

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

Facultad de Quimica



"CONTAMINACION BIOLÓGICA DEL AGUA EN LA
COMUNIDAD DE SANTA MARIA MAGDALENA,
PERTENECIENTE AL MUNICIPIO DE CARRILLO
PUERTO, EN EL ESTADO DE QUERETARO".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

"QUIMICO BIOLOGO"

PRESENTA:

JUANA SUSANA FLORES ROBLES.

J50378

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

Adq.

43

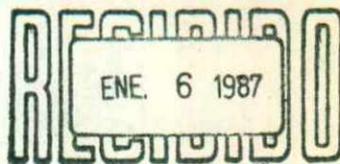
Titulo

Facultad de Quimica

IS.



FACULTAD DE QUIMICA
BIBLIOTECA



❖ U. A. Q. ❖

"CONTAMINACION BIOLOGICA DEL AGUA EN LA
COMUNIDAD DE SANTA MARIA MAGDALENA,
PERTENECIENTE AL MUNICIPIO DE CARRILLO
PUERTO, EN EL ESTADO DE QUERETARO".

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

"QUIMICO BIOLOGO"

PRESENTA:

JUANA SUSANA FLORES ROBLES.

FACULTAD DE
QUIMICA



BIBLOTECA

No. Adq. 150378

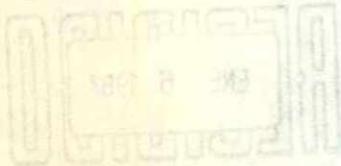
No. Título _____

Clas. TS 614.772

F634e

FACULTAD DE QUIMICA

BIBLIOTECA



COMUNIDAD DE SANTA MARIA MAGDALENA
PERTENECE AL MUNICIPIO DE BARRIO
DE QUERETARO EN EL ESTADO DE QUERETARO

TE 312



COMUNIDAD BIOLÓGICA
PARA OBTENER EL TÍTULO DE

PRESENTO

LUYSA SUSANA FLORES ROBLES

C O N T E N I D O.

CAPITULOS.

INTRODUCCION.....	I.
Objetivo.....	a).
Justificación.....	b).
METODOLOGIA.....	II.
Recolección de la muestra.....	a).
Métodos ó Técnicas.....	b).
Equipo y Material.....	c).
Toma de la muestra aleatoria.....	d).
RESULTADOS Y DISCUSION.....	III.
CONCLUSIONES.....	IV.
Tablas Y Anexos.....	a).
Bibliografía.....	b).

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

A MIS PADRES.

SERGIO ARTURO.

Y

ENEDINA.

Quienes con tanto esfuerzo
y sacrificio, me ayudaron
a llegar a la meta que me
trazé, porque me apoyaba -
en ellos en los momentos -
de flaqueza, lo único que
puedo decirles es:

¡MUCHAS GRACIAS!

A MIS HERMANOS.

JUAN CARLOS Y JUANA ELENA.

Cuyos consejos y apoyo
me llevaron a ser cons
tante en lo que me pro
puse, pues siempre es
tuvieron conmigo.

A TI ROBERTO:

Que con tu compañía y
cariño me ayudaron mo
ralmente en los momenu
tos de soledad y an -
gustia.

A MIS COMPAÑEROS:

ORALIA, LETY, MARUSY:

Que estuvieron con -
migo en los momentos
difíciles.

También queiro agradecer a -
todas aquellas personas que
de una u otra forma contri -
buyeron a que yo realizara -
mi carrera profesional, son
tantos que mi lista sería -
interminable, a todos ellos
¡ muchas gracias!

A MIS MAESTROS:

Ya que con sus conocimientos consejos y **experiencias** ayudaron a mi formación profesional y con especial **cariño** deseo agradecer a algunos de mis maestros: Q.F.B. Carlos-Sierra Salcedo, M.C Alfonso-Pérez Buenrostro, Q. Mischi-ko Shimano, Q.B. Guadalupe - García de Lecona. Q. Luis Muñoz Licea. ya que es imposible mencionarlos a todos.

¡ MUCHAS GRACIAS!

A MIS ASESORES.

Q.F.B. Jorge Carlos Hernández y de Diego, Dra: Guadalupe Salazar Pérez, Dra Silvia Vega Gleason, Q.B. Ma Elena Villagran y con especial **agradecimiento** al Dr: Victor Manuel Calderón-Calderón y el Dr: Carlos Alcocer Cuaron, que me apoyaron - académica y **moralmente** en éste trabajo.

A LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE
QUERETARO.

Por darme la oportunidad de
tener una profesión y ahora
poder colaborar con ella c-
dentro de el personalacadé-
mico y grupo de Investigación.

CAPITULO I.

I N T R O D U C C I O N .

El agua es un elemento indispensable para la vida, pero no solo importa su disponibilidad, sino también su calidad- (1).

El agua para consumo humano debe estar libre de microorganismos patógenos y tener bajas concentraciones de sustancias químicas ó de otra índole, que puedan presentar un riesgo para la salud humana.

(2).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima, que uno de cada cuatro individuos hospitalizados en el mundo, ocupa una cama debido a alteraciones de la salud, ocasionadas por la insalubridad de éste elemento. La importancia sanitaria del agua, es directamente proporcional a la potencialidad que tiene de convertirse en un factor negativo para la salud, al provocar enfermedad. Los informes elaborados por la OMS, indican que el 80% de las enfermedades que se producen en los países del tercer mundo en desarrollo como México, en su mayoría son causadas por la contaminación.

Si no se toman medidas sanitarias sobre los desechos humanos y animales, los cuales contaminan con virus, bacterias, parásitos y hongos patógenos, contribuyentes esenciales de la contaminación a las fuentes de abastecimiento de agua, por ejemplo los estanques que irrigan a la población del vital elemento, así como a la red de distribución de agua potable, con lo que se propicia la transmisión de las enfermedades infecciosas producidas por los microorganismos patógenos.

Las investigaciones de las medidas sanitarias, así como los métodos de prevención y control de contaminación de las aguas, aunado a los procesos de tratamiento del agua, son utilizados con el fin de prevenir las enfermedades que se transmiten fácilmente por medio del uso del agua contaminada (2).

Las formas de evacuación de los desechos humanos, que en nuestra región, Querétaro, es decir, en nuestras zonas rurales, se efectúa al aire libre.

(fecalismo al aire libre), ésto provoca que se produzcan criaderos de moscas y que al posarse sobre los alimentos los contaminen; por otra parte el aire arrastra a los microorganismos portadores de éstos desechos depositandolos en el agua de canales, por lo que es de suponer que el fecalismo al aire libre es la causa principal de la contaminación del agua, aumentando el problema los desechos industriales .

La recolección, tratamiento y evacuación de los residuos de las actividades humanas, constituyen los elementos principales del sistema de control de calidad del agua.

Todas las actividades humanas producen algún tipo de desecho, que puede clasificarse en 8 categorías en general-

que son:

- 1.- Agentes infecciosos.
- 2.- Residuos que consumen oxígeno.
- 3.- Nutrientes de plantas.
- 4.- Sustancias químicas.
- 5.- Sustancias Orgánicas.
- 6.- Sedimentos y otros elementos sólidos.
- 7.- Material radioactivo.
- 8.- Calor.

Para determinar el efecto contaminante de éstos - elementos, es necesario contar con datos objetivos, que - deben de indicar con exactitud las tasas de reacción pro- yectadas, el medio ecológico existente y los cambios futu- ros en el sistema acuático. Por otra parte las variaciones en los caudales de flujo, niveles de reflujos, nutrientes- adiciones térmicas, efectos de toxicidad, de olores y sabo- res, así como de otras variables que también son importan- tes, no sólo por su efecto sobre la salud pública, sino- en cuanto al tipo y grado de contaminación que provocan, - teniendo que especificar cual será el tratamiento que de- be de utilizarse para los diferentes tipos de aguas con- taminadas.

También es importante el diseño y la selección de di- chos tratamientos, así como la evacuación de las aguas - servidas, que se deben de incluir, tanto en los estudios - de "Tratabilidad de un residuo", y en la eliminación re- ferida a la contaminación de sólidos, provenientes de la- separación de líquidos.(3).

Además de determinar el tipo de contaminación biológica; el agua debe ser en la medida posible, cristalina e incolora y no debe tener olor desagradable.

La aplicación de estos sencillos criterios, pueden ser prácticos, pero difíciles de realizar en los países en desarrollo como México, donde hay escasez de personal capacitado, además la falta de laboratorios equipados adecuadamente, en sí nuestra infraestructura es muy deficiente para llevar a cabo la vigilancia y el monitoreo adecuado de la calidad de el agua.

Por lo tanto basandonos en nuestras realidades y circunstancias, se podrían hacer avances considerables, si se tomaran en cuenta los requisitos que consideramos mínimos e indispensables en la calidad de el agua y de esa manera estableceríamos métodos sencillos y eficaces de análisis. La aplicación práctica de medidas de seguridad y control, basadas en la vigilancia constante y eficaz, para no permitir la contaminación de el agua, evitaría en gran parte la cantidad tan enorme de brotes infecciosos,-

que producen la trasmisión de las enfermedades ocasionadas por dicha contaminación, y en general garantizaría la disponibilidad del agua segura. (2).

Muchos países en desarrollo como México y algunas de sus ciudades más importantes industrialmente hablando como lo son: Salamanca, Monterrey, Guadalajara, León, Querétaro, etc, por mencionar algunas, en los últimos años han tenido un gran crecimiento industrial, están afrontando un grave problema en cuanto a contaminación química de sus aguas, - debido a que las nuevas industrias vierten sus desechos en los canales ó en las asequias, las cuales son utilizadas - por nuestra población rural, para lavar la ropa, aseo de las casas, aseo personal, riego de cultivos y en muy pocas ocasiones, pero que sí ha sucedido, para consumo humano y después de todo ésto se agrega el uso de productos químicos agrícolas en los cultivos.

Ya que nos es difícil evaluar el efecto tóxico de los contaminantes químicos a corto plazo, sobre la salud, en especial cuando la concentración es baja y su duración es por largo tiempo. Estos contaminantes pueden ser; metales pesados, compuestos organoclorados y sustancias resistentes a la biodegradación .(2).

Esta problemática ya existente en nuestro Estado de Querétaro, está aumentando día a día y es de suma importancia tratar de forma urgente e inmediata el darle una solución.

De la información antes mencionada, puedo decir que las formas de la contaminación son muchas y muy variadas, algunas se detectan con material y equipo muy sencillo y además accesible a nuestros recursos económicos, pero algunas otras formas de contaminación, requieren para su detección de materiales y de equipo muy sofisticado y de técnicas muy complicadas, por lo que nos resultaría imposible realizarlas debido a que éstas,

las cuales no están a nuestro alcance. La contaminación bio' lógica del agua de consumo se encuentra dentro de la primera clasificación, por lo que creo que al realizar el moni- toreo del agua de consumo, en una de nuestras comunidades - rurales, se van a obtener datos de suma importancia, ya que vamos a tratar de conocer el grado de contaminación y relacionarlo con la incidencia de enfermedades gastrointestinales que padece la población y en base a éste dato, se tratará de buscar alguna solución y/o alternativa de mejoramiento en cuanto a la calidad del agua.

a).- OBJETIVO.

El ejido de Santa María Magdalena, es una población que se encuentra ubicada al lado Noroeste de la ciudad de Querétaro, a una latitud de $101^{\circ} 57'$, con una longitud de $20^{\circ} 37'$ y una altitud de 1,830 M. sobre el nivel de el Mar.

El poblado cuenta aproximadamente con 9,000 habitantes, los que forma alrededor de 657 familias.

La población cuenta con una escuela primari y un Kinder Garden; la mayoría de los habitantes económicamente activos-son obreros de las fábricas aledañas a la zona, por lo que - los servicios médicos son absorbidos en su mayoría por el - IMSS, los que carecen de éste servicio, son atendidos por - el Hospital Civil y la Secretaria de Salubridad de la ciudad de Querétaro.

Ahí en la población se cuenta con los servicios médicos de un particular, que funciona desde hace varios meses.

Se instaló el drenaje y se empedró la zona central de la población, desde hace más de un año.

En un recorrido que se realizó por la población, se hizo de nuestro conocimiento, que había varias manzanas en las que carecían de agua desde hace varios meses, por lo que hasta la fecha se ha sustituido por la provisión de carros bomba que llegan hasta la población para surtirles de éste líquido.

En los alrededores de la población existen grandes extensiones de áreas de cultivo, las que se están perdiendo, debido a que a la población la rodea un canal, llamado, el Canal del Areanal, al que una gran parte de las industrias cercanas vierten sus desechos y éstos a su vez son utilizados en numerosas ocasiones por los campesinos para regar sus sembradíos, para el baño personal y labado de ropa principalmente, por lo que consideramos que la mayoría de los habitantes,

de Santa María Magdalena, se encuentran en una u otra forma expuestos a contaminantes en forma constante, sin contar con las corrientes de aire que llegan a los individuos que diariamente esperan el camión a la orilla del canal, ellos están ingiriendo a los microorganismos patógenos por vía respiratoria.

Por todos éstos factores se ha escogido, a ésta población para un estudio de Investigación, en el cual se revisó la bibliografía de las técnicas ya existentes a cerca del control y monitoreo del agua, para que en base a las características particulares de la población, se establezca la metodología más adecuada y en esa forma poder mejorar su calidad, de manera que éstos estudios también sirvan como modelo, para otras poblaciones que tengan las mismas características ó que sean semejantes y que presenten un problema similar, para que las soluciones que aquí se plantean puedan servir para resolver ó al menos disminuir el problema.

b).- JUSTIFICACION.

Por lo expuesto anteriormente iniciaremos un estudio del agua de consumo en los domicilios de un grupo de personas - tomadas al azar(en base al número de habitantes se tomó un 10% de la población total, que son aproximadamente 70 familias a estudiar), para que mediante las pruebas resultantes, se pueda dar un poco de asesoramiento a la población, intentando el mejoramiento de sus hábitos de limpieza, tanto en los tinacos ó lugares donde almacenen su agua, como en la de sus alimentos, ya que en numerosas ocasiones, el agua - viene por la tubería un tanto cuanto pura, pero al llegar a los lugares de almacenamiento, es ahí donde se contamina y todo ésto provocado unicamente por la falta de aseo en sus recipientes de almacenamiento.

Existen varios métodos sencillos para la purificación del agua por ejemplo: 1.- La ebullición del agua por 15 minutos,

y 2.-La clorinación; éste último se recomienda por su sencillez de aplicación principalmente, bajo costo y eficacia.

Para éste método solo es necesario aplicar cierta cantidad de cloro, por cada litro de agua, en forma periódica, dependiendo del gasto diario que se tenga del agua, ésto se hace con el fin de disminuir un poco el grado de parasitosis tan abundante aquí en el Estado de Querétaro, tanto en las ciudades, como en las poblaciones rurales. Por los datos estadísticos que se tienen, Querétaro es uno de los Estados que ocupan los primeros lugares de parasitosis a nivel Nacional, por lo que en alguna forma se está tratando de disminuir la contaminación biológica y por consiguiente la trasmisión de las enfermedades causadas por los microorganismos que contaminan el agua de consumo.

BIBLIOGRAFIA.

1.- Gloyna Ernest F. y Gerard A, Rohlich.

" Metodos para el control de la contaminación del agua"

Trabajo presentado en el XXXIV reunión anual de la -

Asociación Fronteriza Mexicana- Estadounidense de Sa-

lubridad, celebrada en Hermosillo Sonora, México del-

28 al 30 de Marzo de 1976.

2.- Sánchez Vega José Trinidad, et al.

"Contaminación Biológica del Agua en una comunidad -

del Distrito Federal"

Salud Pública Méxicana.

Mayo- Junio de 1980.

Vol. XII # 13.

Pags 275-280.

3.- Vicente M. Witt. CPS, Washintong, D.C.

Versión condensada de J am Water Works.

Assoc. 74(4), 1982.

Reseñas.

Establecimiento y aplicación de pautas Internacionales de la
calidad del agua para el consumo humano.

C A P I T U L O II.

a).- RECOLECCION DE LA MUESTRA.

Recolección, Conservación y almacenamiento de las muestras.

La recolección, almacenamiento y conservación de las muestras de agua, son pasos importantes para los resultados del análisis de el control de calidad.

Un programa de muestreo puede planearse satisfactoriamente para cumplir con los objetivos de estudio, que pueden hacerse dentro de los límites y factores disponibles, como son; tiempo, dinero y recursos humanos. En el estudio se pueden usar un número pequeño de muestras, lo que se requiere unicamente, es que sea una representación adecuada de el tipo de agua y de el tamaño de el efluente que se va a muestrear.

El número de muestras y el sitio, es determinado principalmente por el inspector, para satisfacer los requerimientos necesarios que establecen los estandares de calidad de el agua.

El microbiólogo puede también participar en la planeación de las pruebas microbiológicas específicas que son necesarias, el número de análisis que pueden llevarse a cabo y el equipo que se requiere. Para la formulación final se dan algunas especificaciones en cuanto al tiempo y condiciones finales de muestreo principalmente, ejem, se puede mencionar la variación de la temperatura, de acuerdo a las estaciones del año, así como las cantidades de flujo del agua, que también se toman en cuenta de acuerdo al período de lluvias; estos dos factores pueden ser importantes, para conocer el período ideal en el que se debe efectuar el estudio, basandose en la temperatura óptima de crecimiento, a la cual se pueden desarrollar los microorganismos contaminantes.

Los recolectores de las muestras conocen exactamente la localización del lugar donde se va a muestrear y deben de estar muy bien entrenados para llevar a cabo las técnicas de la

recolección. Dicha técnica tiene un alto grado de higiene y se utiliza un equipo de muestreo especial.

El recolector de la muestra, es el responsable de registrar toda la información que sea necesaria a cerca de la muestra, para que pueda tener un significado en la evaluación, así como en la interpretación de la información del laboratorio.

Las técnicas de la recolección de la muestra, para análisis Microbiológicos, establecen una serie de precauciones y condiciones, que deben de ser conservadas a fin de obtener resultados significativos en el trabajo.

Antes que nada debemos tener muy claro el objetivo de estudio, ya que en base a esto se van a indicar las características de muestreo, el sitio y el tipo de muestra, que se va a requerir para el análisis, y dependiendo del tipo de muestra, así serán las técnicas, tanto de muestreo como de análisis, ejemplo se pueden muestrear aguas de consumo, agua de desecho, agua re

sidual, agua de lagunas, agua de charcos, agua de aljibes, -
agua de pilas, piletas, agua de estanques, lagos, albercas, -
baños, aguas clorinadas, (aguas de desecho desinfectadas con-
cloro), una vez estando bien determinadas sus características,
cas, se procede a realizar el análisis, por ejemplo grado de
contaminación, tipo de microorganismos Patógenos, de la mues-
tra, ¿de dónde proviene la contaminación?, ó simplemente para
un control de calidad periódico.

El tamaño de la muestra se va a determinar en base al ob-
jetivo de estudio y a la cantidad de agua que se disponga
para muestrear.

Para cada tipo de muestra se dan indicaciones específi-
cas, pero se pueden dar las siguientes indicaciones generales:
1.- Utilizar, recipientes, bolsas, frascos y materiales en -
general, que estén previamente esterilizados para la recolec-
ción, (haciendo uso de el autoclave, según el caso a 121° -

por un período de 20 minutos, ó en el horno a 180 C por 30 min. ó 170^o C por una hora), es necesario cubrir con papel aluminio ó con papel destaza el material que se va a esterilizar, para protegerlo de contaminaciones ulteriores durante el manejo.

2.- Al recolectar la muestra, se deben de evitar contaminaciones del ambiente, tales como: polvo, tierra, saliva, descargas nasofaríngeas, ó de cualquier otra naturaleza.

El recipiente ó bolsa se abrirá justamente lo necesario para introducir la muestra y hecha ésta maniobra, se vuelve a cerrar y a cubrirse tal como estaba originalmente; no se considera necesario durante la maniobra la utilización de mechero.

3.- Es necesario que el recipiente y los dispositivos utilizados para la toma de la muestra no solo se encuentren esterilizados, sino además también deben de estar libres de sustancias que pudieran afectar la viabilidad de los organismos contaminantes que se encuentran presentes en la muestra.

4.- Es recomendable identificar claramente mediante rótulos ó etiquetas, los recipientes antes de colocar en ellos las muestras a fin de evitar confusiones, si se ha de tomar más de una.

5.- En el informe ó acta anexa, se consignará en forma pertinente que pudiera afectar a la prueba ó al valor del resultado, a fin de que el laboratorio tome en consideración éstos detalles y desarrollar una prueba correcta, por ejemplo la posibilidad de la presencia de algún conservador, un olor ó un color desagradable y desusual, sus condiciones de temperatura, conservación, protección contra agentes contaminantes, etc.

6.- Toda medida que se tome para acortar el tiempo comprendido entre la recolección y la llegada de las muestras al laboratorio, contribuirá notoriamente a evitar falseamientos en la imagen Microbiológica del análisis del agua, los cambios que puedan surgir y sufrir durante su transporte, son tanto cualitativos y generalmente se pueden encontrar cifras mayores a las que originalmente había en la muestra, como re -

sultado de la proliferación de un grupo particular de microorganismos, ó bien menor cantidad de ellos, si es que está presente un grupo antagónico.

Es evidente que cada situación plantea problemas específicos en el muestreo; estimamos sin embargo que la conclusión de éstas consideraciones y de las que se señalan en cada tipo de muestras, en particular, permitieran al inspector seguir una metodología adecuada para los objetivos de muestreo y control sanitario del agua.

RECEPCION DE LA MUESTRA.

Introducción.

Es importante la intervención de un Químico en la supervisión del trabajo de recepción de la muestra que llega al laboratorio.

a.- Para constatar el correcto cumplimiento de las indicaciones.

b.- Para aclararse con los remitentes cualquier duda que se suscitara con la idoneidad de la muestra y la aplicabilidad de las determinaciones que se soliciten.

c.- Para la adecuada distribución de las muestras, si es que han de intervenir más de un laboratorista en su estudio.

Procedimiento.

1.- Al recibir la muestra en el laboratorio se debe constatar la clave escrita en el recipiente con el acta ó documento que la acompaña.

2.- Dar el número de control interno, con el que será mane -

- jada la muestra dentro del laboratorio.
- 3.- Tomar nota de las pruebas solicitadas al laboratorio en el acta de muestreo ó de inspección.
 - 4.- Se revisará la fecha de recepción de la muestra, así como la hora de su llegada .
 - 5.- Comprobando que no ha ocurrido derramamiento del contenido del recipiente y que el embase se mantiene íntegro, libre de perforaciones, rasgaduras ó roturas de cualquier tipo. En éste último con la muestra es impropia para el estudio.
 - 6.- Examinar el contenido del recipiente (frascos que deben de ser transparentes), y consignar cualquier característica que sugiera cambio ó alteración del producto, por ejemplo decoloración, enturbiamiento, cambio de olor, formación de películas ó sedimentos, desintegración, etc.
 - 7.- Verificar siempre que sea posible la temperatura de la muestra, al recibirla en el laboratorio cuando se trata de recolecciones que requieran una transportación refrigerada.

8.- Distribuir la muestra recibida a la mayor brevedad al laboratorio ó laboratorios que han de intervenir en su análisis.

RECIPIENTES PARA LA MUESTRA.

1.- Frascos para la muestra. Los frascos adecuados para la muestra, deben de ser de material resistente, para que soporten las condiciones de esterilización a que son sometidos, así como la acción de algunos solventes. Los frascos deben de ser de preferencia de borosilicato(vidrio), de boca ancha y con tapón de rosca ó puede ser tapón de vidrio, también se pueden utilizar frascos de plástico que sean resistentes al calor, los cuales se puedan utilizar sin que al esterilizarlos produzcan materiales tóxicos. El tapón debe ser de rosca que éste no permite que haya acción bacteriostática ó producción de compuestos nutritivos durante el proceso de esterilización.

ESTERILIZACION Y LIMPIEZA DE LOS FRASCOS.

Los frascos para la muestra pueden ser de menos de 125ml. con ésta capacidad ya tenemos un volúmen adecuado y además -- queda espacio para mezclar perfectamente antes de que el agua sea analizada. Los frascos de 250, 500, y 1000 ml también son- usados para numerosos análisis, pero con menos frecuencia.

Los frascos que tengan astillas, roturas ó superficies - grabadas se desechan. Todos los frascos deben de cerrar her - méticamente, antes de usar el frasco debe de estar bien lava- do con detergente y agua caliente, volviendo a enjuagar con- ésta última, para eliminar todos los residuos que pudieran q- quedar de detergente, y enjuagando finalmente con agua desti- lada, por lo menos tres veces.

En algunas ocasiones se pueden someter los frascos a - prueba y de éste modo detectar la presencia de agentes bacte- riostáticos ó residuos inhibitorios para algunos microorganismos.

AGENTES DE CLORINACION.

El cloro es el agente que más frecuentemente se encuentra en los frascos de las muestras de agua y de las aguas residuales. La adición de tiosulfato de sodio a los frascos de muestra antes de la esterilización, a una concentración de la solución de 10% (se agrega 0.1 ml por cada 125 ml de volumen de muestra (1)), esta concentración neutraliza aproximadamente 15 mgr/ lt de cloro residual.

AGENTES QUELANTES.

La presencia de un agente quelante en los frascos de muestra puede quedar adherido a él en el momento de muestrear supuestamente si contiene más de 0.01 mgr/lt de metales pesados, como son: Zinc, Níquel, Plomo, etc, ya se considera contaminado.

Para éstos casos, se agrega una solución que tenga una concentración de 15% de tetracetato de etilendiamina ácido (EDTA), con sal de tetrasodio agregando solo 0.3 ml de ésta solución por cada 125 ml de volumen de muestra, antes de esterilizar, se neutraliza la acción de éstos agentes quelantes sobre las bacterias.

ENVOLTURA DE LOS FRASCOS.

Para evitar la contaminación de las tapas y los cuellos

de los frascos se cubren con papel aluminio ó papel destraza antes de la esterilización.

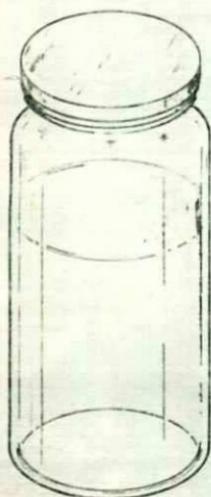
ESTERILIZACION DE LOS FRASCOS.

Los frascos de vidrio ó de plástico resistentes al calor se pueden esterilizar en el autoclave a 121 C por un período de 15 minutos, una alternativa podría ser la esterilización en seco por aire caliente, por un tiempo no menor de 2 horas a una temperatura de 170 C. Otra forma que también se puede utilizar para éste tipo de material, es agregando óxido de etileno a los frascos, que también se utiliza para las bolsas de plástico ó para los embases que no resisten altas temperaturas.

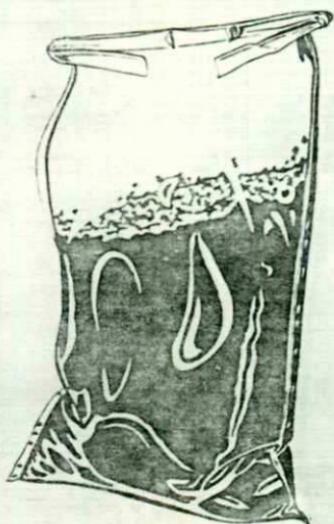
Los frascos ó recipientes que se esterilizan con gas se pueden almacenar toda la noche antes de que sean utilizados, para dejar que todos los residuos ó trazas de gas se disipen.

BOLSAS DE PLASTICO.

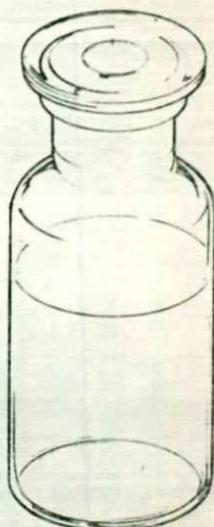
En el mercado se dispone de bolsas que practicamente sustituyen a los frascos de vidrio ó de plástico (Whirlpack), que se utilizan en el muestreo de sólidos ó de alimentos. Los fabricantes de bolsas indican que éstas están hechas para abrirse una sola vez, solo en el momento de muestrear, ya que la bolsa es esterilizada antes de salir a la venta.



A



B



C

- A.- Frasco de vidrio con tapa de rosca.
B.- Bolsa de Plástico (Wirl-Pack).
C.- Frasco de vidrio con tapón de vidrio.

TECNICAS DE MUESTREO.

Hay varias formas de muestrear, una de ellas puede ser recolección y muestreo a mano, ó bien puede utilizarse un aparato para las tomas del fondo de canales, lagos, pozos, rios, etc, también hay lugares donde se requiere de sistemas especiales de muestreo, debido a que el sitio señalado sea de difícil acceso, por ejemplo, un muelle, un puente ó un banco adyacente a las superficies del agua.

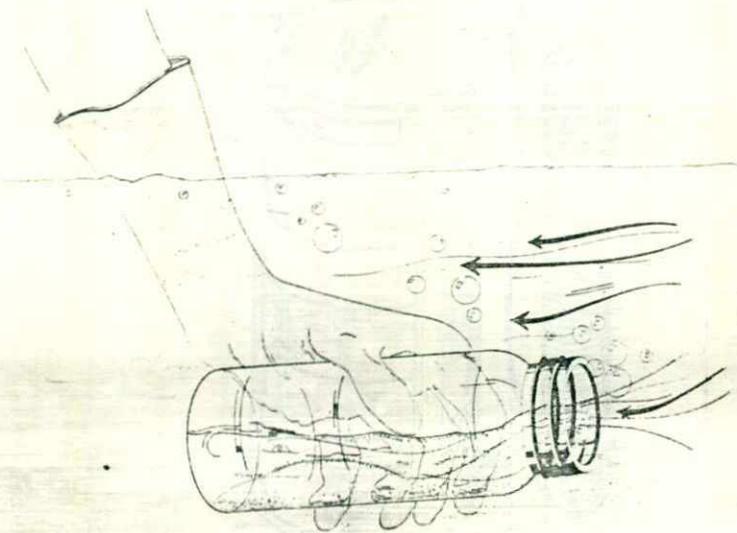
Muestreo de aguas clorinadas.

Cuando la muestra es de aguas residuales desinfectadas ó tratadas con cloro, bien puede ser agua residual, de centros de recreación, como albercas y baños, por lo que a los recipientes donde se va a muestrear se les agrega un agente desclorinador como los que se mencionaron anteriormente.

Muestreo de superficies a mano.

Para éste método se puede utilizar un gancho que sostenga el frasco de monitoreo.

Se debe investigar el lugar, etiquetar el frasco, muestrear e inmediatamente cerrar el frasco perfectamente con su tapa de rosca y cubrirlo con el papel aluminio, para protegerlo de la contaminación.



Aquí se ilustra la forma de muestrear superficies a mano.

reo requiere de un equipo que llegue a cierto nivel de profun
didad, para que al sumergirse se abra en el lugar de muestreo,
se llene, se cierre y se saque a la superficie, aunque de pre
ferencia las mediciones más efectivas son las que se realizan
con un cable muy largo, echo de material resistente como el -
acero.

Bibliografía (Toma de la muestra).

- 1.- Fuhs, G Wolfgang, 1977. Personal communication. Director of -
the Enviromental Health Center, Division of Lab, and Research
New York State Health Deparmen, Albany, New York.
- 2.- Geldrich, E.E. 1975. Handbook for evaluating bacteriological -
Water Laboratories,(2nd ed). U.S. Enviromental Protection -
Agency, Municipal Enveromental Research Laboratory, Cincina-
ty, Ohio, EPA 670/9-75-006.
- 3.- Guidelines Establishing Test Procedures for the analysis -
of pollutans. 40 CFR part 136,52780, as amended.
December 24, 1975.
- 4.- Hauser, (L.S.) ed. 1965 National Sellfish Saniattion program.
Manual of operations, Part I. Sanitation of sellfish growing -
areaus. U.S. Public Health Service, Washintong, D.C.
- 5.- National Interim Primary Drinking Water Regulations,40code -
of Federal Regulations, Amendments to part 141, December . -
24 de 1975 .

- 6.- Public Health Laboratory Service Water Subcommittee, 1953. The effect of storage on the coliform and bacterium coli-counts of water samples. Storage for six hours at room - and refrigerator temperatures J. HYG. 51:559.
- 7.- Public Health Laboratory Service Water Subcommittee, 1953. The effect of sodium Thiosulfate on the coliform and bacterium coli counts of non-chlorinated water sample. J.HYG. 51:572.
- 8.- Shipe, E.L. and A. Fields, 1954. Comparison of the molecular filter technique with agar plate count for enumeration of escherichia coli on various aqueous concentrations of Zinc and copper sulfate. Appl. Microbiol. 2:382.
- 9.- Shipe, E.L. and A. Fields. 1956. Chelation as a method for measuring the coliform index in water supplies. Public Health Rep. 71:974.
- 10.- Van Donsel, D.J. and E.E. Geldreich, 1972, Relationship of Salmonella to fecal coliforms in bottom sediments. water 5:1079 Research.
- 11.- Wech, P.S. 1948 Limnological Methods. Blakiston Company, Philadelphia, PA.

12.-Wills, Carroll, 1975 (June). Chain custody Procedures,
National Enforcement Investigations Center Denver, Co-
lorado, U.S. EPA.

13.-Zobell, C.E. 1941. Apparatus for collecting water su -
plies sample from different depths for bacteriological
analysis. J. Marine Research 4:173.

SECCION b).- TECNICAS.

Parte III A.

ESTANDARD PLATE COUNT. (SPC).

Recuento total de bacterias (RTB).

b.- METODOLOGIA.

Metodos analíticos.

Parte III. Sección A.

Método del Estandard Plate Count.(SPC).

Método del Recuento Total de Bacterias. (RTB).

1.- Sumario.

El método del RTB, es una forma de medir - cuantitativamente y de una manera directa a las bacterias-aeróbicas y anaeróbicas facultativas que se encuentran en - las aguas del medio ambiente, éstas bacterias se multipli - can generalmente en forma muy rápida, en medios selectivos. Esto se hace tomando una muestra alícuota de agua y se colo - ca en una caja Petri, se le agrega el medio de cultivo(- agar para métodos estandard a una temperatura de licuefac - ción, que no debe ser demasiado elevada, por que puede ma - tar las bacterias, 44-46°C), se mezcla perfectamente la - muestra y el medio, para que haya una correcta distribución de las bacterias en toda la caja.

Cada colonia que crece en el medio proviene de una cé - lula bacteriana.

Aunque algunas partes de la caja Petri no se prestan-

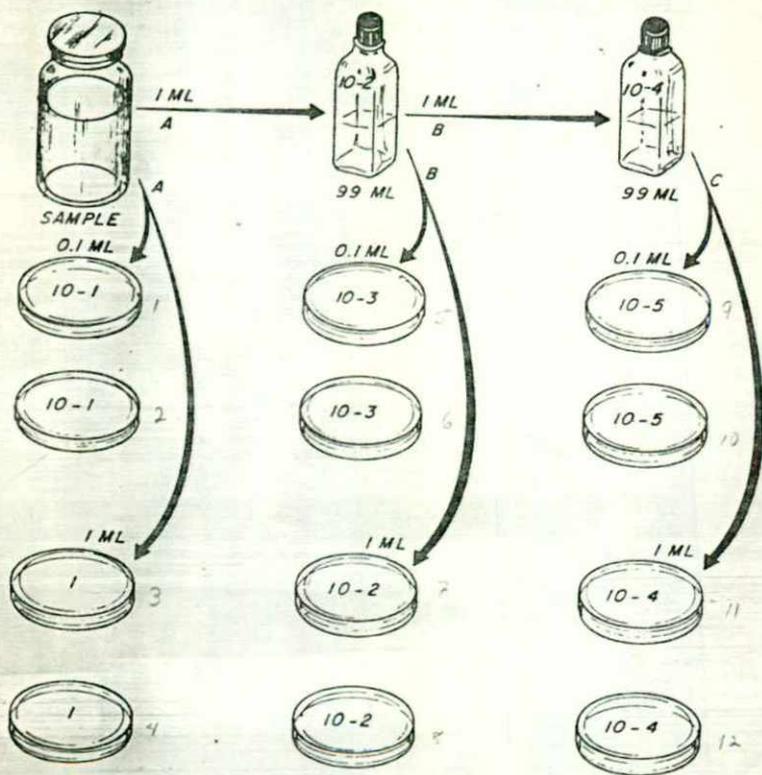
para hacer el recuento de las colonias, debido a que no reúnan las condiciones adecuadas, por ejemplo, que no se haya mezclado bien el medio y la muestra, por lo que el crecimiento se va a observar únicamente como un amontonamiento de colonias, ó que se produzca alguna contaminación, en general el método del RTB, nos proporciona una técnica uniforme que es utilizada como prueba comparativa para el control de calidad, en la prueba del monitoreo del agua.

2.- Acción y Aplicación.

Esta técnica es muy simple y útil para la determinación de la cantidad de bacterias en el agua potable, por lo que se usa en el control de calidad de los procesos de tratamiento del agua.

El método del RTB, ofrece un proceso que nos ayuda a mejorar la calidad bacteriológica del agua, distribuida por los sistemas de la red pública.

También nos permite conocer la efectividad de la clorinación de los sistemas de agua potable y permite detectar la presencia de posibles conexiones de contaminación en dicha red.



Forma típica de realizar las diluciones para el Método del Estándar Plate Count

5.- El frasco de la dilución 1:100 se agita vigorosamente y las diluciones siguientes se hacen con muestras alícuotas (pasando 1 ml) del frasco anterior a los frascos en blanco, se utiliza una pipeta estéril en cada ocasión, que se diluye la muestra y antes de hacer la dilución se agita vigorosamente el frasco para una correcta distribución de las bacterias.

6.- Cuando una alícuota se deja caer en el frasco, la pipeta no debe entrar más de 2,5 cm por debajo de la superficie de la muestra.

4.- Preparación del agar.

1.- Para la preparación del agar, se realiza de acuerdo a las indicaciones que trae cada frasco de polvo deshidratado y ya que está preparado se mete a esterilizar, por un período de 15 a 20 minutos, es muy importante que el tiempo sea exacto, ya que si éste permanece por más tiempo a elevadas temperaturas, se pueden desnaturalizar las proteínas que componen el medio y por lo tanto éste ya no sirve.

También es importante aclarar que cuando se esteriliza el medio de cultivo y no se utiliza de inmediato se puede guardar en el refrigerador, por algún tiempo, ó bien

si se prepara y se deja sin esterilizar, también se pueden guardar en el refrigerador por algún tiempo, hasta el momento en que se van a utilizar ó después derretirlo a baño María a 100°C, en éste caso también es importante que el medio no dure mucho en el baño, por que se descompone, solo se derrite una sola vez ya que si sobra se descha, pues cada vez que el medio se somete al calor, se precipitan los componentes de éste, produciendo grumos ó bolas, dando mal aspecto y cierto porcentaje de error en el recuento bacteriano, ya que el precipitado que se forma no permite que se haga un recuento correcto.

Cuando el agar se haya derretido, se mantiene a una temperatura de 44-46°C mediante baño María, manteniendo un termómetro sumergido en el baño en un frasco por separado, para checar la temperatura.

5.- Preparación del sembrado.

a.- Siempre se corre un duplicado de cada caja, para cada dilución, aunque se utilice un tamaño más pequeño.

b.- Se marca cada caja y se ordenan adecuadamente, se prepara un blanco para checar cada dilución, e incluso las diluciones conocidas, se le anota la fecha y alguna otra información que sea necesaria e importante.

3.- Con una pipeta limpia y estéril, tomar una alícuota de cada dilución y colocarlas en las cajas de Petri respectivas de acuerdo a sus etiquetas, para el proceso se utiliza una pipeta estéril en cada dilución y en cada transferencia.

4.- Después de obtener la alícuota deseada del frasco, se limpia la punta de la pipeta y se recarga la pipeta sobre el fondo de la caja Petri, esperando a que caiga por capilaridad, evitando de éste modo posible contaminación.

5.- Para disminuir el número de bacterias que aparecen en la muestra, ninguna de las diluciones se debe de preparar en la caja. Todo esto se efectúa en 20 ó 25 minutos.

6.- Vaciado del agar a las cajas de Petri.

1.- Usando el termómetro para el control de la temperatura del baño, checar la temperatura del medio antes de vaciarlo.

2.- Vaciar más ó menos entre 12 y 15 ml por caja, del medio de agar derretido y a la temperatura adecuada (44-46 C°), la caja debe de contener la muestra alícuota de prueba. Mezclar el medio inoculado cuidadosamente, evitando salpicar las paredes y en general el interior de la caja .

Se dá a continuación una técnica ó recomendación para la rotación de la caja.

Se gira 5 veces a la derecha, 5 veces a la izquierda, 5 veces hacia atrás y 5 veces hacia adelante. También se puede rotar en forma de 8 ó bien en forma circular.

3.- Pipetear 1 ml de agua estéril y vaciarlo en una caja, agregarle el agar, mezclarlos e incubarla y tomarla como muestra piloto, éste control nos sirve para checar la efectividad de -

la pipeta estéril, las cajas, el agua de dilución, el medio, etc.

7.- Incubación de las cajas.

1.- Después de que el medio ha solidificado (generalmente- 10 minutos después del vaciado), invertir las cajas e incubar de inmediato a 37°C .

2.- Incubar todas las muestras de agua que están sometidas- a la prueba exepto, la caja de control, las demás se incubarán por un período de $48\text{ Hrs} \pm 3\text{ Hrs}$ a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ C}$ y la caja control se incuba a la misma temperatura pero por un período de 72 Hrs. La incubación prolongada se requiere para que los microorganismos tengan tiempo de recuperarse y produzcan grandes generaciones.

3.- Las cajas se agrupan en la incubadora en hileras pequeñas, no se deben de hacer pilas muy grandes. Estas indicaciones se deben de tomar muy en cuenta, para permitir que -

el aire circule en forma adecuada por el incubador y que a la vez la temperatura sea uniforme en toda el área de incubación, para mantener el equilibrio.

8.- Recuento y registro de las colonias.

Después del período de incubación, se examinan las cajas y se seleccionan las que tienen entre 30 y 300 colonias.

El recuento se hace inmediatamente, ayudándose con el cuentacolonia, éste cuenta con un equipo para seguir la caja, así como un vidrio de aumento para observar mejor las colonias, además tiene una fuente de luz y se puede adicionar un contador de mano para mayor control.

Para el conteo se puede utilizar un contador electrónico, que cuente y registre las colonias al mismo tiempo, que se marquen en el tabulador y nos dé el resultado automáticamente cuando finalice el conteo.

El contador de colonias está disponible para el recuen-

to de todas las colonias, pero especialmente las más grandes, éste contador está provisto de un registro digital y una pantalla visual para la revisión y el recuento de las colonias de la caja Petri, aunque tengan diferentes tamaños. La posición del contador de colonias varía de acuerdo al número y tamaño de las colonias por caja. El analista puede comprobar los resultados periódicamente con los recuentos del contador manual.

Las siguientes indicaciones pueden usarse para el reporte del SPC ó recuento total de bacterias (RTB)

a.- Cajas que contienen entre 30 y 300 colonias.

Se cuentan todas las colonias y se dividen entre el volumen de prueba (en ml), si el duplicado de alguna de las diluciones contiene entre 30 y 300 colonias, se suman éstas al recuento de las colonias de las demás cajas y se dividen entre el volumen de prueba (en ml), como sigue:

Suma de colonias. = SPC/ ml.

Suma del volúmen de prueba en ml.

Registrar la dilución utilizada y el número de colonias en cada caja y reportar como recuento total de bacterias/ml. (SPC).

Si se observa que dos ó más diluciones consecutivas, se encuentran en el rango mencionado, se cuentan independientemente de alcanzar el recuento final de la caja por 100 ml. Por medio de éste cálculo, el recuento por ml se utiliza como valor para el reporte final.

Por ejem, si se cuentan cajas con 280 y 34 colonias en la dilución 1:100 y 1:1000 de la muestra, el cálculos de la siguiente manera: $\frac{280}{0.01\text{ml}} = 28000/\text{ml}$ y $\frac{34}{0.001} = 34000/\text{ml}$.

Reporte del valor final: $\frac{28000 + 34000}{2} = 31,000 \text{ SPC/ml}$.

b.- Cuando todas las cajas contienen un total de menos de 30 colonias.

Si hay menos de 30 colonias en todas las cajas, registre el número de colonias en la caja que se haya sembrado la menor dilución y reporte el recuento de la siguiente manera.

$$\frac{\text{Recuento de la caja.}}{\text{Dilución de la caja.}} = \frac{22}{0.1} = 220.$$

Reportar el recuento como:

Cálculo del SPC/ml = 220/ml.

c.- Sí un ml de la muestra produce un recuento total menor que 30 colonias, se reporta igual que en la parte b.

d.- Cajas en las que no hubo crecimiento.

Si en todas las cajas de todas las diluciones se observa que no hay crecimiento de colonias, el recuento se reporta como menor que uno, esto se hace en la caja que tenga la dilución más baja.

Por ejemplo, si 0.1, 0.01 y 0.001 ml de muestra se sometieron a prueba y no hay desarrollo de colonias, se puede usar la dilución menor de 0.1 para los cálculos y reportar como menor que, en la forma siguiente:

$$\frac{1}{\text{dilución de prueba.}} = \frac{1}{0.1} = \text{menor que } 10.$$

Reporte el recuento: Recuento total de bacterias (SPC) mayor que 10 ml.

e.- Recuento en las cajas que presentan un desarrollo de más de 300 colonias.

Cuando el recuento total de la caja donde se sembró la dilución más alta, es mayor de 300 col, el recuento se multiplica por el valor de la dilución que se usó en esa caja y se reporta como mayor que (SPC/ml), Por ejem, si en el duplicado de las diluciones de 1.0 , 0.1 y 0.01 ml de muestra, hay un recuento promedio que es mayor de 500 col y menor que 340, se usa la dilución menor, para que cuando se trate de hacer los cálculos ésta sea utilizada y se haga el reporte en la

en la forma siguiente:

$$\begin{array}{l} \text{Recuento de la caja.} = \frac{340}{0.01} = 34,000 \text{ por lo tanto:} \\ \text{Dilución de la muestra.} \end{array}$$

el SPC es mayor que 34000/ml.

f.- Recuento en las cajas que hay incontables colonias por caja.

La división cuadrículada que tiene el cuenta colonias - puede servir de ayuda para el recuento, cuando se presentan en las cajas con un número muy grande de colonias.

Quando en el recuento hay menos de 10 colonias por cm^2 - se cuentan las colonias existentes en 13 cuadros, teniendo así una distribución representativa de las colonias. Se seleccionan 7 cuadros horizontales que se encuentran en forma consecutiva y 6 cuadros verticales también en la misma forma para el recuento.

Se suman las colonias que se contaron en los 13 cuadros y se multiplican por 5 para dar el valor calculado del número

de colonias por caja (éste valor es para las cajas Petri de vidrio, que tienen un área total de 65 cm^2), y para las cajas de plástico se multiplica por 4.32(que tienen un área total de 57 cm^2). Cuando hay más de 10 colonias por cm^2 , se cuenta un promedio de cuatro cuadros representativos por cm^2 y se multiplica por el número de cm^2 de la caja, para obtener el valor del número de colonias por caja, luego de hacer ésta operación se multiplica por el recíproco de la dilución, conociendo así el valor del cálculo/ml.

Cuando se encuentran cajas con más de 100 colonias por cm^2 , los resultados se reportan como: SPC mayor que 6500, en el frasco de la dilución mayor.

g.- Cuando se encuentran cajas con colonias demasiado extendidas.

En éste caso se reporta:-No hay resultado debido a la gran extensión de las colonias en crecimiento-, por lo que las cajas son desechadas, sobre todo cuando la extensión al-

canza un área mayor que la mitad de la caja.

Cuando se pueden contar las colonias, que se encuentran en un área representativa de la caja, es decir si se propagan en un área que sea menor que la mitad de la caja se siguen las siguientes indicaciones.

- a.- Contar las cadenas de colonias como una sola colonia.
- b.- Contar cada extensión de colonias como una sola, éstas crecen como una capa fina entre el agar y la caja.
- c.- También cuando hay crecimiento en la película de agua -- que se forma en el borde de la caja, se cuenta como una colonia.
- d.- Ajustar el recuento para todas las cajas y reportar como: Cálculo del SPC/ml.
- h.- Registro de los datos.

Se debe mencionar como información adicional, algunos detalles que hayan ocurrido en el transcurso de la ejecución de

la prueba, como por ejemplo, diluciones incorrectas, confusión de cajas, rupturas, contaminación del equipo que se utilizó, el material, medio ambiente, errores en la medición, contaminación de las cajas de control, todo esto se debe de reportar como accidente de laboratorio.

i.- Reporte de los resultados.

Reportar el recuento y el registro de los cálculos del SPC como: "Colonias /ml y no por 100 ml.

El valor del SPC puede redondearse como se indica en las figuras significativas (S.F.), obtenidas del siguiente procedimiento.

- 1.- S.F. para un recuento real de 0-9 colonias por caja.
- 2.- S.F. " " " " 10-99 " " "
- 3.- S.F. " " " 100-300 " " "

j.- Precisión y exactitud.

Prescott et al (7) reporta la desviación estandard del

recuento individual de 30 a 300 colonias con una variación de 0-30%. En las cajas hay un error del 10%, para los recuentos de 100-300 colonias.

En las diluciones también tenemos cierto porcentaje de error y aproximadamente se considera que éste es de un 3%, en cada dilución y lo que al sumarlo aumenta el porcentaje. Se puede esperar una gran variación de acuerdo a la elevada cantidad de bacterias en las muestras de agua residual, por lo que se tienen que hacer varias diluciones.

El personal del laboratorio debe tener varios duplicados del análisis, para tener dos rangos de error comparativo, es decir cajas con un error del 5% y otras con el 10%, si el analista que realiza el recuento no está de acuerdo con el valor obtenido, puede repetir el recuento e inclusive el procedimiento, para evitar un mayor porcentaje de error.

Método para coliformes totales. (NMP).

En ésta sección se desarrollan varias técnicas para el recuento de las bacterias coliformes totales, que se encuentran en el agua de consumo y en el agua residual. El método que se elija va a depender de las características de la muestra de agua. Aquí la técnica que más se va a mencionar es la del (NMP) Número Mas Probable, debido a que las otras requieren de material con el cual no se cuenta.

La sección se divide como sigue:

- 1.- Definición del grupo coliforme.
- 2.- Método del Número Mas Probable. (NMP).
- 3.- Diferenciación del grupo coliforme por las pruebas Bioquímicas.

1.- Definición del grupo coliforme.

Las coliformes, ó el grupo de coliformes totales, incluye a todos los microorganismos aeróbicos y anaeróbicos facultativos Gram negativo, éstos microorganismos no forman esporas y fermentan la lactosa, tienen forma de barra (bacilos), la fermentación de la lactosa sucede en un período de incubación de 24-48 Hrs a una temperatura de 37°C.

La definición también incluye a los gérmenes del género de: Escherichia coli, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, etc.

Aplicación.

La prueba de las coliformes totales puede ser usada para el análisis de cualquier tipo de agua ó de agua residual, pero ésta prueba ha tenido un mayor desarrollo y ha incrementado su empleo más específicamente como indi-

cador de la contaminación.

Por lo tanto la prueba de las coliformes totales puede ser usada y queda como indicador para la calidad bacteriológica del agua potable, de los sistemas de distribución y los abastecedores públicos, por lo que la ampliación de la medición de la contaminación se decide por las pruebas a estas aguas.

Utilmente estas pruebas también se están utilizando en el monitoreo del agua de mar.

Aunque la mayoría de las muestras de agua pueden ser analizadas por varias técnicas para el recuento del número de coliformes totales, en algunos métodos, por ejemplo, en el (FM), muchas de las coliformes pueden perderse, debido al alto contenido de microorganismos que contenga la muestra, por lo que este procedimiento es menos utilizado. Por esto y por algunas otras cau-

sas, el método del NMP, en numerosas ocasiones es utilizado más frecuentemente, sobre todo cuando el contenido de sólidos ó de sustancias tóxicas que contienen las aguas de desechos industriales, es abundante.

El método del (FM) por incubación retardada, es utilizada en inspecciones ó monitoreos, que son situaciones de emergencia, cuando el método del NMP no se puede llevar a cabo, debido al lugar donde se va a tomar la muestra, ó por que el tiempo y la temperatura límite ya no permite el almacenamiento de las muestras.

El resultado consiste en obtener, con éste método, la información de las fuentes de contaminación de las diferentes muestras que se procesan(1,2), la aplicación de éste método para una fuente de agua específica, se obtiene de estudios preliminares por comparación del Filtro de Membrana.

BIBLIOGRAFIA.

Sección(III). Técnica A. Recuento total S.P.C.

- 1.- Clark, D.S. 1971, studies on the surface plates method - of counting. Can J. Microbiol. 17:943.
- 2.- Geldreich, E.E.H.D. Nash, D.J. Reasoner and R.H. Taylor 1972. The necessity of controlling bacteriological popu- lation in potable waters. Community Water Supplies. J. - Amer Water Works Assoc. 64:596.
- 3.- Geldreich E.E. 1973. Is the total count necessary, Ist - ANWA Technological Countfarence Proceedings, Amer Water - Works Assoc. VII-1 Cincinnati, Ohio.
- 4.- Geldreich, E.E.H.D. Nash, D.J. Reasoner and R.H. Taylor- 1975 The necessity of controlling bacterial populations- in potable waters: Bottled Water and Emergency Water Su - pplies. J. Amer Works Assoc. 67:1171.
- 5.- Klein D.A. and S. Wu 1974. Stress: a factor to be consi- dered in heterotrophic enumerations microorganism from - aquatic environment Appl. Microbiol. 27:429.

- 6.- Prescott, S.C. & E. A. Winslow, and M.H. Mac Crady. 1946 -
Water Bacteriological. (6th ed.) John Wiley and Sons. -
Inc. p, 46-50
- 7.- Van Sostenberg, A.A. and C.H. Lee, 1969, Pour Plates, -
Appl Microbiol. 18:1092.

SECCION III- B.

METODO PARA COLIFORMES TOTALES.

Por el Número Más Probable. (NMP).

Prueba Presuntiva.

Ver la figura III-B-2. e iniciar con la prueba presuntiva, colocar en hilera 5 tubos de fermentación que contengan Caldo Lauril y colocarlos en ésta forma en las gradillas. Seleccionar los volúmenes de la muestra y etiquetar cada blanco de los tubos para identificar las diferentes muestras y volúmenes inoculados.

a.- Para el agua potable se utilizan 5 porciones de 10 ml cada una, ó 5 porciones de 100 ml cada una.

b.- Para las aguas relativamente contaminadas, los volúmenes de agua se colocan en hilera de 5 en 5, que van de 100, 10, 1, 0, 0.1 y 0.01 ml. respectivamente, los volúmenes posteriores se distribuyen como se hace con la muestra original.

c.- Para conocer el grado de contaminación inicial de la muestra original distribuida en las diluciones de los 5 -

En éste paso se toma el inóculo de los tubos de la prueba presuntiva positiva y se pasan a tubos que contengan Caldo Lactosa Bilis Verde brillante (BBGL), que contiene agentes selectivos e inhibitorios que suprimen a todos los microorganismos que no sean coliformes, la producción de gas después del período de incubación de 24-48 hrs a una temperatura de 37° C, que constituye una prueba confirmatoria positiva y en éste punto termina la segunda parte del NMP.

La prueba complementaria se inicia con el estriado de la prueba positiva de BBGL en cajas que contengan EMB e incubar las cajas por un período de 24 Hrs a una temperatura de 37° C. Las colonias típicas y las que no lo son, se pasan a tubos de fermentación que contengan Caldo Lauril y agar nutritivo en tubo inclinado, la formación de gas en el tubo inclinado y la presencia de mi-

microorganismos gram-negativos(en forma de barra),constituyen un complemento positivo de la prueba de las coliformes.

El NMP por 100 ml es calculado según el NMP de la tabla, la que tiene su fundamento en los resultados de la prueba confirmatoria completa.

Aplicación. Ventajas.

En el procedimiento del NMP, se utiliza el método del tubo de dilución, que tiene mayor sensibilidad a la toxicidad y soporta mejor el crecimiento de los microorganismos del medio ambiente. El método puede aplicarse para detectar coliformes totales, en aguas desinfectadas con cloro, efluentes primarios y algunos otros tipos de agua.

El procedimiento del tubo multiple es también utilizado para los casos en que las muestras por examinar, sean turbias, contengan los sedimentos ó basura del agua de desecho, por que las partículas visibles no interfieren en la prueba.

Limitaciones.

Es cierto que las bacterias que no son de la familia coliforme, pueden inhibir ó suprimir a las bacterias coliformes ó actuar en una forma sinérgica en la fermentación del Caldo Lauril y producir resultados falsos positivos, que pueden ocurrir también en los tubos de BBGL, cuando se analizan las aguas de los afluentes primarios, de las aguas que han sido desinfectadas con cloro, especialmente cuando las aguas de la lluvia se han mezclado con las aguas residuales.(3).

Los resultados falsos negativos, pueden ocurrir cuando el agua contiene nitritos(4). Los resultados falsos positivos son más comunes en los sedimentos.

2.- Método del Número Más Probable. (NMP).

Sumario.

Este método detecta y calcula el número de las coliformes totales en la muestra de agua, por las técnicas de la - multiple fermentación en tubo.

Este método se lleva a cabo en tres etapas, la primera es la prueba presuntiva, la segunda la prueba confirmatoria y la tercera y última la prueba complementaria.

En la prueba presuntiva se utiliza una serie de tubos de fermentación, que contengan Caldo Lauril, los cuales se inoculan con una dilución decimal de la muestra de agua.

La formación de gas, después de un período de incubación de 48 Hrs a una temperatura de 37°C, constituye una - prueba presuntiva positiva, para el número de coliformes - totales. Sin embargo, el NMP se tiene que llevar a cabo a través de la prueba confirmatoria, para que los resultados sean válidos.

frascos que se colocaron por duplicado en cada hilera.

Esta serie de diluciones nos proporciona los resultados del grado de contaminación inicial, que va desde menos de 200 hasta más de 16 000 000 /100 ml de muestra.

d.- Agitar la muestra así como cada dilución, vigorosamente 25 veces por minuto, inocular cada uno de los 5 tubos de la hilera, con su respectivo duplicado en forma creciente de acuerdo a la dilución y luego incubar a 37° C.

e.- Después del período de incubación de 24 ± 2 hr, agitar suavemente los tubos en las gradillas y examinarlos para ver si hubo crecimiento ó producción de gas . En ningún momento éste elemento constituye una prueba positiva y si no se observa, se vuelve a incubar por otras 24 horas, examinando nuevamente al término de éste tiempo.

Los tubos que se sospeche que sean positivos, tienen que someterse a la prueba confirmatoria, los resultados se-

liformes de origen fecal), con los organismos que han crecido en los tubos de la prueba presuntiva y al mismo tiempo - inocular los medios para la prueba confirmatoria.

registran en las pruebas de la boratorio.

f.- Si el laboratorio usa el método del NMP, para el análisis de las aguas de suministro, se dice que se ha encontrado tubos que tienen un gran crecimiento, pero que no tienen producción de gas, los tubos que se reporten como negativos, pueden ser sometidos a la prueba confirmatoria para checar la disminución de coliformes.

g.- Si los tubos de las pruebas positivas no presentan producción de gas después de un período de incubación de 48 Hrs[±] 3, éstos se descartan y se reportan los resultados como: Prueba Presuntiva Negativa. y los tubos que están sospechosos en ésta prueba se someten a la prueba confirmatoria.

h.- La prueba para las coliformes totales se corre como en la parte III-C, el analista puede inocular el medio de(EG), (es un medio para diferenciar microorganismos co

Prueba Confirmatoria.

(Ver la figura III-B-2).

a.- Agitar cuidadosamente cada tubo positivo de la prueba-presuntiva y con un asa estéril de 3 mm de diámetro ó con un aplicador de madera, pasar a tubos que contengan BBGL, - agitar cuidadosamente los tubos para mezclar el inóculo - con el medio y después incubar a 37°C.

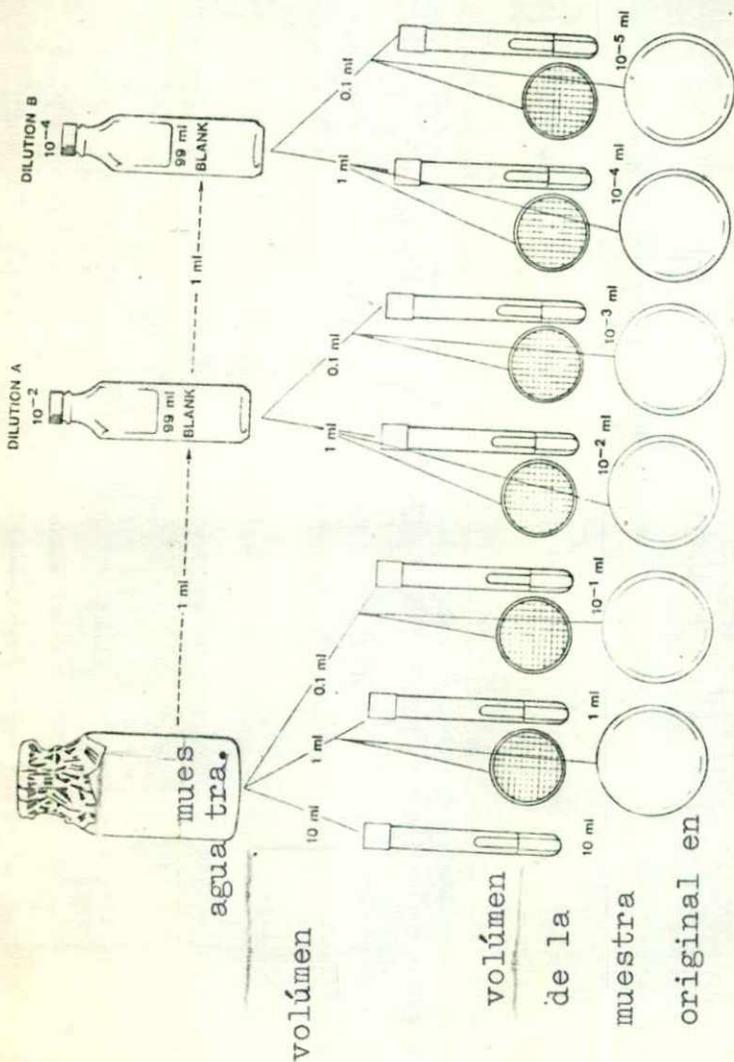
b.-Después del período de incubación que es de 24 Hrs ⁺ 2- examinar los tubos para ver si presentan producción de gas.

Si no hay producción de gas en los tubos (prueba negativa), reincubar los tubos por otro período de 24 Hrs. Re - registrar los tubos que presenten gas positivo y gas negativo

Guarde los tubos positivos para someterlos a la prueba confirmatoria, bien puede ser para checarlos en control de calidad ó para checar los tubos que presenten reacciones dudosas.

c.- Después de 48 hrs, volver a examinar los tubos de las - pruebas confirmatorias, registrar los tubos positivos y negativos y guardar los positivos para la prueba complementaria como en el inciso de arriba. (b).

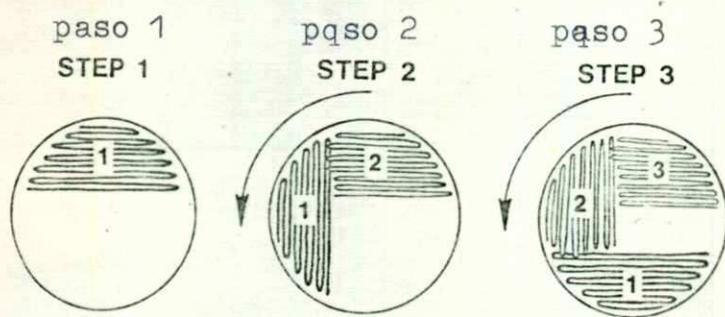
d.- Como rutina diaria en el análisis del agua que se efec-



Preparación de la dilución decimal.
tubos y cajas

túa, al mismo tiempo se puede determinar el tipo de microorganismos, cuando la prueba confirmatoria alcanza un 5% de positividad, ésto se puede llevar a cabo con un mínimo de muestras de la prueba confirmatoria, las que se llevan hasta la prueba complementaria.

e.- Para certificar que el suministro de agua está llegando en condiciones biológicas adecuadas, el laboratorio checará por lo menos cada tres meses el agua, ó llevará hasta la prueba complementaria el 10% de las muestras de la prueba confirmatoria positiva en el análisis del NMP.



Forma de Estriar la muestra en la superficie de los agares y placas de gelatina.

Prueba Complementaria.

Ver la figura III-B-2, los tubos de la prueba confirmatoria positiva, pueden someterse a la prueba complementaria, a través de la identificación con las pruebas Bioquímicas y pruebas de cultivo que se llevan a cabo en la forma siguiente:

a.- Estriar una ó más cajas con agar de Eosina Azul de Metileno(EMB), con cada uno de los tubos que resultaron positivos en la prueba del BBGL. Incubar las cajas a 37°C, por un período de 24 Hrs.

b.- Después del período de incubación, pasar una ó varias colonias típicas (núcleadas y con ó sin brillo metálico), a un tubo de fermentación que contenga Caldo Lauril y otras con agar nutritivo, también se puede utilizar el método del Pour Plate (Vaciado en caldo), pero en tubos inclinados, - estos se incuban por un tiempo de 24 a 48 Hrs a 37°C.

Si no hay colonias típicas, seleccionar colonias atípicas, por lo menos dos de ellas, e inocule en los tubos de fermentación que contienen el caldo lauril (CT) e incubarlos (seleccione colonias mucoides y sin núcleo),

c.-La formación de gas en los tubos de fermentación y la presencia de microorganismos Gram negativos, en ningún momento indican una prueba positiva complementaria para las coliformes totales .

PRUEBA PRESUNTIVA.

PRUEBA CONFIRMATORIA.

PRUEBA COMPLEMENTARIA.

Muestra.

Caldo Lauril + triptosa.

37 C.

gas + a las 24 Hrs.

gas - a las 24 hrs/

reincubar 24 hrs.

gas + a las 48 hrs.

gas - a las 48 hrs.

Caldo Lactosa Bilis verde brillante.
a 37 C.

gas + a las 24 hrs.

gas - a las 24 hr.

reincubar por 24 hrs.

gas +

gas -

Agar de Eosina azul de metileno. (EMB),
24 hrs a 37 C.

agar nutritivo inclinado.

Caldo Lauril en tubo

24 hrs a 37 C

24 a 48 hrs a 37 C.

Gram +
(forma esporas).
prueba neg.

Gram-(no forma esporas).

coliformes presentes.

gas +

col presentes.

gas

prueba n

CONSIDERACIONES ESPECIALES PARA EL AGUA

POTABLE.

Cantidad de Muestra.

Para el análisis de las muestras de agua potable, la cantidad de éstas, puede ser de 5 tomas de 10 a 100 ml como se indica en la parte (Coliformes fecales) CFR 40 y - 141 (5).

Confirmación.

Si el laboratorio utiliza la prueba del NMP, en el análisis de las redes de distribución de agua, frecuentemente se van a encontrar con tubos que presentan crecimiento, pero que no tienen producción de gas, éstos tubos que se reportan como negativos, deben ser sometidos a la prueba confirmatoria, para checar el por que de la disminución de las coliformes totales.

Prueba complementaria.

De las muestras de agua que son llevadas al laboratorio se dice que un 10% de éstas muestras por lo menos deben ser sometidas a la prueba complementaria mínimo cada tres meses, así como los cultivos que lo requieran, pero no los cultivos que presenten Gram positivo.

Cálculos.

Los resultados de las pruebas confirmatorias, pueden obtenerse de la tabla para el NMP, el cual tiene su fundamento, en el número de tubos positivos en cada dilución (ver la figura de la tabla de la parte II-C-4.9 para los cálculos, los resultados y los detalles del NMP).

La tabla II-C-4. Ilustra el NMP y el 95 % de los límites confiables de las combinaciones de los resultados positivos y negativos de 5 porciones de 10, 5 de 1.0 y 5 de 0.1 mililitros de muestra, son sometidos a las pruebas antes mencionadas.

La tabla II-C-5 muestra los índices y los límites para el NMP, para los 5 tubos de prueba y las muestras individuales de agua potable que son analizadas en el laboratorio.

Cuando la serie de diluciones decimales son diferentes a las que se dan en la tabla, se selecciona el valor del NMP de la tabla II-C-4 así como los cálculos que se pueden obtenerse mediante la fórmula que se dá a continuación:

NMP (de la yabla). $x \frac{10}{\text{mayor volúmen de prueba.}} = \text{NMP}/100\text{ml}$

Reporte de resultados.

Reporte el valor del NMP por 100 ml de muestra, ver el ejemplo de la figura III-D-2 y III-D-3.

Precisión y exactitud.

La precisión del NMP incrementa su exactitud con el aumento del número de duplicados que se hagan de la prueba, se recomienda 5 tubos de las 5 diluciones del NMP, tanto para el agua residual, como para el agua natural, pero para el agua potable, solamente se requiere de 5 tubos, cuando son volúmenes individuales.

Diferenciación de los grupos coliformes por medio de las pruebas Bioquímicas adicionales.

Sumario. La diferencia de los nombres del grupo coliforme-

y sus especies en general, se basa en las pruebas Bioquímicas adicionales y las pruebas de cultivo (ver la prueba-III-B-1), éstas pruebas requieren de procedimientos específicos, para que sus resultados sean válidos.

Métodos Para Coliformes Fecales.

Los métodos del Filtro de Membrana directo(FM), la -
incubación retardada(MF), la multiplicación en tubo, el NMP
así como otros, etc, son procedimientos que pueden ser uti-
lizados para el recuento o la determinación del grupo de -
las coliformes fecales, en el agua y en las aguas residua -
les. Una descripción general de las técnicas de laboratorio
para éste grupo de microorganismos, se dan en la parte II-C.

El método se vá a elegir dependiendo de las caracterís-
ticas de la muestra.

La sección se divide como sigue:

- 1.- Definición del grupo de las Coliformes Fecales.
- 2.- Número Más Probable (NMP).

BIBLIOGRAFIA.

NUMERO MAS PROBABLE (NMP).

- 1.-Bordener, R.H.C.F. Frith and J. A. Winter, (Editors),-
1977. Proceedings of the Symposium on the Recovery of -
Indicator Organism Employing Membrane Filters. U.S. -
Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring
and Support Laboratory, Cincinnati, H. (EPA 600/9-77-
024).
- 2.-Geldreich, E.E.H.F. Clark C.B. Huff, and L.C. Best, 1965.
Fecal coliform-organism medium for the membrana filter-
technique. J.Amer. Water Works Assoc. 57:268.
- 3.-Geldreich, E.E. 1966. Sanitary Significance of fecal co-
liforme in the Environment, U.S. Dept. of the Interior-
FWPCA, WP 20-3, 122 pp.
- 4.- Green, B.L.E.M. Gleusen, and V Litsky, 1975 two-tempe-
rature membrane filters method for enumeration of fe -
cal coliform bacteria for chlorinated effluent. Appl. -
Environ Microbiol. 33. 1259.
- 5.- Lin, S.D. 1973. Evaluation of coliform test for chlo-
rinated secondary effluent. J. Water Pollution Con -
trol Federations 45: 498.

Metodos Analíticos:Parte III- Sección C

Métodos para Coliformes Fecales.

1.- Definición del grupo Coliforme.

El grupo coliformes fecales, es una parte del grupo de las enterobacteráceas. Este grupo se define como un grupo-Gram negativo, no esporulado y que al descomponerse ó al reaccionar con un medio carbohidratado, fermenta la lactosa en un período de 24 hrs a una temperatura de 44.5°C, además que presenta producción de gas en los tubos de fermentación, otra de sus características es la producción de acidéz, dando colonias de color azul en el método del (FM).

Las especies más comunes del grupo de las coliformes fecales, son las de la *Escherichia coli*, cuya presencia indica la contaminación del agua.

2.- Método del Numero Mas Probable. (NMP)

Sumario: Para los cultivos positivos de Caldo Lauril (CL) (en forma semejante a la prueba presuntiva del método del NMP de la parte III-B), se inocula un poco de crecimiento -

de los tubos que resultaron positivos al medio de EC (medio para coliformes), y se incubaba a 37°C , por 24 Hrs (ver la figura II-C-2). La formación de gas en algunos de los tubos de fermentación, es una reacción confirmatoria positiva. El número de coliformes fecales se calcula en base a la tabla del NMP y que se fundamenta en el número de tubos positivos en el medio de (EC) (8).

Procedimiento.

El procedimiento general para el método del NMP se da en la parte III-C-2.

a.- Se prepara el medio como el que se utiliza en la prueba presuntiva para coliformes totales (CL), y el medio de (EC) se marca claramente cada blanco patrón, para identificar los diferentes volúmenes inoculados de las muestras.

b.- Inocular el medio de la prueba presuntiva, con una cantidad adecuada de la muestra, como se indica en el pro -

cedimiento anterior ,(parte III-B).

c.- Agitar suavemente el tubo inoculado con el asa de platino, para transferir un poco de crecimiento del tubo, de la prueba presuntiva positiva que tenga un tiempo de 24 -- 48 Hrs, al tubo que contiene el medio para la prueba confirmatoria. Agitar suavemente en la gradilla el tubo que contiene el medio de (EC), inoculado y dejar que se mezcle el inóculo con la muestra con el medio.

d.- Incubar el tubo con el medio de EC por 24 Hrs a 37°C.

Los tubos se pueden colocar en la incubadora a los 30 minutos después de haberlos inoculado. El agua del incubador debe por lo menos tener una profundidad hasta donde sea el nivel del medio de cultivo en los tubos.

e.-La presencia de gas en los tubos de fermentación de la prueba confirmatoria del medio de EC, después de 24 Hrs-

de incubación, aunque sea en poca cantidad, constituye una prueba confirmatoria positiva para las coliformes fecales.

Calculos.

a.- Los cálculos para el Número de coliformes fecales , se basan en la cantidad de tubos positivos, en los que hubo fermentación, usando el medio de EC, el valor se saca usando la tabla para el NMP.

b.- Los resultados del NMP, se elaboran con tres diluciones incluyendo la dilución mayor y todos los tubos positivos, de las siguientes diluciones .(de preferencia las dos siguientes), por ejem, si hay 5 tubos de la dilución de 10 ml, 3 de las de 1.0 ml y cero de las de 0.1 ml, por lo que los resultados quedan codificados de la siguiente manera en la prueba: 5-3-0. El código se encuentra localizado en la tabla IL-C-4 del NMP y se registra NMP/100 ml. Ver la parte C-II.4.9. para seleccionar los pasos y el significado de las diluciones,

Reporte de resultados.

Reportar las coliformes fecales como en el método del NMP y se registra el NMP/100 ml de muestra.

Precisión y exactitud.

La precisión en el recuento del NMP se basa en la tabla del NMP.

NOTA. La precisión del valor del NMP aumenta con el incremento del número de duplicados que se corran de cada muestra de prueba.

Figura III C-1

Verificación de las colonias coliformes fecales, en el método del NMP.

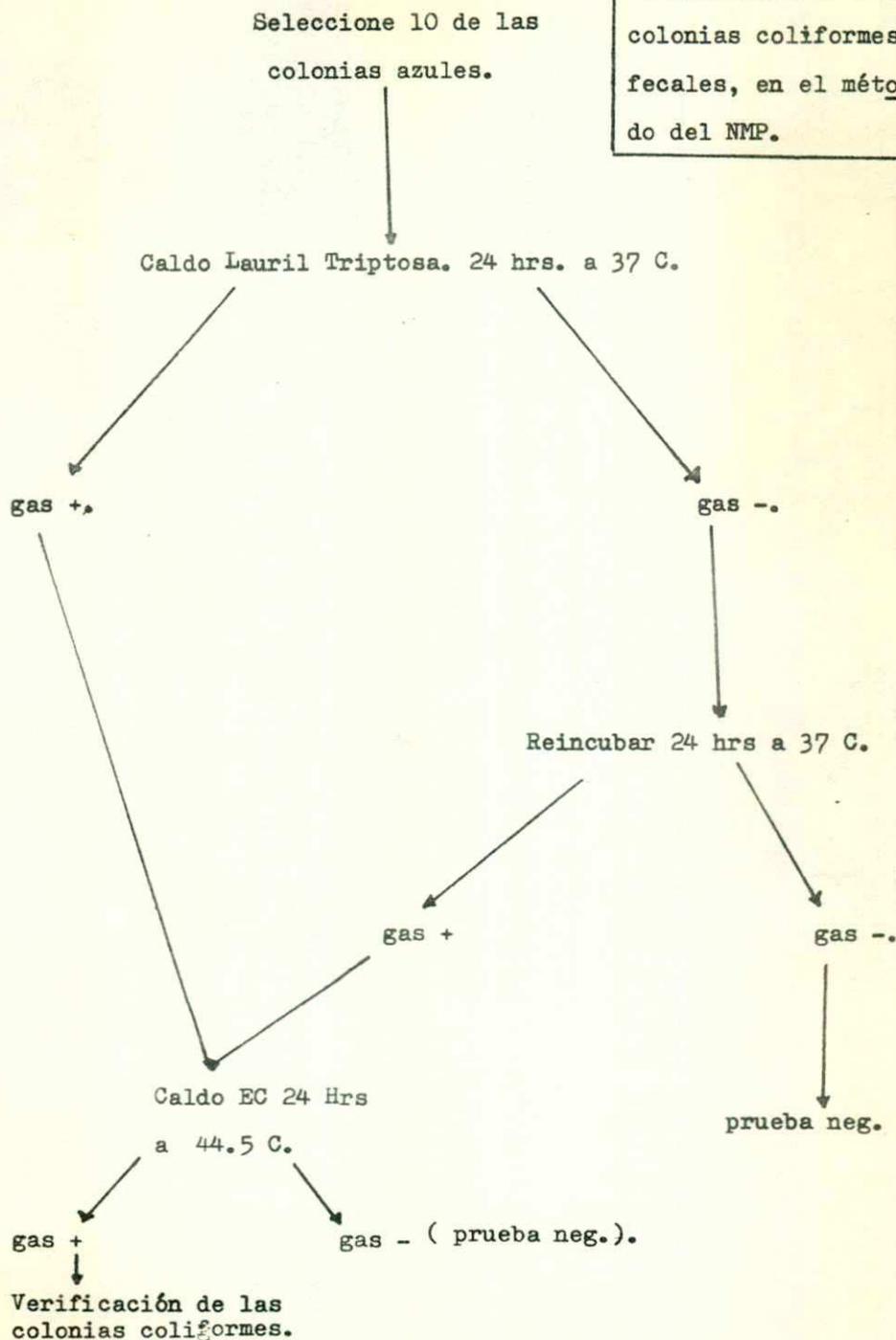


Figura III-C-2, para la prueba de las coliformes fecales en el NMP.

PRUEBA PRESUNTIVA.

Muestra.

Caldo Lauril Triptosa.
por 24 Hrs a 37 C.

gas +.

gas-.

reincubar por 24 hrs.

gas +.

gas -

(prueba neg.)

Elevar la temperatura
de la prueba en el me
dio de EC a 44.5 C.

gas + a las 24 hrs.

gas - a las 24 hrs.

coliformes fecales
presentes.

prueba neg.

Calculo para coliformes fecales (NMP).

PRUEBA CONFIRMATORIA.

BIBLIOGRAFIA. Sección III parte C (Método para coliformes
fecales).

- 1.- Brezenski, F.T. and J.A. Winter , 1969 Use for the delayed incubation membrane filter test for determining coliform, bacteria in sea water. Water Res 3: 583.
- 2.- Geldreich, E.E.P.W. Kabler H.L. Jetre and H.F. Clark, - 1955. A. Delayed Incubation membrane filter for coliform bacterial in water. Amer Jour. Public Healt 45: 1462
- 3.- Geldreich, E.E. 1975. Handbook for evaluating water bacteriological laboratories (2nd ed).EPA-670/9-75-006.U.S.
- 4.- Geldreich. E.E. 1976 H.F. Clark and, C.B. Huff,1946. - A. Study of pollution indicators in a was estabilita - tion pond. J. WPCF? 36 : (11):1372.
- 5.- Geldreich.E.E.,1976 Fecal coliforms fecal streptococo - density relationship in waste discharge and receiving - waters. In. CRC Critical Reviews in Enviromental Control. p 349.
- 6.- National Interic. Prymary drinkyng Water regulations 247 -264. In: A.W. Hoadley and B.J. Dutka, Eds Bacterial Indicators of pollutions, Health hazards Associated with wa - ter, ASTMSTP 635, American Society for testing and mate - rials, Philadelphia PA.

- 7.- Pavlova, M.T. Litsky and F.J. Francis, 1971 A comparative study of starch hidrólisis by fecal streptococo emlogy-plate and tube technique . Health Lab. Sci. 8:67
- 8.- Prescott. S.S.C.-E.A. Winslow and M.H. Mc Crady, 1946. - water bacteriology : (6th ed), John Wiley and Sons, Inc. 46-50.
- 9.- Tubirsh, H. 1951, the anaerogenic effect of nitrates and Nitrites- On Gram- Negativ eneteric bacteria water regu-lation 40 code of Federal regulations (C.F.R.)part 141.14 (v) y (c), published Federal Register,40,59566, December-24,1975.

MÉTODOS ANALÍTICOS.

PARTE III.

SECCION D. ESTREPTO-

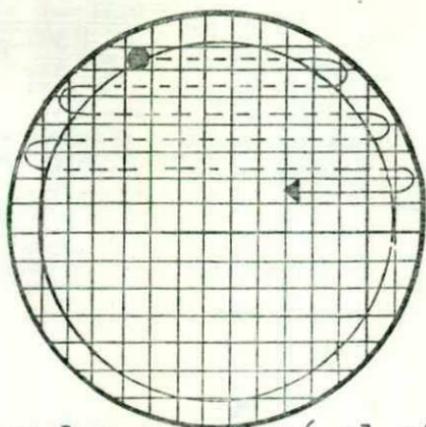
COCO FECAL.

Algunos de los métodos para determinar el número de Estreptococos fecales en el agua de consumo, así como en las aguas residuales son: El método del filtro de membrana (MF), el Número Más Probable (NMP), y el Peur Plate, son los procedimientos que se pueden usar para el recuento e identificación de éste tipo de microorganismos.

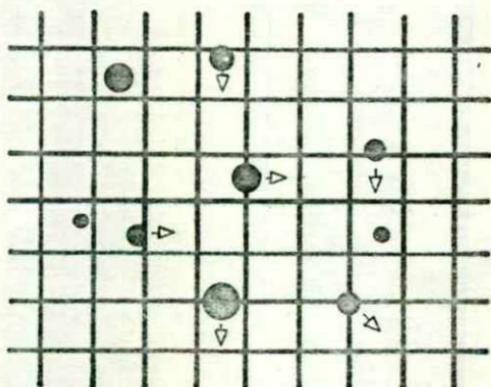
Una descripción más completa de ésta técnica se da en la parte II C. Al igual que en los demás procedimientos, el método que se seleccione va a depender de las características de la muestra.

La sección se divide como sigue:

- 1.- Definición del grupo del Estreptococo fecal.
- 2.- Método del Número Más Probable.



Forma de contar las colonias (el círculo interior indica el área de recuento efectivo y la línea - el camino ó la forma de ir contando).



Una porción del crecimiento está marcada en la cuadrícula y se indica con una flecha a que cuadro pertenecen.

3.- Método del Pour Plate.

4.- Identificación de las especies de Estreptococo.

1.- Grupo del Estreptococo fecal. DEFINICION.

Estreptococo fecal y Lancefields. grupo D del Estreptococo. Los términos de "Estreptococo fecal" y "Lancefield's - grupo D Estreptococo", se pueden usar como sinónimos, cuando se usan como indicadores de la contaminación fecal. Las especies contaminantes y sus variantes empleadas son: *S. faecallis*, *S. faecallis* subespecie *Liquefaciens*, *S. faecallis* subespecie *zymogenes*, *S. faecium*, *S. bovis* y *S. equinus*.

Estos microorganismos son detectados en los análisis sanitarios, mediante la medición y la metodología empleada para cuantificar los microorganismos, y de ese modo, calcular el grado de contaminación del agua basandose en el número y tipo de microorganismos que se encuentren.

La información en general nos indica que existen otros Estreptococos que pertenecen al grupo Q de los St. Lancefield's, éstos se encuentran más frecuentemente en las heces de los humanos que en las de otros animales de sangre caliente, por ejem, pollos, en el que se encuentra el S. avium, el que es característico en las heces de éstos animales y menos frecuente en las heces de los humanos, perros, puercos, etc. El grupo Q antigénico de éste Estreptococo, se encuentra en la pared celular de éstos microorganismos y en el caso de los Estreptococos del grupo D, su antígeno está localizado en medio de la pared celular y la membrana del citoplasma, donde se tiene la antigenicidad de éste tipo de Estreptococo en forma natural, de la especie D.

Este antígeno presente, nos indica una relación entre el grupo D y el grupo Q de los microorganismos.

El grupo Q del Estreptococo, permite conocer la incidencia de los "Biotipos intermediarios" del grupo Q del Estreptococo (1).

Los organismos del grupo Q, se desarrollan en medios de cultivo compuestos, que permiten el aislamiento y recuento del Enterococo. Kenner et al.(2).

Se ha podido comprobar que los Biotipos de los Enterococos, se encuentran más frecuentemente en las heces de las aves de corral, cabras, vacas y humanos.

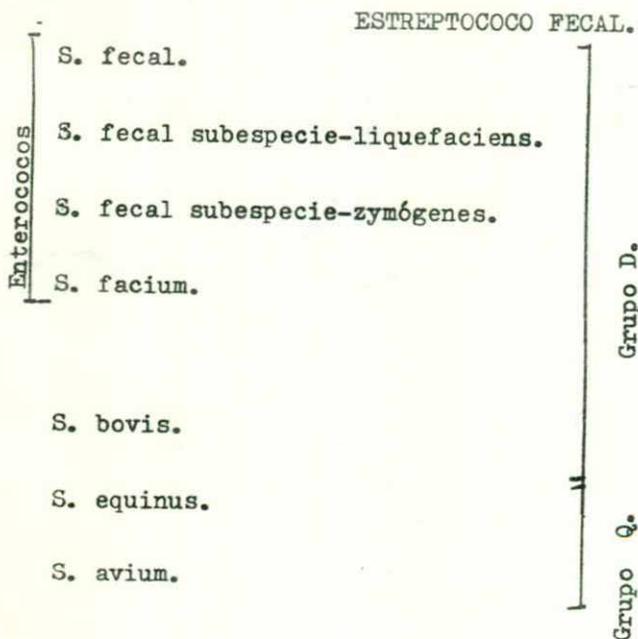
El 40% de los Estreptococos aislados de las heces de las aves de corral por Kenner y colaboradores, presentan Biotipos de los Enterococos. Es probable, que se describan algunos biotipos, como parte del grupo Q del Estreptococo.

Algunas de éstas especies se pueden considerar dentro del grupo del Estreptococo fecal.

Definición del Estreptococo fecal.

El término del Estreptococo fecal, es utilizado para describir al Estreptococo como lo indica la calidad sanitaria del agua de consumo y del agua residual.

El grupo Del S. fecal, se incluye en el grupo Q y - en el grupo D serológico.



Estreptococo viridians.

El Estreptococo viridians, principalmente el *S. salivarium* y el *S. mitis*, no se les considera como parte del Estreptococo fecal, como se mencionó anteriormente, ya que éstos dos tipos de microorganismos son habitantes normales del tracto nasofaríngeo. Estas subespecies se encuentran reportadas en muy pocos trabajos, casi no se detectan en las heces y crecen solamente en algunos medios para Estreptococo, por lo tanto, como el número de éstos microorganismos es bajo, así como la frecuencia con que se presentan es poca y su tiempo de vida media es corto, se considera que por éstos motivos se debe excluir de la clasificación del Estreptococo fecal.

Aplicaciones.

Los datos del Estreptococo fecal, permite la verificación de la contaminación, por su presencia en las aguas

de consumo, en las aguas residuales y a la vez nos dá la información adicional de la posible origen de la contaminación.

En combinación con la información que nos pueda proporcionar la determinación de las bacterias coliformes. El Estreptococo fecal, es utilizado en las pruebas sanitarias como suplemento de las coliformes fecales, cuando se requiere de mayor precisión para detectar las fuentes de contaminación, es decir su origen.

La frecuencia del Estreptococo fecal en el agua, indica que existe contaminación fecal en el agua por los animales de sangre caliente. Por el momento no se conoce como se multiplican éstos microorganismos en el medio ambiente.

Otra de las formas de identificar el tipo de (St). Estreptococo presente en las muestras, serían las pruebas Bioquímicas características de "Aislamiento e identificación del Estreptococo fecal" (ver la figura III-D-2), y

luego toda la información que resulta se utiliza para tratar de identificar la fuente de contaminación, por ejemplo, *S. bovis*, *S. equinus*, son huéspedes específicos y se les asocia a las heces del hombre y de los animales de sangre caliente. Un alto porcentaje de contaminación con este tipo de microorganismos está relacionado a las plantas procesadoras de carne, plantas lecheras, comederos de animales y tierras de cultivo, así como en general con todas las industrias de alimentos. Esto se ha podido deducir debido al tiempo tan corto de supervivencia de los microorganismos fuera del tracto gastrointestinal, del animal portador, su presencia indica la contaminación reciente de los animales del campo, es decir de los animales que pastan, o los que son sacrificados en las plantas productoras de carne, donde se trabaja con algunos animales que sean portadores y en las industrias lecheras, las cuales mandan sus desperdicios y-

desechos a los desagües, los que sirven como agua de riego para los pastizales, que a su vez sirven de alimento para el ganado y en ésta forma se vuelve a iniciar el círculo vicioso.

2.- Método del NMP.

Sumario.

El procedimiento de la fermentación en tubo, calcula el número de *Streptococos* fecales presentes en la inoculación de la dilución 1:10 de la muestra en el tubo con caldo. Los tubos positivos de la prueba presuntiva, se observan en el medio de dextrosa ácida, por la turbidez presente, después de un período de incubación de 24 a 48 Hrs a 37°C, se confirma así la presencia del *Streptococo* fecal. Luego se toma un inóculo del caldo de dextrosa ácida, se estría en un medio de PSE (equivalente a Esculina Azida Agar), y se reincuba a 37 C, por un período de 24 Hrs (5). La presencia de colonias negroparduscas, con halo café castaño, confirma la presencia del *Streptococo* fecal.

El NMP se registra en base a los resultados de la prueba confirmatoria y para los resultados se usan las tablas del NMP.

Aplicación.

Este método puede ser utilizado para la determinación del *Streptococo fecal*, en aguas de consumo y en aguas residuales, así como en las heces, una de sus desventajas puede ser el tiempo de proceso y es menos directo que otros métodos. El NMP se utiliza para muestras que no pueden ser analizadas por la técnica del FM ó el método del Pour Plte, debido a la turbidez del agua, el alto número de bacterias presentes en la muestra, compuestos metálicos existentes en ella la presencia de coagulantes, la clorinación de las redes de distribución del agua ó de los canales de desecho, el número de muestras así como el volumen que se tenga, ya que la técnica tiene ciertas limitaciones.

Procedimiento.

El procedimiento del método del NMP, se dá con detalles en la parte II-C-4.

a.- Se prepara el medio para la prueba presuntiva (caldo dextrosa ácida), y la prueba confirmatoria en caja con PSE. (ver la parte II-B-5.4.2. y 5.4.4. respectivamente).

b.- Marcar los tubos, para poder identificar las muestras y la cantidad de ella que se colocó en cada tubo, es decir de cada dilución.

c.- Agitar vigorosamente la muestra 25 veces por minuto.

d.- Inocular la muestra en los tubos de caldo dextrosa ácida, para la prueba presuntiva. El número de Estreptococos fecales que se encuentran presentes en la muestra de las aguas municipales contaminadas, es generalmente bajo ó por lo menos más - bajo, que el número de coliformes presentes en la muestra. - por lo que generalmente se utilizan grandes cantidades de muestra, para la inoculación del NMP y se usan volúmenes más pequeños para la prueba de coliformes. Por ejemplo si el volumen de muestra de 1.0, 0.1, 0.01 y 0.001 ml son utilizados pa

ra las pruebas de coliformes, por el contrario para las pruebas de Estreptococo se utiliza una serie de 10, 1.0, 0.1 y 0.01 ml de muestra para la inoculación.

Usando el medio sólido, se utilizan 10 ml para inocular los tubos con un ml de muestra y en otros tubos se siembra con 1 ml ó menos en caldo .

En muestras de agua que provienen de las plantas procesadoras de carne, de las fábricas de comida y de las aguas negras, se observa una mayor cantidad de Estreptococo fecal que de coliformes fecales.

d.- Checar la gradilla de los cultivos inoculados, mezclar los perfectamente e incubarlos a 37°C por un período de 48 Hrs, examinar la turbidez de los tubos después de 24 Hrs y luego a las 48 Hrs.

e.- Leer cada tubo para ver si no presentó turbidez.

Una prueba presuntiva positiva, presenta turbidez en el medio, puede sedimentar en el fondo del cultivo del tubo ó bien se pueden presentar las dos situaciones.

f.- Para confirmar la prueba presuntiva positiva, se estría una pequeña cantidad de muestra del tubo en cajas que contengan PSE. Se debe de checar la etiqueta del tubo de dextrosa - ácida con la de la caja donde se sembró.

h.- Incubar la caja sembrada . Una prueba positiva evidente es la presencia de colonias negroparduscas con alos café a su alrededor . El número de tubos que resulten positivos son utilizados para obtener los cálculos comparandolos con la tabla del NMP.

Cálculos.

a.- Los calculos para obtener el Número de Estreptococos presentes en la muestra, se fundamenta en base al número de pruebas positivas que se tenga en las cajas de PSE, usando

la tabla de NMP. II-C-1.

b.- El resultado del NMP, es elaborado en base a tres pruebas de dilución confirmatorias, por ejem, si el resultado de la prueba confirmatoria positiva se obtiene de una porción de 5 a 10 ml, 3 porciones de 1 ml y 9 porciones de 0.1 ml, la tabulación de los resultados de la prueba es de 5-3-0, los registros se dán en la tabla II-C-4, para los detalles del NMP y el NMP/ml.

Precisión y exactitud.

La precisión del NMP aumenta con la cantidad de duplicados que se corran por cada prueba, se recomiendan 5 tubos por cada dilución.

Método del Pour Plate.

Sumario .

Pequeñas alícuotas de la muestra original ó de la muestra diluída, se toma y se distribuye en el interior de la caja Petri y luego se le agrega el agar de PSE ó un equivalente (agar esculin -azída) ó de agar KF (agar Estreptocócico de Kenner, Clark y Kabler), se mezclan completamente éste y la muestra de agua. El Estreptococo fecal en el agar PSE, se observa aproximadamente de 1 mm de diámetro y de un color negro pardusco y con alos cafés. Los microorganismos pueden aparecer si es que se encuentran en las muestras de agua, después de un período de incubación de 18 a 24 hrs a una temperatura de 37°C . En el agar KF el Estreptococo se puede observar de un color rojo ó rosa después de 48 hrs de incubación a 37°C .

Aplicaciones.

a.- El método del Pour Plate, se recomienda como alternativa para el procedimiento de la técnica del MF, cuando la fuente de nuestra muestra, ejem, las aguas residuales, que han sido desinfectadas con cloro, ó cuando la muestra presenta demasiada turbidéz, en éstos casos se puede utilizar la técnica del Pour Plate.

El medio que se ha seleccionado, es el del PSE, éste medio tiene varias ventajas, que son:

- 1.- Se requiere solo de 24 Hrs de incubación, en comparación de otros medios que requieren de 48 rs.
- 2.- Además las técnicas se pueden utilizar con cualquier muestra, aunque ésta esté un poco turbia, debido a la concentración de los microorganismos.

En la técnica del Pour Plate, solamente se pueden analizar pequeños volúmenes de agua, esto puede ser una

desventaja, ya que el Estreptococo se encuentra en una concentración muy baja, por lo que el análisis requiere de - grandes volúmenes de muestra y supuestamente la técnica requiere de una cantidad precisa de agua. Por consecuencia - en éstos casos se puede utilizar la técnica del(FM), a me- nos que la muestra esté demasiado turbia y su filtración - sea prácticamente imposible.

Procedimiento.

a.- Agitar los frascos con la muestra en forma vigorosa, - por espacio de 25 veces por minuto, para que las bacterias queden bien distribuidas.

Hay que tomar en cuenta que el frasco en el momento - de agitarlo debe de estar herméticamente cerrado, para evitar que la muestra se salga ó se desparrame.

b.- La dilución de la muestra final, se obtiene del recuento de la caja que tiene entre 30 y 300 colonias. El número de colonias entre éste rango, nos dá el número más exacto-

de contaminación bacteriana, ya que ésta en la muestra original, no es conocida de antemano. El rango de dilución que se necesite, puede prepararse en la caja, obteniendo un rango determinado y dentro del rango normal de recuento de las colonias.

c.- Se pasan de 0.1 y 1.0 ml de las diluciones de la muestra a una caja de Petri que tenga división en el centro.

d.- La dilución inicial es de 1:100 ó de 10^{-2} , con una pipeta de 1 ml se pasa una muestra a un frasco de dilución que contenga 99 ml de agua destilada y estéril, (ver la parte II-C-1-4 preparación de la dilución y la figura II-C-4).

e.- Agitar vigorosamente los frascos de la dilución 1:100 para distribuir uniformemente las bacterias y poder seguir las siguientes diluciones.

f.- Pipetear 0.1 y 1.0 ml de la dilución 1:100 en una caja de Petri, usando una pipeta estéril.

g.- Para las aguas residuales, las aguas de drenaje, se requiere la preparación de diluciones adicionales , así como la elaboración de una mayor cantidad de agar, para las muestras alícuotas.

h.- Prepara un duplicado de las cajas, por cada incremento de éstas que se haga (ver la figura III-A-1), marcarlas con el número de muestra, la dilución y la fecha, así como alguna otra información adicional necesaria y de importancia.

Ya que se ha colocado la cantidad de muestra en la caja, se le agrega el agar y se distribuye perfectamente, se debe recordar que al colocar la dilución en la caja Petri - la pipeta debe estar ligeramente inclinada, casi en forma vertical, así se sostiene la pipeta, sin dejar que ésta toque el fondo y que el contenido escurra libremente por capilaridad.

i.- En cada caja se vacían de 12 a 15 ml de agar a una temperatura de licuefacción (44 a 46), rotar la caja perfectamente . El tiempo entre la dilución, el vaciado y la mezcla, no debe ser mayor de 20 minutos, éstas indicaciones se dan en la parte II-C-2-6-, para mayor información.

j.- Hay que tomar muy en cuenta que el agar solidifica en forma muy rápida y posiblemente en algunas ocasiones inclusive hasta antes de vaciarse, en el fondo del matraz ya se tengan algunos grumos, por lo que es muy importante que se tome en cuenta la realización del proceso en el tiempo antes mencionado. Después de ésta etapa, se colocan las cajas en posición invertida y se introducen a la incubadora a una temperatura de 37°C, por un período de 18 a 24 Hrs, cuando se ha utilizado el medio de PSE y cuando se ha usado el de KF, se incuban las cajas por un período de 48 Hrs.

Identificación, Recuento y Registro de las colonias.

a.- Después del período de incubación, se seleccionan las cajas que tengan un número de colonias que sean entre 30- y 300 de Streptococo fecal. En el agar de PSE, las colonias de Streptococo fecal son de color negro ó pardusco- y tienen un diámetro de aproximadamente 1 mm de diámetro- presentan un halo café a su alrededor (de la colonia', - y en cambio en el medio de KF las colonias del Streptococo se observan de un color rosa ó rojo y tienen un diámetro variado.

b.- Se hace el recuento de las colonias ayudándose con el cuadro de cuenta (que tiene un amplificador de 10x15) y además está cuadrulado.

Para el reporte del recuento se deben seguir los siguientes pasos:

a.- Cuando se tienen cajas con 30 a 300 colonias de Streptococo fecal.

Contar todas las colonias que se presenten en las cajas (entre 30 y 300), calcular el promedio aproximado de las cajas con la dilución adecuada, en la forma siguiente :

$$\frac{\text{Suma total de las colonias.}}{\text{Suma del volumen de prueba/ml.}} = 100 = \text{FS}/100 \text{ ml.}$$

b.- Para cajas que contienen más de 300 colonias.

Cuando el recuento de las cajas tiene más de 300 colonias, por ejem, más de 500 en la dilución de 1.0 ml, más de 500 en la dilución 0.1 ml y aproximadamente 340 en la 0.01 ml, para éstos casos se utiliza la caja que tenga la dilución de 0.01 ml.

$$\frac{340}{0.01} \times 100 = 3,400,000/100 \text{ ml.}$$

c.- Para las cajas que tienen más de 30 colonias.

Si todas las cajas tienen menos de 30 colonias, recordar el número de colonias que se contaron en la caja con -

menor dilución y reportar el recuento como: Recuento del Estreptococo fecal/100 ml.

d.- Para cajas sin crecimiento de colonias.

Si de las cajas que se sembraron ninguna presenta crecimiento se supone un recuento de 1 colonia/ml.

l.-> Colonia. Se divide 1 en tre el número mayor de la muestra filtrada y reportar el valor como menor que. Por ejem, si 0.1 ml, 0.01 y 0.001 ml se filtran y no hay reporte de colonias el recuento es de: $\frac{=1}{0.1} \times 100 =$ menor que 1000 EF/100 ml. y reportar el recuento como menor que 10 por 100 ml.

e.-Cuando todas ó la mayoría de las cajas presentan un gran desarrollo.

Para ésto se utiliza la cuadrícula del contador, y para tener un mejor cálculo, ver la parte III-A-5.6.

Precisión y exactitud.

Se debe de correr un duplicado de la muestra de agua para mayor control, ya que se introduce un cierto porcentaje de error, debido a la diferencia de las superficies de las muestras, pues aunque se agite y se trate de mezclar lo mejor posible, se debe de eliminar la mayor cantidad de error posible.

rescott: et al (6). reportado en el SPC (pero también aquí tiene su aplicación), se muestra la desviación-estándar del recuento individual para 30 y 300 colonias con una variación de σ a 20%, En éstos casos las cajas contienen un error del 10 %, para las cajas con mayor número de colonias que el rango mencionado, por ejem, hay un % un poco más elevado que el mencionado del 10%. El autor acentúa que fuera del error de la dilución que es de un 3% en cada etapa, casi no se adiciona otro mayor

por que es en éste paso donde se incurre más en el error.

Por éste motivo es que generalmente se espera una -
gran variación en las diferentes diluciones, y también -
por la elevada concentración de las muestras del agua re-
sidual, por ser varias diluciones.

El personal del laboratorio, debe correyun duplicado
para tener un recuento entre el 5 y 10 % de error.

Determinación de Coliformes fecales y Streptococcus fecale
en Ratios FC/SF.

La relación del Streptococo fecal y las coliformes fe-
cales en cuanto a su número, permite tener información sobr
la potente superficie de contaminación, se calcúla por indi-
viduo, la contribución del índice de bacterias de los anima-
les que usan para el cálculo de los Ratios FC/SF (7,8), és
tos ratios son:

Hombre.....	4.4
pato.....	0.6
borrego.....	0.4
pollo.....	0.4
puerco.....	0.4
vaca.....	0.2
pavo.....	0.1

Para deducir los Ratios de mayor valor, ver la parte 4.1. en donde nos indican cuales son los principales derivados de la contaminación, ocupando el primer lugar, la basura, los residuos domésticos y los desechos del cuerpo del hombre. Los Ratios que tienen un valor menor de 0.7 sugieren que la contaminación es originada por los desechos de las ganaderías, los criaderos de las aves de corral, así como de las plantas productoras de leche y alimentos en general, que en forma conjunta vierten sus desechos a los canales de desagüe, los cuales llegan a los sembradíos contaminando los alimentos del hombre y los pastizales de los animales, formando un círculo vicioso.

Ahora bien para que los Ratios se utilicen, tomaremos en cuenta las siguientes precauciones;

a.- El Número de bacterias puede alterarse drásticamente, cuando el pH de la muestra es menor de 4.0 y mayor que 9.0.

b.- Debido al límite tan pequeño de supervivencia y a la poca capacidad de adaptación que tienen algunos de los grupos del *Estreptococo fecal*, se deben de mantener los frascos de muestra, perfectamente bien cerrados, ya que el origen de la contaminación se obtiene confiablemente de los Ratios. Esto es muy específico por la elevada sensibilidad para el *S. bovis* y para el *S. equinus*.

c.- También se puede decir que son difíciles de utilizar los Ratios en forma efectiva, sobre todo cuando no se conoce el origen de la contaminación.

d.- Las aguas del Mar, bahías, estuarios y aguas que son utilizadas para irrigación, FC/SF Ratios, pueden estar en el límite del valor, debido a que es mayor la contaminación y por lo tanto la fuente de ésta.

e.- Si el recuento del *Estreptococo fecal* es menor que 100/1 ml los Ratios no se deben de aplicar.

Identificación de las especies del Estreptococo fecal.

Aunque el *Estreptococo fecal* ha sido mencionado y descrito en secciones anteriores, se ha podido comprobar su presencia en las pruebas Bioquímicas, en la parte III-D-3.

Para la identificación del *Estreptococo*, hay que tener en cuenta el tiempo, sobre todo para determinar su especie.

La verificación adicional de las fuentes de contaminación de humanos y animales, así como la determinación aislada, es muy importante para el significado de las reglas sanitarias. Para la correcta identificación de especies, se utilizan las pruebas Bioquímicas adicionales, realizando también una descripción y confirmación del grupo Q del *Estreptococo* y los grupos del *S. bovis* y del *S. equinus*, del *Enterococo*, puede separarse como *S. faecium* y *S. faecalis*, con su variedad dentro del grupo, esto es en base al tipo de la fuente de contaminación.

Aplicaciones.

Las pruebas Bioquímicas iniciales confirmatorias que pueden identificar a las colonias aisladas del Estreptococo fecal, con el grupo Q del St, y el Enterococo, pueden ayudar para la separación de las especies de S. bovis y de S. equinus, debido a la observación del crecimiento positivo en algunos medios y a una temperatura de 10° a 45°C, lo que se puede verificar por la existencia de microorganismos en NaCl al 6.5 % y a un pH de 9.6, en éstos casos el Enterococo puede separarse del grupo Q del Estreptococo, mediante las pruebas de reducción del azul de metileno.

Subsecuentemente el Enterococo puede ser separado utilizando pruebas Bioquímicas adicionales. Por ejemplo, el S. bovis y el S. equinus se pueden verificar por la prueba de la hidrólisis del almidón y más adelante en forma posterior, pueden ser separados por la prueba de la fermentación de lactosa.

Estas pruebas requieren de entrenamiento específico, -
del personal que la lleve a cabo para que los resultados -
sean válidos.

Procedimiento.

Se lleva a cabo en la forma que a continuación se dá:
Observando las figuras y los esquemas que se indican para-
la identificación de las especies del Estreptococo fecal.
(las figuras son: III-D-2 y III-D-4).

Aislamiento y confirmación del Estreptococo fecal.(fig - III-D-2)

a).- Seleccionar las colonias típicas del Estreptococo -
fecal, de las cajas donde hubo crecimiento y tomar muestra
para inocular cajas y tubos que contengan medio de agar -
BHI, (Infusión Cerebro Corazón).

b).- Después de inocular, se incuban las cajas por un pe-
riódoo de 24 a 48 hrs a 37°C y se toman algunas de las co-
lonias más características que se presente en el agar y -

se pasan a un vaso limpio para agregarle algunas gotas de -
peróxido de hidrógeno, el que tiene que ir resvalando por -
las paredes, el peróxido debe estar recién preparado y debe
tener una concentración del 3%.

Para la prueba del peróxido se puede utilizar un con -
trol negativo de *S. faecalis* y un control positivo de *Esta*
filococo.

c.- Si la enzima catalaza se encuentra presente, el peróxido
de hidrógeno se descompone en agua y oxígeno, el que se pue
de observar por la formación de burbujas, dandonos una prue
ba positiva, entendiendo que, por lo tanto, no hay especies
de *Estreptococos* y por consiguiente no es necesario conti -
nuar con la verificación ó verificaciones correspondientes.

d.- Si la prueba de la catalaza es negativa, una de las for
mas de separar al *Enterococo* del grupo Q, de las especies de
S. bovis y *S. equinus*, es por la incubación del grupo de -

prueba a una temperatura de 10° y otro grupo a una temperatura de 45°C.

Separación del Enterococo del Grupo Q del Estreptococo.

(ver la figura III-D-2).

a).- Pasar una pequeña cantidad del desarrollo del cultivo del tubo del caldo de B.H.I. (7.4.1.).

b).- Colocar uno de los tubos en un baño María a una temperatura de 45°C y observar el crecimiento, (una evidencia de la prueba positiva, es la presencia de turbidez) después de dos días.

c).- Colocar el otro tubo en un baño a una temperatura de 10°C y observar el crecimiento después de 5 días, si se observa turbidez tanto en el tubo que se mantuvo a 10°C como el que se tenía a 45°, esto quiere decir que la muestra presenta un gran número de microorganismos del grupo Q. Pero si solo se observa crecimiento en el tubo que se tenía a 45°C,

pero no en el que se tenía a 10°C , se confirma la presencia del *S. equinus* y del *S. bovis*. (ver la parte 7.4.7., de este manual, para las especificaciones).

Confirmación del grupo Enterococo. (ver la figura III-D-2).

Este grupo se puede verificar, por medio de la observación del crecimiento de microorganismos, en un medio de cloruro de sodio al 6% (NaCl), y a un pH de 9.6, en caldo de BHI, así como la prueba de reducción del azul de metileno en la leche, indica la verificación del grupo Q.

Prueba de crecimiento en BHI y NaCl al 6.5 %.

Pasar una gota de cultivo de BHI que tenga un período de 24 Hrs de incubación, a un tubo que contenga BHI más NaCl al 6.5% e incubar a 37°C por un período de 3 a 7 días, checar si hay crecimiento, la presencia de turbidez indica una prueba positiva.

Figura III-D-1 verificación del procedimiento para la identificación del Estreptococo fecal.

Se toman 10 colonias típicas aparentemente de Estreptococo fecal, aisladas en un medio de agar.



Caldo y agar de Infusión Cerebro Gorazón (BHI). e incubar por 24 - 48 hrs a 37 C.



Catalasa negativa. (-).



Crecimiento a 45 C



Crecimiento en el medio con 40% de bilis.



verificación del St fecal.

MUESTRA

Agar PSE (Col. negro pardusca con alo café).

Agar KF(col. rosa-rojo).

Catalasa neg.

Crecimiento a 45 y a 10 C.

Crecimiento a 45 C solamente.

Crecimiento en medio con NaCl al 6% y pH da 9.6 en BHI caldo.

Hidrólisis del almidón(+).

azul de metileno en leche al 0.1%

fermentación de la lactosa.

reducción.

no hay reducción.

produc. de ácido solamente.

no hay cambio.

grupo Enterococo.

tentativo del grupo Q.

fuentes de contaminación ganado y aves.

ver la figura III-D-3 y III-D-4.

S. bovis

S. equinus.

Figura III-D-2.

Aislamiento e identificación del St fecal, esquema general.

grupo Enterococo.

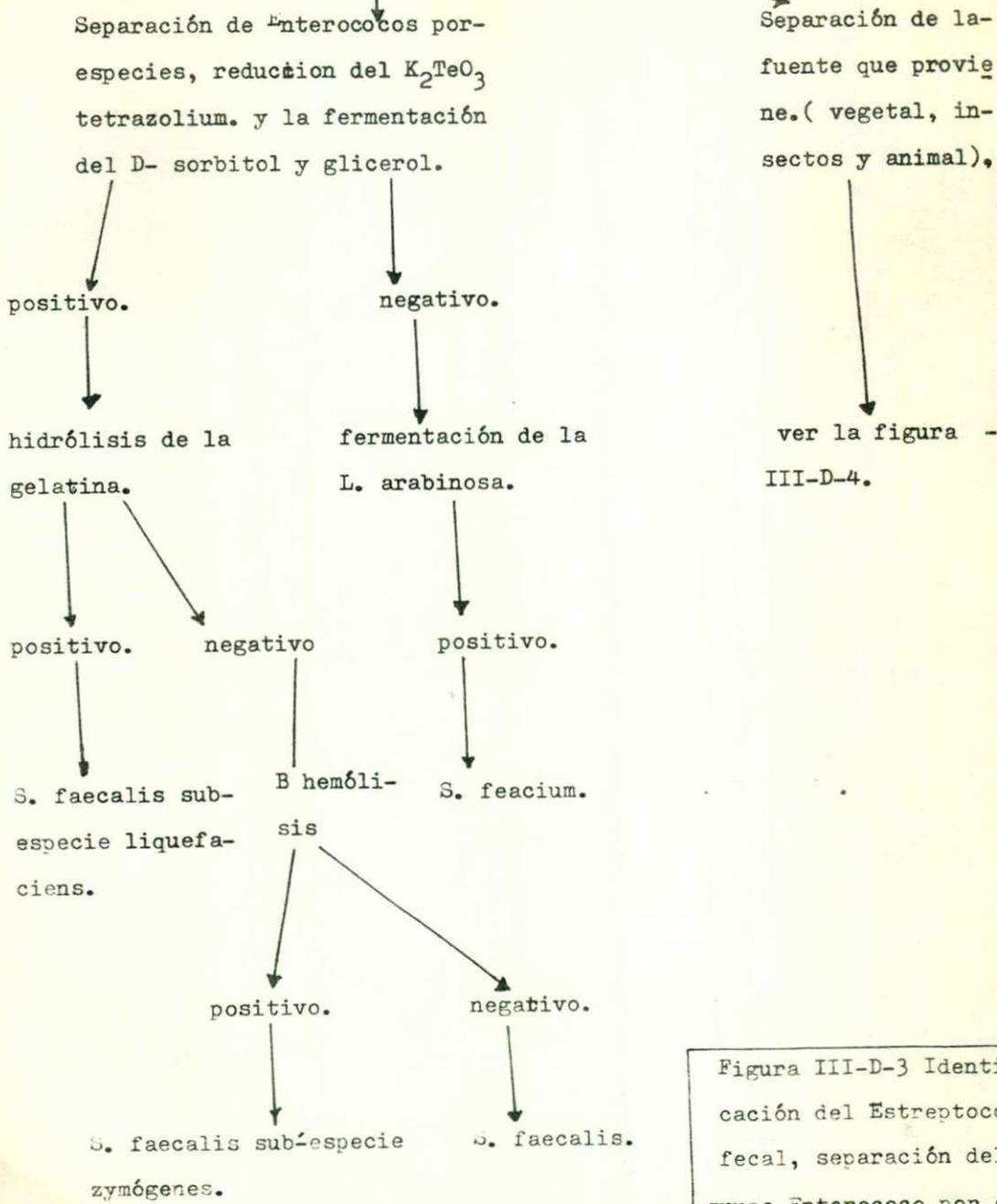
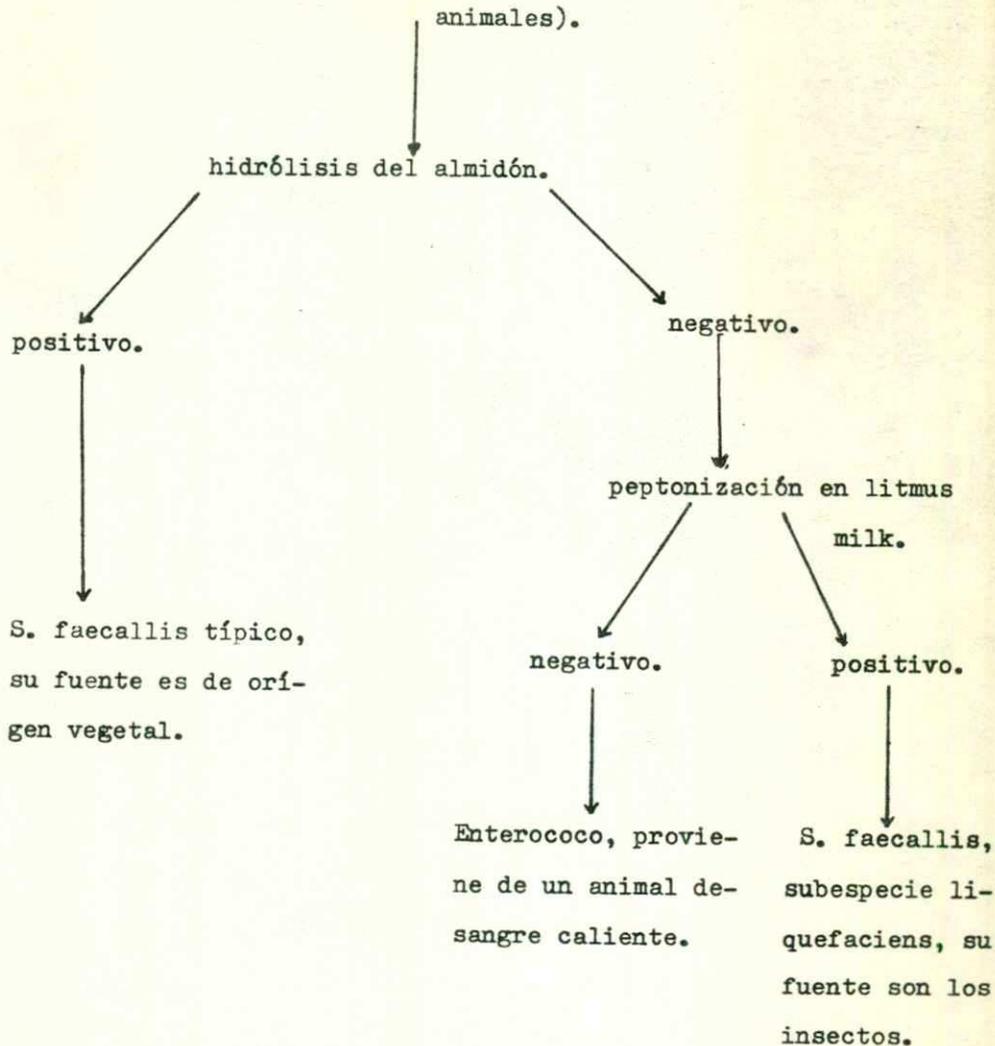


Figura III-D-3 Identificación del Estreptococo fecal, separación del grupo Enterococo por especies.

Separación del Enterococo de su fuente original. (vegetales, insectos y fuentes animales).



FIGUAR III-D-4 Identificación del Streptococo fecal. Separación del Enterococo, según su fuente de origen.

Prueba de crecimiento en caldo de BHI a un pH de 9.6.

Pasar una gota de cultivo de BHI que tenga 24 Hrs, a un tubo que contenga BHI ajustando el pH a 9.6, incubar a 37 C , por un período de 1,2,3.....7 días, para ver si hay indicios de turbidez, en ésta prueba el crecimiento del cultivo indica una prueba positiva.

c.- Reducción del Azul de metileno al 1%.

Pasar una gota del cultivo de BHI, que tenga 24 hrs, en un tubo que contenga leche estéril desnatada, agregándole 1% de azul de metileno, si hay reducción del azul de metileno, cambia de azul a blanco, indica una prueba positiva, Separación de las especies del grupo Enterococo. (ver la figura III-D-3).

El Enterococo puede separarse dentro de sus especies como se describe en la parte 7.4.5. Los grupos de Enterococos pueden ser separados, según sus especies, con la observa -

ción de la prueba de Telurito de potasio y de la 2,3,5 tri
fenil cloruro de tetrasolium, así como la fermentación de -
la D-sorbitol y glicerol.

a.- Tomar algunas colonias del BHI, que tenga 24 hrs de cre
cimiento y con ellas estriar una caja de agar que tenga una
concentración final de 0.4% de telurito de potasio, incubar
la caja en posición invertida a una temperatura de 37°C y-
observar cada caja después de un período de incubación de -
7 días.

Las colonias que reducen el telurito de potasio apare-
cen negras en éste medio.

b.-Tomar una pequeña cantidad de las colonias que han creci
do en el medio de BHI y que tenga 24 Hrs, transferirlas a-
una caja que contenga agar glucosa tetrasolium (ATG), la re
ducción del tetrazolium, se observa después de 48 Hrs a -
una temperatura de 37°C. El grado de reducción se indica -
como sigue:

alta reducción..... (+4 a +3) = rojo.
reducción moderada..... (+2) = rosa.
reducción débil..... (+ 1) = palo de rosa.
Cuando no hay reducción..... (0) = colonias bcas.

Todo éste porcentaje es sobre las colonias que han cre-
cido.

c.- Pasar una pequeña cantidad de las colonias que han cre-
cido en medio de agar de BHI que tengan 24 Hrs y colocar -
las en una caja que tenga base para agar púrpura, ésta -
prueba también se puede llevar a cabo en tubo, el medio de-
cultivo debe tener 1% de D- sorbitol y 1% de glicerol.

Hay que tener mucho cuidado de no picar el agar, ya -
que la siembra se debe de hacer en la superficie del medio-
carbohidratado. Incubar el medio a 37° C, el cultivo sembra-
do no debe de producir ácido en un período de 4 días de -
incubación, ya que la producción de ácido indica una prue -

ba positiva. Una prueba cuya reacción es negativa para el -
D- sorbitol ó glicerol, muestra la presencia del S. feacium.

La base para agar que sirve como indicador puede no-
cambiar de color.

d.- Reducción del telurio de potasio. (presenta colonias de
color negro.)

La reducción del tetrazolium y el desarrollo de coloni-
nias en el agar TTC, además de la fermentación en el D- sor-
bitol y glicerol, indican la presencia del S. faecalis y al-
gunas de sus subespecies.

La determinación del Estreptococo fecium y algunas de-
sus subespecies se efectúa como sigue:

1.- Inocule, por el método de picadura de la gelatina, con-
una pequeña cantidad de crecimiento de un cultivo de agar -
de BHI, que tenga 24 hrs de crecimiento, ya que se ha ino-
culado la gelatina, incubar el cultivo a una temperatura -

de 37°C por un período de 12 a 14 días, de acuerdo a la velocidad de crecimiento. Después del período de incubación se colocan los tubos en baño de agua fría ó en el refrigerador, por espacio de 15 a 30 minutos, para determinar si aún no ha solidificado la gelatina. Los controles inoculados pueden correrse en forma paralela, especialmente cuando la incubación es prolongada y los períodos pueden cruzarse.

La subespecie del *S. liquefacium*, que se mencionó anteriormente como parte del *Estreptococo faecalis*, éste se puede determinar mediante la observación del medio de siembra, es decir si la gelatina se solidifica, quiere decir que se encuentra presente el *S faecalis*, pero subespecie *Zymógenes* y no *liquefaciens*, la reacción que se utiliza para llevar a cabo la separación de éstas dos subespecies, es por hemólisis.

2.- Las propiedades hemolíticas del Estreptococo fecal, se determinan por medio del sembrado en Pour Plate.

Se funde la base para agar sangre y cuando ya esté - frío se le agrega un 10 % de sangre de borrego y se mezcla, las cajas se pueden inocular por estría ó por el método de Pour Plate y se incuban por espacio de 48 Hrs.

Después que ha pasado el período de incubación, se lleva a cabo la lectura, para determinar si hubo crecimiento y se observa la hemólisis alrededor de las colonias y se hace la clasificación correspondiente.

Todas las cajas de éste sembrado se deben de refrigerar toda la noche de preferencia, para que en caso de que se presente la reacción hemolítica, ésta se pueda observar perfectamente.

La hemólisis se clasifica en tres tipos:

Alfa hemólisis. Algunos grupos del Estreptococo rompen(li-

san), parcialmente a los globulos rojos y reducen parcial-
mente la hemoglobina a alfa metahemoglobina, produciendo -
una decoloración del glóbulo rojo, por lo que alrededor -
de la colonia aparece una zona que percibe claramente y se
ve de color verde-amarillento.

Beta Hemólisis. Las enzimas del Estreptococo fecal, destru-
yen totalmente a los globulos rojos, produciendo una zona-
clara de decoloración amarilla alrededor de las colonias,
en el medio de agar sangre. El Estreptococo faecalis sub-
especie zymógenes, muestra B hemólisis en el agar sangre.

Gamma Hemólisis. Algunas enzimas del grupo de Estreptoco-
co que no producen hemólisis, a éste grupo se le conoce -
como Gamma hemolítico, el Estreptococo faecalis es Alfa -
ó Gamma Hemolítico.

La hemólisis se verifica sobre todo cuando se están utilizando transferencia seriadas de un cultivo en el laboratorio, por que en una de las transferencias la hemólisis puede perderse. Esta especificación es muy especial para el *S. faecalis* subespecie *zymógenes*, cuando la B hemólisis no puede llevarse a cabo después de la transferencia en serie.

e.- La reacción negativa del telurio de potasio, el medio de tetrazolium y la ausencia de la fermentación del glicerol y D-sorbitol, indican la presencia del *S. faecium*.

f.- Colocar una alícuota de un cultivo que tenga 24 hrs de crecimiento en medio de cultivo de BHI y pasarlo a un medio de cultivo que contenga base para agar púrpura y agregarle 1% de L-arabinosa. Tener mucho cuidado de no picar el agar y sembrarlo solo en la superficie, incubar el medio inoculado a 37 C , éste no debe de producir ácido en un pe-

riódo de 4 días.

Si el *S. faecium* está presente, La L-arabinosa, se fermenta y produce ácido, por lo que el medio se vuelve amarillo.

Separación del Enterococo de su fuente original (vegetales, insectos y otras fuentes animales).

En contraste con la separación del Enterococo, que se describe en la parte 7.4.4., las especies del Enterococo se pueden separar de su fuente original de donde se producen. La prueba de la hidrólisis del almidón nos indica la separación de un Enterococo que es original de los vegetales y usando ésta misma base, se pueden separar las especies que son de insectos y otros animales.

La prueba de la pentonización de la leche en Litmus milk, nos dá la separación de un microorganismo, originario de un insecto y su diferencia con los grupos de Estreptococos de sangre caliente, se muestran en la figura III-D-4.

Para la identificación del *S.* de los vegetales, se utiliza la hidrólisis, para separarlos de los demás es -

pecies y fuentes de contaminación. El *S. faecalis* subespecie *liquefaciens* y *Enterococo* que se encuentra en los animales de sangre caliente, no se pueden separar por esta prueba.

La prueba de la hidrólisis del almidón se puede llevar a cabo satisfactoriamente, agregándole almidón a las cajas con agar ó bien se puede utilizar almidón en líquido, utilizando tubos. (9).

a.- Prueba de la hidrólisis del almidón en caja.

- 1.- Vaciar un poco de agar a una caja y esperar a que se solidifique, con un lápiz grueso se divide el fondo de la caja en 6 partes, se deja un testigo para cada una de las zonas.
- 2.- Estriar cada una de las divisiones, con muestras de BHI de 24 Hrs de crecimiento e incubar posteriormente a 37°C - por 24 Hrs, después de la incubación, inundar el medio con una solución Iodoiodurada (lugol), ver parte II-C-5.3. las

estriás muestran claramente las zonas hidrolizadas, con la ausencia del color usual. Cuando se muestran zonas negro azuladas, en el almidón Iodurado, alrededor de las colonias que han crecido, se considera una prueba positiva.

b.- Prueba en tubo de la hidrólisis del almidón.

1.- La prueba en tubo también se puede llevar a cabo en tubo, usando un medio líquido en lugar de un agar sólido.

a.-Se inoculan los medios, con el medio líquido de almidón con los microorganismos de prueba y después de un período de incubación de 18 hrs a 37°C, se observan los tubos de almidón, que utilizan una pequeña diferencia a las pruebas de almidón en caja y ésta consiste en que el medio lleva 0.2 ml de cloruro férrico al 2% y 0.2 ml de lugol, agregando 5 ml al medio inoculado y 5 ml al medio de control.(8).

El tubo control(prueba negativo, mantiene un color -

violeta), y la prueba positiva, son los cultivos que hidrolizan y decoloran el almidón, cambiando el color al medio de rojizo hasta violeta fuerte.

c.- Peptonización de la leche.

La peptonización de la leche en litmus milk, es usada para la separación del *S. faecalis* subespecie *liquefaciens* (cuando su fuente de donde proviene son los insectos).

1.- Pasar una gota del cultivo de BHI de 24 Hrs a un tubo que contenga litmus milk e incubar el tubo a 37°C y observar el crecimiento a los 1,2,3.....7 días.

2.- Una prueba de la peptonización positiva, incluye la liquefacción y el aclaramiento de la leche, apareciendo un color pardusco.

La peptonización indica *S faecalis* subespecie *liquefaciens*

El cambio de color sin aclaramiento de la leche ó live cuefacción (coagulación), indica una prueba es negativa y - se presume la presencia del Enterococo, que proviene de fuentes de animales de sangre caliente.

IDENTIFICACION DEL GRUPO Q DEL ESTREPTOCOCO.

La separación e identificación del grupo Q del Str, se inicia aislandolo del Enterococo, con los microorganismos de prueba en BHI + NaCl al 6% y caldo BHI a un pH de 9.6 y un - crecimiento negativo ó la falta de reducción del azul de metileno en leche al 1%,ver la figura III-D-2.

Otra de sus características del grupo Q, es la fermentación de la sorbosa a un pH de 10, y la ausencia de crecimiento en medio del telurito, así como la hidrólisis del almidón, que también es negativa, la prueba se realiza de éste modo:

a.- Inocular un tubo que contenga sorbosa(para fermentarla),

con una pequeña cantidad de crecimiento de un cultivo de BHI de 24 Hrs de incubación. Se debe tener en cuenta, de no picar el agar, de manera que al inocular, se inclina ligeramente la caja y en la superficie de ésta se agrega el medio carbohidratado. Incubar el medio ya inoculado a 37°C, ésta prueba no debe producir ácido en un período de 4 días.

La fermentación de la sorbosa, se presenta cuando hay producción de ácido, lo que produce el cambio de color del medio, que va de púrpura a amarillo.

b.- Pasar una pequeña cantidad de cultivo de BHI a un medio de sorbosa al 1% (parte 5.1.8.), ajustando el pH a 10, con una solución estéril al 30% de fosfato de sodio (ver la parte II-B-5.1.8.), incubar el medio inoculado a 37 C por un período menor de 4 días, si hay crecimiento, indica una prueba positiva.

c.- Inocular un tubo que contenga BHI más 0.4% de teluro de potasio, con un cultivo que haya crecido en medio de BHI de 24 hrs, incubar el cultivo a 37°C por un tiempo de 2 a 14 días, dependiendo de la velocidad de crecimiento del cultivo. Después de que ha pasado el período de incubación, colocar el tubo ó los tubos, en un baño de agua fría ó en un refrigerador por un espacio de 15 a 30 minutos, para determinar si ha solidificado ó no la gelatina. Si se tiene que usar un control paralelo, se corre, sobre todo si los períodos de incubación son prolongados.

d.- El grupo Q del St, no hidroliza el almidón, la prueba de la hidrólisis del almidón se puede llevar a cabo como se indica en la parte 7.4.5. a ó b.

e.- El *Streptococcus avium* sp, lo constituyen los organismos Lancefield's del grupo Q, consecuentemente el grupo Q anti-suero, permite que se usen las pruebas de precipitación, -

para tener un dato más para la identificación de este grupo, sin embargo, éste antígeno que no sea demostrable en todos los filtrados, la identificación en éstos casos depende solamente de las características fisiológicas.

Séparación e identificación del S. bovis. del S. equinus.

a.- S. bovis y S. equinus, se separar como se hace con el Enterococo del grupo Q del Estreptococo y ésto se hace por crecimiento a una temperatura de 45°C , pero no a una temperatura de 10°C (ver la figura III-D-2), S. bovis y S. equinus, pueden ser separados por la prueba de la fermentación de la lactosa, en la cual el S. bovis produce ácido y el S. equinus no. (c).

b.- Prueba de la Hidrólisis del almidón. Se lleva a cabo como se indica en la parte 7.4.5. a ó b. La prueba positiva de la hidrólisis del almidón confirma la presencia del S. bovis y del S. equinus.

c.- La prueba de la fermentación de la lactosa. La diferencia entre S. bovis y S. equinus por la fermentación de la lactosa, pasar una pequeña cantidad de un cultivo en crecimiento de BHI de 24 Hrs, a un cultivo que contenga agar base y a-

BIBLIOGRAFIA. (Sección D Estreptococo fecal).

- 1.- Clausen, E.M.B.L. Green and W. Listky, 1977. Fecal Streptococo indicators of pollutions, pp 247-264. In: A.W. Hoadley and B.J. Dutka eds, Bacterial Indicators of pollution.
- 2.- Kenner B.A. , H.F. Clark and P.W. Kabler, 1960, fecal - streptococci in feces. Am J. Public Health. 50:1553.
- 3.- Kenner B.A. , H.F. Clark and P.W. Kabler , 1961 Fecal - streptococci I Cultivation and enumeration of streptococci in surface water. Appl. Microbiol. 9:15
- 4.- Nwoland, Sandra and R.H. dievel.1967, group Q. Estreptococcico L. Ecology, Serology, Fisiology and Relationship, too established Enterococci. J. Bacteriol. 94,(2):291.
- 5.- Pavlova, M.T.F.T. Brezenski and W Litsski,1972 Evalua - tion of various media for isolation, enumeration and - identification of fecal Streptococci of natural sources. Health Lab Sci. 9: 289.

éste se le agrega un indicador de lactosa al 1% y que esté en tubo de fermentación.

Como siempre se recomienda que cuando se siembre se haga sin picar el agar, solamente sobre la superficie del medio carbohidratado. Incubar a 37°C y observar la reacción - después de 4 días de incubación . Solamente el *S. bovis* dá la reacción positiva de la lactosa y el *S. equinus* no cambia.

REACTIVOS.

A.- PRUEBA DEL INDOL REACTIVO.

Disolver 5 gr de P-dimetilamino-benzaldehído en 75 ml de alcohol isoamílico (ó amílico normal), ACS graduado y agregarle 125 ml de HCl concentrado.

El reactivo se pone de color amarillo y tiene un pH de 6.0, si al final el reactivo es de color oscuro, se tiene que desechar. Algunos colores que toman los reactivos recién preparados no son satisfactorios ó se vuelven insatisfactorios al cabo de unos minutos. El alcohol isoamílico y el benzaldehído son compuestos que se pueden adquirir en pequeñas cantidades, en base a lo que se va a utilizar .

Los reactivos se deben de mantener en frascos de color ámbar ú oscuros y con tapón de vidrio, si es que se van a almacenar.

B.- REACTIVO ROJO DE METILO PARA PRUEBA.

Disolver 0.1 gr de rojo de metilo en 300 ml de alcohol etílico al 95% y diluirlo con 500 ml de agua destilada.

C.-REACTIVO DE PREUBA VOGES PROSKAUER.

1.- Solución de Naftol.

Disolver 5 gr de alfa naftol purificado (derretirlo a 92.5 C ó un poco más), en 100 ml de alcohol etílico absoluto. Esta solución tiene que estar recién preparada en el momento de su uso, por lo que en ocasiones se tiene que preparar diariamente.

2.-Solución de Hidróxido de potasio.

Disolver 40 gr de hidróxido de potasio (KOH), en 100 ml de agua destilada.

d.- REACTIVO DE PRUEBA DE LA OXIDASA.

1.-Reactivo A. pesar 1 gr de naftol y disolverlo en 100 ml de etanol al 95 %.

2.- REACTIVO. B. Pesar 1 gr de p-aminodimetilanilina HCl u(oxalato) y disolver en 100 ml de agua destilada, preparar con frecuencia y almacenarlo en el refrigerador, no por mucho tiempo .

MEDIOS.

- 1.-Tryptofano en caldo, para la demostración de la producción del Indol. (ver la parte II-B-5.1.9.), en la prueba del Indol.
- 2.-Caldo MR-VP (glucosa buffer) para la demostración de la producción de ácido en la prueba del rojo de metilo, debido al cambio de color que se produce en éste medio y la producción de acetil metil carbinol, que se demuestra en la prueba de Voges Proskauer(ver II-B-5.1.9.(b).).
- 3.- Agar Citrato de Simmon's. Para la demostración de que el citrato es utilizado como única fuente de carbono. (ver la parte II-B-5.1.9.(c) para prepararlo).

4.- Agar Nutritivo. Coagulado en un tubo ligeramente inclinado, para la prueba de la oxidasa. (ver la parte II-B-5.1.1. para su elaboración).

5.- Medio de Descarboxilasa. Con base que contenga lisina,-HCl, Arginina-HCl u Ornitina HCL , para la demostración de la utilización de los aminoácidos específicos, (ver la parte II-B-5.5.14).

6.- Medio para la prueba de la motilidad. (Edwards y Ewing), (ver la parte II-B- 5.1.10.).

SISTEMAS DE MULTIPRUEBAS.

También se puede realizar toda la serie de pruebas Bioquímicas utilizando tiras reactivas que se adquieren en el comercio con los proveedores de productos y reactivos químicos, algunas de las marcas que se pueden utilizar son: API-entérica 20(es de productos analíticos INC), Enterotubo(- Diagnóstico Roche), Inolex(División Biomédica Inolex de - Corporación Farmacéutica y química Wilson), Miniteck(Labo-

ratorios Biológicos y Químicos de Baltimore), Pathotec prueba
ba en bandas(de la compañía Warner- Lambert).

PROCEDIMIENTO PARA LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS.

1.-Las pruebas Bioquímicas generalmente se pueden llevar a cabo con controles positivos y negativos. ver la parte de la tabla IV-A-5.

2.- Prueba del Indol.

a.- Inocular un cultivo puro con 5 ml de triptofano en caldo.

b.- Incubar el cultivo inoculado, a 37°C , por 24 hrs, se debe de mezclar perfectamente el medio de cultivo y la muestra.

c.- Se agrega de 0.2 a 0.3 ml de reactivo de prueba al cultivo que ya tiene 24 hrs de crecimiento, se agita , para mezclar, manteniendo en agitación por 10 minutos, observar y registrar los resultados.

d.- Un color rojo oscuro en el alcohol isoamílico, se puede presentar una capa en la superficie del cultivo, lo que indica una prueba del indol positiva y por el contrario, si el reactivo permanece con su color original, indica una

prueba del Indol negativa. La presencia de un color naranja

indica que hay duda (crecimiento) y se reporta como una reacción +.

3.- PRUEBA DEL ROJO DE METILO.

a.- Inocular un cultivo puro con 10 ml de glucosa buffer en caldo.

b.- Incubar por un período de 5 días y agregarle 5 gotas de metilo (indicador).

c.- Si se observa un color rojo, la prueba es positiva, pero si por el contrario se distingue un color amarillo, la prueba es negativa. La presencia de un color naranja, indica un resultado dudoso, lo que puede indicar la mezcla de dos tipos de microorganismos, presentes en la muestra de prueba, por lo que ésta debe de reportarse.

4.- PRUEBA DE VOGES PROSKAUER.

Esta determinación detecta la producción de acetil ze-

til carbinol, con la presencia del alfa naftol y el hidróxi

do de potasio, que produce un color rojizo.

a.- A un cultivo puro; agregarle 10 ml de caldo buffer de glucosa , 5 ml de sal de peptona glucosada en caldo, ó utilizar previamente el medio de glucosa con buffer que se utilizó para la prueba del rojo de metilo.

b.- Incubar el medio que se haya utilizado y ya que esté inoculado incubarlo por 48 Hrs a 37°C.

c.- Agregar 0.6 ml de solución de naftol y 0.2 ml de KOH a 1 ml de cultivo de la sal de peptona glucosada en caldo que tenga 48 hrs de incubación, éste se separa en tubos limpios, se agita vigorosamente por un período de 10 segundos se deja mezclar perfectamente y posteriormente se deja reposar por 2 ó 4 horas.

d.- Observar los resultados y registrarlos. La presencia de un color rosa carmesí, indica una prueba positiva. Esta prue

ba no se debe leer despues de más de 4 horas. Una prueba ne
gativa, puede darnos un color cobre ó un color café muy pá-
lido.

5.- PRUEBA DEL CITRATO.

a.- Inocular un tubo que tenga citrato de Simmon's, usando
una pequeña porción de cultivo puro, inocular una caja por-
picadura y despúes estriar el medio con mucho cuidado, de -
manera que no se toque ó raye los medios nutritivos.

b.- Incubar a 37 C por 48 hrs.

c.- Examinar el tubo inoculado para ver si hay ó no creci -
miento del microorganismo que se sembró, ó para ver si no -
ha producido cambio de color, si el agar tomó un color azul
prusia y se observa crecimiento en el medio, indica una prue
ba positiva; si no hay cambio de color indica una prueba ne
gativa.

6.- Prueba del citocromo oxidasa. (indofenol).

La prueba del citocromo oxidasa, se puede llevar a cabo con un producto comercial ya preparado. Este es un papel con franjas, que sirven como indicadores, ó un medio de agar en tubo inclinado, ésto se realiza en la forma siguiente:

a.- Inocular el agar nutritivo, del tubo inclinado e incubarlo a 37°C , por un período de 18 a 24 Hrs. Los cultivos viejos pueden quedarse sin usar.

b.- Agregar dos ó tres gotas de reactivo A y B en el tubo inclinado, mezclarlo y leer la reacción en dos minutos, no más.

c.- Una reacción positiva muy marcada , se pone de color azul en el tubo, ó en papel indicador, se presenta en 30 segundos. Si se observa una reacción ligera después de 2 minutos, no se debe de tomar en cuenta.

7.- Prueba de la descarboxilasa(Lisina, Ornitina y Arginina).

a.- La prueba completa de la descarboxilasa, requiere de una serie de tubos de cada uno de los aminoácidos y tubos con-

trol que no contengan dichos aminoácidos.

b.- Inocular ligeramente cada tubo.

c.- Agregar suficiente aceite estéril a cada tubo de caldo (el aceite debe ser mineral), ésto es para formar una capa de aproximadamente de 3 a 4 mm de diámetro en la superficie y cerra el tubo con tapón de rosca.

d.- Incubar de 18 a 24 hrs a 37°C y leer, si dá una reacción negativa se puede reincubar por un período un poco mayor de 4 días .

e.- La reacción positiva produce un color púrpura, en cambio la reacción negativa es de color amarillo.

Se debe de leer primero el tubo control que no tiene aminoácidos , en éstos tubos la reacción tiene que estar de color amarillo, para que sea válida.

Los tubos positivos que son de color púrpura, pueden tener turbidez como evidencia del crecimiento, por que los-

tubos sin inocular, también pueden ser de color púrpura .

Si no hay fermentación, puede ser que estén presentes algunas sustancias alcalinas durante la incubación.

8.- Prueba de la motilidad.

a.- Inocular por picadura, en el centro del tubo que contiene el medio para la prueba de la motilidad, a una profundidad que no sea mayor que la mitad del tubo.

b.- Incubar los tubos de 24 a 48 hrs a 37°C.

c.- Examinar los tubos para observar el crecimiento, si son negativos reincubar en una cámara de agua por más de 5 días.

d.- Si los microorganismos inoculados no presentan movimiento, solo crecimiento a lo largo de la línea de inoculación, la prueba de la motilidad es negativa.

Quando ésta prueba es positiva, se observa crecimiento fuera de la línea de inoculación, y se extiende a través del medio produciendo una apariencia nebulosa u oscura.

e.- Agregar el 2,3,5 cloruro de trifenil tetrazolium (TTC), éste medio nos sirve como auxiliar, para observar mejor la motilidad. Los organismos que han crecido en el tubo inoculado reducen el TTC, por lo que producen una coloración roja a lo largo de la línea de crecimiento.

9.- Pruebas Bioquímicas adicionales.

Pueden utilizarse otras pruebas Bioquímicas si se cree necesario para la identificación adicional de bacterias entéricas, por ejemplo, la fermentación específica de carbohidratos, ver la tabla E-5-III, para las características Bioquímicas de las Enterobacteriaceas.

10.- Sistemas de multiprueba. Estos están disponibles, con tubos de prueba, los que proporcionan diferentes medios de cultivo para las distintas pruebas, vienen en unidades de plástico y el medio viene deshidratado, discos impregnados-

Con medios y papeles con franjas indicadoras impregnadas de reactivo.

Algunos de éstos sistemas utilizan diversos códices como auxiliares en la identificación de las bacterias.

Algunos Investigadores han comparado los sistemas de - multipruebas con los sistemas convencionales y tradicionales de las pruebas Bioquímicas y casi todas es lo mismo, aunque se están haciendo estudios más recientes en donde se reporta que se están aislando un gran número de microorganismos por ésta pruebas, tanto con las tradicionales, como con los sistemas de multiprueba.

Tabla III-B-1.

Diferenciación de las coliformes y los organismos relacionados con las reacciones de las pruebas Bioquímicas.

BACTERIAS.	Indol.	Rojo de Voges metilo. Proscauer.	Citrato.	Citocromo Oxidasa.	Ornitin des carboxilasa.	lisin desc.	Arginin descar.	motilidad.
<u>Escherichia coli.</u>	+	+	-	-	V	V	V	+
<u>Citrobacter. freudii.</u>	-	+	+	-	V	V	V	+
<u>Enterobacter aerógenes.</u>	-	+	+	-	+	+	+	-
<u>Klebsiella.</u>	+	-	+	-	-	+	-	-
<u>Pseudomonas.</u>	-	-	+	+	-	-	-(+) ¹	+
<u>Aeromonas.</u>	+	-	+	+	+	-	+	+

V.- variable.

().-Reacción de P aeruginosa.

Sección c).

EQUIPO Y MATERIAL.

-APARATOS Y MATERIALES.

- 1.- Incubador que mantenga la temperatura a 37 ± 0.5 C, la temperatura se checa con un termómetro certificado por la NBS, ó con un equivalente en cuanto a exactitud.
- 2.- Baño de agua, que mantenga la temperatura del agar a 44-46 C .
- 3.- Contador de colonias, modelo Quebec, Darkfiel, ó un equivalente.
- 4.- Contador de mano ó electrónico(opsional).
- 5.-Cartucho para pipetas de acero inoxidable, aluminio,etc.
- 6.- Cartucho para cajas Petri de " " " " .
- 7.- Termómetro certificado por la NBS (National Bureau of Standard), o' un equivalente en cuanto a exactitud, que tenga su carta de calibracióm.
- 8.- Un distribuidor bacteriológico estéril (T.D.), ó pipetas de Mohor, de vidrio, ó de plástico de medidas adecuadas(ver la parte II-B-1.8.1.).

- 9.- Cajas Petri de vidrio ó de plástico estériles de 100 x 15 mm.
- 10.- Frascos de dilución de vidrio Pyrex, marcados hasta un volúmen de 99 ml, que tengan su tapón de rosca con su protección de corcho.
- 11.- Mechero de tipo Fischer, Bunsen ó una parrilla eléctrica.
- 12.- Asas para inocular de 3mm de diámetro, de cromo ó de platino, agujas para sembrar, calibradas (26 B & S) y un embase apropiado para colocarlas.
- 13.- Gradillas para los tubos(que le quepan 50 tubos de 25mm de diámetro.).
- 14.- Aplicadores estériles, palillos de plástico.
- 15.-Tubos de cultivo Pyrex de 150 x 25 mm ó de 151 x 20 mm- que contengan tubitos de fermentación de 75 x 10 mm, con tapón .

MEDIOS DE CULTIVO.

De la sección A.

1.- Agar Estéril de SPC (agar para métodos Estandar, que contiene, triptona, glucosa, levadura y agar), colocados en tubos(15 a 20 ml por tubo), ó en un volúmen cuantitativo - en los frascos de dilución, cerrados con su tapón de rosac y su protección de corcho, ver la parte II-B. 5.1.5.

2.- Agua Buffer de dilución estéril, colocada en los frascos de dilución hasta la marca de 99 ml \pm ml., bien cerrados ver la parte II-B-7.

De la sección B.

1.- Para la prueba p̄resuntiva se requiere de Caldo Lauril - ver la parte II-B-5.3.1, el caldo lactosado no se utiliza - por que puede dar reacciones falsas positivas.

2.- Para la prueba confirmatoria, se requiere del Caldo bi-lis verde brillante, ver la parte II-B-5.3.2.(8864)

3.- Para la prueba complementaria. Se utiliza el agar de Es ina Azul de Metileno. (EMB). ver la parte II-B-5.3.3. también en éste paso se utiliza el Agar Nutritivo, ver la parte II-B-5.1.1. y 5.1.5.

4.- El agua de dilución . Agua destilada estéril colocada - en los frascos de dilución hasta donde están marcados los - 99 ml. con su tapón de rosca. ver la parte II-B.

Sección C.

1.-Caldo Lauril Triptosa (igual que en la prueba para coliformes totales, en la parte presuntiva), preparar un volumen de 10 ml en la concentración adecuada, de acuerdo a las muestras que se van a utilizar (ver la parte II-B-5.-3.1.).

2.- Preparar el medio de Ec en un volumen de 10 ml para cada tubo de fermentación (ver la parte II-B-5.3.4.).

3.- Diluciones del agua. Puede ser agua buffer estéril ó - agua peptonada, colocada en los frascos de dilución.

Sección D.

1.- Dextrosa ácida preparada en volúmen de 10 ml, que se pa-
san a los tubos de prueba ya que es caldo (no se requiere-
de tubos de fermentación), ver la parte II-B-5.4.2. para -
su preparación . El caldo de Etil violeta ácida no se utili-
za ya que éste puede dar reacciones falsas positivas.

2.- Pfizer Selectivo. Enterococo (PSE), equivalente a Escu-
lin Azida Agar en el Pour Plate, ver la parte II-B-5.4.4. -
para su preparación.

3.- Agua destilada de dilución. Se esteriliza y se coloca -
en los frascos de dilución.

Para las pruebas Bioquímicas.

1.- vasos graduados de 25 a 500 ml .

2.- Tubos de prueba con tapón de rosca de 100 x 13 mm y -
150 x 20 mm.

Medios para el Pour Plate.

- 1.- Agar Pfizer selectivo para Enterococo (PSE), ó un equivalente como la esculina-azida-agar.
- a.- El agar se prepara antes de esterilizarlo, en un matraz Erlen Meyer ó un frasco que tenga tapón de rosca.
- 2.- Caldo Infusión Cerebro Corazón, (BHI).
- 3.- Agar de BHI.
- 4.- Caldo de BHI más NaCl (cloruro de sodio al 6%).
- 5.- Caldo de BHI a un pH de 9.6.
- 6.- Cajas con almidón.
- 7.- Caldo BHI con 40% de bilis.
- 8.- Medio líquido de almidón.
- 9.- Agar nutritivo sólido.
- 10.- Litmus milk (solución indicadora).
- 11.- Leche desnatada con 0.1 % de azul de metileno.
- 12.- Teluro de potasio en caldo BHI.
- 13.- Teluro de potasio en agar sangre (opcional).

- 14.- Glucosa tetrasolium (T G) agar, ó 2,3,5 trifenil -
cloruro de tetrasolium agar (TTC).
- 15.- Agar sangre con 10 % de sangre.
- 16.- Solución de D-sorbitol al 1% en base de agar rojo -
morado.
- 17.- Glicerol al 1 %, en base para agar púrpura.
- 18.- Solución de L-arabinosa al 1% en agar púrpura.
- 19.- Solución de lactosa al 1% en agar púrpura.
- 20.- Solución de sorbosa al 1% en agar púrpura.
- 21.- Solución de sorbosa al 1% en base de agar púrpura a
un pH de 10.

Para su preparación, todos los medios de cultivo se
puede consultar la parte II-B de 5.1.1. a 5.1.12.

Sección d).-

EXTRACCION DE LA MUESTRA

ALEATORIA.

d.- Obtención de la muestra aleatoria,

En lo que se refiere a la parte estadística del trabajo y refiriendonos a la forma en la que se extrajo la muestra representativa de la población tendremos lo siguiente:

Se efectuó un censo-encuesta en toda la población en el que además de conocer el número de habitantes, también se les preguntó, por ejemplo, que tipos de alimentos consumían y con que frecuencia, como era su ~~aseo~~ ~~aseo~~ personal, con que tipo de servicios contaban, por ejem, agua potable luz drenaje, consultorio médico, la ocupación de sus habitantes, etc; y el resultado de ésta encuesta nos proporcionó algunos datos, para conocer más a fondo, tanto el nivel socioeconómico, como el estado nutricional de los habitantes del mencionado ejido y de ésta manera tener un panorama más general de la población en cuestión.

La población general se dividió en manzanas, para tener un mayor control sobre la ubicación del domicilio de cada familia, para poder localizarlas más fácilmente des -

pues se realizara el sorteo.

Cuando ya se tuvo a toda la población censada y las encuestas con los datos solicitados, se procedió a tomar un 10% del total de las familias, como muestra aleatoria.

Según el censo el número total de familias, fue de 657 dando un total de 9000 habitantes, que al tomar el 10% nos da un número de muestra de 70 familias aproximadamente, que se obtiene al azar.

Como éstos datos se tomaron en el mes de Agosto, a pesar de que no ha pasado mucho tiempo, es de suponer que el total de la población ya aumentó, ó por lo menos ha variado, lo que anotaré en la parte de conclusiones, y si se observa que el número de habitantes al que se tenía censado, es muy diferente, se procederá a realizar nuevamente el sorteo, para aumentar el tamaño de nuestra población.

Para tener los rangos de edades con los que se iba-

a trabajar, tuvimos una asesoría de parte de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), que nos proporcionó a dos consultores expertos en enfermedades tropicales y ya que han trabajado con poblaciones que tienen las mismas características que la nuestra, pues bien, ellos nos sugirieron que trabajáramos con edades de 0 a 5 años, por la frecuencia con que se presentan las enfermedades gastrointestinales en éste rango de edades, tal padecimiento llegó a ser mortal en algunos casos.

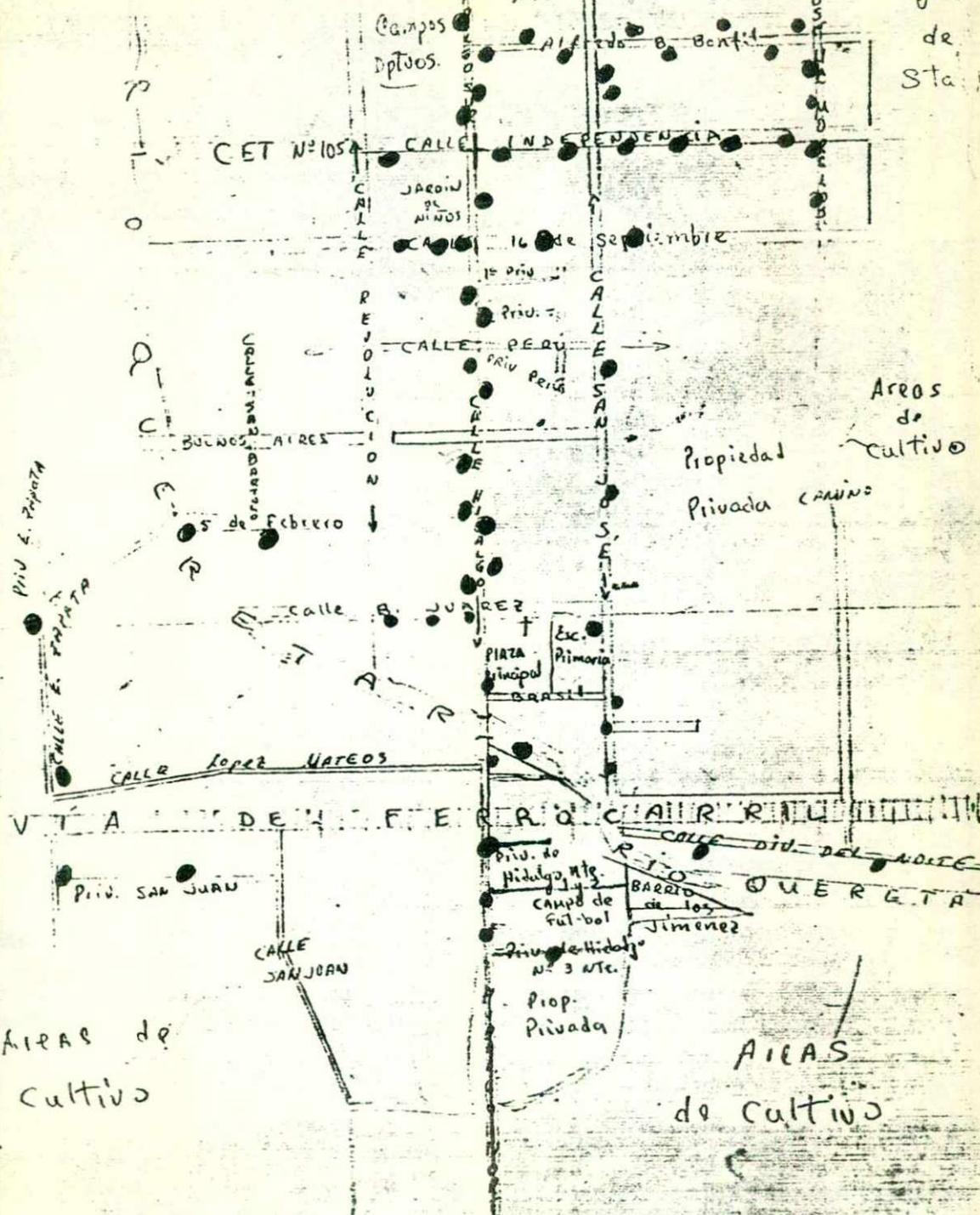
Nuestro estudio tiene como finalidad conocer la relación existente entre la contaminación del agua de consumo y la incidencia de las enfermedades gastrointestinales, por lo que se debería de tomar más en cuenta el dato anteriormente mencionado. Los Doctores asesores fueron: Dr: Luis Cifres y Dr German Mora.

En base a lo anteriormente expuesto, se decidió que de las 70 familias a estudiar, solo se tomarían a los niños de 0 a 5 años que tuviera cada familia y revisando los censos se encontró que dentro de cada familia, ó por lo menos en la mayoría, solo había un niño de 0 a 5 años, por tal motivo solo se muestrearán 70 niños, en total como muestra representativa, el muestreo se llevará a cabo de la siguiente manera:

Se muestreará a 10 niños diariamente durante una semana y se va a reencuestar sobre la alimentación del niño, también se tomarán muestras del agua de consumo en diferentes recipientes y muestras de los alimentos, así como de las personas que se encuentran más en contacto con el niño, también se pedirá una muestra de materia fecal.

Se va a trabajar una serie de muestra, pero yo solo reportaré las del agua de consumo.

Mapa de Sta. María Magdalena



Gjid
de
Sta

Areas
de
cultivo

AREAS
de cultivo

AREAS de
cultivo

Diseño de la muestra.

Método de muestreo: Se tomará en cuenta - casa habitación de la población de Santa María Magdalena, en - donde existan niños menores de 5 años, los cuales están debidamente localizados a través del censo Poblacional realizado específicamente para éste trabajo en los meses de Febrero- Abril - de 1985.

El censo indica que existen 847 niños me- nores de 5 años, en los que el 90 % presentaba en el momento - de la realización de éste, Gastroenterítis, ya fuese aguda ó - crónica y de larga evolución.

Tamaño de la muestra: Considerando lo antes mencionado y de acuerdo a la frecuencia del evento y a las - características tan especiales de la población; una muestra representativa sería el 10% del total de los niños menores de 5- años. Tendremos entonces que aplicando la normal a la binominal resultará:

$$P(100) - P(100) = 5$$

$$1.96 = \frac{1}{100 \cdot PQ/n} \text{ despejando } n$$

$$(1.96)(100) = \frac{1}{PQ/n}$$

$$\frac{(196)^2}{5} = \frac{1}{PQ/n}$$

$$\frac{(-196)}{5} = PQ \frac{1}{n}$$

$$\frac{(196)^2}{5} PQ = n$$

$$n = \frac{(196)^2}{5} PQ$$

$$n = \left(\frac{196}{5}\right)^2 (.90) \quad n = 137.88$$

En donde 1.96 es el valor de la discrepancia que pensamos encontrar.

P.- Es la proporción de las características a estudiar.

Fórmula Z = $\frac{P - \pi}{\sqrt{\frac{\pi(1-\pi)}{n}}}$

$$\sqrt{\frac{\pi(1-\pi)}{n}}$$

para una certeza del 95%.

para una discrepancia de $\pm 5\%$ entre

la población y la muestra tenemos: $100p - 100\pi = 5$

Sustituyendo : $1.96 = \frac{(100p - 100\pi)}{100 \sqrt{\frac{\pi(1-\pi)}{n}}}$

$$100 \sqrt{\frac{\pi(1-\pi)}{n}}$$

$$1.96 = \frac{5}{100 \sqrt{\frac{\pi(1-\pi)}{n}}}$$



$$1.96 = \frac{5}{\sqrt{\frac{\pi(1-\pi)}{n}}}$$

$$\left(\frac{196}{5}\right)^2 = \frac{n}{\pi(1-\pi)} \longrightarrow \left(\frac{196}{5}\right)^2 = \frac{n}{\pi(1-\pi)}$$

$$\left(\frac{196}{5}\right)^2 \pi(1-\pi) = n$$

Si realmente la población tiene una incidencia de diarrea de \pm el 90% entonces: $\pi = (0.9)$ y $1-\pi = (0.1)$ luego

$$\pi(1-\pi) = (0.9)(0.1) = 0.09 \text{ por lo tanto:}$$

$$\left(\frac{196}{5}\right)^2 0.09 = n, \quad (39)^2 (0.09) = 138.$$

Realizamos el tamaño de la muestra por dos fórmulas, una vez -
obtenido el resultado procederemos a la selección de éstos niños -
por medio del método aleatorio simple.

Capitulo. III.

Resultados y Discusiones.

RESULTADOS.

Como se mencionó en la parte de la justificación, el estudio iniciado pretendía conocer el grado de contaminación que tenía ó que tiene el agua de consumo de los pobladores del ejido de Santa María Magdalena, por las características que ya conocemos(que se encuentra circundada por el canal del arenal, que llega agua de desechos industriales y contaminantes biológicos), (heces fecales principalmente), ahora después de haber muestreado cerca de 40 a 65 familias hemos obtenido datos muy importantes, pues se comprobó que la población recibe através de la tubería (red de distribución del agua potable), un agua que según los resultados practicados a ella, su estado bacteriológico es bastante aceptable, ya que la cantidad de microorganismos presentes es mínima, lo que viene a comprobar nuestra hipótesis de que donde el agua se contamina es en los recipientes donde se almacena, ya sea ollas, tambos, cubetas, ó tinacos y por otro lado la parte de la

población que no tiene agua entubada ó que no les llega a pesar de tener tubería, la toman de alguna pipas que surten de éste líquido a la población, en éste caso también hay peligro de una mayor posibilidad de contaminación y aunando que se encuentran junto el Canal del Arenal, que es demasiado insalubre ya que en lugar de llevar agua tal parece que arrastrara solamente materia fecal.

Las muestras que se tomarón en la comunidad fueron procesadas por dos técnicas , la primera fúe por el Método del NMP (numero más probable), y la segunda fué el SPC(recuento total de bacterias), en la parte del NMP, se corrió con sus tres partes para mayor control,(la prueba presuntiva, confirmatoria y complementaria), y finalmente a todas las pruebas positivas se les realizó la tinción de Gram.

Lo anterior sobre la contaminación del agua, se comprobó mediante el análisis de ésta con las pruebas antes mencionadas, por ejem, de una misma casa se tomaron varias

TABLE II-C-4

Most Probable Number Index and 95% Confidence Limits for Five Tubes, Three Dilution Series (8, 9)

No. of Tubes Giving Positive Reaction out of			MPN Index per 100 ml	95% Confidence Limits		No. of Tubes Giving Positive Reaction out of			MPN Index per 100 ml	95% Confidence Limits	
5 of 10 ml Each	5 of 1 ml Each	5 of 0.1 ml Each		Lower	Upper	5 of 10 ml Each	5 of 1 ml Each	5 of 0.1 ml Each		Lower	Upper
0	0	0	<2			4	2	1	26	9	78
0	0	1	<0.5	7		4	3	0	27	9	80
0	1	0	<0.5	7		4	3	1	33	11	93
0	2	0	<0.5	11		4	4	0	34	12	93
1	0	0	<0.5	7		5	0	0	23	7	70
1	1	0	<0.5	11		5	0	1	31	11	89
1	1	0	<0.5	11		5	0	2	43	15	110
1	1	1	<0.5	15		5	1	0	33	11	93
1	2	0	<0.5	15		5	1	1	46	16	120
2	0	0	<0.5	13		5	1	2	63	21	150
2	0	1	1	17		5	2	0	49	17	130
2	1	0	1	17		5	2	1	70	23	170
2	1	1	2	21		5	2	2	84	28	220
2	2	0	2	21		5	3	0	79	25	190
2	3	0	3	28		5	3	1	110	31	250
3	0	0	1	10		5	3	2	140	37	340
3	0	1	2	25		5	3	3	180	44	500
3	1	0	2	25		5	4	0	130	35	300
3	1	1	4	34		5	4	1	170	43	490
3	2	0	4	34		5	4	2	220	57	700
3	2	1	5	46		5	4	3	280	90	850
3	3	0	17	5	46	5	4	4	350	120	1,000
4	0	0	13	3	31	5	5	0	240	68	750
4	0	1	17	5	46	5	5	1	350	120	1,000
4	1	0	17	5	46	5	5	2	340	100	1,300
4	1	1	21	7	63	5	5	3	920	300	3,200
4	1	2	26	9	78	5	5	4	1600	640	5,800
4	2	0	22	7	67	5	5	5	> 2400		

TABLE II-C-5

Most Probable Number Index and 95% Confidence Limits for Testing Potable Waters

Number of Positive Tubes from five 10 ml Portions	MPN Index/100 ml	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
0	< 2.2	0	6.0
1	2.2	0.1	12.6
2	5.1	0.5	19.2
3	9.2	1.6	29.4
4	16	3.3	52.9
5	> 16	8.0	Infinite

TABLE II-C-3
Acceptable Limits*

Parameters	Lower	Upper	Remarks
Total coliform bacteria	20 (0 for potable waters)	80	Limit, 200 colonies of all types
Fecal coliform bacteria	20	60	
Fecal streptococci	20	100	

* Colony counts < or > the limits cited above must be identified as outside of this range.

TABLE II-C-6

Selection of Coded Results, Five Tube Series

Test	10	Positive		Tubes/ml			Sample Volume		Code
		1.0	0.1	0.01	0.001	0.0001			
1	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>0</u>	0	0	0		5-3-0	
2	5	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	0	0		5-4-0	
3		<u>4</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	0	0		4-1-0	
4	5	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>1</u>	1	0		5-4-2	
5	4	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>0</u>	0			5-3-0	
6		5	5	<u>5</u>	<u>5</u>	<u>5</u>		5-5-5	
7		<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	0	0		0-0-0	
8		<u>4</u>	<u>0</u>	<u>2</u>	0	0		4-0-2	
9		<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	0	0		0-1-0	

*Underlines indicate positive tube series selected for code.

muestras, una de la llave directamente, otra de donde la
almacenan (ollas con tapadera), y una tercera del agua de
garrafón(que es la que compran generalmente), las tres
muestras dieron un número muy diferente de bacterias, en
el recuento total, siendo la más contaminada la muestra
que se tomó del recipiente donde es almacenada, en segundo-
lugar la de la red de distribución y por último la del agua
de garrafón, con ésto se verificó que donde se lleva a ca-
bo la contaminación es el lugar donde se almacena, por fal-
ta de aseo y en algunas ocasiones por dejar destapados los
recipientes, siendo contaminados también por las moscas.

Como se mencionó anteriormente hay un sector de la po-
blación que carece de agua potable desde hace más de un
año y en una de las casas donde muestreamos, nos menciona-
ron que tanto el drenaje, como una de las granjas porcíco-
las que hay en el ejido vierten sus desechos a un caño y -

que en algunas ocasiones cuando abren la llave el agua sale demasiado sucia, probablemente la red de distribución tiene una infiltración hacia los desagües, por lo que se está contaminando el agua de consumo, tal vez se escuche raro y se puede pensar que esto no es posible, que en la actualidad y a 5 minutos de una capital Estado suceda esto, es decir que existan personas que ingieren agua en tales condiciones de insalubridad, pero en el ejido nos confirmaron lo anterior.

En la metodología se mencionaron cuatro técnicas para procesar las muestras de agua, pero solo pudimos montar dos de ellas (NMP y SPC), debido a la carencia tanto de material, como de medios de cultivo y como solo se consiguieron 4 de los que se utilizan en las técnicas más importantes para el control bacteriológico del agua, solamente se realizaron esas dos.

El estudio se ha modificado un poco, debido a que ya se conoce mejor a la población , así como sus problemas en lo que se refiere a la calidad del agua, por lo que se ha optado por girar un poco el estudio de Investigación hacia lo que es la gastroenteritis en los menores de 5 años, causada por la contaminación del agua de consumo, de acuerdo a los métodos estadísticos, se numeraron las familias y se extrajeron los números en forma aleatoria.

Aunque ha variado el estudio ya que se está tratando de que salga lo mejor posible, el protocolo inicial ha cambiado debido a las revisiones de que ha sido objeto por nuestros asesores, así como la experiencia que ha ido adquiriendo el grupo, gracias a los cursos que se han llevado, por ejem, Epidemiología y Estadística, es-

tas son las causas fundamentales por las que ha variado un poco el estudio desde su inicio hasta la fecha.

Al inicio del trabajo se contaba con algunos datos acerca del número aproximado de pobladores en el ejido y posteriormente se reforzó con el nuevo censo-encuesta, en base a esto y consultando algo de bibliografía, además de la asesoría de la experta en Estadística de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), Dra Silvia Hartman, se llegó a la conclusión de que la muestra se debía obtener tanto en la forma tradicional (por medio de la fórmula), como con la ayuda de un mapa de la población, en el que se divide el poblado en sectores, tomando en cuenta los puntos cardinales, distribuyendo lo más homogéneamente a la población a estudiar, de manera que los dos métodos nos dieran ó arrojaran resultados que fueran muy similares entre sí, el número resultante fue de 80 niños

aproximadamente, generalizando es un niño por familia (solamente tomé 60 muestras), tomando en esa forma las muestras - las familias a muestrear fueron las siguientes:

Nombre	domicilio.	muestra.
1.- Eustolia Pérez.	Brasil # 4	depósito.
2.- María Juárez Ramírez.	Brasil # 18.	cubeta.
3.- Juana Juárez	Brasil # 8.	olla con tapa.
4.- Ma. Luz García.	Brasil # 14.	bote con tapa.
5.- Fam . García Pérez.	Brasil # 28.	botellón y cu- beta.
6.- Belinda Sánchez Vargas.	Hidalgo # 15.	botellón y lla <u>ve</u> .
7.- Catalina Pérez	Hidalgo # 9 .	llave.
8.- Fam Hernández Rivera.	Hidalgo # 11.	tinaja y llave.
9.- Belén León Montero.	Juárez # 7.	llave y tinaja.
10.-Victoria Hernández.	Revolución #1	garrafón y cantaro.

11.- Escuela primaria.	zona centro.	manguera
12.-Ma del Carmen León	Júarez # 23.	(llave).
13.-Angélica Juárez.	Revolución # 14.	(llave).
14.- Ma. de jesús V.	" " # 51	(olla).
15.-Margarita Juárez.	Júarez # 3.	(tambo).
16.-Rosa Pérez León.	Revolución # 20.	(llave).
17.-Ma. Paula Vargas.	Privada Hidalgo # 1.	(tinaco).
18.-Josefina Dávila Hernández.	Hidalgo # 10.	(cubeta).
19.-Ma de la Cruz Luna.	Hidalgo # 23.	(botellón).
20.-Ma de la luz Castillo.	Revolución # 34.	(llave).
21.-Ma de la luz García.	Hidalgo # 29.	(manguera)
22.-Celia D' León .	Júarez # 23.	(olla).
23.- Filiberto Jiménez.	Hidalgo # 43.	(tambo).
24.- Arturo García Luna.	16 de Sep. # 2.	(cubeta).
25.- Juan Pérez González.	Alfredo Bonfil # 53.	(olla).
26.- Luis Fernando G.	San José S/N.	(llave).

27.- Elizabeth Sánchez .	San José # 15.	olla.
28.- Lucia Rojas.	Independencia # 19.	cubeta.
29.- Felipe Pérez.	" " # 20.	tambo.
30.- Fidel D' León.	" " # 32.	llave.
31.- Sofia Farfan.	Privada de San Juan # 2.	llave.
32.- José González.	Hidalgo # 1.	cubeta.
33.- Francisco Pérez. P.	Júarez # 27 A.	llave.
34.- Alfredo García.	Alfredo Bonfil #41	olla.
35.- Beatriz Hernández.	Revolución # 25.	tambo.
36.- Patricia Almanza.	Revolución # 60.	tambo.
37.- Yolanda López.	San Juan # 2.	llave.
38.- Gilberto Juárez.	5 de Febrero # 32.	llave.
39.- Esperanza López D' León.	Hidalgo # 4.	llave.
40.- Ma. de Lourdes Trejo.	Hidalgo # 50.	tinaco.
41.- Angélica D' León Verdez.	Hidalgo # 56.	olla.
42.- Josefina Arrollo.	Hidalgo # 61.	olla.

43.- Angélica Luna.	Alfredo Bonfil # 35.	tinaco.
44.- Estela García.	16 de Septiembre # 29.	llave.
45.- Margarita D' Santiago.	Priv. Revolución #14.	llave.
46.- Francisco Sánchez.	Francisco Villa # 1.	llave.
47.- Victor González D' León.	Emiliano Zapata # 2.	garrafón.
48.- Esther D'Santiago.	San José # 3.	garrafón.
49.- Carmela Cortéz.	Priv San José. # 9.	garrafón.
50.- Carmen Glez Jiménez.	Independencia S/N .	olla.
51.- Esperanza Estrada.	Morelos S/N.	tinaco.
52.- Consolación Balderas.	Alfredo Bonfil # 59.	cubeta.
53.-Rosa. Fernández.	Hidalgo # 17.	cubeta.
54.- Rebeca Rios.	Hidalgo # 19.	tambo.
55.- Clementina Cruz.	" " # 8.	tambo.
56.- Concepción Vargas.	" " #9.	cubeta.
57.- Lourdes Patiño.	" " # 11.	llave.
58.- Fermín Ortiz.	" " # 13.	olla.
59.- Oscar Galindo.	" " # 17.	Olla
60.- Pedro Resendiz.	" " # 4.	llave/

Resultado de las muestras que se analizaron por el método del recuento total de bacterias (SPC), en todas las muestras se utilizó el método del Pour Plate ó vaciado en caja - y se sembró 1 ml de muestra con dos diluciones, 1:10 y 1:100.

Se utilizó el agar para métodos Estándar.(SPC).

Las pruebas se realizaron a un total de 60 muestras de agua de consumo, las muestras fueron tomadas de la red de distribución, las cubetas donde la almacenan y del garrafón de agua purificada. A cada una de las muestras se le hicieron tres diluciones: a b y c.

Clave:

a = Dilución Directa.

b = Dilución 1:10.

c = Dilución 1:100

No de muestra.	<u>a</u> col/ml.	<u>b</u> col/ml.	<u>c</u> col/ml.
1.-	100 " "	30 " "	-----
2.-	Incontables "	285 " "	40 " "
3.-	500 " "	330 " "	320 " "
4.-	200 " "	190 " "	100 " "
5.-	20 " "	10 " "	-----
6.-	Más de 300 " "	295 " "	200 " "
7.-	200 " "	136 " "	80 " "
8.-	30 " "	-----	-----
9.-	300 " "	200 " "	180 " "
10.-	Más de 300 " "	295 " "	200 " "
11.-	" " 300 " "	310 " "	280 " "
12.-	Incontables " "	300 " "	298 " "
13.-	200 " "	180 " "	150 " "
14.-	300 " "	280 " "	200 " "

No de muestra.	<u>a</u> col/ml.	<u>b</u> col/ ml.	<u>c</u> col/ml.
15.-	190 " "	100 " "	98 " "
16.-	Incontables" "	300 " "	260 " "
17.-	195 " "	100 " "	80 " "
18.-	190 " "	100 " "	25 " "
19.-	20 " "	12 " "	9 " "
20.-	Incontables " "	300 " "	280 " "
21.-	" " " "	300 " "	260 " "
22.-	260 " "	120 " "	66 " "
23.-	-----	-----	-----
24.-	-----	-----	-----
25.-	280 " "	230 " "	200 " "
26.-	Incontables " "	300 " "	200 " "
27.-	60 " "	23 " "	20 " "
28.-	277 " "	200 " "	100 " "
29.-	-----	-----	-----
30.-	60 " "	55 " "	40 " "
31.-	23 " "	20 " "	15 " "
32.-	180 " "	100 " "	95 " "
33.-	Incontables " "	300 " "	180 " "
34.-	300 " "	295 " "	200 " "

Nº de muestra.	<u>a</u> col/ml.	<u>b</u> col/ml.	<u>c</u> col/ml.
35.-	125 " "	100 " "	100 " "
36.-	120 " "	100 " "	80 " "
37.-	50 " "	30 " "	10 " "
38.-	250 " "	200 " "	180 " "
39.-	280 " "	190 " "	100 " "
40.-	300 " "	250 " "	160 " "
41.-	Incontables " "	300 " "	290 " "
42.-	280 " "	190 " "	190 " "
43.-	Incontables " "	290 " "	200 " "
44.-	300 " "	250 " "	200 " "
45.-	20 " "	18 " "	10 " "
46.-	50 " "	40 " "	25 " "
47.-	100 " "	90 " "	80 " "
48.-	150 " "	100 " "	80 " "
49.-	-----	-----	-----
50.-	-----	-----	-----
51.-	-----	-----	-----
52.-	10 " "	5 " "	-----
53.-	100 " "	80 " "	30 " "
54.-	100 " "	60 " "	20 " "

No de muestra.	<u>a</u> col/ml.	<u>b</u> col/ml.	<u>c</u> col/ml.
55.-	150 " "	100 " "	80 " "
56.-	200 " "	180 " "	100 " "
57.-	-----	-----	-----
58.-	270 " "	200 " "	196 " "
59.-	300 " "	280 " "	200 " "
60.- Incontables	" "	300 " "	295 " "

Resultados realizados a las 60 muestras de agua de consumo de la comunidad de Santa María Magdalena, el método utilizado fue el de el(N.M.P.) Número Más Probable.

PRUEBA PRESUNTIVA.

En tubos de fermentación en Caldo Lauril Sulfato.

Claves utilizadas:

a = Dilución directa.

b = Dilución 1:10.

c = Dilución 1:100.

& = Producción de gas. # = Turbidéz. + = ligera,

+ + = media, + + + = abundante, + + + + = máxima.

No de la muestra.	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>
1.-	& + + y #	& +	negativo (-).
2.-	& + +	& +	&
3.-	& + + +	& + +	# +
4.-	& + +	& +	#
5.-	&	#	#
6.-	& + +	& +	&
7.-	& + +	& +	&
8.-	&	&	#
9.-	& + +	& + +	& + +
10.-	& +	#	negativo (-).

No de la muestra.	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>
11.-	& +	&	&
12.-	&	#	&
13.-	& + +	#	#
14.-	& + + +	& + +	& +
15.-	#	&	negativo.(-)
16.-	negativo.	negativo.	negativo.(-)
17.-	#	&	negativo.(-)
18.-	negativo.	negativo.	negativo.(-)
19.-	#	negativo.	negativo.(-)
20.-	negativo.	negativo.	negativo.(-)
21.-	#	&	negativo.(-)
22.-	negativo.	negativo.	negativo.(-)
23.-	negativo.	negativo.	negativo.(-)
24.-	#	negativo.	cambio de color.
25.-	#	negativo.	negativo.(-)
26.-	negativo.	negativo.	negativo.(-)
27.-	negativo.	negativo.	negativo.(-)
28.-	negativo.	negativo.	negativo.(-)
29.-	&	& j $\frac{1}{2}$	&
30.-	$\frac{1}{2}$	& +	&

No de la muestra.	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>
31.-	#	&	negativo. (-)
32.-	# +		negativo. (-)
33.-	negativo.	negativo.	negativo. (-)
34.-	& + +	& +	&
35.-	& + +	& +	&
36.-	& +	&	&
37.-	#	#	#
38.-	# +	# +	#
39.-	# + +	#	#
40.-	&	& y # + +	# +
41.-	& y # + +	# +	#
42.-	& y # + + +	# + +	# +
43.-	& y # + + +	# + +	# +
44.-	negativo.	negativo.	negativo.
45.-	negativa.	negativa.	negativo.
46.-	&	#	negativo. (-)
47.-	&	#	#
48.-	& +	&	&
49.-	negativo.	negativo.	negativo. (-)
50.-	&	#	#

No de la muestra.	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>
51.-	negativo.	negativo.	negativo.
52.-	negativo.	negativo.	negativo.
53.-	&	#	#
54.-	& +	#	#
55.-	& + +	& +	&
56.-	& + +	& +	&
57.-	negativo.	negativo.	negativo.
58.-	& +	&	&
59.-	& + +	& +	&
60.-	& + +	& +	&

Número Más Probable

PRUEBA CONFIRMATORIA

En tubos de fermentación en Caldo bilis verde brillante.

3.-	-----	2 + + + +	& +
4.-	-----	cambio de color.	-----
5.-	-----	cambio de color.	-----
7.-	-----	# +	-----
15.-	-----	cambio de color.	-----
17.-	-----	2 +	-----
19.-	-----	&	-----

No de la muestra.	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>
20.-	#		
24.-	#		&
25.-	#		.
26.-	& +		
36.-		#	
37.-			cambio de color.
39.-			#
45.-		&	
53.-	#		
54.-	#		
60.-		&	

Prueba: MUNERO MAS PROBABLE.

Resiembra de los tubos de BBGL (bilis verde brillante lactosado) a cajas de agar con Eosina Azul de Metileno - (EMB) y y tubos con agar inclinado(agar nutritivo), para verificar el crecimiento de los microorganismos Gram negativos mediante la tinción de Gram, que se realiza posteriormente al período de incubación y crecimiento.

De los tubos que presentaban crecimiento, se sembraron en los medios anteriormente mencionados y casi en la mayoría de las cajas se observó desarrollo de colonias puras, es decir se puede decir que solo son colonias de coliformes libres de contaminación de otros microorganismos, ya que en el tubo de agar nutritivo solo crecieron un solo tipo de colonias, blanquesinas y que al realizar el frotis y la tinción de Gram, se observaron solamente microorganismos -

Gram negativos.

Las colonias que crecieron en el medio de EMB, tenían el característico brillo metálico que presenta las bacterias coliformes en el medio de EMB.

No se realizaron pruebas Bioquímicas, para identificar con exactitud el tipo de microorganismos, debido a los costos que ocasionan por los medios de cultivo, siendo éste uno de nuestros principales inconvenientes.

Desde el capítulo de la Introducción, se viene mencionando que el agua es un importante vector, en la transmisión de las enfermedades infecciosas de tipo entérico en comunidades tanto humanas como animales, por lo que la mayoría de los estudios sobre bacteriología se han dirigido principalmente hacia lo que es el aspecto sanitario del agua y como mencionamos anteriormente, el mejor criterio para establecer la calidad del agua, es conociendo el número y el tipo de bacterias que se encuentran en ella.

La flora bacteriana que se pudiera considerar autóctona del agua, no es bien conocida y esto es, en parte, debido a que muchos de los miembros que habitan en ella, crecen difícilmente en los medios de cultivo artificiales del laboratorio. Sin embargo, se puede mencionar brevemente, algunos de los microorganismos que se desarro -

llan en ella y son los siguientes grupos bacterianos:

1.- Bacterias superiores del orden de las Chlamidobacteriales, incluyendo bacterias del azufre, hierro y otras.

2.- Caulobacterias.

3.- Espirilos. Algunos tan grandes como de 20 a 30 micras de largo.

4.- Bacilos.

a.- Pigmentados, como *Serratia mercescens* y *Chromobacterium violaceum*,

b.- No pigmentados como: Bacterias fluorescentes-Pseudomonas fluorescens.

-Ciertas bacterias del azufre.

-Termófilas.

-Bacilos aerobios esporágenos.

5.- Cocos:

a.- Pigmentados, generalmente amarillos, muy frecuentemente *Sarcina lutea*.

b.- No pigmentados. -*Micrococcus aquatilis*, *M. candicans* y otros.

6.- Bacterias fijadoras del nitrógeno- *Azotobacter aquatilis*.

7.- Bacterias nitrificantes, -*Nitrosomonas* y nitrobacterias.

Si se pudiera aislar con facilidad las cepas bacterianas consideradas como patógenas, a partir del agua no sería necesario las no patógenas, para determinar la calidad bacteriana y mejor dicho la calidad sanitarias del agua. Sin embargo no es el caso, y las especies patógenas son oscurecidas por un mayor número de bacterias saprófitas que las acompañan. Y sumando a ésta el hecho

de que muchas de las especies patógenas tienen requerimientos especiales para su cultivo, por lo que es necesario emplear técnicas laboriosas para su aislamiento.

Es lógico pensar que el agua que está contaminada con materia fecal, puede contener también bacterias que sean productoras de enfermedades entéricas. Esta hipótesis se convierte en un hecho comprobado, en el caso de que las aguas negras, en donde se vierten los residuos fecales de toda la comunidad, que además de individuos contaminados con éstos gérmenes, existen portadores sanos que prácticamente siembran éstas aguas con microorganismos enteropatógenos.

Con fines prácticos, el hallazgo de indicadores de contaminación fecal del agua, significa que tal muestra representa un peligro para la salud, y por tal motivo, el análisis bacteriológico del agua, está encaminado hacia la búsqueda de éstos indicadores de contaminación fecal.

Los mejores indicadores desde el punto de vista bacteriológico, lo constituyen los miembros de la flora normal bacteriana del intestino, que son excretados con las heces, que permanecen viables por ciertos períodos de tiempo: por ejemplo, Coliformes, enterococos (*Streptococcus faecalis*) y *Clostridium perfringes*. Cualquiera de éstos tres grupos de microorganismos permanecen viables por más tiempo, por ejemplo *Salmonella typhi* agente causal de la fiebre tifoidea en el hombre.

La técnica usual para el análisis bacteriológico de la calidad sanitaria del agua, utilizada como indicador de la contaminación fecal, el grupo de coliformes, por varias razones.

- 1.- En primer lugar, su número es mayor en las aguas contaminadas que el de los otros dos grupos.
- 2.- Su viabilidad en el agua es suficiente para determinar contaminaciones fecales, más ó menos recientes.
- 3.- Su aislamiento y cultivo es bastante fácil.

Los enterococos son menos abundantes y su cultivo es -
más difícil. Cl. perfringes, siendo un germen esporulado, no
permite especificar si la contaminación fecal es reciente -
o no; en caso de serlo, las especies patógenas ya han muer-
to si es que se encontraban presentes. Además es un germen-
que se encuentra en menor número que las coliformes.

El grupo coliformes lo constituyen miembros de la fa -
milia Enterobacteriaceae, que utiliza la lactosa, con forma-
ción de gas.

En aguas contaminadas con heces, E. coli y Enterobacter
aerógenes y cloacas, que son los coliformes responsables de -
las pruebas positivas.

Además de las pruebas cualitativas para buscar colifor -
mes es conveniente hacer una prueba cuantitativa para deter -
minar el número total de bacterias de todos tipos que se -
encuentren por unidad de volumen. Este tipo de determinación
es aproximada, ya que como vimos anteriormente, algunas es-

pecies bacterianas autoctonas del agua, no crecen en los -
medios convencionales del laboratorio.

La legislación vigente en materia de salubridad y dis -
posiciones conexas de la Secretaría de Salubridad y Asis -
tencia, establece, que para que un agua sea considerada po -
table, desde el punto de vista bacteriológico, es necesa -
rio que reúna las siguientes características:

- 1.- No debe de contener más de 20 coliformes/Lt.
- 2.- En la prueba cuantitativa, el resultado no debe ser ma -
yor de 200 colonias/mililitro de muestra.
- 3.- Debe estar libre de gérmenes que licuen la gelatina, -
que produzcan pigmento (cromógenos), ó que despidan mal -
olor.

En base a la falta de material para realizar todas - las técnicas del control bacteriológico del agua, y ya que solo se consiguieron algunos medios de cultivo, la calidad bacteriológica del agua que se estuvo procesando, se verificó solamente por el Recuento de Coliformes Totales y por el Número Más Probable, pero se considera que con éstas dos pruebas ya se tiene una pequeña idea de la calidad del agua de la comunidad que se estudió.

Aunque se tiene en proyecto que más adelante cuando se tenga un poco más de recursos tanto económicos como técnicos, se montarán las cuatro técnicas y se volverá a realizar el estudio, en diferente época del año, para ver las variaciones que hay.

DISUSION.

Para llevar a cabo la elaboración de éste trabajo se pasó por muchísimos obstáculos y todo esto debido a que en nuestro Estado(Querétaro) y en egenral en todo nuestro país (México), los estudiantes que egresan de cualquier licenciatura, ó de cualquier área, Ingeniería, Ciencias Biológicas, Leyes, Arquitectura, etc, no tenemos la más mínima idea de lo que es la investigación, ó por lo menos tener un poco de conocimiento de lo que es el "Metodo Científico", ya que éste no tiene aplicación en las escuelas a nivel Bachillerato, y si es que se lleva al alumno no le queda bien claro la idea del Método ó la forma en la cual se aplica y creo que ésta es una parte del estudiante que está dormida y no ha sido explotada debido a la falta de actividad científica, ya que todos los

estudiantes tenemos éste tipo de inquietudes y sobre todo -
los que nos hemos inclinado por carreras que se encuentran-
relacionadas con el área de la salud, como siempre nos en -
contramos con preguntas como: ¿ Cuales son las causas del -
aumento en las tasas de mortalidad infantil en ésta ciudad,
por enfermedades de tipo intestinal producidas por entero -
bacteriaceas, que son tan frecuentes en nuestra región y -
aunado a ésto tenemos que nuestro Estado ha crecido y ocu-
pa los primeros lugares en muchas afecciones como son: la -
amibiasis, desnutrición, cancer cervicouterino, malformaciones -
congénitas (toda ésta información la hemos adquirido por -
pláticas con Médicos de la región), y éstas son solo algu -
nas de las enfermedades de las que podemos hablar y creemos
que son muy importantes para la salud en general de nuestra
población y a pesar de ésto no nos hemos ocupado por recopi

lar datos a nivel regional, para tratar de conocer que tan cierta es ésta información y de ésta manera tratar de buscar una solución al alcance de nuestros recursos.

Por que aunque es muy importante conocer la problemática de salud a nivel mundial, por ejem, de la amibiasis, lo que se debería hacer, supongo, es revisar los archivos de las Instituciones y conocer los casos que se han dado aquí en Querétaro, para poder inciar la Investigación en el Estado, ya que aunque la desnutrición que padecen los niños Queretanos y la que padecen los niños del Africa, tiene las mismas consecuencias y desenlaces, las causas no son las mismas, es decir, influyen factores diferentes, por ejem, clima, las condiciones sociales, el nivel educativo de los padres, el tipo de alimentación, la flora y la fauna, etc y si los factores son diferentes no es posible-

atacar el problema en la misma forma, por lo que creo que--
es de mucha importancia iniciar las Investigaciones a nivel
regional y en ésta forma contar con datos reales de nuestra
población y de ésta manera poder trabajar en elaborar pla-
nes para dar algunas soluciones a nuestra gente y sobre to-
do que sena ideas que se puedan llevar a cabo en base a los
recursos humanos, económicos y tegnológicos que existen en-
nuestro país y no estar buscando tecnologia sofisticada y -
soluciones que se basan en problemas que tienen diferentes-
causas a la nuestra.

Cuando se inició éste trabajo, desconociendo por com-
pleto lo que se refiere a el área de Investigación, empecé-
por informarme y leer un poco a cerca de lo que es "Método -
Científico", así como relacionar con personas dedicadas a la
Investigación(los expertos de la Organización Panamericana-

de la Salud, Organización Mundial de la Salud, asesores de la UNAM, Investigadores del Instituto de Enfermedades tropicales, etc por mencionar algunos de ellos), para conocer un poco más el campo en el cual me iniciaba, y ahora después - de casi dos años de estar en el Proyecto de Investigación - dentro de la Escuela de Medicina, he tenido la oportunidad de relacionarme con las personas que están haciendo Investigaciones a nivel Internacional, algunos de ellos son: Dr: - Italo Barragán, Dr: Luis Cabrera Coello, Dr: Ezequiel Paz, - todos ellos Epidemiólogos, Dra: Silvia Hartman Estadística - Dr: Cifres y Dr: German Mora Expertos en enfermedades Tropicales, Del Instituto de Enfermedades Respiratorias Dr: Daniel López Acuña Epidemiólogo, Dra: Cristina Cortina de Nava, en el área de Laboratorios; Dra Gisela Humbolt, Dr: Romilio Espejo, (UNAM), Dra: Monike Mitastein coordinadora de

la organización de Programas de Postgrado en la Universidad del Estado de México y éstos son solo algunos de los Investigadores con los que hemos tenido relación, el grupo de Investigación que se está formando aquí en la Escuela de Medicina de la UAQ , ya que es muy cierto ese dicho de que "para hacer Ciencia hay que rodearse de ella", además de los profesores arriba mencionados, son algunos más los Investigadores que nos han asesorado y revisado nuestros protocolos, - entre los que destacan, la Dra Silvia Vega Gleason, que se ha convertido en nuestra asesora permanente por parte de la UNAM, también nuestro grupo de Investigación ha asistido a cursos de Epidemiología, Estadística, conferencias sobre - contaminación del agua y contaminación ambiental, que nos han proporcionado la información mínima para seguir por el camino de la Investigación Regional, claro que ésta en -

nuestro país está en pañales, pero ya se tiene mucha relación con las personas expertas en ésta área y que realizan Investigación a nivel Mundial, lo que sucede es que en la mayoría de los casos carecemos de la información necesaria para encontrar los caminos que nos relacionen con los expertos, pero como en la actualidad se está dando mucha importancia en lo que se refiere a la Investigación en área de la salud, se está trabajando ya para contar con datos en todo el país y de ésta manera tener una base que nos pueda ayudar a crear una infraestructura, para que sobre ella se levanten los pilares de la Investigación Nacional en Ciencias de la salud. Ahora bien, ya se tiene el camino para relacionarse con Investigadores que tienen más tiempo dedicados a éste campo, lo único que nos falta es hacer más grande y más fuerte ésta relación con éste tipo de

Instituciones y de personas y lograr algo importante en éste campo.

Por otro lado, a lo largo del tiempo que me ha llevado el elaborar éste trabajo, también he tenido la oportunidad de asesorar a varios grupos de la Escuela de Medicina Humana y de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en el área del laboratorio de cultivos, donde he podido aplicar los conocimientos que he adquirido en lo que se refiere al "Método Científico", ésto me ha permitido detectar y darme cuenta de algunas inquietudes en los estudiantes, en lo que se refiere a el área de Investigación, lo que sucede es que no los hemos sabido motivar adecuadamente.

Bueno al inicio de éste capítulo expresaba sobre las muchas dificultades que tuve que superar para realizar el presente trabajo y de verdad que fueron muchas, por que des-

de que inicié la revisión Bibliográfica, tuve problemas para encontrar información actual a cerca de artículos que hablaran sobre la contaminación del agua de consumo y del tipo de Investigación que se ha estado haciendo a nivel Nacional e Internacional, pero, ó no había, ó era demasiado atrasada. Necesitaba datos para poder adentrarme más en el problema, saber que tipo de muestras tenía que usar, las técnicas que se requerían, etc, de alguna manera también, saber con que información contaba a nivel regional.

Después de leer y traducir algunos artículos sobre el tema elaboré la introducción de mi trabajo, después interpreté el "Manual de técnicas Microbiológicas para control del agua de consumo humano y de desecho", ya que ahí fue donde encontré las técnicas que se han estandarizado (en el Centro de Investigaciones de Contaminación Ambiental, CEACA) así como en otros laboratorios Nacionales e Internacionales,

que son las mismas que se utilizan en lo que se refiere al control Microbiológico del agua y a la calidad de ésta.

Todo el proceso de la elaboración de la tesis ha sido un poco complicado, por los numerosos imprevistos que se han presentado, pero de las partes que se me han hecho más difíciles, ha sido el montaje de las técnicas, ya que no contaba, ni con el material más indispensable para trabajar (material de vidrio, agua destilada, gas, medios de cultivo y la obtención de la muestra), además se tuvo que sensibilizar a la población que se iba a muestrear, para que nos permitiera entrar a sus domicilios a tomar las muestras del agua (60 muestras aproximadamente), para ello se tuvo que conseguir una gran cantidad de frascos y someterlos a esterilización, para poder realizar un muestreo adecuado, ó por lo menos lo más cercano a ello, otro de los problemas a los que nos enfrentamos, fue el que no tenía

mos forma de transportanos para traer las muestras de la comunidad, pero ésto se solucionó mediante la solicitud a la Rectoría de la UAQ de una Combi, el que se nos proporcionó por varios días y además de tomar las muestras de agua, también pudimos realizar la encuesta y recolectar las muestras de heces fecales. En lo que se refiere a la encuesta, se realizó para conocer el estado nutricional de los niños, su nivel socioeconómico, el grado cultural de los padres, otras de las preguntas que realizamos en la encuesta, tenían como finalidad conocer, si el niño había padecido en las últimas dos semanas diarrea y cuales eran las características de ésta, color, aspecto, cantidad, frecuencia de las evacuaciones, también se cuestionaba de que si algún otro miembro de la familia había ó ha padecido diarrea frecuentemente.

El tipo de alimentos que consumía y la frecuencia con-

la que consumían determinado alimento, por ejem, huevo, leche, carne, fruta, verdura, cereal, pan, tortilla, refresco, etc. Otras de las preguntas que se incluyeron, fueron las de que si tenían baño, fosa séptica ó defecaban al aire libre, en donde recolectaban el agua que ingerían, si tenían tinaco, aljibe, cubetas, tambos, etc, con el fin de que cuando tomáramos las muestras pudiéramos contar con más datos acerca de los niños que se iban a muestrear y en base a esos datos obtenidos tratar de relacionarlos entre la gastroenteritis y el consumo de alimentos contaminados, ó con el agua de consumo de éste ejido.

Otro de los obstáculos que se nos presentaron, fue el de tener un lugar adecuado para almacenar las muestras, desde su recolección hasta el momento de su proceso y sobre todo que éstas se conserven en buen estado.

También tuvimos que enfrentarnos a la carencia de per-

sonal adiestrado para el muestreo y la recolección de nuestro material (tanto de la muestra, como la aplicación de las encuestas), aunque fúe con un poco de trabajo se logró formar un pequeño grupo de 6 personas el cual lo integramos de las siguiente manera; tres laboratoristas de la Escuela de Medicina, un alumno de la Escuela, La Dra: Guadalupe Salazar Pérez y yo.

Para mantener las muestras en refrigeración acudimos a el Centro de Estudios Académicos y de Contaminación ambiental(CEACA), y a los laboratorios de la Escuela de Medicina de la Universidad Autonoma de Querétaro, donde se ha llevado a cabo la mayor parte del Trabajo. En el CEACA, tuvimos la asesoría de parte de la Q.B. Guadalupe Martínez, tanto en el montaje de las técnicas, como en el almacenamiento de las muestras.

Y después de haber sorteado toda ésta clase de penalidades y obstáculos, creo que por fin estoy llegando a la meta cumpliendo con los objetivos que me trace al iniciar el trabajo y más que nada aunque ha sido un poco tardado, la experiencia que he adquirido es maravillosa, ya que nunca pensé en dedicarme a la Investigación y ahora es uno de los campos donde me siento más realizada, que aunque fueron muchos los retos a vencer, me he relacionado con mucha gente valiosa y además he encontrado apoyo como por ejem, el QFB Jorge Carlos Hernández de Diego, La Dra: Guadalupe Salazar-Pérez , nuestra asesora de proyectos, Silvia Vega Gleason y con especial gratitud al Dr: Victor Manuel Calderón Calderón ex director de la Escuela de Medicina y al Dr. Carlos Alcocer Cuaron Actual director de la Escuela de Medicina, que son los maestros que más han colaborado y apoyado los planes de Investigación, así como también un especial reconocimiento al Licenciado Braulio Guerra Malo, actual Rector de la UAQ-

que ha colaborado grandemente en cuanto al apoyo a los programas de asesoría para la Investigación, que por ahora son trabajos sencillos y no de mucha complejidad, pero creo que al paso del tiempo van a ser un poco más grandes y más sólidos, en la medida que se avance en cuanto a los cursos y asesorías que se toman y de ésta manera alcanzar un nivel más alto tanto en material como en conocimientos.

Algo que quiero mencionar y que considero de las cosas más importantes que me han sucedido a lo largo de la elaboración del proyecto, es el beneficio que obtuvimos al muestrear en el poblado de Santa María Magdalena, ya que hemos tenido contacto directo con las personas afectadas y hemos podido observar vivamente las condiciones reales en las que se encuentra la comunidad a estudiar y en general la mayoría de nuestras comunidades y hablo en plural, por que así-

como se encuentra la comunidades que elejimos para trabajar, de la misma manera se encuentran muchas otras comunidades en lo que se refiere al estado socioeconómico, nutricional, educativo, condiciones de vivienda e higiene , etc, si no son iguales si muy parecidas a la nuestra, y aunque sea poca la información que se obtenga, ya es un abance muy grande al tener en nuestro archivo los datos recolectados de ésta población y así conocer en la medida posible el grado de contaminación, tanto de su agua de consumo, como de su población y posteriormente realizar un estudio comparativo, tomando como grupo testigo una población que tenga características similares a Santa María Magdalena, pero que no tenga acceso a ningún canal de contaminación como en éste caso es el Canal del Arenal, se ha pensado un poco en la población de Amazcala, pero ésto es a futuro.

Capitulo IV.

CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES.

Este es el último capítulo de mi trabajo y después de tanto tiempo de estarlo elaborando, se siente un poco de nostalgia y a la vez mucha alegría, por que por fin se llega a la meta trazada y se busca escalar un peldaño más en la vida profesional.

Después de volcar una serie de datos en éstas hojas y más que nada una serie de experiencias tanto negativas como positivas e independientemente de los resultados del trabajo, que si bien no fueron los que esperaba, ó por el contrario, que sea más de lo que suponía encontrar, de cualquier modo considero que los datos obtenidos a lo largo de éste proyecto van a tener una gran utilidad ya sea para proyectos futuros ó bien para continuación de éstos mismos ó de otros, por éstas razones creo que lo importante es que se siga con éste sistema de titulaciones, ya que si es

verdad que es tardado, pero también es una de las formas por las cuales se puede aplicar el "Método Científico" - y además se adquiere bastante experiencia y muchas relaciones, para poder utilizarlas posteriormente cuando ya nos dediquemos a ejercer nuestra carrera,

En lo que respecta a las conclusiones de mi trabajo- puedo decir que la relación entre las enfermedades gastrointestinales y el consumo de agua contaminada no es tan alta ya que los resultados que se obtuvieron a través del proceso de las muestras, nos confirman que sí está contaminada el agua, pero no a tal grado que sea justamente la causa de la alta incidencia de las enfermedades gastrointestinales en el ejido de Santa María Magdalena ya que existen otros factores contaminantes de más peligro y más frecuentes, como son: el contacto directo con-

el fecalismo al aire libre, la basura y la ingesta de alimentos contaminados con aguas negras, ó manipulados por personas que carecen de todo aseo personal(no se lavan las manos al manipular los alimentos),

Al principio del trabajo, se tenía otra idea muy diferente debido a que no se conocía a la población también como ahora y se pensaba que todos los habitantes consumían el agua del Canal del Arenal, de ahí que se suponía que la causa de la parasitosis, fuera el consumo del agua contaminada, pero ahora conocemos que un alto porcentaje de la población (60%), tiene agua entubada y que solo una pequeña parte de la población tiene acceso a las aguas de éste canal para utilizarlas como agua de consumo humano y como se realizaron varias visitas a la población se observaron más de cerca éstos factores que se mencionaron arriba, y que aunque nuestra hipótesis no haya sido cierta ya tenemos

más armas para poder atacar el problema en la forma más adecuada, además que todos los datos se quedan en un archivo, aquí en la Escuela de Medicina , para posteriormente poder utilizarlos, cuando, sea necesario, además que se puede seguir el mismo método para Investigar algunos problemas de parasitosis en poblaciones similares a nuestro modelo.

De acuerdo a las cifras que se tiene de los análisis del agua en el Ejido de Santa María Magdalena, aunque las cifras del recuento total no son muy altas , en la mayoría de las muestras, no se puede considerar de todos modos como agua de buena calidad, debido a que las que salen con mayor número de bacterias, son las muestras que se tomaron de los lugares donde se almacena el agua(ollas), y las muestras que nos proporcionaron de los garrafones en su mayoría nos muestran resultados negativos, quedando entre -

Éstas dos las muestras que dan un número medio y son las que se tomaron de algunas de las llaves de la red de distribución normal, por lo que no se puede considerar, ni que el agua sea potable, ni que esté tan contaminada como para que sea la causa de los problemas gastrointestinales de la población, que siguen siendo frecuentes, por que según la encuesta que se realizó hubo bastantes familias que presentaron cuadros de infección intestinal aguda en por lo menos uno de sus miembros.

I N D I C E.

	PAGS.
INTRODUCCION.....	1-8
Objetivo.....	9-11
Justificación.....	12-13
RECOLECCION DE LA MUESTRA.....	
Generalidades.....	14-20
Recepción de la muestra.....	21-24
Selección y limpieza de los frascos.....	24
Agentes de clorinación.....	25
Agentes quelantes.....	25
Envoltura de los frascos.....	26
Esterilización de frascos y bolsas.....	26
Muestreo de aguas clorinadas.....	27
Muestreo de superficies a mano.....	27
Muestreo de superficies a profundidad.....	28-29
METODOLOGIA.....	30
Parte III sección A.	
Estandar Plate Count.(Recuento Total de Bacterias)...	32-33.
Procedimiento.....	34-39.
Recuento de la colonias.....	40-47
Reporte de resultados.....	47-48

Sección B PARTE III.

Método para coliformes totales.....	49-52.
Método del Número Más Probable (NMP).....	53-56.
Procedimiento. Prueba Presuntiva.....	57-60.
Prueba confirmatoria.....	61-62.
Prueba complementaria.....	63-64.

Sección C parte III.

Método para coliformes fecales.....	69.
Definición del grupo de las coliformes fecales.....	70.
Método del NMP.....	70-71.
Procedimiento.....	71-72.
Cálculo.....	73.
Reporte de Resultados.....	74.

SECCION D .Parte III.

Generalidades.....	75.
Definición del Grupo del Estreptococo fecal.....	76-78
Estreptococo Viridians.....	80.
Aplicaciones.....	80-83.
Método del N.M.P.....	84
Aplicaciones.....	85.
Procedimiento.....	85-88.
Cálculos.....	88-89.
Método del Por Plate.....	90.
Aplicaciones.....	91.
Procedimiento.....	92-95.
Recuento y registro de las colonias.....	96-100

Determinación de coliformes fecales y <i>Streptococo fecal</i> en Ratios.....	101-103
Identificación de las especies del <i>Streptococo fecal</i>	104.
Aplicaciones.....	105.
Procedimiento.....	106-108
Separación del <i>Enterococo</i> del grupo Q.	
Confirmación del grupo <i>Enterococo</i> por Pruebas Bioquímicas.....	109-117.
Separación del <i>Enterococo</i> de su fuente original	118-120
Identificación del grupo Q del <i>Streptococo</i>	121-125.
Separación e identificación del <i>S. bovis</i> y <i>S. equinus</i>	126-127.
REACTIVOS.....	128-132.
Procedimiento para las pruebas Bioquímicas.....	133-141.
APARATOS Y MATERIALES.....	142-148.
OBTENCIÓN DE LA MUESTRA ALEATORIA.....	149-155.
RESULTADOS.....	156-161.
Relación de las familias que se muestrearon.....	162-166.
Tablas de los resultados de las pruebas.....	167-175.
Resultados de las pruebas de NMP.....	176-185.
DISCUSIÓN.....	186-201
CONCLUSIONES.....	202-206