



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores
"ZARAGOZA"

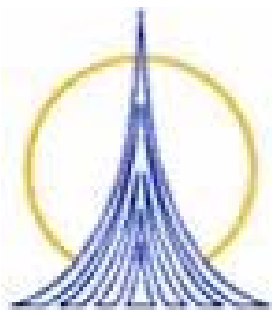
Implementación en el Método de Filtración por
Membrana para la Determinación de Bacterias
Coliformes en Muestras de Agua

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

JOSE MARIA MANCERA SALAZAR



MÉXICO, D.F.

ABRIL DE 2005



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Q.F.B. ENRIQUETA CASTREJON RODRÍGUEZ
Vocal	Q.F.B. IDALIA LETICIA FLORES GÓMEZ
Secretario	Q.F.B. JOSE OSCAR GONZÁLEZ MORENO
Suplente	Q.F.B. MAURO ARRIETA SÁNCHEZ
Suplente	Q.F.B. LETICIA HUERTA FLORES

AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar dándole las gracias a dios, el camino no fue fácil, pero con su ayuda lo pude recorrer, volteo atrás y todavía no puedo creer que lo haya logrado, te agradezco por todo lo que me haz dado

El orden en que los nombro no refleja el grado de importancia

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", por la formación profesional, incluyendo a todos los profesores que forman profesionales

Agradezco a la Comisión Federal de Electricidad, en especial al Laboratorio de Desarrollo Químico del Agua, por todo el apoyo que me brindo para que yo pudiera cumplir con este sueño.

Agradezco a mi padre la herencia que me dio, inculcarme el amor por los colores azul y oro de mi amada UNAM

Agradezco a mi madre por que ella me formo como persona, por el apoyo y fortaleza que me brinda en los momentos difíciles

Agradezco a mi amada esposa Esmeralda que recorrio junto a mi esta parte del camino, por soportar mi mal humor cuando llegaba sin ánimos por no poder terminar los créditos de la Universidad

Las siguientes líneas son dedicadas a mis hijos José María y Omar, el día de hoy no saben leer pero cuando puedan hacerlo quiero que se enteren de que su padre pudo terminar la universidad y que ellos fueron el principal motor de este logro

Agradezco a el Ingeniero Roberto Villegas, por todo el apoyo que me brindo para poder lograr esto

Agradezco a mi tío Mario Mancera el total apoyo que siempre me ha brindado

Agradezco todo el apoyo y ayuda que también me ha brindado mi mejor amigo Eduardo Mancera Salazar, sigues tú

No quiero dejar de mencionar a dos grandes personas que me apoyaron durante mis estudios, ellos son los “Juanes”, Juan Miguel Calderón Zavala y Juan López Guzmán, gracias amigos

Por ultimo quiero escribir esto para todos los estudiantes de la FES-Zaragoza, recuerden que cuando estén trabajando ejerciendo su profesión, están representando a esta gloriosa universidad, no la defrauden

INDICE

1.Antecedentes Generales	1
1.1 Implementación	1
1.2 Bacterias del Grupo Coliforme	2
1.3 Filtración por Membrana	9
1.4 Muestras de Agua	18
1.5 Transmitancia	20
1.6 Preparación de una suspensión de bacterias	23
1.7 Curva de crecimiento bacteriano	23
2.Planteamiento del Problema	26
3.Objetivos	28
4.Material y Método	29
4.1 Material	29
4.2 Metodología	31
5.Resultados y Análisis de Resultados	37
6.Conclusiones	50
7.Propuestas y Recomendaciones	51
8.Bibliografía	52
Anexo A	55
Anexo B	59
Anexo C	62

INTRODUCCIÓN

Los laboratorios que realizan ensayos y/o calibración, deben de demostrar su competencia técnica, es decir deben de evidenciar que las mediciones que efectúan las realizan adecuadamente y que sus procesos de medición están bajo control.

Para evidenciar que un proceso esta bajo control o que una determinación se realiza adecuadamente es necesario utilizar controles de calidad, que sirvan como herramienta para lograr este control.

En el Laboratorio de Desarrollo Químico del Agua de la Comisión Federal de Electricidad, se realizan diferentes tipos de ensayos en muestras de agua, análisis de espectrofotometría de absorción atómica, análisis de espectrofotometría de u.v.-visible, análisis volumétricos, análisis gravimétricos y análisis bacteriológicos.

Uno de los controles de calidad que utiliza el laboratorio en todos sus ensayos es el análisis de muestras de concentración conocida, esto para evaluar el porcentaje de recobro y evaluar si el método cumple o no cumple.

Para los ensayos analíticos existen diferentes productos y /o reactivos que podemos saber su valor convencionalmente verdadero y así saber cuanto es el porcentaje de recobro.

Uno de los ensayos bacteriológicos que efectúa el laboratorio es la determinación de bacterias del grupo coliforme en muestras de agua aplicando el método de filtración por membrana, para este parámetro no existe un producto comercial que se pueda utilizar como una muestra de concentración conocida.

Se pueden adquirir cepas de referencia que nos ayudan a evaluar si los medios de cultivo utilizados sirven o no (reto bacteriano), por tal motivo en el laboratorio se procedió a realizar una implementación en el método de determinación de bacterias del grupo coliforme en muestras de agua, que consistió en preparar una suspensión de bacterias que sirviera como control en los análisis (conocido comúnmente como standard).

Para elaborar esta suspensión se tomo como referencia el método general de análisis 0100 (MGA 0100) de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos séptima edición del año 2000.

En el procedimiento de este método general de análisis explica como se puede preparar una suspensión de bacterias a 580 nm empleando como señal de respuesta el porcentaje de transmitancia, una de las bacterias que se puede emplear para llevar a cabo esta suspensión es ***Escherichia coli***, que es un bacilo gram negativo no esporulado que pertenece a la familia Enterobacteriácea.

Se prepararon varias suspensiones del microorganismo a 580 nm utilizando diferentes porcentos de transmitancia, así como diferentes diluciones para obtener en la membrana de filtración después de la incubación, colonias bien definidas y que se pudieran contar.

Por último se procedió a evaluar los datos obtenidos para saber cual es la preparación adecuada de la suspensión.

1. Antecedentes Generales.

1.1 Implementación.

El significado de implementar es, facilitar los instrumentos necesarios para la realización de algo, suministrar, poner en funcionamiento, aplicar métodos.

Para la implementación es conveniente utilizar un proyecto piloto, donde se evaluara la factibilidad de la implementación y evidenciara los progresos que se podrán conseguir (Aguayo, 2002).

El equipo formado para la ejecución del proyecto piloto desarrollará los mecanismos y procedimientos, pudiendo ser sus miembros colaboradores en la generalización posterior de estas prácticas.

Cuando se lleva a cabo una implementación, la cultura de la organización evolucionara hacia nuevas formas de pensamiento y trabajo, y se introducirán nuevas tecnologías que modificaran las tareas habituales.

En el proceso de implementación se debe considerar, todo un conjunto de técnicas y herramientas para obtener un proceso de calidad, a bajo costo y con los requerimientos de ecoeficiencia, seguridad, etc.

El proceso de implementación lleva implícitas tres fases:

- I Fase de Análisis
- II. Fase de diseño del cambio organizacional
- III. Fase de Implementación y gestión del cambio

I. Fase de análisis:

Generalmente con base estratégica de capitalización de recursos y capacidades, que tiene como fin ultimo especificar las oportunidades.

II. Fase de diseño del cambio organizacional:

El factor humano, el proceso, la organización.

III. Fase de implementación y gestión del cambio:

Que contempla la implementación de lo establecido en la fase anterior mediante un proyecto piloto.

1.2 Bacterias del Grupo Coliforme

Las bacterias del grupo coliforme pertenecen a la familia Enterobacteriácea, esta familia se define como bacilos gram negativos, no esporulados, unos inmóviles y otros móviles con flagelos peritricos, que se desarrollan bien en medios artificiales, su hábitat natural es la parte distal del intestino, todas las especies que interesan en patología humana reducen los nitratos a nitritos, todas utilizan la glucosa formando ácido con o sin gas visible, su composición antigénica es muy compleja, con interrelaciones serológicas entre los diversos géneros de esta familia y aun con géneros y especies de otras familias (Fraude, 1984).

Tribu	Género	Especie
Escherichiae	<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>
	<i>Shigella</i>	<i>S. dysenteriae, S. flexneri, S. boydii, S. sonnei</i>
Edwardsiellae	<i>Edwardsiella</i>	<i>E. tarda</i>
Salmonelleae	<i>Salmonella</i>	<i>S. cholerae-suis, S. typhi, S. enteritidis</i>
Citrobactereae	<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii, C. diversus</i>
	<i>Klebsiella</i>	<i>K.pneumoniae, K. ozaenae, K.oxytoca K.rhinoscleromatis</i>
Klebsiellae	<i>Enterobacter</i>	<i>E.cloacae, E.aerogenes, E. agglomerans</i>
	<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens, S. liquefaciens, S. rubidea</i>
	<i>Hafnia</i>	<i>H. alvei</i>
Proteeae	<i>Proteus</i>	<i>P. vulgaris, P. mirabilis</i>
	<i>Providencia</i>	<i>P. alcalifaciens, P. stuartii, P. rettgeri</i>
Erwinieae	<i>Morganella</i>	<i>M. morganii</i>
	<i>Erwinia</i>	
	<i>Pectobacterium</i>	
Yersinieae	<i>Yersinia</i>	<i>Y. pestis, Y. enterocolitica, Y. pseudotuberculosis, Y. ruckeri, Y. intermedia, Y. fredericksonii</i>

Tabla 1. Nomenclatura de la Enterobacteriáceas (Roger, 1981)

No todos los géneros que pertenecen a la familia de las Enterobacteriáceas, son coliformes, la manera de diferenciarlos es por sus características bioquímicas.

El grupo coliforme es un grupo de bacterias que comprende todos los bacilos aerobios y anaerobios facultativos, gram negativos, no esporulados que producen ácido y gas al fermentar la lactosa, su crecimiento es en un rango de temperatura de 10°C a 46°C, su rango de crecimiento satisfactorio es entre 20°C y 40°C y el óptimo es de 37°C.

La mayor parte de las cepas son destruidas después de su exposición a 60°C durante 30 minutos.

Las especies clásicas de este grupo son ***Escherichia coli*** y ***Enterobacter aerogenes***.

Las bacterias del grupo coliforme al ser sembradas en agar Endo presentan colonias rojas, pero tienen un brillo metálico al centro, muy característico de la especie, en agar sangre algunas bacterias presentan β-hemólisis (Quentin ,1991)

En la tabla 2 se enlistan los miembros del grupo coliforme.

Tribu	Género	Especie
Escherichiae	<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>
Citrobactereae	<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii, C. diversus</i>
Klebsielleae	<i>Klebsiella</i>	<i>K.pneumoniae, K. Ozaenae, K.oxytoca K.rhinoscleromatis</i>
	<i>Enterobacter</i>	<i>E.cloacae, E. Aerogenes</i>
	<i>Hafnia</i>	<i>H. alvei</i>

Tabla 2. Especies que pueden fermentar lactosa con producción de gas (Roger, 1981)

Estos microorganismos están distribuidos ampliamente, en todas partes, en el sentido de que los bacilos coliformes se encuentran universalmente en las vías intestinales del hombre y animales, tanto de sangre caliente como de sangre fría.

1.2.1 Diferenciación Fisiológica

La diferenciación de los bacilos coliformes han sido de considerable importancia en microbiología, tanto medica como sanitaria, la necesidad de ambas ha conducido al desarrollo de una cantidad amplia de pruebas bioquímicas diseñadas para mejorar su diferenciación en el laboratorio.

Tradicionalmente se han empleado, con mayor frecuencia cuatro reacciones bioquímicas: la formación de indol a partir de triptofano, la prueba del rojo de metilo, la reacción de Voges-Proskauer y la capacidad de utilización del citrato como fuente de carbono, a estas cuatro pruebas se le conoce como IMViC (Pelczar, 1991)

En la Tabla 3 se presentan las distintas reacciones bioquímicas de bacterias del grupo coliforme, que son importantes para su diferenciación.

Especie	Indol	Rojo de Metilo	Voges-Proskauer	Citrato de Simmons	Lactosa	ONPG Hidrólisis	Orntina	Lisina	Sorbitol	Motilidad 35-37°C
<i>Citrobacter diversus</i>	99	100	0	99	35	96	99	0	99	95
<i>Citrobacter freundii</i>	5	100	0	95	50	95	20	0	98	95
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	5	98	95	95	100	98	98	100	97
<i>Enterobacter agglomerans</i>	20	50	70	50	40	90	0	0	30	85
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	5	100	100	93	99	96	0	95	95
<i>Escherichia coli</i>	98	99	0	1	95	95	65	90	94	95
<i>Escherichia coli, inactive</i>	80	95	0	1	25	45	20	40	75	5
<i>Escherichia hermanii</i>	99	100	0	1	45	98	100	6	0	99
<i>Escherichia vulneris</i>	0	100	0	0	15	100	0	85	1	100
<i>Hafnia alvei</i>	0	40	85	10	5	90	98	100	0	85
<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	20	95	95	100	100	0	99	99	0
<i>Klebsiella ozaenae</i>	0	98	0	30	30	80	3	40	65	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	10	98	98	98	99	0	98	99	0

Tabla 3. Reacciones bioquímicas de bacterias del grupo coliforme expresadas en por ciento de positividad (Pelczar, 1991)

1.2.2 Diferenciación por su temperatura de crecimiento

La norma mexicana NMX-AA-102-1987 de la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial elabora una clasificación de los coliformes de acuerdo a su temperatura de crecimiento y a sus características fisiológicas.

a) Organismos Coliformes: Organismos capaces de formar aeróbicamente colonias ya sea a 35 ± 1 °C o 37 ± 1 °C en un medio de cultivo lactosado selectivo y diferencial, con producción de ácido y aldehído dentro de un periodo de 24 h.

b) Organismos coliformes termotolerantes: Organismos capaces de formar aeróbicamente colonias a 44 ± 0.5 °C en un medio de cultivo lactosado selectivo y diferencial, con producción de ácido y aldehído dentro de un periodo de 24 h.

1.2.3 Estructura Física y Química de los Coliformes.

Todos los miembros del grupo coliforme, presentan una estructura similar.

Son bacilos gram negativos, no esporulados, que miden de 1.0 a 2.0 μm x 0.5 μm , los organismos móviles de esta grupo poseen flagelos peritricos.

La proteína de los flagelos (Ag H) serológicamente es diferente según la cepa, incluso dentro una misma especie.

Un antígeno K presente (polisacárido o proteína capsular de cubierta) puede enmascarar al antígeno lipopolisacárido estructural somático (O), que forma parte integral de la pared celular.

En el caso de ***Escherichia coli*** produce dos tipos de fimbrias o cilios que rigen su capacidad patógena.

El primer tipo es de cilios comunes o sensibles a la manosa, y el segundo es el de antígenos de factor colonizante, resistentes a la manosa, la figura 1 se puede observar la estructura general del grupo coliforme.

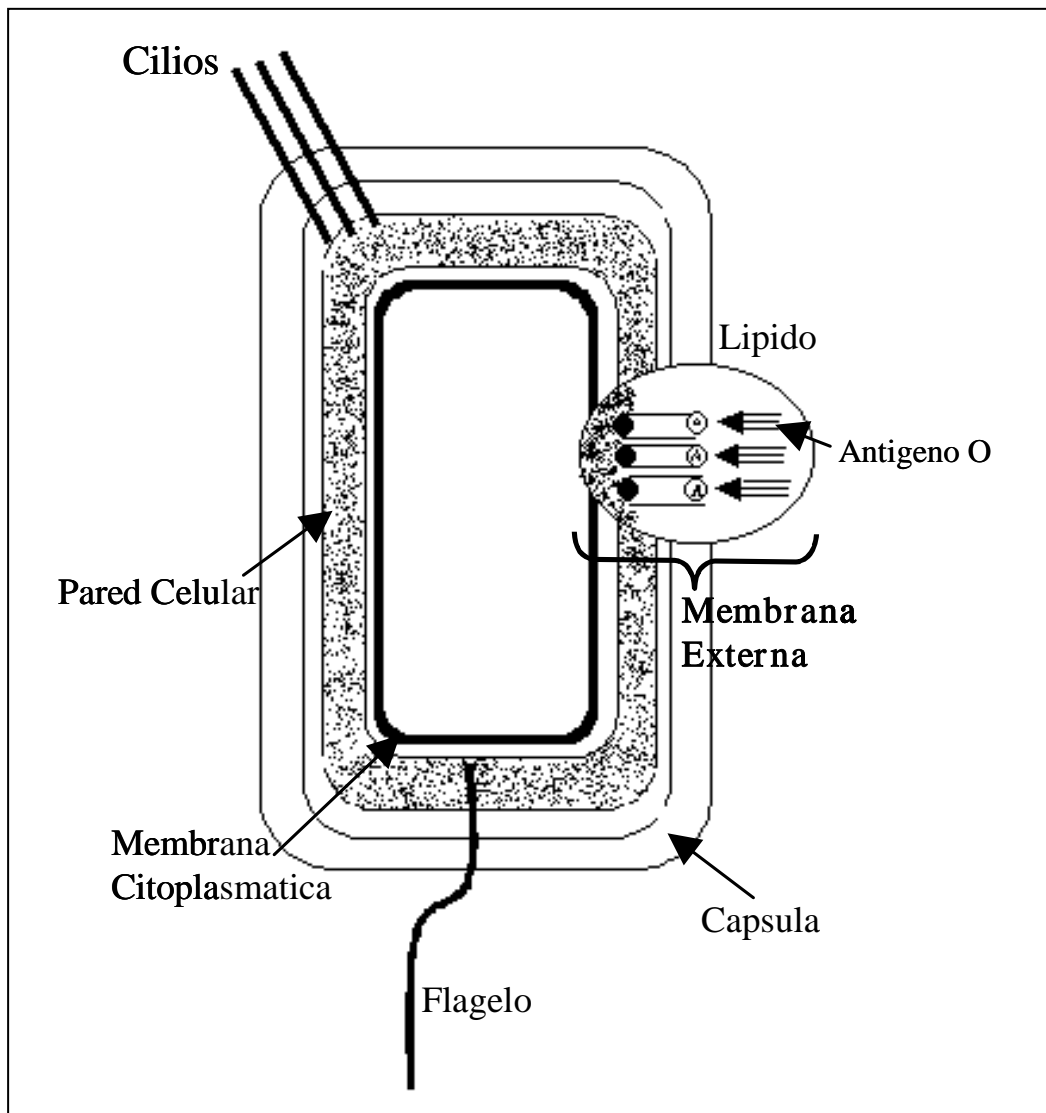


Figura 1. Estructura general de las bacterias coliformes (Quentin, 1991)

1.2.4 Género *Escherichia*

En la actualidad se reconoce al género *Escherichia* por su bacteria tipo que es *Escherichia coli* en la cual hay varios cientos de tipos antigénicos, los tipos se caracterizan por ser combinaciones diferentes de los antígenos O (antígenos lipopolisacáridos de la pared celular), K (antígenos polisacáridos capsulares), y H (proteínas flagelares antigénicas) por lo que resultan varios miles de serotipos (Burrows, 1974).

Escherichia coli es miembro de la flora normal y no es muy patógeno, tiene gran importancia médica por la frecuencia y la naturaleza grave de las infecciones que provoca.

El organismo vive en el colon sin provocar trastorno manifiesto, sin embargo dada su presencia en las heces, con frecuencia alcanza y afecta otras áreas del cuerpo, en especial vías urinarias y peritoneo.

No solo se puede encontrar en el colon del hombre, también se puede encontrar en animales de sangre caliente, en el agua, en la leche y en el suelo.

Escherichia coli, al igual que otros coliformes, tienen requerimientos de cultivo simples, pueden crecer en un medio de glucosa y sales, como en uno de agar sangre o en agar eosina azul de metileno (EMB).

Escherichia coli es anaerobio facultativo y fermenta con facilidad glucosa, lactosa y algunos otros azúcares, produciendo ácido y gas.

1.2.5 Género *Klebsiella*

El microorganismo conocido comúnmente como bacilo de Friedlander (Burrows, 1974) fue descrito primero por este investigador como agente etiológico de neumonía, su nombre formal es *Klebsiella pneumoniae*, estas bacterias no son móviles y ordinariamente poseen cápsula fuerte que es el origen de colonias mucoides-viscosas (Zimsser, 1987)

Aunque el organismo en ocasiones provoca infecciones crónicas en varios órganos, se conoce mejor como la causa de la neumonía hemorrágica, la mortalidad de la neumonía por *Klebsiella* es alta, por tanto es esencial el diagnóstico a tiempo.

Hay mas de 80 antígenos K y más de 10 antígenos O reconocidos en el género, el organismo puede identificarse en forma directa de una muestra de esputo, por la prueba de la hinchazón capsular llevada a cabo con antígenos específicos.

El bacilo de Friedlander se aísla fácilmente en cultivos de agar sangre, sus colonias son grandes con crecimiento poco común, con crecimiento denso y viscoso.

El género ***klebsiella*** se distribuye en la naturaleza, se puede encontrar en el agua, en la vegetación, en granos, ocasionalmente en aceite, en pulpa de madera, en plantas que se emplean en la industria textil y en el proceso de la caña de azúcar.

1.2.6 Género ***Enterobacter***

Las especies de ***Enterobacter*** se encuentran como comensales en el intestino y se aíslan frecuentemente del suelo y agua, solo rara vez causan infecciones naturales.

El género ***Enterobacter*** se relaciona con el género ***Klebsiella***, por lo que su diferenciación en ocasiones es complicada.

El género ***Enterobacter*** contiene cinco especies (***E. aerogenes***, ***E. agglomerans***, ***E. gergoviae***, ***E. sakasaki*** y ***E. cloacae***) que habitan en la tierra, el agua y el intestino grueso de los mamíferos.

La especie que es aislada frecuentemente es ***E. cloacae***, aunque las cuatro especies restantes también se han aislado de material clínico.

1.2.7 Géneros **Citrobacter** y **Hafnia**.

La mayor parte de aislados del genero **Citrobacter** provienen de infecciones respiratorias y de vías urinarias, los pacientes con estas infecciones suelen estar enfermos o sufrir otros trastornos que perturban las defensas antimicrobianas, los aislados de **Citrobacter** suelen ser sensibles a los aminoglucósidos y tetraciclinas.

Hafnia alvei, que en tiempo se clasifico como **Enterobacter hafniae**, provoca infecciones de un tipo similar a las que causa la especie **Enterobacter**.

1.3 Filtración por Membrana

La filtración por membrana es el mecanismo mediante el cual se atrapan en la superficie de la membrana, contaminantes cuyo tamaño es mayor que el tamaño del poro (Millipore,2004)

Los contaminantes de tamaño menor que el específico del poro atraviesan la membrana o pueden quedarse retenidos en su interior mediante algún otro mecanismo, los filtros de membrana se utilizan para aplicaciones fundamentales como la esterilización y la filtración finales.

Ventajas:

- Son posibles tamaños absolutos de poro inferiores a la micra
- Puede retener bacterias y partículas (dependiendo del tamaño del poro)
- Generalmente tiene bajo contenido de extraíbles
- Integridad probada

Desventajas:

- Caudales de flujo menores que los materiales profundos
- Mas costosos que los materiales profundos

Hay dos factores que determinan la efectividad de un proceso de filtración de membrana: selectividad y productividad.

La selectividad se expresa mediante un parámetro llamado factor de retención o de separación (tamaño de poro).

La productividad se expresa mediante un parámetro llamado flujo (expresado en $L/m^2 h$). La selectividad y la productividad dependen de la membrana.

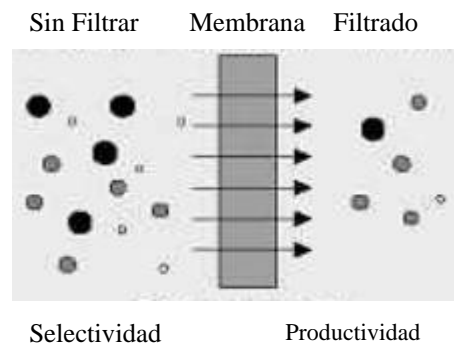


Figura 2. Selectividad y Productividad de una membrana (Scheider&Schuell,2002)

La filtración por membrana, es un proceso que puede ocurrir a baja temperatura, esto es principalmente importante porque permite el tratamiento de los materiales sensibles al calor, es por esto que se aplican ampliamente para la producción de alimento.

Es un proceso de bajo costo energético, la mayor parte de la energía requerida es la necesaria para bombear los líquidos a través de la membrana.

La cantidad total de energía utilizada es mínima comparada con las técnicas alternativas, tales como evaporación.

Para pasar un líquido a través de la membrana es necesario incrementar la tasa de flujo o la velocidad de filtración, es por eso que la filtración se divide en:

- Filtración por vacío
- Filtración a presión

1.3.1 Filtración por vacío

La filtración por vacío se lleva a cabo en un sistema en el cual se coloca una membrana de filtración, en un soporte especial, el líquido se hace pasar a través de la membrana con ayuda de una bomba que succiona el aire que se encuentra en el sistema, al pasar el aire este arrastra al líquido, las partículas de tamaño mayor al tamaño del poro se quedarán atrapadas en la membrana.

En la figura 3, se puede apreciar el funcionamiento de un sistema de filtración por vacío.

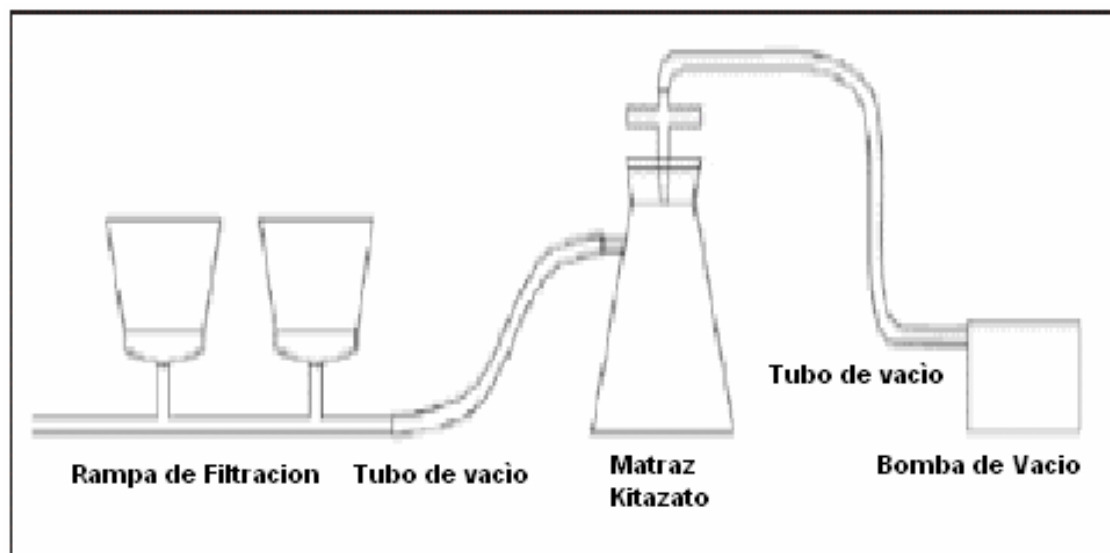


Figura 3. Sistema de filtración a vacío (Scheider & Schuell,2002)

1.3.2 Filtración a presión

La filtración a presión se lleva a cabo aplicando una fuerza en el sistema de filtrado que provoca el paso del líquido a través de la membrana, las partículas de mayor tamaño al tamaño de poro se quedan retenidas en la superficie de la membrana.

En la figura 4 se puede apreciar el funcionamiento de un sistema de filtración a presión.

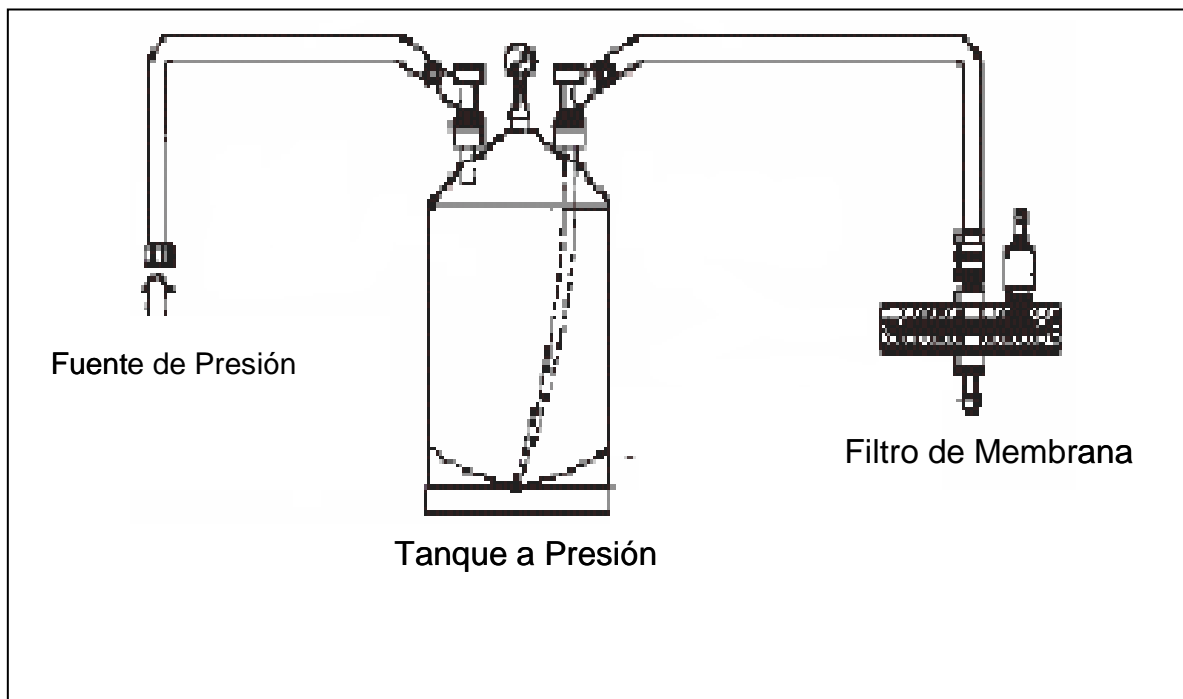


Figura 4. Construcción típica de un sistema de filtración a presión (Scheider & Schuell, 2002)

1.3.3 Tipos de Membranas

Existen diferentes tipos de membranas que se utilizan en el proceso de filtración, las membranas que se utilizan para la determinación del grupo coliforme por filtración de membrana es de esteres de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.45 μ m y un diámetro de 47 mm.

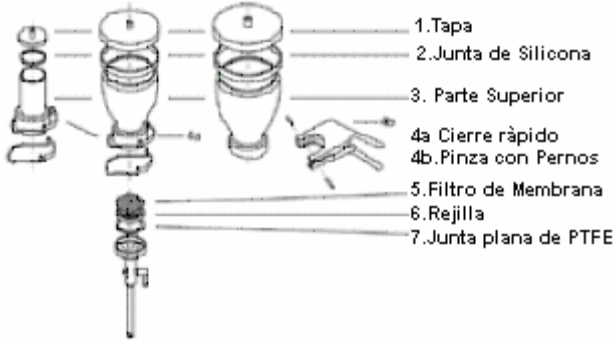
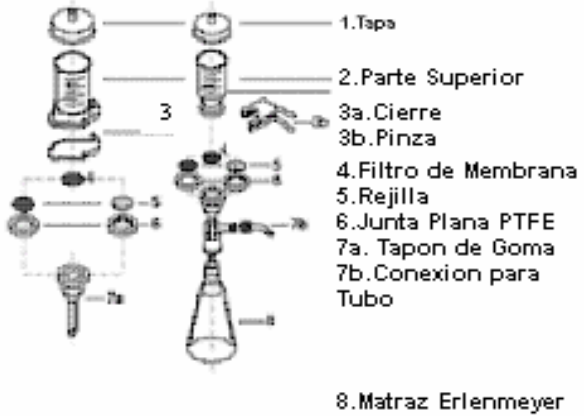
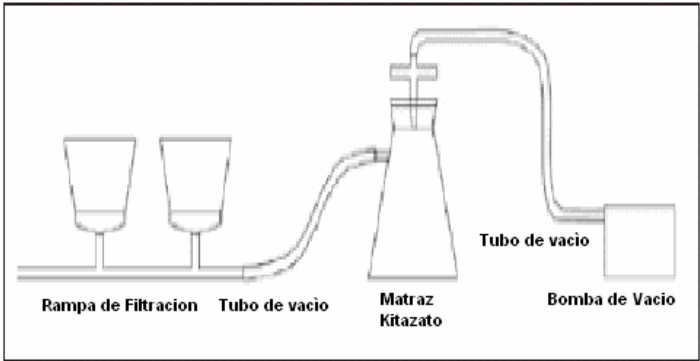
En la tabla 4 se describen los diferentes materiales de las membranas que se utilizan en la técnica de filtración, así como su tamaño de poro y su diámetro.

Material	Tamaño de Poro(μ m)	Diámetro de Membrana (mm)
Nitrocelulosa	0.45	47
Nitrocelulosa	0.22	47
Nitrocelulosa	0.7	47
Nitrocelulosa	1.2	47
Poliestersulfona	0.22	13
Poliestersulfona	0.22	25
Poliestersulfona	0.22	47
Poliestersulfona	0.22	90
Poliestersulfona	0.22	142
P.V.C	0.8	25
P.V.C	0.8	37
P.V.C	0.8	47
P.V.C	5	25
P.V.C	5	37
P.V.C	5	47

Tabla 4. Diferentes tipos de membranas (Millipore, 2004)

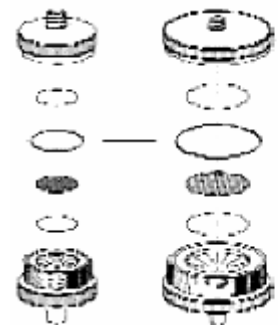
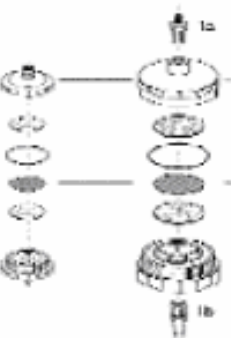
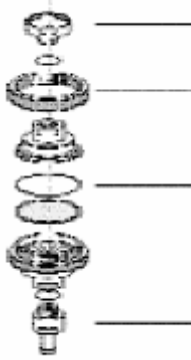
1.3.4 Equipos de Filtración

Existen diferentes equipos de filtración, pueden funcionar a presión o por vacío, en las tablas 5 y 6 se muestran algunos equipos.

Descripción	Esquema
<p>Marca: Scheider & Schuell Modelo: Serie MV050 Material: Acero Inoxidable</p>	 <p>1.Tapa 2.Junta de Silicona 3. Parte Superior 4a Cierre rápido 4b.Pinza con Pernos 5.Filtro de Membrana 6.Rejilla 7.Junta plana de PTFE</p>
<p>Marca: Scheider & Schuell Modelo: Serie GV Material: Vidrio</p>	 <p>1.Tapa 2.Parte Superior 3a.Cierre 3b.Pinza 4.Filtro de Membrana 5.Rejilla 6.Junta Plana PTFE 7a. Tapon de Goma 7b. Conexion para Tubo 8. Matraz Erlenmeyer</p>
<p>Marca: Scheider & Schuell Modelo: AS selectron Material: Vidrio/ Acero Inoxidable</p>	 <p>Rampa de Filtracion Tubo de vacio Matraz Kitazato Bomba de Vacio</p>

<p>Marca: Millipore</p> <p>Modelo: XX1002540</p> <p> XXF2004710</p> <p> XXF2004725</p> <p>Material: Acero Inoxidable</p>	<p>1. Embudo 4. Tapón 2. Pinzas 5. Rejilla-Soporte 3. Cono 6. Base para rejilla</p>
<p>Marca: Millipore</p> <p>Modelo: XX1104700</p> <p> XX1104710</p> <p> XX11J4750</p> <p>Material: Polipropileno</p> <p>Tipo de Filtración: Vacío</p>	<p>1. Tapa del Embudo 2. Tapones de Goma 3. Portafiltros 4. Tapon para vacio 5. Embudo 6,7,8, Base para Membrana 9. Tapon 10. Recipiente 11. Tapa del Recipiente</p>

Tabla 5. Equipos de filtración a vacío (Millipore,2004, Scheider & Schuell,2002)

Descripción	Esquema
<p>Marca: Scheider & Schuell</p> <p>Modelo: Serie FM</p> <p>Material: Acero Inoxidable</p>	 <ol style="list-style-type: none"> 1. Parte Superior 2. Rejilla 3. Junta de Silicona 4. Filtro de Membrana 5. Rejilla 6. Parte Inferior
<p>Marca: Scheider & Schuell</p> <p>Modelo: Serie FP</p> <p>Material: Polisulfona</p>	 <ol style="list-style-type: none"> 1. Conexión de Presión 2. Parte Superior 3. Rejilla 4. Junta de Silicona 5. Filtro de Membrana 6. Rejilla 7. Parte Inferior
<p>Marca: Scheider & Schuell</p> <p>Modelo: Serie FP</p> <p>Material: Polisulfona</p>	 <ol style="list-style-type: none"> 1. Conexión de Presión 2. Junta Plana de PTFE 3. Anillo de Cierre 4. Parte Superior 5. Filtro de Membrana 6. Parte Inferior 7. Conexión con Oliva


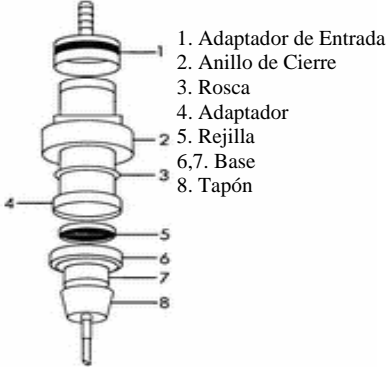
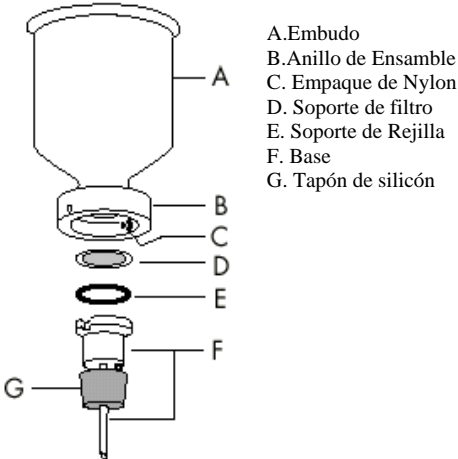
<p>Marca: Scheider & Schuell</p> <p>Modelo: Serie MD-142</p> <p>Material: Teflón</p>	
<p>Marca: Millipore</p> <p>Modelo: XX4004700</p> <p>XX4004740</p> <p>Material: Acero Inoxidable</p>	
<p>Marca: Millipore</p> <p>Modelo: XX2004720</p> <p>Material: Acero Inoxidable</p>	

Tabla 6. Equipos de filtración a presión (Millipore,2004 Scheider & Schuell,2002)

1.4 Muestras de Agua.

El objetivo de la toma de muestras es la obtención de una porción de material cuyo volumen sea lo suficientemente pequeño como para que pueda ser transportado con facilidad y manipulado en el laboratorio sin que por ello deje de representar con exactitud al material de donde procede.

Este objetivo implica que la proporción o concentración relativa de todos los componentes serán las mismas en las muestras que en el material de donde proceden, y que dichas muestras serán manejadas de tal forma que no se produzcan alteraciones significativas en su composición antes de que se hagan las pruebas correspondientes.

La persona que recoge una muestra y la lleva a un laboratorio para realizar unas determinaciones específicas es responsable de su validez, cuando se toma una muestra de agua se debe de cuidar su manipulación, cuidar que esta no se deteriore o contamine, antes de llegar al laboratorio.

Cuando se tomen muestras para análisis microbiológicos, no se debe de llenar el envase, se tiene que dejar un espacio para que exista oxígeno en el medio y los organismos presentes en la muestra no sufran algún daño (Métodos Normalizados, 1992)

Existen diferentes tipos de muestras como son:

- a) muestras de sondeo
- b) muestras compuestas
- c) muestras integradas

1.4.1 Muestras de Sondeo

Estrictamente hablando, una muestra recogida en un lugar y un momento determinados solo puede representar la composición de la fuente en ese momento y lugar.

Sin embargo cuando se sabe que una fuente es bastante constante en su composición durante un periodo considerable o a lo largo de distancias sustanciales en todas direcciones, puede decirse que una muestra representara un periodo de tiempo mas largo.

En estas circunstancias algunas fuentes puede estar muy bien representadas por una muestra simple de sondeo, esto es en el caso de algunos suministros de agua y algunas aguas superficiales.

1.4.2 Muestras Compuestas

En la mayoría de los casos, la expresión muestras compuestas se refiere a una mezcla de muestras sencillas tomadas en el mismo punto en distintos momentos, en ocasiones se utiliza la expresión compuesto-tiempo para distinguir este tipo de muestras de otros.

Se considera como estándar para la mayoría de los análisis una muestra compuesta que represente un periodo de 24 horas, sin embargo en determinadas circunstancias puede resultar preferible una muestra compuesta que represente una desviación, un periodo más corto o el ciclo completo de una operación periódica.

1.4.3 Muestras Integradas.

En algunos casos, la información necesaria se obtiene mejor analizando mezclas de muestras individuales, recogidas en distintos puntos al mismo tiempo o con la menor separación temporal posible, a las muestras de este tipo se les llama integradas.

Un ejemplo de la necesidad de este tipo de muestras es cuando se muestrean ríos o corrientes cuya composición varia según la anchura y la profundidad.

Para valorar la composición media o la carga total, hay que recurrir a mezclas de muestras que representen distintos puntos de la sección transversal y que sea proporcional a los flujos relativos.

1.5 Transmitancia

La transmitancia, T , es la relación entre el poder de radiación transmitido por una muestra (P) y el poder de radiación que incide sobre la muestra de (P_0), medidos ambos en la misma posición del espectro y con la misma rendija.

$$T = P/P_0 \dots \dots \dots \text{ec.1}$$

se supone que el haz es de radiación paralela y que incide sobre las superficies planas y paralelas de la muestra, formando ángulos rectos, también es común utilizar el concepto de por ciento de transmitancia

$$\%T = (P/P_0) 100 \dots \dots \dots \text{ec.2}$$

que es el mismo concepto de transmitancia solo que expresada en por ciento (Ayres,1982).

La transmitancia no es directamente proporcional a la concentración, como lo es la absorbancia (la absorbancia es directamente proporcional a la concentración), para obtener una grafica lineal se debe de graficar $\log T$ contra concentración, en la figura 5 se pueden observar mejor estos comportamientos.

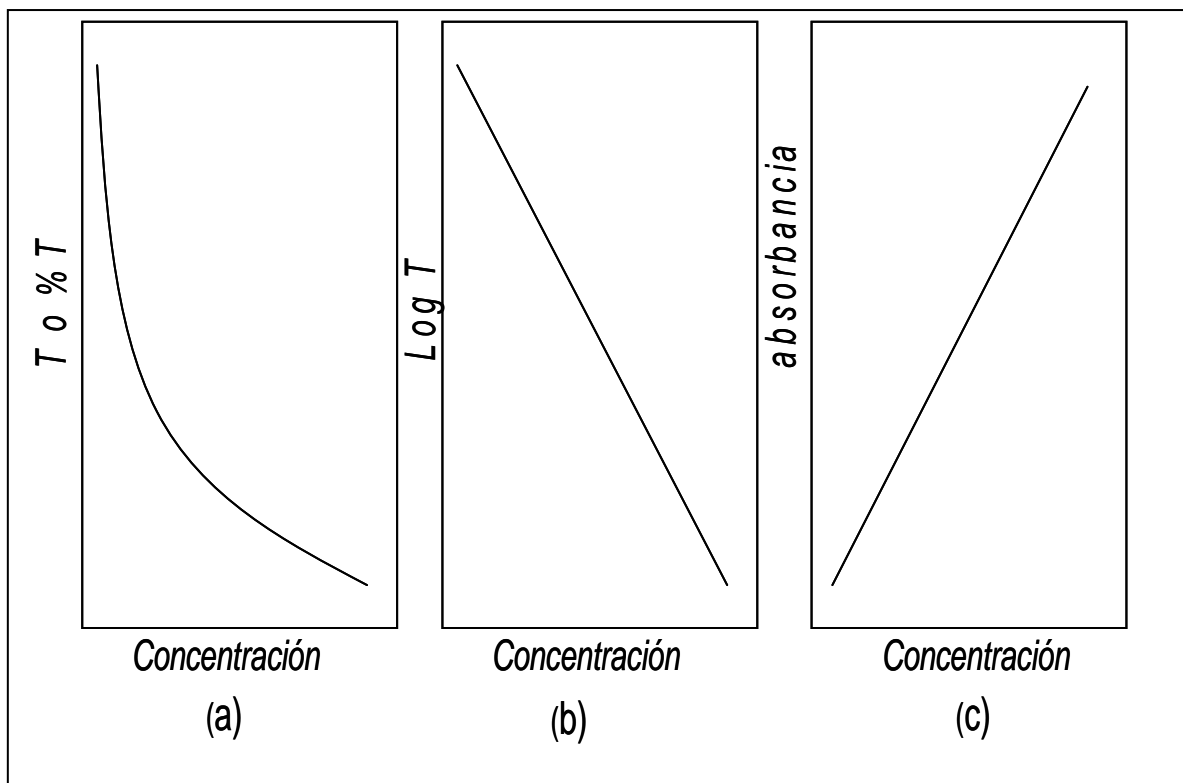


Fig. 5 Comportamiento que se tiene al graficar T o $\%T$ contra concentración (a), $\log T$ contra concentración (b) y absorbancia contra concentración (c).

1.5.1 Leyes de la espectrofotometría

Cuando un haz de energía radiante monocromática incide sobre una capa homogénea de una sustancia “transparente”, parte de la energía es absorbida y el resto transmitida, por último una pequeña parte es reflejada.

Si la energía radiante incidente tiene longitudes de onda de la región visible del espectro y el medio a través del cual tiene que pasar, absorbe selectivamente ciertas longitudes de onda, el color observado corresponderá a las longitudes de onda de la energía transmitida.

1.5.2 Ley de Bouguer

Esta ley se divide en dos partes:

a) La energía radiante monocromática transmitida en un medio homogéneo es proporcional a la energía radiante incidente, la relación entre la energía radiante transmitida, P , y la incidente, P_0 , es una constante:

$$T = P/P_0 \dots \dots \dots \text{ec.1}$$

b) La energía de radiación transmitida decrece en progresión geométrica cuando la longitud del camino óptico aumenta en progresión aritmética, capas de igual espesor absorben fracciones iguales de energía de una radiación incidente sobre ellas (Day 1989).

La ley de Bouguer se expresa matemáticamente por

$$-\log T = ab \dots \dots \dots \text{ec.3}$$

donde: T = transmitancia

b = camino óptico

a = absortividad del medio

El término T lleva un signo negativo porque la transmitancia decrece cuando aumenta el camino óptico.

1.5.3 Ley de Beer

Expresa la relación entre la transmitancia y concentración de material absorbente, es decir que para un camino óptico dado, la transmitancia disminuye en progresión geométrica cuando la concentración aumenta en progresión aritmética, por tanto:

$$-\text{Log } T = ac \dots \dots \dots \text{ec.4}$$

donde: T = transmitancia

c = concentración

a = absortividad, absorbancia por unidad de concentración y unidad de camino óptico.

1.5.4 Ley de Beer- Bouguer

Esta ley expresa que al graficar la absorbancia (A) de una sustancia dada a camino óptico constante, en función de la concentración (c) es una recta de pendiente a, y la representación de Log T contra c es otra línea recta de pendiente -a, en la cual a es la absortividad de la sustancia, con dimensiones de unidades de concentración y camino óptico (Day 1989).

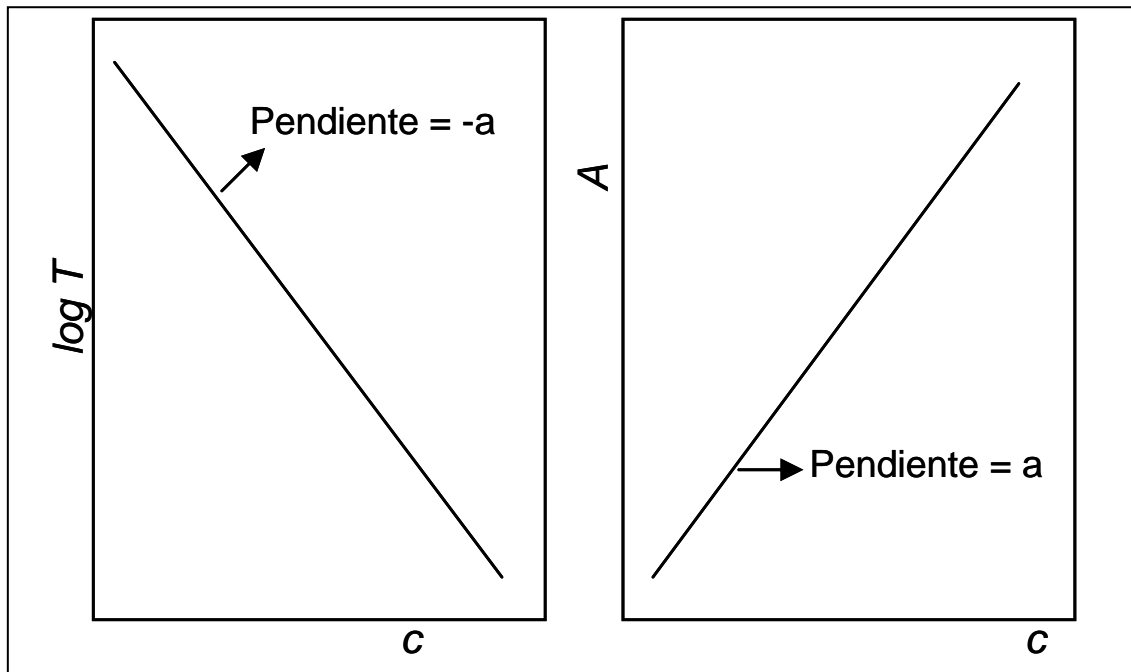


Fig. 6 En la figura se observa lo que expresa la ley de Beer- Bouguer

1.6 Preparación de una suspensión de bacterias.

En la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 7ª edición, en el método general de análisis MGA 0100. Potencia Microbiológica de antibióticos, especifica como preparar una suspensión de microorganismos.

Método número 1

Preparación de la suspensión. Sembrar el microorganismo de prueba en tubos con el medio de cultivo preparado en posición inclinada. Incubar a 32°C-35°C durante 24 horas. Cosechar el crecimiento con 3 mL de solución salina estéril. Inocular con esta suspensión 5 tubos de 22 x 220 mm, que contienen aproximadamente 15 mL de cultivo inclinado o una botella Roux con 250 mL de medio de cultivo. Incubar a 32°C-35°C durante el periodo de tiempo indicado para cada microorganismo. Transcurrido el tiempo de incubación, cosechar el crecimiento de cada tubo con aproximadamente 4.0 mL de solución salina o con 50 mL para botellas Roux (este volumen depende de la cantidad de crecimiento).

Ajuste de la suspensión. Determinar en la suspensión original la dilución que permita obtener en un fotocolorímetro y a una longitud de onda de 580 nm un 25 por ciento de transmitancia \pm 2 por ciento (FEUM,2000).

En el método para la preparación de la suspensión, menciona que se debe de realizar dos resiembras del microorganismo antes de preparar la suspensión en porcentaje de transmitancia, esto es con la finalidad de obtener solo microorganismos que se encuentren en la fase exponencial de crecimiento.

1.7 Curva de crecimiento bacteriano

La curva del crecimiento bacteriano resulta de la representación gráfica de la determinación periódica del número de células viables por mililitro que existen en un líquido inoculado con células microbianas provenientes de un cultivo que ha crecido previamente hasta la saturación (Burrows,1974).

Esta curva de crecimiento se divide en cuatro fases:

a) Fase de Latencia o Rezago

Este periodo consiste en la adaptación de las células microbianas a su nuevo ambiente, en esta fase, las células microbianas se encuentran empobrecidas en cuanto a metabolitos y enzimas, esto debido a las condiciones desfavorables que representaba el cultivo previo.

Por lo anterior, en este lapso de tiempo se forman las enzimas y los metabolitos intermedios hasta alcanzar las concentraciones necesarias para reiniciar el crecimiento.

Este periodo se puede prolongar en el caso de que el medio de cultivo previo y las condiciones actuales resulten tan diferentes que las células sean genéticamente incapaces de sobrevivir, por lo que sólo unas cuantas mutantes podrán subsistir, y obviamente se requerirá más tiempo para que éstas se multipliquen lo suficiente y sea notorio el aumento de células.

b) Fase Exponencial

En esta fase las células se encuentran en un estado de crecimiento sostenido, se sintetiza nuevo material celular a una tasa constante, pero éste material es en sí catalítico y la masa aumenta de manera exponencial.

Lo anterior continua hasta que uno o más nutrientes se agoten, o hasta que se acumule tal cantidad de metabolitos tóxicos que se inhiba el crecimiento, el nutriente limitante para los organismos aerobios suele ser el oxígeno.

Durante el crecimiento exponencial, la tasa de crecimiento de las células (medida en gramos de biomasa producida por hora), cuando el crecimiento no es limitado por los nutrientes, se puede obtener multiplicando la constante de la tasa de crecimiento (k) por la concentración de biomasa, la constante de la tasa de crecimiento es la tasa a la cuál las células producen más células, y el valor que esta toma se interpreta como los gramos de biomasa producidos por cada gramo de biomasa preexistente creados en una hora.

El crecimiento se denomina exponencial porque la biomasa se incrementa exponencialmente con respecto al tiempo.

Esta fase puede prolongarse indefinidamente si las células se transfieren repetidamente a un medio nuevo (fresco) de composición idéntica al anterior, lo cual se logra de manera automática mediante dos aparatos : el Quimiostato y el turbidostato.

c) Fase Estacionaria

Ante el agotamiento de nutrientes en el medio o la acumulación de metabolitos tóxicos el crecimiento cesa por completo después de un periodo de decrecimiento en la tasa de crecimiento.

No obstante, por lo general en esta fase se puede observar recambio celular, lo cual se debe a que, aunque existe una pérdida lenta de células por muerte, dicha pérdida se compensa exactamente por la formación de nuevas células a través de crecimiento y división, así, la cifra de células viables se mantiene constante, aunque en realidad en el conteo aumente poco a poco el número de células, si se cuentan también las muertas.

Para comprender lo anterior debemos considerar que, para una célula microbiana, muerte significa la pérdida irreversible de la capacidad para reproducirse (crecer y dividirse), lo cuál se comprueba cuando una célula es incapaz de producir una colonia en cualquier medio, de lo anterior se deriva que designar a una célula microbiana como muerta no implica su destrucción física.

La duración de esta fase depende de la naturaleza del microorganismo y de las condiciones del medio.

d) Fase de Muerte

Esta fase representa el decremento de células debido al aumento progresivo de la tasa de mortalidad, misma que tarde o temprano alcanza un valor sostenido.

Por lo general, una vez que la mayoría de las células ha muerto, la tasa de mortalidad disminuye bruscamente, por lo que un número pequeño de sobrevivientes pueden persistir en cultivo por meses o años, dicha persistencia puede deberse a que las células consiguen crecer gracias a los nutrimentos liberados por las células que mueren y se lisan, observándose recambio celular.

En la figura 7 se observan las cuatro fases de la curva de crecimiento.

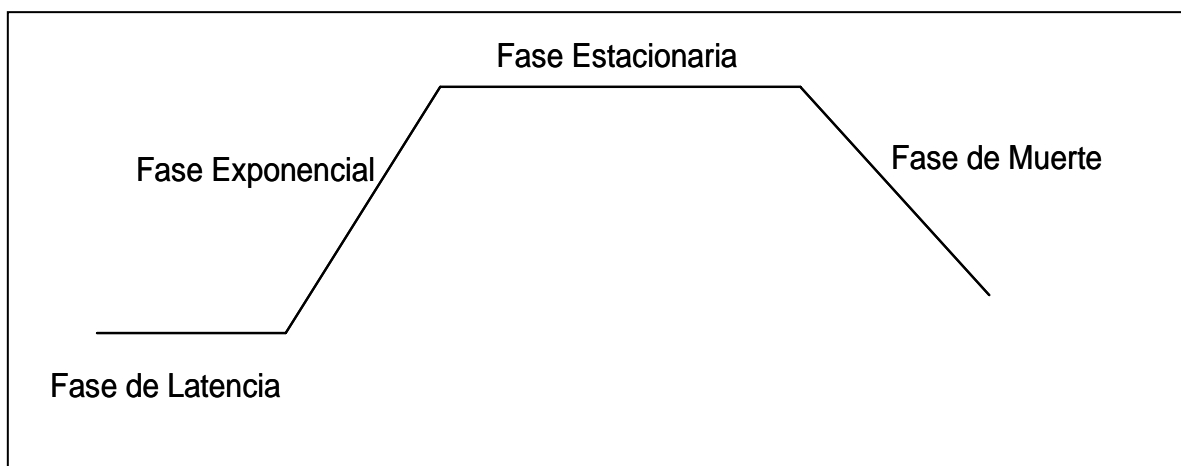


Fig. 7 Curva de crecimiento bacteriano

2. Planteamiento del Problema

La Comisión Federal de Electricidad , es la empresa que genera, transmite, distribuye y comercializa energía eléctrica para 22.3 millones de clientes, lo que representa casi 80 millones de mexicanos, un compromiso de la empresa es ofrecer servicios de excelencia a los clientes, garantizando altos índices de calidad en todos sus procesos, al nivel de las mejores empresas eléctricas del mundo.

Esta formada por varias direcciones que son: Operación, Finanzas, Administración, Proyectos de Inversión Financiada, de Modernización y Cambio Estructural; y por último el Organo Interno de Control.

Dentro de la dirección de Operación se encuentra la Subdirección Técnica, que es la que controla a la Gerencia de Estudios de Ingeniería Civil, creada en el año de 1987 para desarrollar ingeniería básica aplicada a la exploración, selección de sitios, diseño y construcción de nuevas centrales termoeléctricas.

Para cumplir con sus funciones y responsabilidades actualmente esta constituida por subgerencias y dentro de la estructura organizacional de la Subgerencia de Estudios Hidrográficos, esta ubicado el departamento de Geohidrología mismo que incluye al Laboratorio de Desarrollo Químico del Agua, diseñado desde 1980 para participar en actividades relacionadas con la toma de muestras de agua, análisis químico y bacteriológico para la caracterización del agua natural y residual.

Para la Comisión Federal de Electricidad es muy importante ofrecer servicios con calidad, por tal motivo el Laboratorio de Desarrollo Químico del Agua se encuentra en proceso de acreditación ante la Entidad Mexicana de Acreditación a.c. (EMA), para demostrar su competencia técnica.

Una de las pruebas que se desean acreditar es la determinación de bacterias del grupo coliforme por filtración de membrana.

En la actualidad la presencia de bacterias del grupo coliforme en agua, es indicativo de contaminación fecal, esto es un factor importante en la determinación de la calidad de un cuerpo acuífero

Por tal motivo es importante evidenciar que el Laboratorio de Desarrollo Químico del Agua, realiza sus determinaciones con aptitud técnica, para documentar el método.

Y se efectuó función se propuso efectuar pruebas de reto bacteriano a los medios de cultivo; que se utilizan para la determinación de bacterias del grupo coliforme, así mismo se propuso elaborar o preparar una suspensión de bacterias estandarizada que funcionara como un control en la determinación y así poder demostrar que en las membranas se pueden determinar diferentes números de colonias.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Implementación en el método de filtración por membrana para la determinación de bacterias coliformes en muestras de agua.

3.2 Objetivo Particular

Desarrollar una metodología para la preparación de una suspensión de un microorganismo coliforme que sirva como control para determinar bacterias coliformes en muestras de agua.

Determinar de la metodología su repetibilidad y reproducibilidad.

Establecer el rango del %T, para preparar la suspensión del microorganismo.

Documentar los datos obtenidos.

4. Material y Método

4.1 Material	Marca
Asa Bacteriológica	
Algodón	Chapultepec
Caja petri de 47 a 49 mm de diámetro	Millipore
Espátula	
Probeta de 100 mL	Kimax
Botellas de Vidrio tapa de rosca de 300 mL	Kimax
Mechero Fisher	
Pipeta Graduada de 1 mL	Pyrex
Pipeta Graduada de 5 mL	Pyrex
Pipeta Graduada de 10 mL	Pyrex
Gradilla	
Membranas de Nitrocelulosa tamaño de poro 0.45 µm diámetro de 47 mm	Millipore Lote: H4JN88040
Celdas de vidrio de paso de luz de 2.5 cm	Hach

4.1.2 Material Biológico

<u>Escherichia coli</u> ATCC 25922	Factura: 3901/IPN
<u>Salmonella typhimurium</u> ATCC 14028	Factura: 3995/IPN
<u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 25923	Factura: 4164/IPN

4.1.3 Reactivos.

Cloruro de Sodio (grado reactivo)	Marca: J.T. Baker
Agua desionizada (tipo II)	Lote: 240804

4.1.4 Equipo

Balanza	Marca: Sartorius	Modelo: RC250S
Autoclave	Marca: Aesa	Modelo: CV-250
Incubadora	Marca: Lab-Line	Modelo: C-240
Refrigerador	Marca: General Electric	Modelo: 2215
Bomba de Vacío	Marca: Mityvac	Modelo:1G98
Equipo de filtración	Marca: Millipore	Modelo: XX2004720

4.1.5 Instrumentos

Espectrofotómetro	Marca: Hach	Modelo: DR-2000
-------------------	-------------	-----------------

4.1.6 Medios de Cultivo

Caldo Rojo de fenol + Lactosa	Marca: Becton Dickinson	Lote:30077792
Agar Endo	Marca: Merck	Lote: VM066844
Agar Infusión Cerebro-Corazón	Marca: Bioxon	Lote:4078967
Agar m-FC	Marca: Becton Dickinson	Lote: 3160677

4.1.7 Soluciones

Cloruro de Sodio al 0.85% P/V

4.2 Metodología

4.2.1 Diagrama de Bloques.

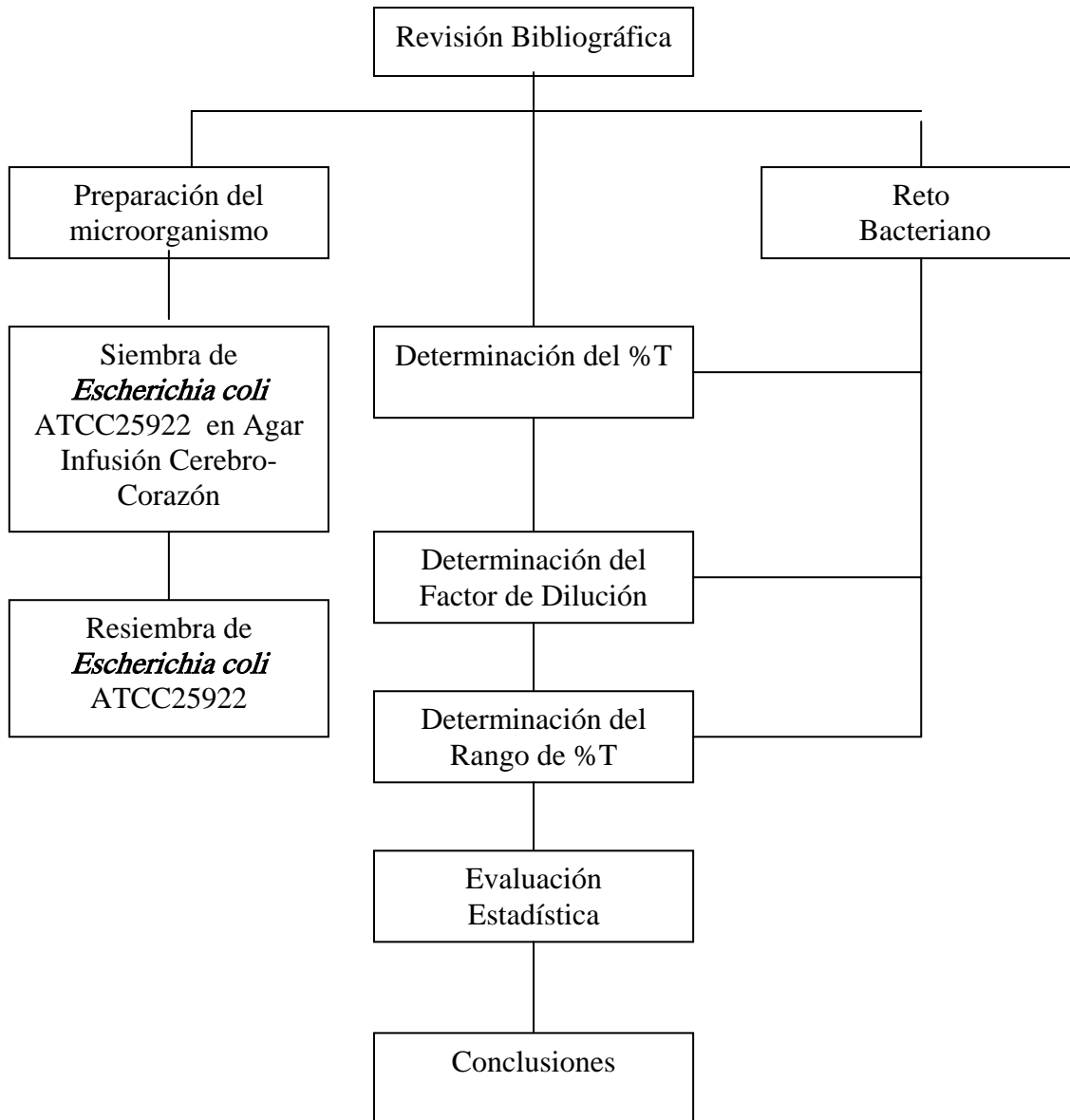


Diagrama 1. Metodología general

4.2.2 Procedimiento.

4.2.2.1 **Revisión Bibliografica.** Efectuar la revisión en fuentes primarias y secundarias sobre el problema que se plantea resolver.

4.2.2.2 **Preparación del Microorganismo.** Sembrar la cepa de trabajo ***Escherichia coli*** en agar Infusión cerebro corazón, se incuba durante 24 h a $35^{\circ} \pm 1$, después del periodo de incubación se resiembra la bacteria, en el medio de cultivo antes utilizado y se incuba a $35^{\circ}\text{C} \pm 1$, durante 24 h.

4.2.2.3 **Reto bacteriano.** Sembrar en los medios de cultivo que se utilizan (agar ENDO y agar m-FC), por la técnica de filtración de membrana, las cepas bacterianas de ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028, ***Staphylococcus aureus*** ATCC 25923 y ***Escherichia coli*** ATCC 25922, así mismo inocular el caldo rojo de fenol más lactosa.

4.2.2.4 **Determinación del %T.** Después de haber realizado la segunda resiembra, se toma una asada del microorganismo y se resuspende en solución de cloruro de sodio al 0.85%, se ajusta la suspensión a 90 %T a 580 nm.

Hecha la suspensión se toma 1, 3 y 5 mL de la suspensión se completan a 100 mL con solución salina al 0.85% previamente esterilizada, se agita perfectamente la suspensión, se filtran dos volúmenes de 25 mL utilizando membranas de tamaño de poro 0.45 μm , una de las membranas se siembra en agar endo, se incuba a $35^{\circ}\text{C} \pm 1.0$ durante 24 h, la otra membrana se siembra en agar m-FC, se incuba a $44 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 24 h, para entender mejor observar la figura 8

Si el resultado es incontable, se procede a elaborar otra suspensión de bacterias previamente resembrada en agar infusión cerebro-corazón, se preparan las suspensiones aumentando de uno en uno el %T (91, 92, 93, 94...), tomando en todas 1, 3 y 5 mL, llevando a un volumen de 100 mL, con agua estéril hasta que las colonias sean contables o se empiecen a definir, seguir el procedimiento que se ilustra en la figura 8

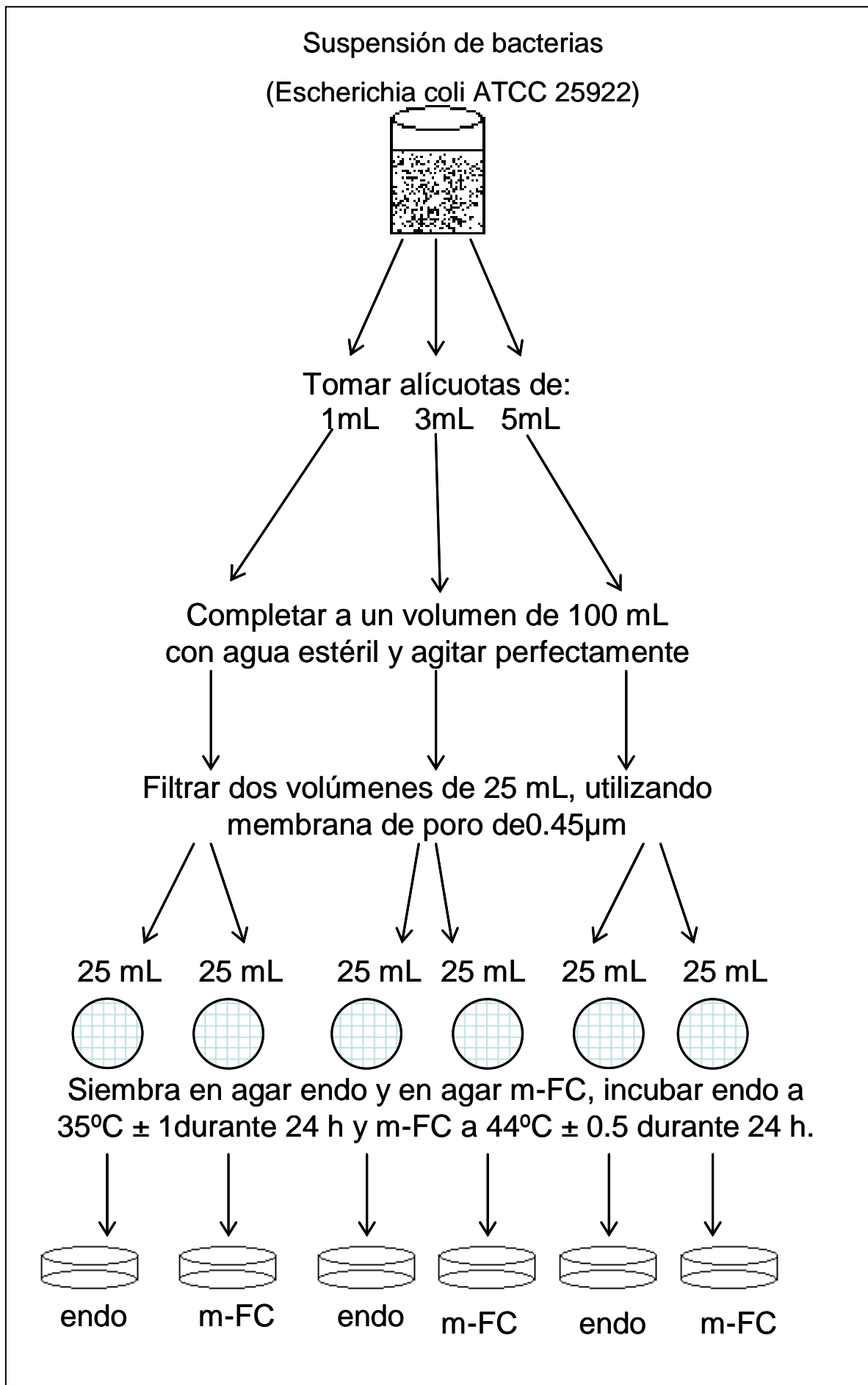


Figura 8. Procedimiento para determinar el % T

4.2.2.5 Determinación del Factor de Dilución. Cuando se encuentre el %T adecuado determinar las diluciones adecuadas, de la suspensión hecha, tomar alícuotas de 1, 3 y 5 mL y llevarlos a 100 mL con agua estéril, agitar perfectamente, de cada frasco tomar un mililitro y mezclarlos con 99 mL de agua estéril, agitar perfectamente, filtrar dos volúmenes de 25 mL de la dilución con membranas de tamaño de poro de 0.45 μm , una de las membranas sembrar en agar endo, incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 1.0$ durante 24 h, la otra membrana sembrar en agar m-FC a 44 ± 0.5 $^{\circ}\text{C}$ durante 24 h, ver figura 9

Si el resultado es incontable volver a preparar la suspensión utilizando el microorganismo recientemente resembrado con el %T ya fijado, tomar alícuota de 1, 3 y 5 mL, llevar a un volumen de 100 mL, agitar la suspensión, de cada frasco tomar un mililitro y mezclarlo con 99 mL de agua estéril, agitar perfectamente tomar de esta ultima suspensión un mililitro de cada uno y mezclarlos con 99 mL de agua estéril, mezclar perfectamente filtrar dos volúmenes de 25 mL por membrana tamaño de poro de 0.45 μm , una de las membranas sembrar en agar endo incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 1.0$ durante 24 h , la otra membrana se siembra en agar m-FC, incubar a $44^{\circ}\text{C} \pm 0.5$, ver figura 9

Después de la incubación se revisan las cajas si el resultado es incontable, preparar nuevamente la suspensión de bacterias con la cepa previamente resembrada con el %T fijado, se toman alícuotas de 1, 3 y 5 mL, se llevan a un volumen de 100 mL, se agita y se toma de cada frasco un mililitro, se mezclan con 99 mL de agua, se agitan se toma nuevamente 1 mL de cada frasco y se mezclan con 99 mL de agua, se agita, se filtran dos volúmenes de 25 mL por membrana de 0.45 μm , una de las membranas se siembra en agar endo incubando a $35^{\circ}\text{C} \pm 1.0$ durante 24 h, la otra membrana se siembra en agar m-FC incubando a $44^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ durante 24 h, ver figura 9

Si las colonias son bien definidas en todas las alícuotas, se procede a evaluar, el %T, hacia arriba y hacia abajo, utilizando las diluciones ya establecidas, pero cambiando el volumen de siembra, sembrando 25 mL.

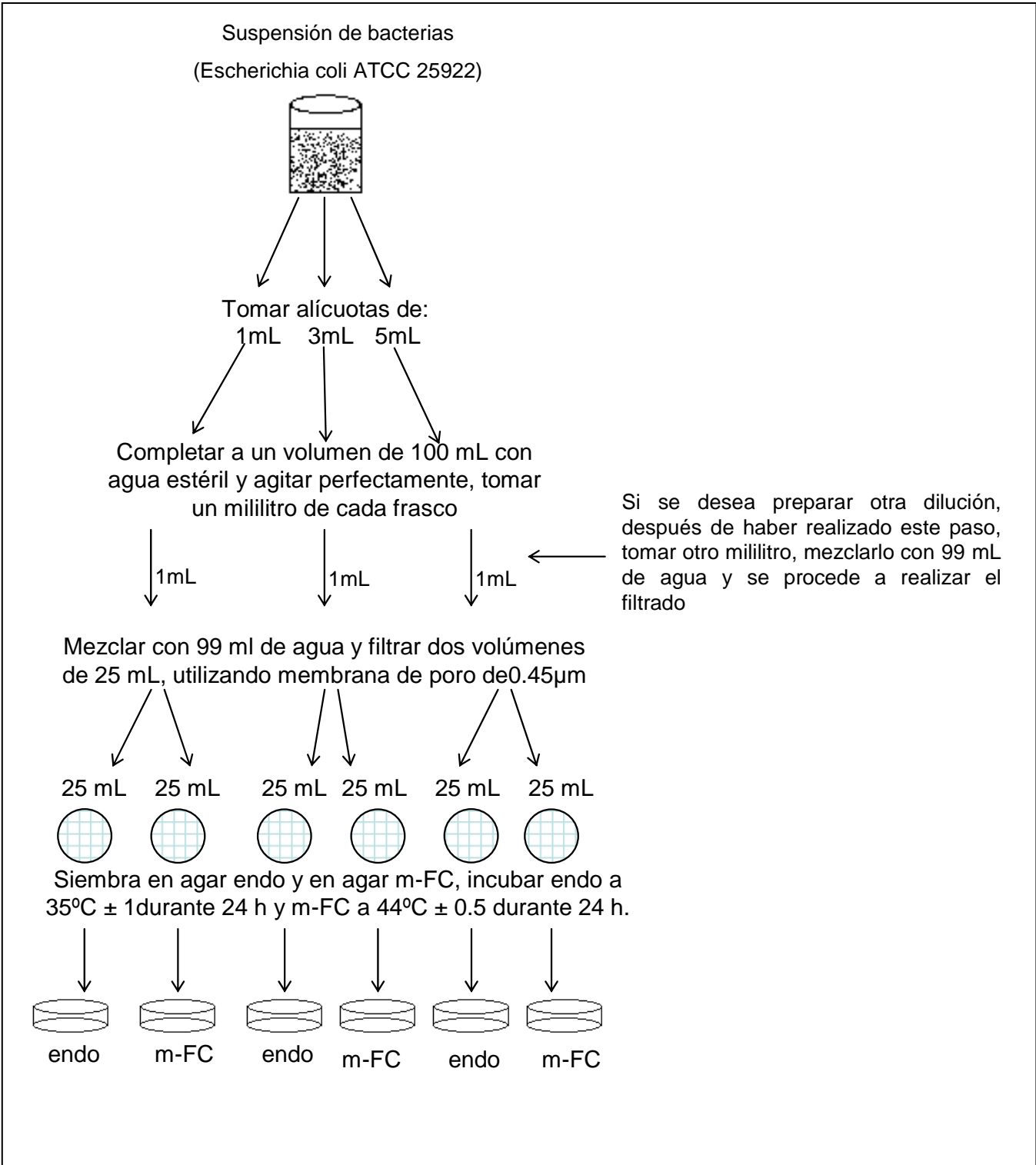


Figura 9. Procedimiento para determinar las diluciones adecuadas

4.2.2.6 Determinación del rango de %T. Una vez que se tenga elegido el %T y el factor de dilución, evaluar dos diferentes %T, es decir uno hacia arriba y el otro hacia abajo.

4.2.2.7 Evaluación Estadística. Con los datos obtenidos evaluar si el método de preparación es repetible y reproducible.

4.2.2.8 Conclusiones.

5. Resultados y Análisis de Resultados

5.1 Preparación del Microorganismo

Microorganismo	Agar	Incubación	Observaciones
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Infusión cerebro corazón	35°C 24h	Al realizar siembra se observan colonias blancas, redondas, crecimiento pobre
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Infusión cerebro corazón	35°C 24h	Al realizar resiembra se observan colonias blancas, redondas, crecimiento abundante

Tabla 7. Resultados obtenidos de la preparación del microorganismo.

Se puede observar en la tabla 7, que al realizar la siembra del microorganismo, el crecimiento fue pobre, esto se debe a que al momento de sembrar de la cepa original, no todas las bacterias se encontraban viables, algunas ya se encontraban en la fase de muerte, al efectuar la resiembra del microorganismo, se aprecia un crecimiento abundante, esto se debe a que las bacterias se encontraban en la fase exponencial de la curva de crecimiento.

5.2 Reto Bacteriano

Microorganismo	Agar	Incubación	Observaciones
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	ENDO	35°C 24h	Colonias Incoloras
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	m-FC	44°C 24h	Colonias grisáceas
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	ENDO	35°C 24h	Sin crecimiento
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	m-FC	44°C 24h	Sin crecimiento
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	ENDO	35°C 24h	Colonias rojas, brillo metálico
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	m-FC	44°C 24h	Colonias azules

Tabla 8. Resultados obtenidos de las pruebas de reto bacteriano en agar

Microorganismo	Incubación	Observaciones
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	35°C 24h	Producción de gas (-), producción de ácido (-)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	35°C 24h	Producción de gas (+), producción de ácido (+)

Tabla 9. Resultados obtenidos de las pruebas de reto bacteriano en caldo rojo de fenol más lactosa

Se aprecia en la tabla 8, la diferente morfología colonial que presentan las cepas bacterianas al sembrarlas en los agares ENDO y m-FC, esto se debe a la capacidad que tienen para fermentar la lactosa, la cepa de ***Escherichia coli*** ATCC 25922, presenta colonias rojas, esto es por la fermentación de la lactosa, al fermentarla produce ácido, el indicador que contiene el medio de cultivo vira y se aprecian las colonias rojas, las colonias de ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028, se observan incoloras, esto se debe a que no fermentan la lactosa y el indicador no vira, para el caso de la cepa de ***Staphylococcus aureus*** ATCC 25923, no se observa crecimiento en ninguno de los dos medios de cultivo, debido a que el agar ENDO contiene sulfito de sodio y fucsina que inhibe el crecimiento de las bacterias gram positivas, el agar m-FC, contiene sales biliares que también inhiben el crecimiento de las bacterias gram positivas.

En la tabla 9 se observa la confirmación de la diferenciación fisiológica de las cepas utilizadas, la producción de gas y de ácido se debe al consumo de la lactosa.

5.3 Determinación del %T

Volumen de Siembra: 25 mL		
Agar Endo		Agar m-FC
% T	Observaciones	Observaciones
90	Se observa abundante crecimiento	Se observa abundante crecimiento
91	Se observa abundante crecimiento	Se observa abundante crecimiento
92	Se observa abundante crecimiento	Se observa abundante crecimiento
93	Se observa abundante crecimiento	Se observa abundante crecimiento
94	Se observa abundante crecimiento	Se observa abundante crecimiento
95	Se observa abundante crecimiento	Se observa abundante crecimiento
96	Se observa abundante crecimiento	Se observa abundante crecimiento
97	Aunque no se pueden contar, el crecimiento comienza a disminuir, con relación a los otros % T.	Aunque no se pueden contar, el crecimiento comienza a disminuir, con relación a los otros % T.
98	Aunque no se pueden contar, el crecimiento comienza a disminuir, con relación a los otros % T.	Aunque no se pueden contar, el crecimiento comienza a disminuir, con relación a los otros % T.
98.5	Aunque no se pueden contar, el crecimiento comienza a disminuir, con relación a los otros % T.	Aunque no se pueden contar, el crecimiento comienza a disminuir, con relación a los otros % T.
98.6	Aunque no se pueden contar, el crecimiento comienza a disminuir, con relación a los otros % T.	Aunque no se pueden contar, el crecimiento comienza a disminuir, con relación a los otros % T.
98.7	El crecimiento bacteriano disminuye, con relación a los %T, en el centro no se distinguen las UFC, pero en las orillas de caja se distinguen, por lo tanto este es el %T que se fija	El crecimiento bacteriano disminuye, con relación a los %T, en el centro no se distinguen las UFC, pero en las orillas de caja se distinguen, por lo tanto este es el %T que se fija

Tabla 10. Resultados de la determinación del %T ,el resultado fue incontable para las alícuotas de 1,3 y 5 mL.

Al observar la tabla 10 nos podemos dar cuenta que se comenzó a trabajar a partir del 90 %T , como el resultado fue incontable se fue aumentando una unidad cada vez en la preparación de la suspensión, en todas el resultado es incontable debido a la cantidad de microorganismos presentes en la suspensión, cuando se prepara la suspensión al 97 %T aunque el resultado también era incontable el crecimiento era menos en comparación con los otros %T, se preparo la suspensión al 98 %T, después del periodo de incubación, el crecimiento disminuye considerablemente, por esta razón se procede a prepara una suspensión al 98.5 %T, después del periodo de incubación el crecimiento disminuye bastante, por esta razón se prepararon otras dos suspensiones aumentando de 0.1 %T en 0.1 %T , cuando se prepara la suspensión al 98.7 %T el resultado después del periodo de incubación en los dos medios de cultivo (endo y m-FC) es que en el centro de la caja no se distinguían las colonias pero en la orilla de la membrana ya se observaban colonias definidas, por tal motivo este fue el %T que se fijo.

5.2 Determinación del Factor de Dilución

%T = 98.7 Volumen de sembrado: 25 mL				
Agar	Dilución 1 (mL:10 ⁻⁴)	UFC	Dilución 2 (mL:10 ⁻⁶)	UFC
Endo	1	> 400	1	105
m-FC	1	> 400	1	102
Endo	3	> 400	3	284
m-FC	3	> 400	3	279
Endo	5	> 400	5	420
m-FC	5	> 400	5	415

Tabla 11. Resultados obtenidos de la determinación del factor de dilución

Después de que se determino el %T se comenzó a realizar diluciones, en la tabla 11 se concentran los resultados obtenidos después de haber realizado dos diluciones diferentes.

En la primer dilución, las colonias ya se observaban definidas, pero por la cantidad de UFC, no se podían contar adecuadamente, se contabilizaron en todas las cajas mas de 400 UFC, esto debido a en la membrana se quedaban retenidos una cantidad abundante de bacterias que al reproducirse impedían que se contabilizaran adecuadamente por tal motivo,

se efectuó una segunda dilución, al filtrar la segunda dilución, las colonias ya se encontraban bien definidas y su contabilización era ya posible, debido a que el número de bacterias que se quedaron retenidas en el filtro era menor.

5.3 Determinación del rango del %T

Agar	Alícuota: 1 mL	Alícuota: 3 mL
Endo	Fcalc: 3.23	Fcalc: 0.58
	Ftablas: 3.88	Ftablas: 3.88
m-FC	Fcalc: 3.85	Fcalc: 3.79
	Ftablas: 3.88	Ftablas: 3.88

Tabla 12. Resultados obtenidos de evaluar el rango del %T

Estadigrafo de contraste:
 Ho: No hay efecto de % T
 Ha: Si hay efecto de % T
 $F_{calc} < F_{tablas}$, por lo tanto Ho se acepta

Como podemos observar en todos los casos Fcalc es menor a la Ftablas, esto se debe a que no existe efecto de %T, es decir que si podemos tener un rango del %T cuando se este preparando una suspensión de bacterias, en la parte de evaluación estadística se describe el análisis de varianza.

5.4 Evaluación Estadística

5.4.1 Determinación de los límites de confianza de la media

Agar	1 mL	3 mL	5 mL
	UFC	UFC	UFC
ENDO	105-111	284-299	405-420
m-FC	102-109	282-295	400-411

Tabla 13. Resultados obtenidos de los límites de confianza de la media

En la tabla 13, se concentran los resultados de los límites de confianza de las medias para cada una de las alícuotas, estos resultados se obtuvieron después de realizar 10 repeticiones de cada alícuota (nivel), se determinó la media, la desviación normal, el coeficiente de variación y los límites superiores e inferiores (ver anexo C), de cada alícuota tomada de la suspensión original, sembrada en los dos medios de cultivo.

Este cálculo se realizó para definir el intervalo dentro del cual pudiéramos suponer de manera razonable que se encuentra el valor verdadero, esto por que se tenía que definir el valor de cuantas UFC equivalía una suspensión al 98.7 %T después de dos diluciones, estos límites servirán para poder aceptar una determinación usando una suspensión del microorganismo (**Escherichia coli ATCC 25922**).

5.4.2 Repetibilidad

Agar	Alícuota: 1 mL	Alícuota: 3 mL
Endo	χ^2 calc: 0.2407	χ^2 calc: 0.2405
	χ^2 tablas: 9.48	χ^2 tablas: 9.48
m-FC	χ^2 calc: 0.7619	χ^2 calc: 0.3819
	χ^2 tablas: 9.48	χ^2 tablas: 9.48

Tabla 14. Resultados Obtenidos de evaluar la repetibilidad

Estadígrafo de Contraste:

Ho: La preparación es repetible con _____mL

Ha: La preparación No es repetible con ____mL

$\chi^2 \text{ calc} < \chi^2 \text{ tablas}$, por lo tanto Ho se acepta

Los resultados de repetibilidad, se encuentran concentrados en la tabla 14, la secuencia más detallada se puede encontrar en el anexo C, se evaluó cada alícuota tomada de la suspensión original en cada medio de cultivo utilizado, esto se realizó porque se necesitaba saber si el método de preparación para cada alícuota tomada de la suspensión original y después de dos diluciones podía ser repetible, para confirmar esto se realizó prueba chi-cuadrada (χ^2), esta prueba se realizó para probar si las frecuencias observadas difieren en forma significativa de las que se podrían esperar.

El estudio para la alícuota de 5 mL no se realizó, esto debido al número de colonias al cual equivale esta alícuota, que para algunos analistas es difícil contar, en todos los casos $\chi^2 \text{ calc} < \chi^2 \text{ tablas}$, por lo tanto todas las preparaciones son repetibles.

5.4.3 Reproducibilidad

Alícuotas Original: 1 y 3 mL Unidades: %Recobro		
Agar: Endo Volumen de Siembra: 25 mL		
Analista	día 1	día2
1	96.29	106.21
	99.07	99.12
	101.85	97.28
	107.71	95.36
	99.31	102.35
	100.34	101.25
2	98.25	98.25
	102.25	102.58
	98.02	101.02
	98.29	99.23
	100.02	98.56
	105.23	102.36

Tabla 15. Resultados obtenidos de la prueba de reproducibilidad de las alícuotas de 1 y 3 mL, sembradas en agar endo

Estadígrafo de contraste:

a) Ho: no hay efecto del analista; Ha: si hay efecto del analista

b) Ho: no hay efecto del día ; Ha: si hay efecto del día

c) Ho: no hay efecto de la interacción analista/día

Ha: si hay efecto de la interacción analista/día

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F Calc.</i>	<i>F tab.</i>
Muestra	0.18026667	1	0.18026667	0.01720993	4.35125003
Columnas	0.39015	1	0.39015	0.03724735	4.35125003
Interacción	0.36015	1	0.36015	0.03438327	4.35125003
Dentro del grupo	209.491433	20	10.4745717		
Total	210.422	23			
Total	0.18026667	1			

Tabla 16. Análisis de varianza de las alícuotas de 1 y 3 mL, sembradas en agar ENDO

Alícuotas Originales: 1 y 3 mL Unidades: %R		
Agar: m-FC Volumen de Siembra: 25 mL		
Analista	dia 1	dia2
1	97.14	99.04
	105.71	102.85
	95.23	103
	96.12	99
	95.61	105
	96	101.25
2	98.23	100.34
	99.54	97.93
	97.85	96.35
	102.56	102.56
	101.57	103.95
	99.58	98.56

Tabla 17. Resultados obtenidos de la prueba de reproducibilidad de las alícuotas de 1 y 3 mL, sembradas en agar m-FC

Estadígrafo de contraste:

a) Ho: no hay efecto del analista; Ha: si hay efecto del analista

b) Ho: no hay efecto del día ; Ha: si hay efecto del día

c) Ho: no hay efecto de la interacción analista/día

Ha: si hay efecto de la interacción analista/día

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F Calc.</i>	<i>F tab.</i>
Muestra	0.39270417	1	0.39270417	0.04680691	4.35125003
Columnas	25.3998375	1	25.3998375	3.02743902	4.35125003
Interacción	23.9400375	1	23.9400375	2.8534436	4.35125003
Dentro del grupo	167.797517	20	8.38987583		
Total	217.530096	23			
Total	0.39270417	1			

Tabla 18. Análisis de varianza de las alícuotas de 1 y 3 mL, sembradas en agar m-FC

Para el estudio de Reproducibilidad se evaluó la preparación de las suspensiones por dos analistas diferentes en días diferentes, se determinaron los % Recobro, esto para poder realizar el análisis de varianza, se prepararon las dos alícuotas por triplicado, esto por dos analistas en dos días diferentes es por eso que en las tablas 15 y 16 aparecen 6 niveles (3 por la alícuota de 1 mL y 3 por la alícuota de 3 mL), en los dos casos (incubación en agar endo y en agar m-FC), las $F_{calc} < F_{tab}$, por lo que no existe efecto por analista, no hay efecto por el día de preparación y por ultimo no existe efecto analista-día.

5.4.4 Determinación del Rango del %T

Alícuota Original: 1 mL Unidades: UFC					
Agar: Endo Volumen de siembra: 25 mL					
%T	Análisis 1	Análisis 2	Análisis 3	Análisis 4	Análisis 5
98.6	107	110	109	104	108
98.7	102	109	106	108	107
98.8	105	103	105	103	105

Tabla 19, Resultados de la evaluación del % T, partiendo de una alícuota original de 1 mL

Análisis de varianza de un factor

Ho: No hay efecto de % T

Confianza = 0.05

Ha: Si hay efecto de % T

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Día 1	3	538	107.6	5.3
Día 2	3	532	106.4	7.3
Día 3	3	521	104.2	1.2

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Fcalculada	F tablas
Entre grupos	29.7333333	2	14.8666667	3.23188406	3.88
Dentro de los grupos	55.2	12	4.6		
Total	84.9333333	14			

Tabla 20. Análisis de varianza, de una alícuota de 1 mL, utilizando agar ENDO

F calc < F tab, por lo tanto se acepta Ho

Alícuota Original: 3 mL Unidades: UFC					
Agar: Endo Volumen de siembra: 25 mL					
%T	Análisis 1	Análisis 2	Análisis 3	Análisis 4	Análisis 5
98.6	290	296	295	299	290
98.7	284	290	300	296	283
98.8	280	288	292	288	301

Tabla 21, Resultados de la evaluación del % T, partiendo de una alícuota original de 3 mL

Análisis de varianza de un factor

Ho: No hay efecto de % T

Confianza = 0.05

Ha: Si hay efecto de % T

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Día 1	3	1470	294	15.5
Día 2	3	1453	290.6	54.8
Día 3	3	1449	289.8	58.2

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Fcalculada	F tablas
Entre grupos	49.7333333	2	24.8666667	0.58054475	3.88
Dentro de los grupos	514	12	42.8333333		
Total	563.733333	14			

Tabla 22. Análisis de varianza, de una alícuota de 3 mL, utilizando agar ENDO

F calc < F tab, por lo tanto se acepta Ho

Alícuota Original: 1 mL Unidades: UFC					
Agar: m-FC Volumen de siembra: 25 mL					
%T	Análisis 1	Análisis 2	Análisis 3	Análisis 4	Análisis 5
98.6	109	110	106	108	109
98.7	102	100	106	108	105
98.8	100	108	105	101	106

Tabla 23. Resultados de la evaluación del % T, partiendo de una alícuota original de 1mL

Análisis de varianza de un factor

Ho: No hay efecto de % T
Ha: Si hay efecto de % T

Confianza = 0.05

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Día 1	3	542	108.4	2.3
Día 2	3	521	104.2	10.2
Día 3	3	520	104	11.5

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Fcalculada	F tablas
Entre grupos	61.7333333	2	30.8666667	3.85833333	3.88
Dentro de los grupos	96	12	8		
Total	157.733333	14			

Tabla 24. Análisis de varianza, de una alícuota de 1 mL, utilizando agar m-FC

F calc < F tab, por lo tanto se acepta Ho

Alícuota Original: 3 mL Unidades: UFC					
Agar: m-FC Volumen de siembra: 25 mL					
%T	Análisis 1	Análisis 2	Análisis 3	Análisis 4	Análisis 5
98.6	285	289	286	290	287
98.7	281	286	289	292	283
98.8	276	281	278	286	285

Tabla 25, Resultados de la evaluación del % T, partiendo de una alícuota original de 3 mL

Análisis de varianza de un factor

Ho: No hay efecto de % T
Ha: Si hay efecto de % T

Confianza = 0.05

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Día 1	3	1437	287.4	4.3
Día 2	3	1431	286.2	19.7
Día 3	3	1406	281.2	18.7

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Fcalculada	F tablas
Entre grupos	108.133333	2	54.0666667	3.79859485	3.88
Dentro de los grupos	170.8	12	14.2333333		
Total	278.933333	14			

Tabla 26. Análisis de varianza, de una alícuota de 3 mL, utilizando agar m-FC

$F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$, por lo tanto se acepta Ho

Se necesitaba saber si la suspensión se tendría que preparar a 98.7 %T o si podía tener un intervalo, por tal motivo se prepararon las suspensiones a 98.6 %T, 98.7 %T y 98.8 %T de las alícuotas de la suspensión original de 1 mL y 3 mL, los resultados obtenidos se encuentran en la tablas 17, 18, 19 y 20, los estadígrafos después de cada tabla muestran en todos los casos que $F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$, lo que significa que no existe efecto del %T.

6. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se concluye que el método para preparar una suspensión de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 580 nm y 98.7 %T es repetible y reproducible en varios días y por diferentes analistas.

También se concluye que la preparación de la suspensión de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 580 nm, se puede preparar a $98.7 \%T \pm 0.1 \%T$ sin que exista efecto en los resultados por esto.

Por ultimo se cumplió el objetivo de la Implementación en el método de filtración por membrana para la determinación de bacterias coliformes en muestras de agua, teniendo criterios para poder aceptar o rechazar resultados obtenidos después de utilizar la suspensión de *Escherichia coli* ATCC 25922 prepara a $98.7 \%T \pm 0.1 \%T$ con una longitud de onda de 580 nm, y con una dilución 1:10⁻⁶ se obtendra una media de UFC de 105

7. Propuestas y/o Recomendaciones.

1. La determinación debe realizarse en condiciones asépticas.
2. Antes de preparar la suspensión es importante resembrar la cepa.
3. Una vez preparada la suspensión agitar perfectamente antes de tomar cualquier alícuota.
4. La suspensión debe de prepararse con agua estéril.
5. El método solo podrá ser realizado por personal capacitado.

8. Bibliografía

1. Aguayo, F.(2002), "Metodología del diseño industrial"2ª ed. Rama, España pp. 550-557
2. APHA-AWWA-WPCF (1992),"Métodos Normalizados para el análisis de Aguas Potables y Residuales", 17ª ed.Díaz de Santos, España secc. 9-75
3. APHA-AWWA-WPCF(1995),"Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater"19ª ed, American Public Health Association, EUA secc. 9-67
4. Ayres, G.(1982), "Análisis Químico Cuantitativo", Ediciones Sol, México pp 463-470
5. Braude, I.(1984), "Microbiología Clínica", 1ª ed, Panamericana, Buenos Aires pp. 313-320
6. Brooks, G.(1999),"Microbiología Medica", 16ª ed, Manual Moderno, México pp 52-55
7. Bryan, A.(1984), "Bacteriología principios y practicas" 3ª ed. Continental, México pp. 343-360
8. Burrows, W.(1974), "Tratado de Microbiología", 2ª ed., Interamericana, México,pp. 510-531
- 9.Ceja,I.(2003),TESIS, Lic. QFB, "Implementación de un método rápido (bioluminiscencia) para la aprobación microbiológica de productos de cuidado oral, México, pp20-25, Fes-Cuautitlan UNAM

10. Collings, V.(1964),”The Freshwater environment and its Significance in Industry”, J. App.Bact, 27, 143-150
11. Day, R.(1989),”Química Analítica Cuantitativa”, 5ª ed, Prentice-Hall-Hispanoamericana, México pp 466-489
12. Devore, L.(2001), “Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Ciencias”, 5ª ed, Thomson Learning, Australia, pp 341-428
13. “Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos”(1994), 6ª ed, pp 189-196
14. Fernández, E.(1981), “Microbiología Sanitaria de Agua y Alimentos”,1, Universidad de Guadalajara, México, pp. 103-110
- 15.Koneman, E.(1989) “Diagnostico Microbiológica”, 3a ed, Panamericana, México, pp 126-151
- 16.Macedo, S.(1997),TESIS, Lic. QFB, ”Validación del método de limites microbianos para la cuantificación de microorganismos mesofilicos aerobios en una suspensión antiácida”, México pp. 12-20, Fes-Cuautitlan UNAM
- 17.Manual Merck (1994),”Medios de Cultivo”, pp. 88-89
- 18.Manual Técnico de Equipos Scheider & Schuell, (2002)“Equipos de Filtración”, pp. 67-90
19. Manual Técnico Millipore (2004), “Productos de Laboratorio”, pp. 36-38

20. Miller, J. C.(1993), "Estadística para Química Analítica", 2ª ed, Addison-Wesley Iberoamericana. México pp 20-110

21. Moreno, C.(1988) ,TESIS, Lic. QFB, "Implementación de técnicas de cuantificación de aflatoxinas", México pp. 24-30, Fes-Cuautitlan UNAM

22.Norma Secretaria de Comercio y Fomento Industrial NMX-AA-102-1987 CALIDAD DEL AGUA-DETECCION Y ENUMERACIÓN DE ORGANISMOS COLIFORMES, TERMOTOLERANTES Y ESCHERICHIA COLI PRESUNTIVA-METODO DE FILTRACIÓN EN MEMBRANA, 23-agosto-1987

23. Pelczar, M.(1991), "Elementos de Microbiología", 4ª ed, Mcgraw-Hill, México pp. 190-210 (1991)

24. Quentin, M.(1991), "Bacteriología y Micología Medica", 2ª ed, Interamericana-McGraw-Hill, México pp 345-360

25. Roger, S.(1981), "Microbiología", 2a ed., Aguilar, España, pp. 300-339

26. Zimsser, W.(1987), "Microbiología", 1ª ED, Panamericana, Buenos Aires, pp. 697-699, 728-732

Anexo A Medios de Cultivo

Agar ENDO

USO:

Medio de cultivo selectivo y diferencial utilizado con más frecuencia en microbiología sanitaria para identificación de organismos entéricos patógenos.

PRINCIPIO:

La peptona proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos, la lactosa es el carbohidrato fermentable, el fosfato de potásico actúa como regulador de pH del medio de cultivo.

La selectividad del agar ENDO resulta de la combinación del sulfito de sodio-fucsina básica que inhiben a las bacterias gram positivas. Los coliformes fermentan la lactosa, formando aldehído y ácido, desarrollando colonias rojas con o sin brillo metálico, producido por la cristalización de fucsina. Las bacterias que no fermentan la lactosa forman colonias incoloras, quedando del color del medio de cultivo por estría cruzada. Incubar 24 h a 35 °C.

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Agar	15.0	Lactosa	10.0
Fucsina básica	0.5	Peptona de carne	10.0
Fosfato dipotásico	3.5	Sulfito de Sodio	2.5

Tabla 27 Composición de agar Endo pH 7.4 ± 0.2

PREPARACIÓN:

Rehidratar 41.5 g del medio en un litro de agua destilada, reposar 10 a 15 minutos, calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante un minuto para disolverlo por completo, esterilizar en autoclave a 121 °C (15 libras de presión) durante 10 minutos, dejar enfriar y dosificar en cajas petri estériles, conservar en refrigeración.

Agar Infusión Cerebro Corazón

USO:

Para el cultivo de una gran cantidad de microorganismos , también se utiliza para el aislamiento de hongos.

PRINCIPIO:

En este medio las peptonas y la infusión son fuentes de nitrógeno, carbono, azufre, vitaminas y factores de crecimiento, la dextrosa es la fuente de carbohidratos (energía), y el fosfato actúa como regulador de pH, el medio de cultivo puede ser adicionado con sangre de carnero, proporcionando factores esenciales de crecimiento para otros organismos exigentes.

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Agar	15.0	Infusión cerebro de ternera	7.7
Cloruro de sodio	5.0	Infusión corazón de res	9.8
Dextrosa	2.0	Peptona especial	10.0
Fosfato dipotásico	2.5		

Tabla 28 Composición de agar Infusión Cerebro Corazón pH 7.4 ± 0.2

PREPARACIÓN:

Rehidratar 52 g del medio en un litro de agua destilada, reposar 10 a 15 minutos, calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante un minuto para disolverlo por completo, esterilizar en autoclave a 121 °C (15 libras de presión) durante 10 minutos, dejar enfriar y dosificar en cajas petri estériles, conservar en refrigeración.

Agar m-FC

USO:

Para el aislamiento de organismos capaces de formar aeróbicamente colonias a 44 ± 0.5 °C en un medio de cultivo lactosado selectivo y diferencial, con producción de ácido y aldehído dentro de un periodo de 24 h.

PRINCIPIO:

El extracto de peptona y el de levadura son la fuente nutritiva, las sales de bilis sirven para inhibir a la bacterias gram positivas, los coliformes fermentan la lactosa, formando aldehído y ácido, desarrollando colonias azules, las bacterias que no fermentan la lactosa forman colonias grisaseas o incoloras.

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Agar	15.0	Cloruro de Sodio	5.0
Proteína de peptona	5.0	Sales de bilis	1.5
Triptosa	10.0	Lactosa	12.5
Extracto de Levadura	3.0	Azul métilico	0.1

Tabla 29 Composición de agar m-FC

PREPARACIÓN:

Rehidratar 52 g del medio en un litro de agua destilada, reposar 10 a 15 minutos, agregar 10 mL de ácido rosólico al 1 % en hidróxido de sodio 0.2 N esterilizar en autoclave a 121 °C (15 libras de presión) durante 10 minutos, dosificar en cajas petri estériles, conservar en refrigeración.

Caldo Rojo de Fenol con Lactosa

USO:

Para la identificación bioquímica de microorganismos basándose en su capacidad para fermentar la Lactosa

PRINCIPIO:

En esta fórmula la peptona de caseína proporciona los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos, la lactosa es el carbohidrato fermentable, al ser utilizado acidifica el medio manifestándose por una reacción ácida por la presencia del indicador rojo de fenol, la detección del gas se observa en la campana de Durham.

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA:

Cloruro de Sodio	5.0
Peptona de Caseína	10.0
Lactosa	5.0
Rojo de Fenol	0.018

Tabla 30 Composición del caldo rojo de fenol con lactosa pH 7.4 ± 0.2

PREPARACIÓN:

Rehidratar 20 g del medio en un litro de agua destilada, reposar 10 a 15 minutos, distribuir en tubos de ensaye con o sin campana, esterilizar en autoclave a 121 °C (15 libras de presión) durante 10 minutos, dejar enfriar y dosificar en cajas petri estériles, conservar en refrigeración.

Anexo B. Caracterización de Bacterias

Caracterización de E.N.C.B. *Escherichia coli* ATCC 25922

PRUEBA	RESULTADO
Morfología microscópica	Bacilos Gram negativos
Arreglo	Aislados
Producción de gas a partir de glucosa	+
Producción de gas a partir de Trehalosa	+
Producción de gas a partir de L-Ramnosa	+
Producción de gas a partir de Mio-Inositol	+
Producción de gas a partir de L-arabinosa	+
Producción de gas a partir de Celobisa	-
Producción de gas a partir de Maltosa	+
Producción de gas a partir de Lactosa	+
Desc. Ornitina	+
Crecimiento y utilización de Mucato	+
Acetato	+
Rojo de metilo	+
Voges Poskauer	-
KCN	-
Indol	+
Movilidad	+
Ureasa	-
Citrato de Simmons	-
Producción de H ₂ S	-

Tabla 31 Caracterización de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922

Caracterización de E.N.C.B. ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028

PRUEBA	RESULTADO
Morfología microscópica	Bacilos Gram negativos
Producción de gas a partir de glucosa	+
Producción de gas a partir de Inositol	-
Producción de gas a partir de Arabinosa	-
Producción de gas a partir de Dulcitol	+
Producción de gas a partir de Lactosa	-
Rojo de metilo	+
Lisina	-
Arginina	-
Orinitina	
Indol	-
Movilidad	+
Ureasa	-
Citrato de Simmons	+
Producción de H ₂ S	+

Tabla 32 Caracterización de la cepa ***Salmonella typhimurium*** ATCC 14028

Caracterización de E.N.C.B. ***Staphylococcus aureus*** ATCC 25923

Prueba	Resultado
Morfología microscópica	Cocos gram positivos
Arreglo	En racimos
Crecimiento aerobio	+
Crecimiento anaerobio	+
Crecimiento en NaCL al 10%	+
Crecimiento en NaCl al 15 %	+
Crecimiento a 15 °C	+
Crecimiento a 45 °C	+
Acetil Metil Carbinol	+
Xilosa	-
Rafinosa	-
Sacarosa	+
Maltosa	+
Manitol	+
Catalasa	+
Ureasa	+
Coagulasa (plasma humano)	+
Hemólisis	Beta
Desoxiribonucleasa	+
Sensibilidad a novobiocina	+

Tabla 33 Caracterización de la cepa ***Staphylococcus aureus*** ATCC 25923

ANEXO C. Evaluación Estadística

Determinación de los Límites de Confianza de la Media

	Agar Endo			Agar m-FC		
	Alícuota Original (mL)			Alícuota Original (mL)		
	1	3	5	1	3	5
	105 UFC	284 UFC	420 UFC	102 UFC	279 UFC	415 UFC
	109 UFC	290 UFC	416 UFC	100 UFC	286 UFC	409 UFC
	106 UFC	300 UFC	418 UFC	106 UFC	295 UFC	410 UFC
	113 UFC	296 UFC	420 UFC	108 UFC	292 UFC	412 UFC
	107 UFC	283 UFC	415 UFC	105 UFC	283 UFC	409 UFC
	110 UFC	295 UFC	408 UFC	102 UFC	292 UFC	399 UFC
	104 UFC	278 UFC	399 UFC	102 UFC	289 UFC	400 UFC
	111 UFC	289 UFC	421 UFC	106 UFC	278 UFC	402 UFC
	105 UFC	301 UFC	400 UFC	110 UFC	296 UFC	398 UFC
	112 UFC	298 UFC	410 UFC	112 UFC	298 UFC	402 UFC
Media	108 UFC	291 UFC	412 UFC	105 UFC	288 UFC	405 UFC
Desviación	3.2249031	7.86271087	8.1520277	3.88873016	7.06792442	6.05896948
t	2.26215889	2.26215889	2.26215889	2.26215889	2.26215889	2.26215889
Intervalo \pm	2.97827057	7.26139039	7.52858098	3.59132979	6.52738721	5.59559463
Coef. Variacion	2.98	2.70	1.97	3.70	2.45	1.49
LCS	111 UFC	299 UFC	420 UFC	109 UFC	295 UFC	411 UFC
LCI	105 UFC	284 UFC	405 UFC	102 UFC	282 UFC	400 UFC

LCS=Límite de Confianza Superior, LCI=Límite de Confianza Inferior, t= t de Student 95% de confianza, g.l.= 9

Tabla 34. Resultados obtenidos de la determinación de los límites de confianza de la media,

Criterio de aceptación para el Coeficiente de Variación, C.V. < 5 %

Repetibilidad

Alícuota Original : 1 mL Unidades: UFC			
Agar: Endo Volumen de Siembra: 25 mL			
Valor Obtenido	Valor Esperado	Obt. - Esp.	(Obt. - Esp.) ² /Esp.
104	108	-4	0.148148148
107	108	-1	0.009259259
110	108	2	0.037037037
110	108	2	0.037037037
109	108	1	0.009259259
		0	0.240740741

Tabla 35. Resultados obtenidos de la prueba de repetibilidad de la alícuota de 1 mL, sembrada en agar endo

Estadígrafo de Contraste Confianza= 0.05 g.l. = 4
 χ^2 calc = 0.240740741 Ho: La preparación es repetible con 1 mL
 χ^2 teórica = 9.487728465 Ha: La preparación No es repetible con 1 mL
 χ^2 calc < χ^2 teórica por lo tanto Ho se acepta

Alícuota Original : 1 mL Unidades: UFC			
Agar: m-FC Volumen de Siembra: 25 mL			
Valor Obtenido	Valor Esperado	Obt. - Esp.	(Obt. - Esp.) ² /Esp.
102	105	-3	0.085714286
111	105	6	0.342857143
100	105	-5	0.238095238
104	105	-1	0.00952381
108	105	3	0.085714286
		0	0.761904762

Tabla 36. Resultados obtenidos de la prueba de repetibilidad de la alícuota de 1 mL, sembrada en agar m-FC

Estadígrafo de Contraste Confianza= 0.05 g.l. = 4
 χ^2 calc = 0.761904762 Ho: La preparación es repetible con 1 mL
 χ^2 teórica = 9.487728465 Ha: La preparación No es repetible con 1 mL
 χ^2 calc < χ^2 teórica por lo tanto Ho se acepta

Alícuota Original : 3 mL Unidades:UFC			
Agar: Endo Volumen de Siembra: 25 mL			
Valor Obtenido	Valor Esperado	Obt. - Esp.	(Obt. - Esp.) ² /Esp.
296	291	5	0.085910653
289	291	-2	0.013745704
292	291	1	0.003436426
285	291	-6	0.12371134
293	291	2	0.013745704
		0	0.240549828

Tabla 37 Resultados obtenidos de la prueba de repetibilidad de la alícuota de 3 mL, sembrada en agar endo

Estadígrafo de Contraste Confianza= 0.05 g.l. = 4
 χ^2 calc = 0.240549828 Ho: La preparación es repetible con 1 mL
 χ^2 teórica= 9.487728465 Ha: La preparación No es repetible con 1 mL
 χ^2 calc < χ^2 teórica por lo tanto Ho se acepta

Alícuota Original : 3 mL Unidades: UFC			
Agar: m-FC Volumen de Siembra: 25 mL			
Valor Obtenido	Valor Esperado	Obt. - Esp.	(Obt. - Esp.) ² /Esp.
286	288	-2	0.013888889
295	288	7	0.170138889
292	288	4	0.055555556
283	288	-5	0.086805556
284	288	-4	0.055555556
		0	0.381944444

Tabla 38. Resultados obtenidos de la prueba de repetibilidad de la alícuota de 3 mL, sembrada en agar m-FC

Estadígrafo de Contraste Confianza= 0.05 g.l. = 4
 χ^2 calc = 0.381944444 Ho: La preparación es repetible con 1 mL
 χ^2 teórica = 9.487728465 Ha: La preparación No es repetible con 1 mL
 χ^2 calc < χ^2 teórica por lo tanto Ho se acepta

Repetibilidad

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

RESUMEN	dia 1	dia2	Total
<i>analista 1</i>			
Cuenta	6	6	12
Suma	604.57	601.57	1206.14
Promedio	100.761667	100.261667	100.511667
Varianza	14.9212967	14.9881367	13.6633788
<i>analista 2</i>			
Cuenta	6	6	12
Suma	602.06	602	1204.06
Promedio	100.343333	100.333333	100.338333
Varianza	8.32310667	3.66574667	5.44950606
<i>Total</i>			
Cuenta	12	12	
Suma	1206.63	1203.57	
Promedio	100.5525	100.2975	
Varianza	10.6133659	8.48043864	

Tabla 39. Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo, sembrado en agar ENDO

RESUMEN	dia 1	dia2	Total
<i>analista 1</i>			
Cuenta	6	6	12
Suma	585.81	610.14	1195.95
Promedio	97.635	101.69	99.6625
Varianza	16.06075	5.694	14.3729841
<i>analista 2</i>			
Cuenta	6	6	12
Suma	599.33	599.69	1199.02
Promedio	99.8883333	99.9483333	99.9183333
Varianza	3.41741667	8.38733667	5.36677879
<i>Total</i>			
Cuenta	12	12	
Suma	1185.14	1209.83	
Promedio	98.7616667	100.819167	
Varianza	10.2384879	7.22789924	

Tabla 40. Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo, sembrado en agar m-FC