



COMISION NACIONAL
DEL AGUA



PROGRAMA AGUA LIMPIA
PROGRAMA AGUA LIMPIA
PROGRAMA AGUA LIMPIA
PROGRAMA AGUA LIMPIA
PROGRAMA AGUA LIMPIA
PROGRAMA AGUA LIMPIA

INTERNATIONAL REFERENCE CENTRE
FOR COMMUNITY WATER SUPPLY AND
SANITATION (IRC)

DETERMINACION DE COLIFORMES FECALES



ADiestRAMIENTO PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE LAS ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES EN EL SECTOR AGUA

BARCODE 9090
245.11 91AD

MANUAL No. 7
DETERMINACION DE COLIFORMES FECALES
1a. edición, 1991



Coordinación de Tecnología Hidráulica Urbano-Industrial
Subcoordinación de Calidad del Agua
CIECCA
Autores:
Ana María Sandoval, Gabriela Carlos
Revisor:
Blanca Jiménez

PROLOGO

El Programa Agua Limpia tiene como objetivo apoyar la estrategia puesta en marcha el 5 de abril en San Luis Potosí por el Lic. Carlos Salinas de Gortari referente a la atención de los problemas de contaminación del agua.

El Programa, en su primera etapa, se basa en cuatro acciones:

1. Proporcionar agua desinfectada en todos los sistemas de distribución.
2. Evitar que se rieguen hortalizas que se consumen crudas con aguas residuales no tratadas.
3. Garantizar que los hielos y el agua embotellada tengan la calidad adecuada para consumo humano.
4. Asegurar que las plantas de tratamiento de aguas residuales funcionen correctamente y que sus efluentes no contaminen los cuerpos receptores.

Estas medidas seguramente influirán en la disminución de las enfermedades diarreicas en el país. Sin embargo, éstas aún pueden propagarse a nivel de epidemia y en ocasiones provocar situaciones de emergencia.

Para capacitar a quien debe tomar decisiones en forma rápida y eficaz, el INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGIA DEL AGUA ha preparado el curso ADIESTRAMIENTO PARA LA PREVENCION Y CONTROL DE LAS ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES EN EL SECTOR AGUA que tiene como material de apoyo una serie de manuales, los primeros de ellos se citan a continuación:

1. Las enfermedades diarreicas.
2. Acciones para el control de enfermedades diarreicas en el sector agua.
3. Medidas prácticas de Ingeniería Ambiental para combatir enfermedades diarreicas.
4. Organización del trabajo y muestreo en campo.
5. Habilitación de un laboratorio de emergencia.
6. Determinación del cloro residual.
7. Determinación de coliformes fecales.
8. Identificación y cuantificación de Vibrio cholerae 01.
9. Sistema de información.

Debido a la situación que vive actualmente el país, en esta primera etapa se hace énfasis en el cólera. En manuales subsecuentes se abordarán otras enfermedades diarreicas que en su momento tengan carácter prioritario.

1 INTRODUCCION.

La demanda de agua para consumo requiere de un abastecimiento sanitario de este recurso, ésto sólo se puede lograr mediante una adecuada vigilancia microbiológica.

En México, una parte significativa del agua destinada para el consumo humano, no está sujeta a una vigilancia sanitaria sistemática, en parte por limitación de recursos e infraestructura y en parte por la carencia de recursos humanos calificados. Esta situación resulta en un mayor riesgo de la población a enfermedades infecciosas transmitidas a través del agua.

El objetivo de este manual es el complementar el curso prevención y control del colera en el sector agua, para contribuir con la capacitación de recursos humanos en aspectos relacionados con la vigilancia sanitaria del agua.

Se pretende que con uso de este manual como guía, los usuarios adquieran los conocimientos y experiencia necesarios para aplicar las técnicas bacteriológicas estandarizadas a la vigilancia sanitaria del agua.

2 IMPORTANCIA SANITARIA DEL ESTUDIO MICROBIOLOGICO DEL AGUA.

El agua para consumo humano puede estar contaminada por microorganismos patógenos de origen fecal como virus, bacterias, y parásitos. Muchas enfermedades importantes se asocian a contaminación del agua por desechos humanos. Algunas de éstas enfermedades, como las gastrointestinales, ocupan lugares preponderantes como causa de mortalidad infantil en lugares donde la pobreza y la desnutrición son comunes, siendo los niños el grupo de la población más afectado. Las enfermedades parasitarias causan debilidad crónica llevando al individuo a un mayor riesgo de sufrir infecciones por otros microorganismos.

La materia fecal contiene una gran cantidad de bacterias, casi siempre inofensivas, algunas de éstas son utilizadas como indicadores de contaminación fecal. En la mayoría de infecciones por bacterias entéricas patógenas existe el estado de portador sano, por lo que en las comunidades donde estas infecciones son comunes, una proporción de individuos sanos serán foco de excreción de bacterias patógenas, este estado de portador puede variar de unas semanas hasta toda la vida del individuo.

3 INDICADORES BACTERIOLOGICOS DE CALIDAD DEL AGUA.

En los diferentes tipos de agua, pueden encontrarse diversas bacterias, de las cuales algunas son indígenas o nativas y por lo tanto pueden ser benéficas, ya que de éstas depende en gran medida el proceso de autopurificación de los cuerpos de agua y, otras que tienen su origen en las excretas de humanos y animales de sangre caliente (animales domésticos, silvestres y aves) que contaminan el agua.

En la evaluación microbiológica de la calidad del agua, sistemáticamente se realizan pruebas de laboratorio que permiten estimar la magnitud de la contaminación. Estas pruebas sistemáticas consisten en la determinación de los indicadores bacteriológicos de contaminación o de calidad del agua.

Los indicadores bacteriológicos, son organismos de un grupo específico, el cual por su sola presencia demuestra que ocurrió contaminación y en ocasiones, sugiere el origen de dicha contaminación.

La cantidad y variedad de bacterias patógenas y potencialmente patógenas, difiere de acuerdo al área geográfica, estado de salud de la comunidad, naturaleza y grado de tratamiento de los desechos, capacidad de autopurificación de los cuerpos de agua y características físicas y químicas del agua.

Debido a los altos costos que representa la caracterización bacteriológica de las aguas, es necesario realizar pruebas que permitan evidenciar la magnitud y origen de la contaminación bacteriana, esto es, la determinación de indicadores bacteriológicos de contaminación. Tradicionalmente, los coliformes totales, coliformes fecales y estreptococos fecales, son los grupos de bacterias indicadoras que se consideran en los estudios y trabajos de evaluación de calidad del agua.

De manera general, idealmente un indicador de contaminación por excretas humanas y de animales de sangre caliente debe poseer las siguientes características:

- Ser aplicable a todo tipo de agua
- Estar presente cuando existen bacterias patógenas de origen fecal
- La cantidad de bacterias estar directamente relacionada con el grado de contaminación fecal
- El tiempo de sobrevivencia debe ser más prolongado que el de los patógenos entéricos
- Desaparecer rápidamente del agua, una vez que han desaparecido los patógenos durante los procesos de autopurificación o de tratamiento.

- No reproducirse en el ambiente
- No deben estar presentes en agua potable
- Poder ser determinado cuantitativamente en forma rutinaria, sin interferencia por otras bacterias
- No ser patógeno al hombre o animales

la determinación de indicadores es de utilidad en múltiples ocasiones:

- Evaluación de la calidad del agua para definir su uso (agrícola, doméstico, recreativo, potable, riego de áreas verdes, entre otros)
- Evaluación de la eficiencia de plantas de tratamiento de aguas residuales y plantas potabilizadoras
- Determinación del efecto de agentes tóxicos y orgánicos en la flora bacteriana
- Identificación de fuentes de contaminación
- Diagnósticos relativamente rápidos de calidad bacteriológica del agua

Los indicadores también son de utilidad cuando el laboratorio no cuenta con recursos suficientes para realizar de manera sistemática la determinación de patógenos. De hecho las pruebas de patógenos se justifican únicamente en investigaciones, en brotes epidémicos y en situaciones específicas.

4 COLIFORMES.

Escherich, en 1885, aisló en heces humanas bacterias que se encontraban de manera consistente y en gran cantidad, por lo que las llamó "organismos característicos de las heces humanas", dándoles el nombre de Bacterium coli commune y Bacterium lactis aerogenes. Migula en 1895, designó a la primera Escherichia coli commune, posteriormente, se demostró que estas especies en realidad eran un conjunto bacteriano de especies y variedades de especies. En la actualidad, el grupo coliforme se define como todos aquellos bacilos cortos, gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, que fermentan la lactosa con producción de gas en 48 horas a 35 $\frac{1}{2}$ C.

Y los coliformes fecales se definen como todos aquellos bacilos cortos, gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, capaces de fermentar lactosa con producción de ácido y gas en 24-48 horas a 44 p 0.5 $\frac{1}{2}$ C.

La principal diferencia entre los coliformes totales y fecales es la capacidad de estos últimos de crecer a mayor temperatura en condiciones de laboratorio.

Desde el punto de vista salud, este grupo es más importante que los coliformes totales, dado que se relaciona más con la probabilidad de encontrar patógenos excretados (bacterias, parásitos y virus entéricos).

Las ventajas de este grupo como indicador son:

- El 95% de los coliformes fecales, dan positiva la prueba de temperatura
- Pueden estar ausentes si la contaminación no es de origen fecal
- Sobreviven menos tiempo que los coliformes totales, por lo que permiten suponer contaminación reciente, si se encuentran en concentraciones altas
- Son más exigentes que los coliformes totales para reproducirse en el ambiente extraintestinal
- Los procedimientos de laboratorio para su cuantificación son relativamente sencillos

Sin embargo, algunas cepas dan negativa la prueba de temperatura en el laboratorio; se ha visto que tienen la capacidad de reproducirse en aguas ricas en nutrimentos, en sedimentos y aún en aguas poco contaminadas; algunas cepas de Escherichia coli sobreviven menos tiempo que Salmonella en aguas a bajas temperaturas y algunas son patógenas al hombre.

5 TECNICA DE TUBOS MULTIPLES.

5.1 Diluciones seriadas.

Los análisis microbiológicos del agua, ya sea para la prueba de tubos múltiples o de filtro de membrana requieren del empleo de cantidades variables de muestra, ésto se logra mediante el proceso de diluciones decimales seriadas, las cuales se deben utilizar cuando se siembren volúmenes de muestra menores de 1mL. El diluyente se debe preparar en tubos con tapa de rosca añadiendo 9 mL de éste para la preparación de diluciones 1:10 (10^{-1}) o en botellas con tapón esmerilado con capacidad para 99 mL para la preparación de diluciones 1:100 (10^{-2}).

Es recomendable destinar tubos y botellas exclusivamente para dilución de muestras, conviene calibrar los tubos y las botellas de dilución a 9 y 99 ml respectivamente, marcando el nivel con un lapiz de diamante. Este procedimiento permite al técnico descartar tubos o botellas que contengan volúmenes diferentes a los requeridos para realizar adecuadamente las diluciones decimales seriadas.

El diluyente ideal es aquel que no provoca cambios en el número de bacterias presentes en la muestra y que no deprime la recuperación de organismos debilitados. La sobrevivencia de microorganismos en un determinado diluyente puede ser muy variable, y está influenciada por el tiempo de permanencia en éste, temperatura, pH, gradiente osmótico, capacidades amortiguadora y quelante, presencia de iones calcio, magnesio y hierro. El agua destilada no es recomendable como diluyente puesto que carece de iones metálicos esenciales así como de capacidad quelante y amortiguadora. Se han utilizado diferentes tipos de soluciones para dilución, las más comunes son la peptonada y la de fosfatos. La primera contiene 0.1 de peptona en agua destilada y se recomienda en la detección de organismos debilitados provenientes de aguas residuales industriales o de aguas superficiales con contenidos altos de iones de metales pesados. La segunda, se prepara a partir de una solución madre (A), que lleva 34.0 g de KH_2PO_4 , pH 7.2, y de otra (B) preparada con 50 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por litro de agua destilada. Para preparar el diluyente fosfatado, se agregan a un litro de agua destilada 1.25 mL de la solución A y 5.0 mL de la B, el producto final deberá tener un pH de 7.2 ± 0.1 . Esta solución de fosfato y magnesio mejora la recuperación de bacterias con lesiones metabólicas inducidas por agua de alta calidad o por aguas con contenidos altos de iones de metales pesados. Se ha observado que cuando se utiliza el agua peptonada como diluyente a temperatura ambiente, puede haber multiplicación bacteriana cuando el tiempo de preparación de las diluciones y el sembrado exceden de 40 minutos, por esta razón, se requiere que cuando se use este tipo de diluyente estos pasos no tarden más de 30 minutos.

Las diluciones no se deben preparar bajo la luz del sol, ya que esto representa un efecto adverso para las bacterias presentes en la muestra, las que en muchas ocasiones ya se encuentran debilitadas.

Se recomienda un mínimo de tres diluciones seriadas para asegurar la obtención de datos cuantitativos. Cuando se carezca de datos bacteriológicos previos de una muestra, es recomendable emplear 5 diluciones decimales para contar con una certeza razonable de que se va a obtener un punto límite entre resultados positivos y negativos. Una dilución decimal se obtiene mezclando 9 partes de diluyente y una parte de muestra, esta mezcla debe ser homogenizada mediante pipeteo o utilizando un homogenizador. Un aspecto muy importante en este procedimiento es el cambiar de pipeta cada vez que se haya despachado líquido para evitar errores por acarreo de microorganismos.

Una vez formada una dilución decimal el procedimiento se repite en forma seriada hasta alcanzar la dilución deseada.

5.2 Técnica de tubos múltiples.

La prueba de tubos múltiples constituye un método estandarizado para la determinación de la densidad de bacterias indicadoras de contaminación. En esta prueba, réplicas de tubos de medios de cultivo específicos, son inoculados con diluciones decimales de una muestra dada de agua. La densidad bacteriana es calculada por medio de fórmulas de probabilidad que estiman el número más probable de bacterias para producir ciertas combinaciones de resultados positivos (como turbidez o formación de gas) y negativos.

Prueba confirmativa coliformes

Cada tubo del ensayo previo que muestre formación de gas en el tubo Durham, se siembra con una asa de inoculación en tubos de ensayo con caldo verde brillante dotados de tubos Durham. Luego se incuban durante 48 horas a 35°C. Los tubos con formación de gas se consideran como positivos, con respecto a bacterias coliformes.

Prueba confirmativa coliformes fecales

Para la prueba confirmativa de coliformes fecales, se realizan inoculaciones en caldo EC, provenientes de los tubos del ensayo previo que mostraron formación de gas, incuban durante 24 horas a 44.5°C. Bajo estas condiciones la formación de gas en caldo EC indica el origen fecal de las bacterias coliformes.

Cuando se analizan muestras de agua potable, se utilizan 5 tubos de fermentación, cada uno con contenidos de 10 o 100ml de la muestra y mínimo 3 diluciones. Pero resulta impráctico usar porciones de 100ml.

Cuando se trata de agua no potable, se inoculan los tubos con cantidades decimales del agua. La selección de éstas va a depender de la densidad probable de coliformes y la experiencia del analista.

Esta técnica puede también ser usada para sedimentos, haciendo una dilución de 10^{-1} . Se pesan 50 gr de muestra (sólida o semisólida) y se adicionan 450 ml de agua de dilución y se agita por 1 ó 2 minutos.

Los resultados del análisis de los tubos de réplica y diluciones son reportados en términos de el Número Más Probable (NMP).

El valor numérico de la estimación del contenido bacteriano es determinado por la dilución que mostró ambos resultados positivos y negativos.

La mejor evaluación de la calidad sanitaria del agua depende de la interpretación de resultados de la técnica de los tubos múltiples o de otros métodos, posiblemente más precisos y de toda la demás información relativa al agua que pueda ser obtenida por reconocimiento de la zona.

Tabla 1. Resumen de la metodología para el análisis de coliformes totales, coliformes fecales y estreptococos fecales

Pueba Presuntiva		Prueba Confirmativa
Muestra		
Diluciones---	Caldo lactosado o laurilsulfato	Caldo verde brillante (coliformes totales) incubar a $35\frac{1}{2}C/48hrs$
	sembrar 3 ó 5 replicas e incubar de 24 a 48hrs a $35p\frac{1}{2}C$	
	tubos positivos	
	tubos positivos	Caldo EC (coliformes fecales) incubar a $44.5\frac{1}{2}C/24hrs$

Nota: se consideran positivos cuando hay formación de gas en el caso de coliformes.

5.3 Uso de las tablas del numero mas probable.

Mediante la utilización de métodos matemáticos de probabilidad es posible estimar el número de bacterias que producen un resultado observable de cualquier combinación de tubos positivos y negativos. Ya que los cálculos para obtener esta estimación es lenta y tediosa, es común que en el laboratorio de microbiología se empleen tablas del número más probable (NMP). Estas tablas contienen arreglos ordenados sobre los posibles resultados obtenidos de la inoculación de una serie de tubos con diferentes cantidades de muestra. Las combinaciones más comunes de resultados de tubos positivos y negativos aparecen en la tabla indicando la estimación del NMP con límites de confianza del 95%.

La mayoría de las tablas se basan en el uso de tres volúmenes diferentes de muestra en orden decimal decreciente (10, 1, 0.1, 0.01 mL etc.). Existen tablas para diferente número de réplicas de cada dilución. Las más comunes son de 5 y 3 réplicas por dilución respectivamente.

Sólo si en los resultados aparecen tubos positivos y negativos cuando menos en una dilución, el número más probable proporciona un estimado significativo de la densidad bacteriana.

La precisión de la estimación del NMP se incrementa al aumentar el número de replicas por dilución.

- Determinación del número más probable

Codificar los resultados de la serie de diluciones en los tubos de la siguiente manera: si inicialmente son inoculadas 5 porciones de 10 mL de muestra, 5 de 1 mL y 5 de 0.1 mL, y los resultados positivos fuesen respectivamente 5, 3 y 0, éstos se codificarán como 5-3-0. El código obtenido es buscado en la tabla del NMP (cuadros 4 y 5) y se registra directamente el NMP en 100 mL. Cuando la serie de diluciones decimales es diferente a 10, 1.0 y 0.1 mL, se utiliza la tabla del NMP de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{NMP}/100\text{mL} = \text{NMP}^* \times \frac{10}{\text{volumen mayor probado}} \quad (1)$$

ejemplo:

Dilución	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
Volumen de la muestra (mL)	0.01	0.001	0.0001
Resultados positivos	5/5	2/5	0/5
*NMP en la tabla		49	

$$\text{NMP}/100\text{mL} = 49 \times \frac{10}{0.01} = 49,000 \quad (4.9 \times 10^4) \quad (2)$$

- Ocurrencia de resultados improbables

Muchos de los posibles resultados de tubos múltiples son omitidos de las tablas del NMP, así, los códigos 0-0-3, 0-0-4 y 0-0-5 junto con muchos otros, no están incluidos. Esto se debe a que la probabilidad de su ocurrencia es muy baja. Si en un laboratorio estos resultados improbables aparecen con una frecuencia mayor del 1%, es posible que esto se deba a procedimientos de laboratorio defectuosos, por lo que deben ser revisados. Cuando el código del NMP no aparezca en la tabla, el NMP puede ser calculado utilizando la fórmula:

$$\text{NMP} = \frac{\text{Num. tubos positivos} \times 100}{\text{« (mL muestra tubos neg.)} \times \text{(mL muestra total)}} \quad (3)$$

5.4 Resultados del NMP

La frecuencia de obtención de resultados que no se encuentren en las tablas debe ser baja, pero esto no debe revasar cierto número (Tabla 1), de otra forma se tendrá que checar el procedimiento de la prueba.

Para mantener actualizadas las técnicas microbiológicas es recomendable revisar la bibliografía reciente, especialmente, la última edición disponible del "Standard Methods for examination of water and wastewater".

Tabla 2. Número máximo permisible de códigos improbables en los análisis de muestras realizadas

Número de Muestras	Número Máximo de Códigos Improbables
1-15	1
16-45	2
46-83	3
84-130	4
131-180	5
181-233	6
234-290	7
291-350	8
351-413	9
414-477	10
478-543	11

Fuente: Current Practices in Water Microbiology, EPA-430/1-74-009

6 TECNICA DE FILTROS DE MEMBRANA.

La técnica de filtros de membrana es altamente reproducible y puede ser empleada para probar volúmenes relativamente grandes de muestra. Sin embargo, la turbidez causada por la presencia de una cantidad alta de algas u otros materiales, puede interferir con la prueba. En algunas ocasiones, la estimación de cantidades bajas de coliformes se puede deber a la presencia de números altos de bacterias no coliformes o a presencia de sustancias tóxicas. Esta técnica no es aplicable al examen de aguas residuales que sólo hayan recibido tratamiento primario, o aguas residuales contaminadas con metales tóxicos o fenoles. El volumen establecido para el análisis de agua potable es de 100 mL, el cual puede ser distribuido en varias membranas. Para otro tipo de pruebas se pueden emplear diferentes volúmenes.

6.1 Volumen de la muestra para filtrar

Como el área de la membrana es relativamente reducida, la misma solo puede soportar el crecimiento de un número limitado de colonias. El número óptimo se estima entre 20 y 80 colonias, con un máximo de 200. Si este número es sobrepasado, puede suceder que haya colonias muy pequeñas o superpuestas; que haya inhibición de crecimiento por superpoblación o que haya colonias atípicas.

La estimación del volumen de la muestra a filtrar depende del tipo de agua. Como regla general se pueden establecer los siguientes volúmenes de filtración:

Tipo de agua	Volumen de muestra a filtrar (ml)
Agua tratada de buena calidad	50 - 100
Agua no tratada de calidad potable	10 - 50
Agua superficial	1 - 10

Cuando no se conozca el origen de la muestra o su probable densidad de bacterias, es necesario proceder a filtrar cantidades que difieran en factores de 10, hasta encontrar el rango apropiado.

Si el volumen de agua a ser filtrada es menor de 10 ml, entonces deberán hacerse pasar por el embudo no menos de 20 ml de agua de dilución estéril antes de la filtración.

6.2 Material

- a) Bomba eléctrica de vacío o cualquier elemento capaz de producir como mínimo una diferencia de presión de media atmósfera.
- b) Matraz Erlenmeyer con salida lateral (Kitasato) de 1 litro con goma suficientemente gruesa para evitar su colapso cuando comienza a actuar el vacío.
- c) Soporte de filtro, consistente en una base porosa para el filtro, la que puede montarse en el Kitasato por medio de un tapón de goma, y un recipiente superior que puede ser sujetado a la base por medio de un forzeps.
Las dos partes del sostén del filtro se envuelven separadamente en papel y se esterilizan en autoclave por lo menos durante 15 minutos a 121 $\frac{1}{2}$ C.
- d) Cajas de Petri de vidrio o plástico de 60 X 15 mm.
- e) Membranas filtrante, de 47 a 50 mm de diámetro, con poro de 0.45 μ m. Las membranas envueltas unitariamente y preesterilizadas son muy convenientes para usarlas en forma inmediata. Las membranas también pueden envolverse en papel, en número conveniente (depende del número de muestras a analizar), y en esta forma esterilizarlas en autoclave, secándose por eliminación rápida de vapor.
- f) Cojinetes absorbentes de medio, consistentes en discos de papel de filtro aproximadamente 1 mm de espesor, del mismo diámetro que las MF.
- g) Pinzas, para el manejo de las membranas se deben usar pinzas con punta redondeada y sin corrugado interior. Esterilizar por flameado con etanol al 95 %.
- h) Lupa, de las 4X ó 5X de poder, para examinar y contar las colonias desarrolladas en las membranas.

6.3 Medio de cultivo

El medio puede ser preparado como caldo y usar cojinetes absorbentes o como placas de agar sólido. El caldo puede solidificarse por la adición de 1.2- 1.5 % de agar antes de la ebullición.

A continuación se muestra el procedimiento para preparar pequeñas cantidades de medio M-FC.

M-FC

- a) Disolver 1.9 g de medio de cultivo deshidratado en 50 ml de agua destilada conteniendo 1.0% de ácido rosólico en solución 0.2 N de hidróxido de sodio.
- b) Calentar el medio a punto de ebullición.
- c) Remover rápidamente de la fuente de calor y enfriar por debajo de 45 $\frac{1}{2}$ C.
- d) No esterilizar por autoclave. El medio puede ser conservado hasta cuatro días en refrigerador, protegido de la luz.

6.4 Determinación de Coliformes fecales

- a) Conectar el matraz erlemeyer (kitazato) con salida lateral a la fuente de vacío y colocar la unidad de filtración en posición. Si se utiliza como fuente de vacío una bomba eléctrica, es aconsejable colocar un segundo matraz entre la bomba y el Kitazato para que actúe como trampa de agua y proteger así la bomba eléctrica.
- b) Abrir una caja petri y colocar una almohadilla en ella.
- c) Con una pipeta estéril agregar 2 ml de medio selectivo para saturar el cojinete.
- d) Armar el equipo de filtración colocando una membrana filtrante estéril sobre el soporte poroso mediante el uso de las pinzas esterilizadas por flameado.
- e) Colocar el embudo superior y asegurarlo con forceps especial.
- f) Añadir en el recipiente superior el volumen de muestra que se ha elegido como óptimo de acuerdo al tipo de agua. Poner en funcionamiento la bomba de vacío. Si la muestra es menor de 10 ml entonces deberán agregarse antes de la filtración de la misma, no menos de 20 ml de agua de dilución estéril.
- g) Luego que la muestra a pasado a través del filtro, desconectar el vacío y enjuagar el embudo con 20 a 30 ml de agua de dilución estéril.
- h) Desarmar el aparato de filtración y con las pinzas colocar la membrana filtrante en la caja Petri sobre el cojinete y con el lado cuadrículado hacia arriba. Asegurarse que no queden burbujas de aire atrapadas entre el cojinete y el filtro.

- i) Para la incubación, invertir la caja de Petri. Colocar en incubadora a $44 + 0.5 \frac{1}{2}C$ durante 24 horas con 100 % de humedad. Alternativamente, la incubación puede efectuarse como se describe a continuación.
- j) En este procedimiento, utilizar cajas de Petri de buen cierre o de sellado hermético. Las cajas son colocadas en bolsas de plástico a prueba de agua.
- k) Sumergir la bolsa de plástico en un baño de agua a $44 + 0.5 \frac{1}{2}C$ durante 24 horas. Las bolsas de plástico debe quedar debajo de la superficie del agua durante toda la incubación, lo que se consigue colocandola bajo un peso razonable, por ejemplo una regilla de metal.

6.5 Reporte de resultados

Los resultados se reportan como coliformes fecales/100 ml. Contar sólo aquellas membranas con colonias dentro de los límites especificados para cada indicador, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Coliformes fecales/100 ml} = \frac{\text{Colonias colif. fec. contadas}}{\text{ml de muestra filtrada}} \times 100$$

Cuando se analizan aguas de buena calidad (potables) generalmente el número de colonias es menor 20 por membrana. Si éste es el caso, se contarán todas la colonias y se aplicará a la fórmula anterior, para estimar la densidad de organismos.

Si aparece crecimiento "confluyente" y las colonias no se distinguen, se reportará como "crecimiento confluyente con o sin coliformes". Si el número total de colonias bacterianas, típicas y atípicas, excede a 200 por membrana, o si las colonias son indistinguibles para el conteo exacto, reportar los resultados como "demasiado numerosas para contarse". En cualquier caso, deberá tomarse otra muestra y seleccionar otros volúmenes para filtrar.

7 PRESENTACION E INTERPRETACION DE DATOS.

- Introducción

El trabajo realizado en el laboratorio, pierde sentido y utilidad, si los resultados que se obtienen no son debidamente revisados e interpretados en el laboratorio antes de ser entregados al solicitante.

- Presentación de resultados

Los formatos en los cuales se presentan los resultados, pueden variar en las diferentes instituciones ; sin embargo, éstos deben incluir información básica de utilidad tanto para el control administrativo y de calidad en el laboratorio como para el usuario.

Siempre deben expresarse las unidades en que se reporta: número más probable por 100 ml (NMP/100ml) si las muestras se procesaron de acuerdo a la técnica de tubos múltiples o unidades formadoras de colonia por volumen especificado, ya sea 1 ó 100 ml (UFC/ 1 ó 100 ml), si la determinación se hizo mediante la técnica de filtración en membrana o por conteo en placa.

Debe incluirse la información que identifica al muestreo y a cada una de las muestras, como son las fechas de muestreo, recepción en el laboratorio, de análisis y de entrega de resultados y el lugar de procedencia; es conveniente dar un número de control interno en el laboratorio a cada muestreo.

En los mismos formatos, es conveniente destinar un lugar para observaciones, en el cual el técnico o analista y el responsable del laboratorio informará sobre eventualidades como p. ej., si la muestra no llegó al laboratorio en el tiempo y condiciones adecuadas para la obtención de resultados confiables, la necesidad de realizar nuevos muestreos.

- Interpretación de resultados

La interpretación de resultados, para que sea de utilidad, debe realizarse de manera ordenada y de acuerdo a los objetivos del estudio. Es necesario hacer las siguientes consideraciones para el análisis de resultados en el laboratorio:

- Se trata de datos bacteriológicos, representativos

- Objetivos del estudio o investigación

- Técnica de tratamiento estadístico

El primer requisito que deben cumplir los datos de indicadores bacteriológicos, es que sean cuantitativos. El recuento de especies de los diferentes grupos de indicadores debe realizarse también cuantitativamente a través de un número estadísticamente definido de cultivos puros, determinando el porcentaje o frecuencia de incidencia de las especies identificadas.

El análisis estadístico, generalmente se basa en el cálculo de las medidas de tendencia central: media aritmética, mediana, moda, o media geométrica. Para seleccionar la forma de valor central, es necesario además, el conocimiento de los métodos de

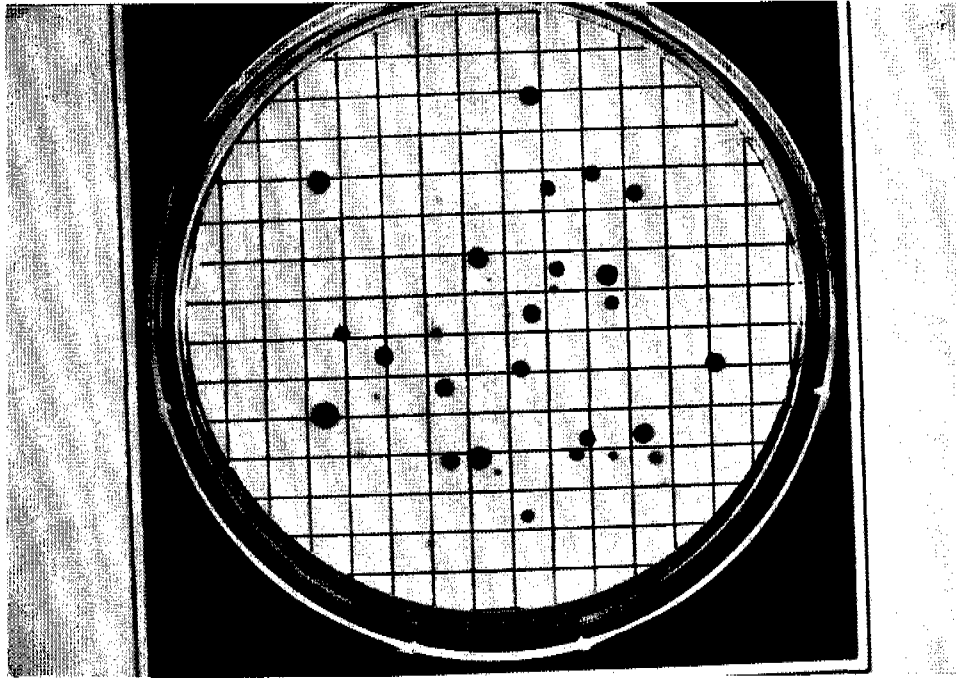


FIG. 1 Los coliformes fecales presentan un color azul. Algunas colonias termofilas no fecales exhiben un color crema.

cálculo, saber como en un reglamento se expresan los patrones de calidad del agua y que tratamiento estadístico expresa o explica mejor los resultados.

Cuando el trabajo está dirigido a la designación de patrones de calidad del agua, es muy útil calcular y arreglar los datos en una tabla de distribución, así, de una estación de muestreo con un número fijado de muestreos pueden obtenerse las medidas de tendencia central, lo cual proporciona el comportamiento de los indicadores en el tiempo.

Frecuentemente en datos bacteriológicos, se utiliza a la media geométrica, debido a que en cantidades grandes como lo son los números de bacterias presentes en un cuerpo de agua, es más fácil manejar logaritmos (la media geométrica se define como el antilogaritmo de la media de los logaritmos). Sin embargo, cuando se trate de agua potable, es más recomendable utilizar la media aritmética ya que los cambios de calidad del agua son más aparentes utilizando esta metodología.

De manera general, los resultados pueden presentarse en tablas de distribución ó gráficamente en histogramas y polígonos de frecuencia, entre otros.

8 BIBLIOGRAFIA.

- APHA 1985. Estandar Methods for the Examination of water and waster water. Washington D.C USA 1145pp.
- Fernández Escartín, E., 1981. Microbiología Sanitaria Agua y alimentos. Vol. 1. Ed. Universidad de Guadalajara, México. 1020pp.
- Geldrich E. Edwin. 1975. Handbook for evaluating water bacteriological laboratories. U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati, Ohio.
- López Alvarez, J. y Barajas Rojas, J.A. 1974. Manual de laboratorio para bacteriología y micología. 2^a. Edición. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Univ. Nacional Autónoma de México.
- Manual de Microbiología del Agua. Dirección General de Desarrollo Tecnológico. 286pp
- Merck, E., 1972., Examen bacteriológico de aguas.
- Rovozzo C.G. y Burke N. Carroll. 1973. A Manual of Basic Virological Techniques. Prentice-Hall, Inc. USA. 284pp.
- Salvato, J.A., 1972. Environmental Engineering and Sanitation. 2^a. Edición. USA. 637pp.
- SARH.1983. Manual del Curso: Estudios de Calidad del Agua.

ANEXO 1. Tablas para la determinación del NMP.

Tabla No 1. Números más probable por 100 mL. Usando un tubo de 50 mL,
cinco tubos de 10 mL y cinco tubos de 1 mL.

COMBINACION DE TUBOS POSITIVOS	NMP 100 ML	LIMITE DE CONFIANZA 95%	
		LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
0 - 0 - 0	< 1		
0 - 0 - 1	1	< 0.5	4
0 - 0 - 2	2	< 0.5	6
0 - 1 - 0	1	< 0.5	4
0 - 1 - 1		< 0.5	6
0 - 1 - 2		< 0.5	8
0 - 2 - 0	2	< 0.5	6
0 - 2 - 1	3	< 0.5	8
0 - 2 - 2	4	< 0.5	11
0 - 3 - 0	3	< 0.5	8
0 - 3 - 1	5	< 0.5	13
0 - 4 - 0	5	< 0.5	13
1 - 0 - 0	1	< 0.5	4
1 - 0 - 1	3	< 0.5	8
1 - 0 - 2	4	< 0.5	11
1 - 0 - 3	6	< 0.5	15
1 - 1 - 0	3	< 0.5	8
1 - 1 - 1	5	< 0.5	13
1 - 1 - 2	7	1	17
1 - 1 - 3	9	2	21
1 - 2 - 0	5	< 0.5	13
1 - 2 - 1	7	1	17
1 - 2 - 2	10	3	23
1 - 2 - 3	12	3	28
1 - 3 - 0	8	2	19
1 - 3 - 1	11	3	26
1 - 3 - 2	14	4	34
1 - 3 - 3	18	5	53
1 - 3 - 4	21	6	66
1 - 4 - 0	13	4	31
1 - 4 - 1	17	5	47
1 - 4 - 2	22	7	69
1 - 4 - 3	28	9	85
1 - 4 - 4	35	12	100
1 - 4 - 5	43	15	120
1 - 5 - 0	24	8	75

Tabla No 1. Números más probable por 100 mL. Usando un tubo de 50 mL, continuación cinco tubos de 10 mL y cinco tubos de 1 mL.

COMBINACION DE TUBOS POSITIVOS	NMP 100 ML	LIMITE DE CONFIANZA 95%	
		LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
1 - 5 - 1	35	12	100
1 - 5 - 2	54	18	140
1 - 5 - 3	92	27	220
1 - 5 - 4	160	39	450
1 - 5 - 5	≥ 240		

Tabla No 2. Números más probables por 100 ml. Usando cinco tubos de 10 mL, cinco tubos de 1 mL y cinco tubos de 0.1 mL.

COMBINACION DE TUBOS POSITIVOS	NMP 100 ML	LIMITE DE CONFIANZA 95%	
		LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
0 - 0 - 0	< 2		
0 - 0 - 1	2	< 0.5	7
0 - 1 - 0	2	< 0.5	7
0 - 2 - 0	4	< 0.5	11
1 - 0 - 0	2	< 0.5	7
1 - 0 - 1	4	< 0.5	11
1 - 1 - 0	4	< 0.5	11
1 - 1 - 1	6	< 0.5	15
1 - 2 - 0	6	< 0.5	15
2 - 0 - 0	5	< 0.5	13
2 - 0 - 1	7	1	17
2 - 1 - 0	7	1	17
2 - 1 - 1	9	2	21
2 - 2 - 0	9	2	21
2 - 3 - 0	12	3	28
3 - 0 - 0	8	1	19
3 - 0 - 1	11	2	25
3 - 1 - 0	11	2	25
3 - 1 - 1	14	4	34
3 - 2 - 0	14	4	34
3 - 2 - 1	17	5	46
3 - 3 - 0	17	5	46
4 - 0 - 0	13	3	31
4 - 0 - 1	17	5	46
4 - 1 - 0	17	5	46
4 - 1 - 1	21	7	63
4 - 1 - 2	26	9	78
4 - 2 - 0	22	7	67
4 - 2 - 1	26	9	78
4 - 3 - 0	27	9	80
4 - 3 - 1	33	11	93
4 - 4 - 0	34	12	93

Tabla No 2. Números más probables por 100 ml. Usando cinco tubos de
 Continuación de 10 mL, cinco tubos de 1 mL y cinco tubos de 0.1 mL.

COMBINACION DE TUBOS POSITIVOS	NMP 100 ML	LIMITE DE CONFIANZA 95%	
		LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
5 - 0 - 0	23	7	70
5 - 0 - 1	31	11	89
5 - 0 - 2	43	15	110
5 - 1 - 0	33	11	93
5 - 1 - 1	46	16	120
5 - 1 - 2	63	21	150
5 - 2 - 0	49	17	130
5 - 2 - 1	70	23	170
5 - 2 - 2	94	28	220
5 - 3 - 0	79	25	190
5 - 3 - 1	110	31	250
5 - 3 - 2	140	37	340
5 - 3 - 3	180	44	500
5 - 4 - 0	130	35	300
5 - 4 - 1	170	43	490
5 - 4 - 2	220	57	700
5 - 4 - 3	280	90	850
5 - 4 - 4	350	120	1,000
5 - 5 - 0	240	68	750
5 - 5 - 1	350	120	1,000
5 - 5 - 2	540	180	1,400
5 - 5 - 3	920	300	3,200
5 - 5 - 4	1,600	640	5,800
5 - 5 - 5	≥ 2,400		

Tabla No 3. Número más probable por 100 mL. Usando tres tubos de 10 mL, tres tubos de 1 mL y tres tubos de 0.1 mL.

COMBINACION DE TUBOS POSITIVOS	NMP 100 ML	LIMITE DE CONFIANZA 95%	
		LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
0 - 0 - 0	< 3		
0 - 0 - 1	3	< 0.5	9
0 - 1 - 0	3	< 0.5	13
1 - 0 - 0	4	< 0.5	20
1 - 0 - 1	7	1	21
1 - 1 - 0	7	1	23
1 - 1 - 1	11	3	36
2 - 0 - 0	9	1	36
2 - 0 - 1	14	3	37
2 - 1 - 0	15	3	44
2 - 1 - 1	20	7	89
2 - 2 - 0	21	4	47
2 - 2 - 1	28	10	150
3 - 0 - 0	23	4	120
3 - 0 - 1	39	7	130
3 - 0 - 2	64	15	380
3 - 1 - 0	43	7	210
3 - 1 - 1	75	14	230
3 - 1 - 2	120	30	380
3 - 2 - 0	93	15	380
3 - 2 - 1	150	30	440
3 - 2 - 2	210	35	470
3 - 3 - 0	240	36	1,300
3 - 3 - 1	460	71	2,400
3 - 3 - 2	1,100	150	4,800
3 - 3 - 3	≥ 2,400		