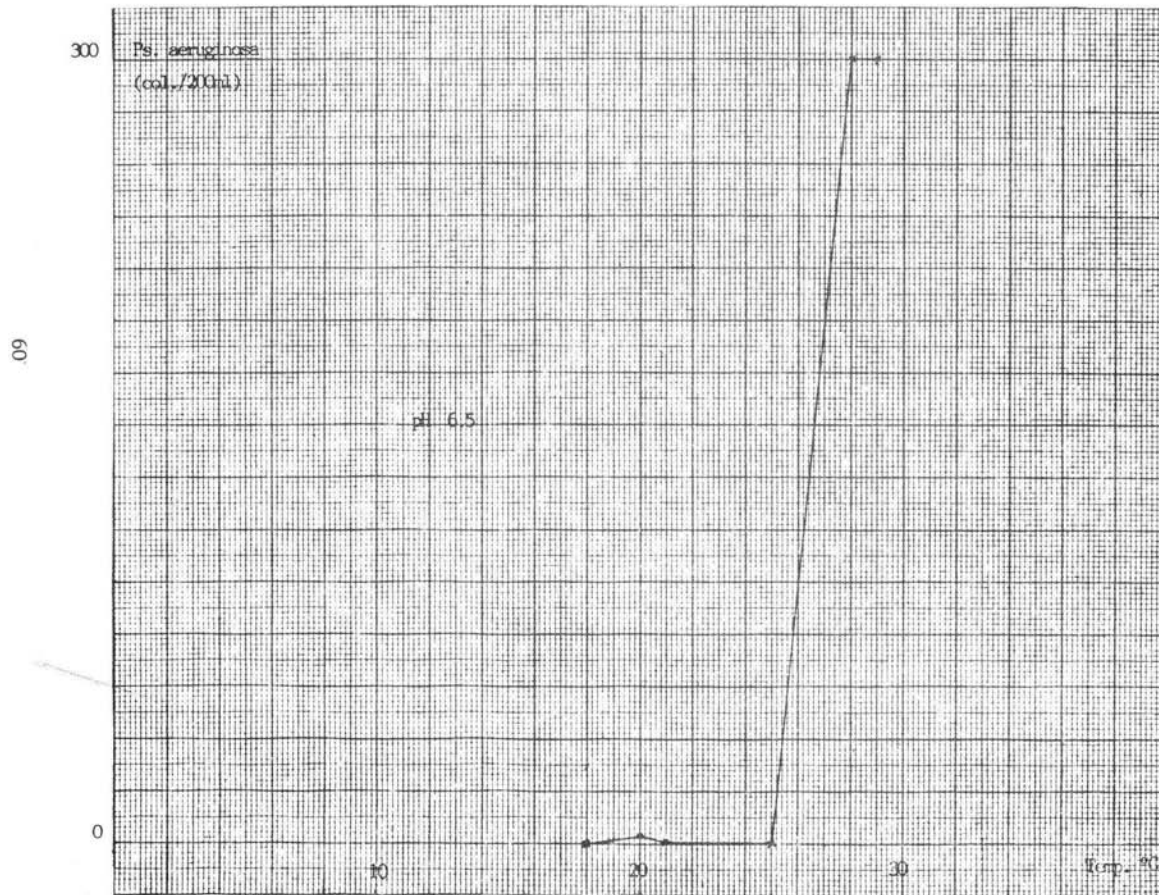


FIGURA 6

Relación de Ps.aeruginosa vs la Temperatura del agua de las piscinas y a pH 7-7.8.

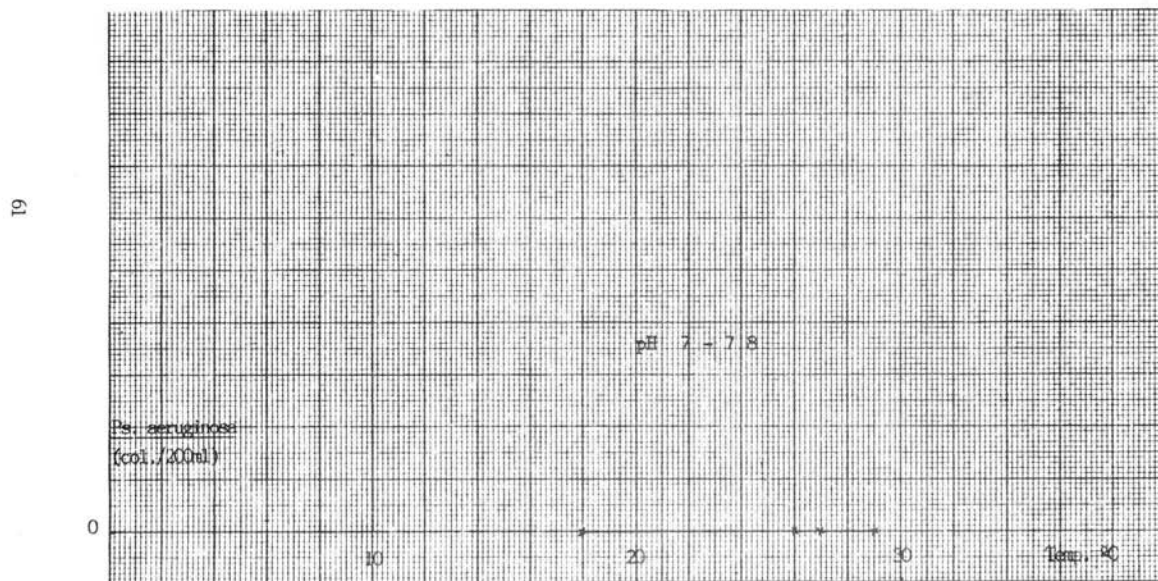


FIGURA 7

Relación de *Ps. aeruginosa* y coliformos totales a diferentes temperaturas y a pH 6.5.

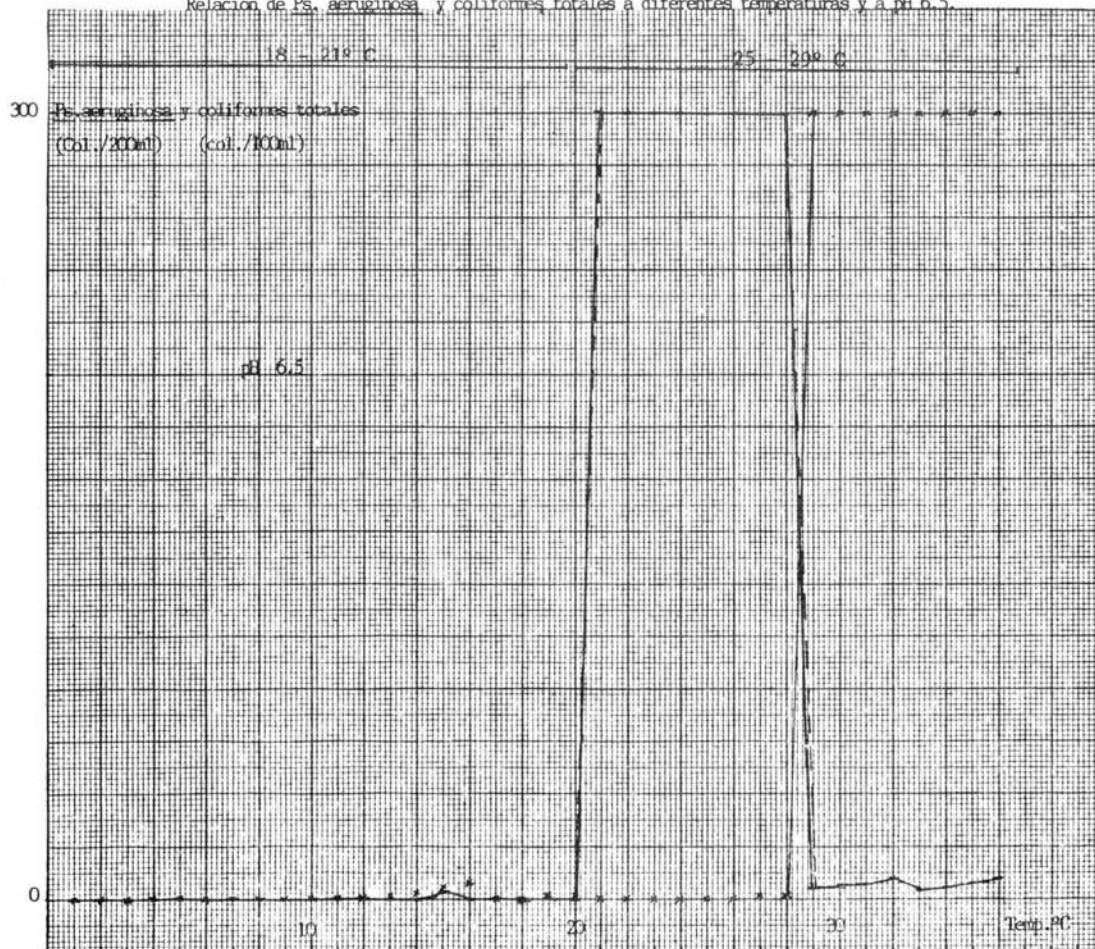


FIGURA 8

Relación de *Ps. aeruginosa* y coliformes totales a diferentes temperaturas y a pH 7-7.8.

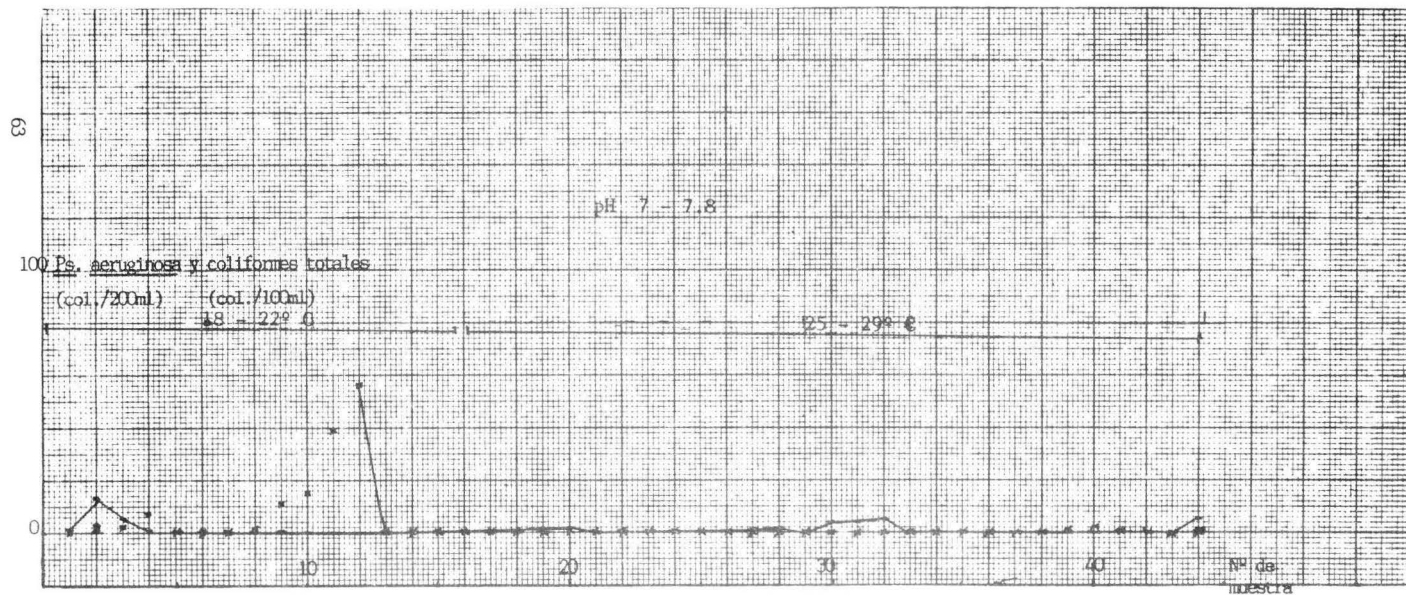


FIGURA 9

Relación de *Ps. aeruginosa* y coliformes fecales a diferentes temperaturas y a pH 6.5.



FIGURA 10

Relación de Ps. aeruginosa y coliformes fecales a diferentes temperaturas y a pH 7-7.8.



VII DISCUSION DE RESULTADOS

1ª Etapa.

Después de haber probado los tres medios, llevando a cabo las modificaciones o diferencias que la bibliografía recomendaba, se puede decir que los tres, utilizan un medio basal semejante, y solo cambian en la cantidad de agar para el mPa Agar (Tabla I).

A diferencia de lo que menciona la bibliografía sobre la esterilización, para las condiciones en que fueron manejados los medios, se demostró que la esterilización del medio basal para mPa C y mPa B, no solo aumenta la caducidad del medio, sino que también mejora la definición colonial, tal vez por la eliminación de posibles bacterias provenientes del ambiente al momento de elaborar el medio, o en el manejo del mismo.

En el medio mPa Agar el ajuste de pH que recomienda la bibliografía, antes y después de la esterilización es de 6.5 y 7.1 respectivamente, por lo que en los otros medios se hizo un ajuste mayor de 7.5, así aunque la esterilización lo bajase, este se mantendría por arriba de 7.0. Esto es muy importante ya que las Pseudomonas aeruginosa, no son ácido-resistentes, lo que parece ser la causa por la cual las cajas en las que crecieron estas bacterias, el color del medio se mantenía o se acentuaba.

También, se realizó una prueba para corroborar esto; se elaboró un lote del medio con pH 5.5, cuyo color era naranja amarillento, se filtraron algunas muestras de piscina, y otras de la dilución 10^{-4} de la cepa pura. En las cajas donde se inoculó la cepa, el medio se tornó rojizo, aunque la cantidad de colonias no fue la acostumbrada para esa dilución, en cambio en las cajas donde se filtraron aguas de piscina, presentaron crecimiento de otras colonias, y el color del medio fué totalmente amarillo. Las cajas utilizadas como patrón permanecieron del mismo color.

O sea que pudiera ser que las mismas Pseudomonas aeruginosa regulan el pH del medio.

De acuerdo al análisis estadístico, los tres medios no presentan diferencia significativa, siendo los tres , buenos para la cuantificación de Ps.aeruginosa. Sin embargo existen ciertas características que los hacen diferentes, una de ellas y tal vez la más importante es el tiempo requerido para la obtención de resultados, ya que en los análisis rutinarios de agua, esto es primordial. Además considerando la diferencia de las condiciones de higiene que se manejan en las piscinas públicas del Distrito Federal con respecto a las de los países de donde proviene la literatura manejada, pudiera ser que la cantidad de bacterias diferentes a Pseudomonas aeruginosa interfieran de manera importante después de las 24 horas de incubación.

Aunque como ya se mencionó la selectividad de los tres medios es muy semejante, ninguno de los tres elimina por completo el crecimiento de otras colonias pertenecientes a la muestra de agua, sin embargo el mPa C las reduce en cuanto a tamaño, evitando así interferencias en la visualización de las colonias positivas.

Otra de las observaciones que confirman las recomendaciones de la bibliografía fué la reducción de sulfapiridina, que en efecto es la responsable de retardar el crecimiento de las Pseudomonas aeruginosa a las 24 horas de incubación. También se probó que los antibióticos utilizados no solo evitan el crecimiento de las colonias negativas, sino también ayudan a la definición colonial de Ps.aeruginosa.

La cantidad y variedad de antibióticos utilizados para cada medio les dan características diferentes, pues casi nunca se presentaron las mismas colonias (negativas) en los medios.

Las características de las colonias de Ps.aeruginosa en los tres medios, y con los diferentes tiempos de incubación, parecen demostrar que existe competencia entre ellas mismas por el espacio y/o alimento ya que en las filtraciones donde se manejaron diluciones inferiores a

10^{-4} , las colonias siempre fueron muy pequeñas y numerosas, de color rosa pálido, formando un velo. Y en donde se manejaron diluciones como 10^{-6} las colonias eran grandes, sobre todo a las 72 horas, extendiéndose sobre el medio hasta perder su forma original.

Lo anterior también puede reforzar la observación hecha sobre el aspecto de que cuando Ps. aeruginosa, se encuentra en el medio inhibe (en parte) el crecimiento de otras colonias.

Con respecto a la forma en que fueron confirmadas las colonias de Pseudomonas aeruginosa, cabe mencionar que no se realizaron pruebas bioquímicas, debido a que siempre se contó con un patrón de comparación proveniente de la cepa pura de Pseudomonas aeruginosa.

Todas las pruebas realizadas con muestras de agua de piscinas se hicieron de manera paralela con la cepa pura, así como todas las resiembras de las colonias sospechosas en Agar Cetrimida.

Resumiendo esta primera parte del estudio podemos decir que dados los resultados del análisis estadístico y a las ventajas que presenta el medio mPa C en relación a los otros dos, específicamente en que requiere solo de 24 horas de incubación para obtener resultados, se escoge al medio mPa C como método para la determinación de Ps. aeruginosa en aguas de piscina.

2ª Etapa.

En la 2ª etapa parece ser que existe una relación curiosa entre las Ps. aeruginosa, el pH y la Temperatura, pues las Ps. aeruginosa a pesar de no ser ácido-resistentes, en las muestras de piscinas, cuando el pH era de 6.5 y la temperatura era alta (25-29) la cantidad de Ps.aeruginosa era elevada, mientras que a pH 7 ó más y a esas mismas temperaturas no había presencia de Ps. aeruginosa. Por otro lado, también se pudo observar que a pesar de que los datos de cloro libre residual no pueden considerarse muy exactos, si son lo suficientemente válidos para tener una estimación de este parámetro y por lo tanto se pudo apreciar que en algunos casos cuando el cloro libre residual era cero no había Ps.aeruginosa y en otros, cuando el cloro libre residual era alto, hasta de 5 ppm, se podían encontrar concentraciones altísimas de Ps.aeruginosa. Lo que se puede deducir de todo esto es que Ps.aeruginosa es muy resistente a la cloración y que sí las condiciones de pH y Temperatura son idóneas para su crecimiento, niveles de cloro libre residual hasta 5 p p m no son obstáculo para su desarrollo.

Por otro lado sí bien es cierto que en la mayoría de los muestreos existía la tendencia de "sí hay coliformes hay Ps.aeruginosa" hubo algunas muestras en las cuales los resultados de coliformes totales y coliformes fecales fueron negativos y sin embargo si se encontraron Ps. aeruginosa; lo cual es una seria advertencia de que el grupo de coliformes no debe ser usado por lo menos como único índice de contaminación en este tipo de piscinas pues resulta un verdadero peligro para la salud del usuario.

VIII CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El objetivo de buscar y probar técnicas cuantitativas apropiadas para la identificación de Pseudomonas aeruginosa en aguas de piscina, fué cumplido al 100%, encontrándose que el medio mPa C fué el mejor de los métodos probados. Una de las principales razones para la selección de este método fué el tiempo para la obtención de resultados, con lo cual también fué cubierto el segundo objetivo.

El tercer objetivo se cumplió al llevarse a cabo el desarrollo del análisis de 10 piscinas, en las cuales fueron analizadas cuatro estaciones haciéndose filtraciones por triplicado para cada una de ellas. De las piscinas analizadas solo el 25 % resultó estar contaminado por Pseudomonas aeruginosa de las cuales solo tres albercas presentaron valores muy altos (ver Tabla VI).

El análisis de pH, Temperatura y Cloro libre residual en el agua de las piscinas, también fué realizado para cumplir con el cuarto objetivo, concluyéndose que a partir de pH 6.5 y a temperaturas de 25-29°C existe un alto desarrollo de Ps. aeruginosa y a esas mismas temperaturas pero a pH de 7-7.8 los valores de Ps. aeruginosa son de cero, de tal manera que esas parecen ser las condiciones idóneas para el mejor desarrollo de la especie en las aguas recreacionales.

Los coliformes parecen seguir también la tendencia de estar presentes cuando lo está Pseudomona aeruginosa, sin embargo en algunos casos no hubo ni coliformes totales ni fecales aún presentándose Ps. aeruginosa lo cual nos da las primeras bases para proponer a Ps. aeruginosa como posible indicador de contaminación de este tipo de aguas.

Es importante aclarar que a pesar de que la cantidad de información obtenida no es suficiente para considerar 100% a Pseudomonas aeruginosa como indicador de contaminación de este tipo de aguas, sí es suficiente

para justificar la continuación de estos estudios, sobre todo habiéndose encontrado que bajo ciertas condiciones este microorganismo es muy resistente a la cloración, y que existe una relación importante entre el pH y la temperatura del agua para que Pseudomonas aeruginosa se encuentre presente en las piscinas.

Sin embargo debido a lo anterior el objetivo final de este estudio, no fué posible cumplirse al 100%.

RECOMENDACIONES.

Hacer pruebas relacionando el pH, Temperatura, Ps.aeruginosa y Cloro libre residual para encontrar los niveles en los cuales el cloro puede eliminar estas bacterias.

Puesto que fueron pocos los casos en que se presentó que los coliformes totales y los coliformes fecales daban cero y valores altos de Ps.aeruginosa se considera conveniente seguir trabajando más profundamente esto, pues también es cierto que estos resultados apoyan la teoría de usar a Ps. aeruginosa como un índice de contaminación en vez de los coliformes totales y los fecales, o paralelamente con ellos, por lo tanto se considera interesante seguir con esta parte del estudio.

Se recomienda realizar estos análisis de manera cuidadosa debido a la cantidad de variables de manejo que presentan en el desarrollo práctico de los mismos. Por ejemplo si las piscinas son públicas o privadas, etc.

También es importante obtener información fidedigna de como se realiza la desinfección e higiene de la piscina.

Obtener la mayor información posible sobre las características propias de la piscina (techada, con caldera, etc.).

Y manejar de ser posible las mismas condiciones generales de las piscinas.

A N E X O

Determinación de Cloro Libre Residual

Método Yodométrico:

En el método yodométrico para la determinación de altas concentraciones (2 mg/l como Cl₂) de ácido hipocloroso (HOCl) la reacción del cloro y las cloraminas con el ión yoduro (I⁻) en solución ácida desprende yodo (I₂) que se titula con tiosulfato de sodio .

PROCEDIMIENTO :

1. A un matraz erlenmeyer de 1000 ml agréguese 500 ml de muestra
2. Agregar 5 ml de ácido acético glacial
3. Y aproximadamente 1 g de KI
4. Titular de inmediato con solución 0.025 N de Na₂S₂O₃ agregando almidón como indicador para la determinación del punto final
5. Hacer una titulación de blanco o testigo con 500 ml de agua destilada 5 ml de ácido acético glacial y 1 g de KI

CALCULOS :

$$\text{mg/l de Cl} = \frac{\text{ml gastados} \times \text{Normalidad del Tiosulfato} \times 35,450}{\text{Volumen de muestra}}$$

Handwritten calculations:

$$\frac{1000 \times 0.2}{35450} = \frac{200}{35450}$$
$$\frac{200}{35450} \times 0.025 \times 35450 = 0.2$$

Final result: 0.2

$$\text{Cl} = \frac{4.43 \times 0.025 \times 35450}{1000} = 0.39$$

Medio de cultivo para coliformes totales por la técnica de filtro de membrana.

Medio M-Endo

Triptosa o polipeptona	10.0 g
Tiopeptona	5.0 g
Casitona o tripticasa	5.0 g
Extracto de Levadura	1.5 g
Lactosa	12.5 g
NaCl	5.0 g
K_2HPO_4	4.375 g
KH_2PO_4	1.375 g
Lauril sulfato de sodio	0.050 g
Desoxicolato de sodio	0.10 g
Sulfito de sodio	2.10 g
Fucsina básica	1.05 g

Rehidratar en 1 litro de agua destilada que contenga 20 ml de alcohol al 95%. Calentar a ebullición y retirarlo inmediatamente del calor.

Enfriar a temperatura menor a 45°C. No esterilizar en autoclave.

El pH final debe ser de 7.1 a 7.3. Conservar el medio en la obscuridad entre 2 y 10°C, y descartarlo después de 96 horas.

Este medio puede hacerse sólido agregando 1.2 a 1.5 % de agar.

Medio de cultivo para coliformes fecales por la técnica de filtro de membrana.

Caldo M-FC

Triptosa	10 g
Proteasa, peptona o polipeptona	5.0 g
Extracto de Levadura	3.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Lactosa	12.5 g
Sales Biliares	1.5 g
Azul de anilina	0.1 g
Agua destilada	1 litro

Rehidratar en agua destilada que contenga 10 ml de ácido rosólico al 1% en NaOH 0.2 N. Calentar a ebullición y enfriar a temperatura inferior a 45°C. No esterilizar en autoclave.

El pH final debe ser de 7.4. El medio debe conservarse de 2 a 10°C, y su tiempo de duración de es 96 horas como máximo.

Solución Amortiguadora

a) Solución Madre de Fosfatos.-

Disolver 34 g de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) en 500 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.2 con NaOH 1N y diluir a 1 litro de agua destilada.

b) Solución Amortiguadora.-

Agregar 1.25 ml de la solución madre de fosfatos y 5 ml de sulfato de magnesio (50 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/1$) a un litro de agua destilada y esterilizar 15 minutos.

Agar Ceftrimida

Peptona de gelatina	20.0 g
Cloruro de magnesio	1.4 g
Sulfato de potasio	10.0 g
Ceftrimida	0.3 g
Agar	13.6 g
Glicerina	10.0 ml
Agua destilada	1000.0 ml

Se disuelve en agua destilada y se remoja 10 minutos, su pH final debe ser de 7.2, se hierve hasta ebullición y se esteriliza a 15 lb de presión, durante 15 minutos.

Agar de Infusión de Cerebro y Corazón

Infusión de cerebro de ternera	200.0 g
Infusión de corazón de res	250.0 g
Mezcla de peptonas	10.0 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Dextrosa	2.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

Se hierve hasta ebullición y se esteriliza a 15 lb de presión, 15 minutos, su pH final debe ser de 7.4 aprox.

Medio A de King, Ward y Raney.

Peptona de gelatina	20.0 g
Cloruro de magnesio	1.4 g
Sulfato de potasio	10.0 g
Glicerina	10.0 ml
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

Se esteriliza a 15 lb de presión, durante 15 minutos. Su pH debe ser de 7.2.

IX B I B L I O G R A F I A

- 1.- Dutka,B.J. and Kwan,K.K. 1977. Confirmation of the Single-Step Membrane Filtration Procedure for Estimation of Pseudomonas aeruginosa Densities in Water. Appl. Environ. Microbiol. 33 (2): 240-245.
- 2.- Esterman,A., Roder,M.D., Cameron,S.A.,Robinson,S.B., Walters, P.R., Lake, A.J. and Christy, E.P. 1984. Determinants of the Microbiological Characteristics of the South Australian Swimming Pools. Appl. Environ. Microbiol. : 325-328.
- 3.- Hoadley,W.A., Ajello, G. and Masterson,N. 1975. Preliminary Studies of Fluorescent Pseudomonads capable of Growth at 41°C in Swimming Pool Water. Appl. Microbiol. 29 (4) : 527-531.
- 4.- Wheeler,F.D.W., Mara,D.D., Jawad Luzan and Oragui,J. 1980. Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli in Sewage and Fresh Water. Water Research 14. : 713-721.
- 5.- Uno más uno. 1982. Contaminadas las albercas del Distrito Federal; un serio problema para los usuarios. pp 2. Revista Mensual.
- 6.- Brodsky,H.M. and Ciebin, W.B. 1978. Improved Medium for Recovery and Enumeration of Pseudomonas aeruginosa from Water Using Membrane Filters. Appl. Environ. Microbiol. 36. (1) : 36-42.
- 7.- APHA,AWWA, WPCF, 1980. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 15ª ed.

- 8.- Brook, T.D. 1978. Biología de los microorganismos. 2ª Ed., Omega, Barcelona.
- 9.- Guinea, J., Sancho, J. y Pares, R. 1979. Análisis Microbiológico de Aguas. 1ª Ed., Omega, Barcelona, pp 30-34.
- 10.- Ramírez, F.E. 1983. Estudio Bacteriológico de Pseudomonas aeruginosa en la Laguna de estabilización de Sto. Tomás Atzingo, Edo. de México. ENEP Zaragoza. UNAM. Tesis Profesional.
- 11.- Buchanan, R.E. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th Ed., The William and Wilkins Company, Baltimore.
- 12.- Manual del curso. Análisis de Aguas y Aguas de Desecho. 1980. III, pp 797, 805, 821.
- 13.- Galvan G.G., Leal, H.P., Robles, V. E. Ramírez, G.P. "Comparación del Método Tradicional para la Determinación de Coliformes Fecales con el Método Rápido A-1". 1er Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria Ambiental. Guadalajara, Jal. Dic. 1978.
- 14.- Dixon, W.J. and Massey, J.F. 1969. Introduction to Statistical Analysis. 13th Ed., Mc Graw Hill. Kogakusha,
- 15.- Secretariat AFNOR. 1983. Water Quality. Method for the Isolation and Enumeration of Pseudomonas aeruginosa from Water by the Membrane Filtration Technique. ISO/ TC 147/ SC 4 FRANCE.

- 17.- Topley, W.W.C. and Wilson, G.S. 1946. Bacteriología e Inmunidad. 2ª Edición. Editorial Nacional, S.A. México. pp 375-381.
- 18.- Iturbide, S.A. 1975. Apuntes de Microbiología. UNAM. México. pp 209-217.
- 19.- Arcos, R. 1982. Estudio Bacteriológico de la Pseudomonas fluorescens en la Laguna de Estabilización de Sto. Tomás Atzingo. Edo. de Méx. ENEP Zaragoza. UNAM. Tesis Profesional.
- 20.- Schoerbel, J. 1975. Métodos de Hidrobiología del agua dulce. H. Blume Ediciones. Madrid.
- 21.- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1974. Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes. Manual.
- 22.- U.S. EPA. 1973. Biological Field and Laboratory Methods for Measuring the Quality of Surface Waters and Effluents. Environ. Monitoring Series.
- 23.- Hach Company, 1980-81. Reading Engineer's Laboratory. Methods Manual.