



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIA EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Determinación de la productividad y selectividad de las placas  
Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes en agua potable  
proveniente de la Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y  
Saneamiento.**

**Disertación previa a la obtención del título de Microbiólogo**

**CYNTHIA CAROLINA ACOSTA DUQUE**

**EDDIE RAÚL VALENCIA RAMOS**

**Quito, 2017**

## **CERTIFICACIÓN**

Certifico que la Disertación de Microbiólogo de la señorita Acosta Duque Cynthia Carolina y el señor Valencia Ramos Eddie Raúl, ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Máster Elena Granda Moreno  
Directora de la Disertación  
Quito, 29 de mayo de 2017

## **DEDICATORIA**

A Dios por guiar cada uno de mis pasos en este camino llamado vida, por estar siempre conmigo y cuidar de mi en todo momento.

A mi familia que de una u otra manera han estado siempre a mi lado alentándome, apoyándome y brindándome su amor incondicional.

En especial quiero dedicar este trabajo a esa persona que siempre ha sido mi guía, mi ejemplo, mi mundo, por todo su esfuerzo, valentía, dedicación y amor, por ser quien siempre me ha dado la fuerza para continuar y dar lo mejor de mi. A mi mamá, gracias por existir y enseñarme a enfrentar la vida.

A aquellos ángeles que desde el cielo me acompañan.

Cynthia

**DEDICATORIA**

A Jesucristo, mi madre, familiares y todos los que hicieron posible este trabajo académico por su constante amor y apoyo.

Eddie

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por ser el lugar idóneo para realizar nuestra formación profesional.

A Mtr. Elena Granda por su guía, apoyo y paciencia durante todo el desarrollo de este trabajo.

A la Empresa 3M-Ecuador y a quienes la representan por encomendarnos este proyecto y por su colaboración para hacer esta investigación posible.

A la Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento (EPMAPS) por abrirnos sus puertas y permitirnos realizar este estudio.

A todas aquellas personas que se han involucrado de una u otra manera haciendo este logro posible.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1</b>	<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>6</b>
3.1.1	OBJETIVO GENERAL.....	6
3.1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
<b>4</b>	<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>7</b>
<b>4.1</b>	<b>AGUA POTABLE</b> .....	<b>7</b>
4.1.1	HISTORIA DEL AGUA POTABLE.....	8
4.1.1.1	Historia de la potabilización del agua en Quito.....	9
4.1.2	POTABILIZACIÓN DEL AGUA.....	11
4.1.2.1	Coagulación, Floculación y Sedimentación.....	11
4.1.2.1.1	Coagulación.....	11
4.1.2.1.2	Floculación.....	12
4.1.2.1.3	Sedimentación.....	12
4.1.2.2	Filtración.....	12
4.1.2.2.1	Filtración granular de alta velocidad.....	12
4.1.2.3	Desinfección.....	13
4.1.2.3.1	Cloro residual.....	13
<b>4.2</b>	<b>CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA</b> .....	<b>14</b>
4.2.1	MICROORGANISMOS INDICADORES.....	14
4.2.1.1	COLIFORMES TOTALES.....	15
4.2.1.1.1	Coliformes Fecales o Termotolerantes.....	15
<b>4.3</b>	<b>ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA</b> .....	<b>16</b>
4.3.1	TÉCNICA DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA.....	16
<b>4.4</b>	<b>MEDIO DE CULTIVO M-COLIBLUE24</b> .....	<b>17</b>
<b>4.5</b>	<b>PLACAS PETRIFILM™ AQUA DE 3M™ PARA RECuento DE COLIFORMES</b> .....	<b>17</b>
4.5.1	Composición de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes..	18
4.5.2	Modo de Empleo de las Placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes.....	18
4.5.3	Interpretación de las Placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes	18
<b>5</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
<b>5.1</b>	<b>MATERIALES Y EQUIPOS</b> .....	<b>19</b>

5.1.1	MATERIALES DE LA FASE DE MUESTREO .....	19
5.1.2	MATERIALES DE LA FASE DE LABORATORIO .....	19
5.1.3	EQUIPOS.....	21
<b>5.2</b>	<b>MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
5.2.1	RECOLECCIÓN DE MUESTRAS .....	21
5.2.1.1	Desactivación del cloro residual .....	24
5.2.2	TRANSPORTE DE MUESTRAS .....	24
5.2.3	CONTROL DE CALIDAD .....	25
5.2.3.1	Medio de cultivo .....	25
5.2.3.1.1	Verificación de características.....	25
5.2.3.1.2	Prueba de esterilidad .....	25
5.2.3.2	Control de equipos .....	26
5.2.3.3	Esterilización de materiales.....	26
5.2.3.4	Características de las cepas a diferentes temperaturas de incubación.....	26
5.2.4	PROCESAMIENTO DE MUESTRAS .....	31
5.2.4.1	Procedimientos pre-Analíticos .....	31
5.2.4.2	Inoculación de las muestras .....	31
5.2.4.2.1	Preparación de las cepas de trabajo.....	32
5.2.4.2.2	Preparación de la escala McFarland.....	33
5.2.4.2.3	Preparación del Inóculo.....	33
5.2.4.2.4	Inoculación de las muestras.....	36
5.2.4.3	Prehidratación de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ .....	37
5.2.4.4	Filtración de las muestras.....	39
5.2.4.5	Incubación y análisis de las colonias .....	42
5.2.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	43
<b>6</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>45</b>
6.1	EVALUACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD Y SELECTIVIDAD DE LAS PLACAS PETRIFILM™ AQUA DE 3M™ .....	46
6.2	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LAS PLACAS PETRIFILM™ AQUA DE 3M™ PARA DIFERENCIAR ENTRE COLIFORMES FECALES Y TOTALES MEDIANTE VARIACIÓN DE TEMPERATURA .....	56
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>
<b>10</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>79</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Recolección de muestras en la planta de tratamiento Bellavista.....	22
Figura 2. Recolección de muestras en la planta de tratamiento El Placer.....	22
Figura 3. Recolección de muestras en la planta de tratamiento Puengasí.....	23
Figura 4. Transporte de las muestras.....	24
Figura 5. Control de esterilidad de los medios de cultivo.....	26
Figura 6. Colonias de <i>E. coli</i> incubadas a 35°C en los medios m-Colibblue24 (Derecha) y placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ (Izquierda).....	28
Figura 7. Colonias de <i>E. coli</i> incubadas a 44,5°C en los medios m-Colibblue24 (Derecha) y placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ (Izquierda).....	28
Figura 8. Colonias de <i>E. aerogenes</i> incubadas a 35°C en el medio m-Colibblue24.....	29
Figura 9. Colonias de <i>E. aerogenes</i> incubadas a 44,5°C en el medio m-Colibblue24.....	29
Figura 10. Colonias de <i>E. aerogenes</i> incubadas a 35°C en Petrifilm™ Aqua de 3M™.....	30
Figura 11. Colonias de <i>E. aerogenes</i> incubadas a 44,5°C en Petrifilm™ Aqua de 3M™.....	30
Figura 12. Cepas bacterianas en BHI.....	33
Figura 13. Transferencia de las cepas a BHI.....	34
Figura 14. Incubación de las cepas por 24 horas a 35-37 °C.....	34
Figura 15. Transferencia de las cepas a cubetas para medir la turbidez.....	35
Figura 16. Lectura de la turbidez de cada cepa.....	35
Figura 17. Diluciones seriadas en base 10.....	36
Figura 18. Inoculación de las muestras.....	37
Figura 19. Adición de 1 mL de agua destilada en las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™.....	38
Figura 20. Descenso de la película superior de la placa Petrifilm™ Aqua de 3M™.....	38
Figura 21. Presión del esparcidor sobre la placa Petrifilm™ Aqua de 3M™.....	39
Figura 22. Posicionamiento de la membrana de éster celulosa de 47 mm con poros de 0,45 µm para la filtración de la muestra.....	40
Figura 23. Transferencia de la membrana después de filtrar la muestra al medio m- ColiBlue24.....	41
Figura 24. Localización de la membrana después de la filtración de la muestra en las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™.....	41
Figura 25. Incubación a 35 °C.....	42

Figura 26. Incubación a 44,5 °C. ....	43
Figura 27. Crecimiento de bacterias no coliformes en m-Colibblue24. ....	46
Figura 28. Crecimiento bacteriano en el medio m-Colibblue24 del inóculo $1,5 \times 10^0$ UFC/mL de la muestra N° 7. ....	51
Figura 29. Crecimiento bacteriano en placas Petrifilm™ Aqua 3M™ del inóculo $1,5 \times 10^0$ UFC/mL de la muestra N° 25. ....	51
Figura 30. Crecimiento bacteriano en el medio m-Colibblue24 del inóculo $1,5 \times 10^1$ UFC/mL de la muestra N° 28. ....	52
Figura 31. Crecimiento bacteriano en placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ del inóculo $1,5 \times$ $10^1$ UFC/mL de la muestra N° 2. ....	52
Figura 32. Crecimiento bacteriano en el medio m-Colibblue24 del inóculo $1,5 \times 10^2$ UFC/mL de la muestra N° 13. ....	53
Figura 33. Crecimiento bacteriano en placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ del inóculo $1,5 \times$ $10^2$ UFC/mL de la muestra N° 27. ....	53
Figura 34. Gráfico de barras comparativo de las dos técnicas. ....	54
Figura 35. Crecimiento bacteriano de <i>E. coli</i> (colonia azul) y <i>E. aerogenes</i> (colonia roja) en m-Colibblue24 del inóculo $1,5 \times 10^0$ UFC/mL de la muestra N° 2. ....	61
Figura 36. Crecimiento bacteriano de <i>E. coli</i> (flecha negra) y <i>E. aerogenes</i> (flecha blanca) en placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ del inóculo $1,5 \times 10^0$ UFC/mL a 44,5°C de la muestra N° 7. ....	61
Figura 37. Crecimiento bacteriano de <i>E. coli</i> (colonias azules) y <i>E. aerogenes</i> (colonias rojas) en m-Colibblue24 del inóculo $1,5 \times 10^1$ UFC/mL de la muestra N° 25. ....	62
Figura 38. Crecimiento bacteriano de <i>E. coli</i> (flecha negra) y <i>E. aerogenes</i> (flecha blanca) en placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ del inóculo $1,5 \times 10^1$ UFC/mL a 44,5°C de la muestra N° 6. ....	63
Figura 39. Crecimiento bacteriano de <i>E. coli</i> (colonias azules) y <i>E. aerogenes</i> (colonias rojas) en m-Colibblue24 del inóculo $1,5 \times 10^2$ UFC/mL de la muestra N° 28. ....	64
Figura 40. Crecimiento bacteriano de <i>E. coli</i> (flecha negra) y <i>E. aerogenes</i> (flecha blanca) en placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ del inóculo $1,5 \times 10^2$ UFC/mL a 44,5°C de la muestra N° 15. ....	64
Figura 41. Gráfico de barras comparativo de las dos técnicas para el recuento de <i>E. coli</i> . 65	
Figura 42. Gráfico de barras comparativo entre <i>E. aerogenes</i> y colonias atípicas termotolerantes. ....	66

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Características de las cepas incubadas a diferentes temperaturas. ....	27
Tabla 2. Datos para la evaluación de productividad y selectividad.....	47
Tabla 3. Prueba t de student para recuento de <i>E. coli</i> en los métodos estudiados.....	55
Tabla 4. Datos para diferenciación entre coliformes fecales y coliformes totales mediante temperatura.....	57
Tabla 5. Prueba t de student para recuento de <i>E. coli</i> en los métodos estudiados para selectividad mediante temperatura. ....	65
Tabla 6. Prueba t de student para recuento de <i>Enterobacter aerogenes</i> y colonias atípicas termotolerantes para selectividad mediante temperatura.....	67

**ÍNDICE DE ANEXOS**

Anexo 1. Certificado de análisis de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 .....	79
Anexo 2. Certificado de análisis de <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048.....	81
Anexo 3. Certificado de Análisis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 .....	83
Anexo 4. Registro de Temperatura de la Refrigeradora con congeladora Ecasa .....	85
Anexo 5. Registro de Temperatura de la Incubadora Memmert .....	87

## 1 RESUMEN

El agua es un recurso vital para todos los seres que habitan el planeta, para el ser humano el agua de consumo debe ser potable. La verificación de la calidad microbiológica del agua se realiza mediante análisis microbiológicos, los cuales pueden ser laboriosos, costosos y el volumen de muestra analizado es poco. Las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ son una alternativa útil para el trabajo diario en los laboratorios encargados del análisis de agua, dichas placas han sido validadas únicamente para su uso en agua embotellada por esta razón el presente estudio busca evaluar la productividad y selectividad de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes en agua potable proveniente de la EPMAPS.

El estudio se llevó a cabo mediante la comparación de la técnica de placas Petrifilm™ Aqua y el método estandarizado. Con el fin de evaluar la productividad y selectividad las muestras fueron inoculadas con una cantidad conocida de microorganismos, aquellos utilizados fueron *E. coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Adicionalmente se investigó la capacidad de dichas placas para diferenciar entre coliformes fecales y totales únicamente variando la temperatura de incubación, para ello se utilizó un inóculo con *E. coli* ATCC 25922 y *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048.

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante la prueba t de student, en ellos se puede apreciar que *P. aeruginosa* no se desarrolló en ninguno de los dos métodos, lo cual demuestra la selectividad de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes, además la comparación estadística de los recuentos obtenidos de *E. coli* demuestran que la diferencia entre ambos métodos no es significativa. En cuanto a la capacidad de diferenciar entre coliformes fecales y totales únicamente variando la temperatura de incubación se determinó que las placas Petrifilm™ Aqua son comparables con el método tradicional al recuperar coliformes termotolerantes, en este caso representados por *E. coli*. Sin embargo, la temperatura afecta el crecimiento del resto de coliformes totales, por lo cual se aprecia el crecimiento de colonias que no cumplen con las especificaciones en las placas Petrifilm™ Aqua.

Se puede concluir de este estudio que las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes tienen una buena productividad y selectividad al ser utilizadas en la matriz agua potable.

## 2 ABSTRACT

Water is a vital resource for every being that inhabit the planet, for humans drinking water must be potable. Verification of microbiological water quality is carried out by microbiological analyzes, which can be laborious, expensive and the volume of sample analyzed could be little. The 3M™ Petrifilm™ Aqua Coliform Count Plate are an useful alternative for the daily work in laboratories in charge of water analyzes. These plates had been validated only for use in bottled water and for this reason the present study aims to evaluate the productivity and selectivity of 3M™ Petrifilm™ Aqua Coliform Count Plate in potable water from EPMAPS.

This study was executed by comparing the 3M™ Petrifilm™ Aqua plate technique and the standardized method. In order to evaluate productivity and selectivity the samples were inoculated with a known quantity of microorganisms, the ones use were *E. coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Additionally, it was investigated the capacity of these plates to differentiate between fecal and total coliforms by changing the incubation temperature, for that, another inoculum were made with *E. coli* ATCC 25922 and *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048.

The results were analyzed by t-student test, in which it can appreciate that *P. aeruginosa* has not develop in either method, which demonstrates the selectivity of 3M™ Petrifilm™ Aqua Coliform Count Plates. Also, the statistical comparison of the obtained counts of *E. coli* shows that the difference between both methods is not significant. The ability to differentiate between fecal and total coliforms by changing only the incubation temperature determined that 3M™ Petrifilm™ Aqua plates are comparable to the traditional method recovering thermotolerant coliforms, in this case represented by *E. coli*. However, the temperature affects the growth of the remainder total coliforms, which grown as colonies that do not accomplish with the specifications on 3M™ Petrifilm™ Aqua plates.

It can be concluded from this study that 3M™ Petrifilm™ Aqua Coliform Count Plates have a good productivity and selectivity used on potable water as matrix.

### 3 INTRODUCCIÓN

El agua potable es aquella que al ser ingerida durante toda la vida, no representa un riesgo considerable para la salud del consumidor, sin importar la edad o vulnerabilidad que este presente; además, debe ser sensorial y visualmente aceptable (Casani, Rouhany, & Knøchel, 2005; Organización Mundial de la Salud [OMS], 2006; Damikouka, Katsiri, & Tzia, 2007). La calidad del agua se puede ver afectada por contaminación química y microbiológica, lo cual puede desencadenar en perjuicios a la salud de su consumidor (Silva et al., 2010; Alba et al., 2013).

La principal causa de enfermedades relacionadas con agua es la contaminación microbiológica de la misma (Gesche, Vallejos, & Saez, 2003; OMS, 2006). La ingesta de agua potable contaminada es una de las principales causas de enfermedades entéricas (OMS, 1995 citado por Carrillo & Lozano, 2008). La enfermedad más frecuentemente contraída por agua contaminada es la salmonelosis (Moya-Egoavil, Alvarado-Salinas, & Vásquez-Valles, 2013). Además de *Salmonella* sp. existen otras bacterias involucradas en epidemias causadas por la contaminación de agua potable como *Escherichia coli* O157:H7 (Yu & Bruno, 1996).

La verificación de la calidad microbiológica del agua se realiza mediante un análisis microbiológico in vitro (OMS, 2006), siendo estas las técnicas usadas en el laboratorio para determinar la presencia/ausencia, cantidad y tipo de microorganismos presentes en una muestra de agua (Carrillo & Lozano, 2008). El análisis microbiológico del agua potable es necesario para garantizar que del sistema de potabilización de agua se obtenga agua libre de microorganismos patógenos (Walter, J., 2003 citado por Carrillo & Lozano, 2008). La detección de cada uno de los microorganismos patógenos presentes en el agua resultaría muy cara (Kilungo, 2013); por esta razón, la OMS recomienda el uso de microorganismos indicadores de contaminación fecal (Bain et al., 2012). El principal grupo de microorganismos indicadores de la calidad de agua es el grupo de bacterias coliformes totales o fecales (APHA-AWWA-WPCF, 2000 citado por Carrillo & Lozano, 2008) debido a su fácil detección. La identificación de bacterias coliformes en una muestra de agua potable sugiere falencias en el proceso de potabilización de esta, e indica contaminación de distintos orígenes como fecal o de suelos (Organización Panamericana de la Salud [OPS], 1987).

El análisis microbiológico del agua debe ser realizado antes y después de ser tratada, y a aquella que es almacenada para su distribución. Los análisis del agua potable pueden ser realizados con mayor frecuencia si el método utilizado es sencillo de esta manera existe mayor probabilidad de detectar la contaminación (OMS, 2006).

Los métodos utilizados en los análisis microbiológicos del agua deben ser estandarizados con el fin de obtener resultados uniformes entre laboratorios (Bridgewater, Rice, Baird, Eaton, & Clesceri, 2012). Las técnicas que se utilizan con mayor frecuencia son aquellas basadas en el cultivo bacteriano como filtración de membrana y el número más probable (Walter, J., 2003 citado por Carrillo & Lozano, 2008; Kilungo, 2013). Sin embargo, los métodos utilizados para los análisis microbiológicos de agua suelen ser laboriosos, costosos y el volumen de agua analizada es poco (Kilungo, 2013). Por esta razón, las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ se presentan como una alternativa útil para el trabajo diario en los laboratorios encargados de los análisis de agua (3M Food Safety, 2011a).

Las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ han sido desarrolladas para realizar análisis microbiológicos de agua (3M Food Safety, 2011a); sin embargo, este método no está estandarizado, por lo que debe ser validado para los diferentes tipos de agua como el agua potable (Bridgewater et al., 2012) debido a que estas placas han sido aprobadas únicamente para su uso en agua embotellada (3M Food Safety, 2011a). La validación de un método no estandarizado se realiza con el objetivo de garantizar la obtención de resultados fiables. Al ser un método cuantitativo se debe determinar el rendimiento del método por medio de características como precisión, repetitividad, reproducibilidad, sensibilidad, límite de detección, límite de contaje superior y rango (Bridgewater et al., 2012). Por este motivo, el presente trabajo pretende responder la siguiente pregunta: ¿Qué productividad y selectividad presentan las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ en agua potable proveniente de la Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento (EPMAPS)?

Las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ son una herramienta desarrollada para facilitar el análisis microbiológico de agua (3M Food Safety, 2011a).

El presente estudio busca probar la efectividad de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ en agua potable proveniente de los sistemas de distribución de la EPMAPS, con el fin de comprobar su uso en este tipo de agua y de esta manera aprovechar las ventajas brindadas por las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ en el trabajo diario del laboratorio.

Actualmente existen cuatro tipos de placas Petrifilm™ Aqua de 3M™, las cuales permiten el recuento de microorganismos heterótrofos, coliformes, enterobacterias, y mohos y levaduras. La especificidad de estas placas para cada grupo de microorganismo se da gracias a los nutrientes y compuestos que contiene cada tipo de placa, los cuales son equivalentes a los medios de cultivo utilizados por los métodos tradicionales (Rios & Riquez, 2007; 3M Food Safety, 2011a; 3M Food Safety, 2011b). Las placas Petrifilm™ de 3M™ presentan algunas ventajas frente al método tradicional. Una de ellas es el desarrollo de los análisis de agua con mayor rapidez ya que se encuentran listas para su uso, además de evitar errores durante la preparación del medio de cultivo. Otras ventajas son la reducción de desechos producidos en el laboratorio y la disminución del espacio utilizado, dado que las placas son compactas (3M Food Safety, 2011a).

El cloro es generalmente utilizado para el tratamiento del agua, para evitar la contaminación con microorganismos debido a que este presenta ventajas frente a otros desinfectantes. El cloro además de eliminar los microorganismos presentes permanece como remanente en el agua lo que ayuda a prevenir contaminaciones posteriores (Gesche et al., 2003; Carrillo & Lozano, 2008).

Los resultados de los análisis microbiológicos del agua potable pueden verse afectados por la presencia de cloro residual (Moya-Egoavil et al., 2013), que es la cantidad de cloro que permanece en el agua potable después de un tiempo de contacto definido (Ministerio de la Protección Social y de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 2007), por ello se debe utilizar un agente declorinador antes de procesar las muestras de agua potable. Comúnmente se utiliza tiosulfato de sodio para este fin, debido a su capacidad de neutralizar el cloro y mantener la cantidad bacteriana durante el transporte de las muestras (Bridgewater et al., 2012).

El uso conjunto de tiosulfato de sodio en las placas Petrifilm™ puede dar como resultado la inhibición del crecimiento bacteriano (3M, 2004; 3M, 2008; 3M, s.f.a), debido a esto la neutralización del cloro residual de las muestras empleadas en las placas Petrifilm™ se realizará con caldo Letheen (3M, s.f.b).

El presente estudio pretende probar la hipótesis de que las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ tienen buena productividad y selectividad al ser empleadas en muestras de agua potable.

### **3.1 OBJETIVOS**

#### **3.1.1 OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la productividad y selectividad de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes en agua potable proveniente de la EPMAPS.

#### **3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comprobar la capacidad de detección que poseen las placas Petrifilm™ Aqua en muestras de agua potable.
- Cuantificar la cantidad de bacterias coliformes y no coliformes recuperadas en el método convencional y el método que utiliza las placas Petrifilm™ Aqua de una muestra que contienen un inóculo bacteriano conocido.
- Comparar los resultados obtenidos con el método convencional y con el método que utiliza placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes.

## 4 MARCO TEÓRICO

### 4.1 AGUA POTABLE

El agua es un recurso vital para todos los seres que habitan el planeta; en particular, para los seres humanos este elemento debe ser inocuo y accesible (OMS, 2006; República del Ecuador Asamblea Nacional, 2014). El agua destinada al consumo humano es conocida como agua potable. El agua potable o agua de consumo inocua es aquella que, sin importar la vulnerabilidad que presente el consumidor, no causará daño importante a la salud de este; además de ser incolora, presentar olor y sabor agradable (OMS, 2006; Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica [ANMAT], 2012). El tratamiento que recibe este tipo de agua garantiza que su consumo sea seguro (Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN], 2014). Para ello debe cumplir con características físicas, químicas y microbiológicas las cuales garanticen que su ingesta sea segura para la salud de sus consumidores (OMS, 2006; Carrillo & Lozano, 2008). Por lo tanto no debe presentar elementos de procedencia orgánica, inorgánica, biológica o radioactiva, su pH debe ser entre 6,5 y 8,5.

El agua potable puede ser empleada en múltiples labores domésticas, de higiene personal, limpieza y para la preparación de alimentos por lo cual es importante conocer que esta no es estéril; sin embargo, se debe certificar que se encuentra libre de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación fecal (OPS, 1988; *United States Enviromental Protection Agency* [EPA], 2002; Presidencia de la República, s.f.). Para impedir que los suministros de agua se contaminen con patógenos se debe usar varias barreras (*National Healt and Medical Research Council & National Resourse Management Ministerial Council* [NHMRC & NRNNC], 2011). Es así que en una muestra de agua de 100 mL el recuento de bacterias coliformes debe ser de 0 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (Ministerio de la Protección Social y de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 2007; INEN, 2014) y no debe encontrarse bacterias como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Ministerio de la Protección Social y de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 2007; ANMAT, 2012). Asimismo se debe adjuntar el recuento de bacterias mesófilas el cual no debe superar 100 UFC/mL (Ministerio de la Protección Social y de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 2007).

#### 4.1.1 HISTORIA DEL AGUA POTABLE

En un principio la calidad del agua se fundamentaba únicamente en aspectos organolépticos como su color, sabor u olor por lo que el mejoramiento de la calidad del agua se basaba en esto (EPA, 2000).

Existen registros del mejoramiento de la calidad de agua que datan desde 4000 a.C., inicialmente el tratamiento del agua se fundamentaba en disminuir su turbidez; tratamientos como hervir el agua, exponerla al sol o filtrarla a través de carbón fueron descritos en escritos sanscritos y griegos. Por otro lado, los Egipcios en 1500 a.C. usaban químicos para que las partículas salieran fuera del agua. En 1700 la filtración fue establecida como un método efectivo para clarificar el agua (EPA, 2000; Salzman, 2005; Condorchem Envitech, 2015).

En 1685 el primer filtro múltiple fue desarrollado, este poseía una unidad de sedimentación y un filtro de arena. Posteriormente en 1750 se comenzó a utilizar filtros de algodón, fibras de esponja y carbón en las casas (Lenntech BV, s.f.).

Durante 1800 la frecuencia de la utilización de la filtración lenta con arena aumentó en Europa, existió una mejor comprensión de los contaminantes no visibles para el ojo humano presentes en el agua y se probó que el cólera era una enfermedad transmitida por agua.

Durante los siglos XIX y XX se descubrió que la turbidez podría involucrar problemas con patógenos y con materia fecal por lo que el tratamiento del agua se basó en reducir dicha turbidez. El método de filtración lenta fue popularizándose cada vez más, sin embargo al no ser suficiente se comenzó a utilizar métodos de desinfección como la cloración y el ozono (EPA, 2000).

En 1914 el Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos estableció estándares para la calidad bacteriológica del agua, con el transcurso de los años incrementaron los parámetros de la calidad del agua y las regulaciones fueron cada vez más estrictas.

Durante los últimos años de la década de los 60 existieron avances en la producción de los químicos útiles para la agricultura y el área industrial, estos se convirtieron en contaminantes en el agua. Los métodos utilizados para el tratamiento del agua tales como adsorción con carbón activado granular, floculación y aeración resultaban poco efectivos para remover algunos de dichos químicos (EPA, 2000).

Encuestas realizadas a partir de 1960 revelaron que menos de la mitad de las plantas de tratamiento de Estados Unidos cumplían con los estándares establecidos, por esta razón nuevas leyes fueron propuestas en 1973. En los siguientes años nuevas leyes fueron aprobadas, lo que llevó a un incremento en la cantidad de sistemas de agua que aplicaban algún tipo de tratamiento.

La extensión de la población llevó al aumento de los sistemas de distribución de agua por lo que existe la necesidad de realizar una desinfección adicional para asegurar la calidad del agua que llega a su destino.

Las técnicas que permanecen eficaces hoy en día son la filtración y la cloración, sin embargo, el descubrimiento de patógenos resistentes al cloro y la presencia de químicos en las fuentes de agua potable han fomentado que algunos avances sean realizados en cuanto a desinfección, como la utilización de ozono, y mejoras en el desarrollo de la membrana de filtración (EPA, 2000).

#### **4.1.1.1 Historia de la potabilización del agua en Quito**

El agua es un recurso vital para todos los seres humanos, por ello los asentamientos siempre se han situado cerca de esta. La zona en la que se ubicó la ciudad de Quito presentaba una variada geografía con deshielos, ríos, lagunas, quebradas y abundantes lluvias lo cual fue suficiente para abastecer a la ciudad de agua. El paso de los años, la construcción de puentes, alcantarillas, canales y relleno de las quebradas según las necesidades de la ciudad, transformaron dicha geografía, convirtiéndose así en un lugar completamente diferente al de sus inicios (Benítez et al., 2014).

La principal fuente de abastecimiento de agua fue el volcán Pichincha desde el establecimiento de Quito, las diversas exigencias de la ciudad creciente provocaron que en 1535 se establecieran normas regulatorias con respecto al manejo del agua proveniente del Pichincha y lagunas aledañas. En el año 1887 se construye una nueva acequia con la finalidad de llevar el agua de El Atacaso hacia las fuentes de agua pública de donde los aguateros podían transportarla (EPMAPS Agua de Quito, s.f.; Benítez et al., 2014).

A partir del siglo XX el municipio de Quito, quien era el encargado del manejo del agua, implementa proyectos para cumplir con la necesidad de canalizar la ciudad y establecer un sistema de potabilización de agua con el objetivo de mejorar la calidad sanitaria de la

misma, esto se llevó a cabo con asesoría extranjera (Benítez et al., 2014). En el año 1904 se firma un contrato con la finalidad de iniciar los estudios para realizar los planos de dicho proyecto, de esta manera se realiza la revisión de las fuentes de agua de Quito (EPMAPS Agua de Quito, s.f.; Benítez et al., 2014). Las fuentes de agua en Quito son divididas en altas y bajas dependiendo del tipo de vertiente. Las vertientes altas serán las más frecuentemente escogidas, ya que estas son económicamente más viables debido a que no necesitan ser elevadas mecánicamente.

En 1906 se crea la Junta de Agua Potable y Canalización, la cual se encarga del manejo del agua y de las obras asociadas a esta. Desde 1905 se desarrollan proyectos para proveer de agua a la ciudad, dichos proyectos se ven retrasados por motivos tanto económicos como políticos, finalmente en 1908 se firma el contrato para la construcción de la primera planta de tratamiento. La construcción de dicha planta culminó dos años más tarde y su correcto funcionamiento tardó aún más (Benítez et al., 2014). Para el año 1913 Quito cuenta con su primera planta de tratamiento conocida como “El Placer”. En 1915 se instauró el cobro del agua, ahora potable, y el uso de medidores en las casas que recibían agua canalizada.

Entre los años 1925 y 1940, la necesidad de mejorar los hábitos higiénicos de la población llevó a la creación de baños, lavanderías y duchas públicas, lo que provocó que la demanda del agua incrementara, además existió un notable aumento de la población durante estos años (EPMAPS Agua de Quito, s.f.; Benítez et al., 2014). El manejo del agua pasó al Departamento de Obras Públicas Municipales en 1940, en años posteriores se encargó la Dirección de Agua Potable.

El crecimiento poblacional provocó la expansión de la ciudad, la cual inició hacia el norte a partir de 1940, continuó al sur y desde 1970 hacia los valles. Esto ocasionó que entre los años 1975 y 1978 el suministro del agua potable no llegara a algunos sectores, además de no ser suficiente para abastecer a toda la ciudad. En 1960 se crea la Empresa Municipal de Agua Potable de Quito (EMAP-Q) la cual se encarga de administrar el servicio de agua potable, de su mantenimiento, de asegurar su inocuidad, de investigar las fuentes de agua y realizar las ampliaciones necesarias para abastecer a la ciudad.

En 1966 se crea la Empresa Municipal de Alcantarillado de Quito, la cual a fines de 1993 se fusiona con EMAP-Q, esta unión fue necesaria debido a dificultades económicas para realizar obras de alcantarillado grandes. En el año 2009 la empresa incrementa sus responsabilidades encargándose del tratamiento y descontaminación de las aguas residuales por lo cual su nombre cambia a Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable

y Saneamiento (Benítez et al., 2014).

#### **4.1.2 POTABILIZACIÓN DEL AGUA**

La potabilización del agua es un procedimiento mediante el cual el agua cruda, agua de origen natural que no ha sido tratada (INEN, 2014), es procesada para que sea adecuada para el consumo humano (Ministerio de la Protección Social y de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 2007). El agua cruda puede tener diversos orígenes tales como deshielo de las cordilleras, subterránea, lagos, ríos, riachuelos y lluvia (Benítez et al., 2014; EPA, 2012). Dependiendo de la calidad del agua su tratamiento puede ser distinto (Willey, Sherwood, & Woolverton, 2008; EPA, 2012). Habitualmente este proceso se realiza mediante los siguientes pasos: coagulación, floculación, sedimentación, filtración y desinfección (Presidencia de la República, s.f.).

##### **4.1.2.1 Coagulación, Floculación y Sedimentación**

El proceso de coagulación, floculación y sedimentación se refiere a la adición de químicos, los cuales forman flóculos que se adhieren las partículas del agua causando que estas se sedimenten (LeChevallier & Kwok-Keung, 2004; EPA, 2012). Estos químicos se conocen como coagulantes, los usados con mayor frecuencia son sulfato de aluminio, sulfato férrico, cloruro de aluminio y cloruro de polialuminio. Existen compuestos denominados ayudantes de coagulación que actúan con las sales de hierro y de aluminio para mejorar el proceso de coagulación (Stanfield, Lechevallier, & Snozzi, 2003).

###### **4.1.2.1.1 Coagulación**

La adición de los coagulantes al agua produce precipitados de hidróxido los cuales son conocidos como flóculos, éstos tienen la característica de ser porosos por lo que las partículas del agua y algunos microorganismos son atrapados allí (Stanfield et al., 2003; LeChevallier & Kwok-Keung, 2004).

#### 4.1.2.1.2 Floculación

La floculación es el proceso por el cual se produce la interacción entre las partículas del agua y los flóculos formados por los coagulantes añadidos al agua (LeChevallier & Kwok-Keung, 2004).

#### 4.1.2.1.3 Sedimentación

La unión de las partículas del agua con los flóculos crea partículas más grandes y pesadas, lo que provoca que se hundan (LeChevallier & Kwok-Keung, 2004). En el caso que los flóculos formados sean muy livianos pueden ser removidos por flotación por aire en el cual las partículas suben a la superficie y son removidas de allí o mediante filtración (Stanfield et al., 2003).

Para facilitar este proceso se utilizan mecanismos en los que las partículas se unen a un soporte del cual serán removidas posteriormente (Pozo, 2012). Terminado este proceso la cantidad de bacterias removidas será del 40 al 99% (Stanfield et al., 2003).

### **4.1.2.2 Filtración**

La filtración se utiliza para eliminar partículas más pequeñas del agua (EPA, 2012). Es una barrera física que retiene a varios patógenos (Stanfield et al., 2003), y sustancias orgánicas e inorgánicas presentes en el agua (Madigan, Martinko, & Parker, 2004). Mediante este proceso el agua es clarificada (EPA, 1999).

#### 4.1.2.2.1 Filtración granular de alta velocidad

La filtración granular de alta velocidad se refiere al paso del agua por un lecho empaquetado de materiales granulares, éste puede ser de uno, dos o tres materiales. Los materiales granulares usados son arena de sílice, carbón de antracita, granate (LeChevallier & Kwok-Keung, 2004), arena y carbón activado granular (Stanfield et al., 2003; LeChevallier & Kwok-Keung, 2004). Convencionalmente, el agua debe pasar por filtros de arena, grava y carbón (EPA, 2012).

### 4.1.2.3 Desinfección

La desinfección se realiza para eliminar algunos microorganismos que se pueden encontrar en el agua, para ello se le añade una pequeña cantidad de cloro u otros agentes (EPA, 2012). La desinfección puede ser realizada mediante la utilización de ozono, luz ultravioleta u otros desinfectantes (LeChevallier & Kwok-Keung, 2004) siendo el método más frecuente es la cloración. El cloro además de eliminar la mayoría de patógenos neutraliza compuestos orgánicos, al hacerlo el cloro se consume (Madigan et al., 2004), es por ello que la cantidad de cloro empleada debe ser suficiente para que permanezca en el agua un remanente de 0,2 a 2 mg/L, esto se conoce como cloro residual libre (Willey et al., 2008).

#### 4.1.2.3.1 Cloro residual

Cloro residual es el remanente de cloro presente en el agua después de realizar el proceso de desinfección. Durante el proceso de desinfección del agua se añade una cantidad de cloro suficiente para que este reaccione con las partículas aún presentes en el agua y permanezca un exceso de cloro (Agbar agua, 2014).

Existen dos tipos de cloro residual, cloro residual libre y cloro residual compuesto. La presencia de cloro residual libre en un cuerpo de agua clorado garantiza su correcta desinfección (Fernández-Crehuet, Moreno, & Pérez, 2001).

La determinación del cloro residual se puede realizar mediante O-tolidina o mediante dietil-p-fenilén diamina (DPD o DFD). La O-tolidina presenta una reacción rápida con el cloro residual libre y reacciona solamente después de 5 segundos con el cloro residual compuesto, lo cual no permite la diferenciación entre ellos, ya que hace imposible comparar con una escala de color; de esta manera se pueden cometer errores tales como confundir entre los dos tipos de cloro residual y decir que un cuerpo de agua se encuentra correctamente clorado (Fernández-Crehuet et al., 2001).

La técnica recomendada para la determinación de cloro libre residual es utilizando DPD, ya que permite establecer la cantidad exacta de cloro libre residual presente en el agua. El DPD a pH 6,2 – 6,5 da una coloración roja, la cual equivale a la concentración de cloro libre residual que puede valorarse volumétricamente con una solución de sulfato ferroso amoniacal o semi-cuantitativamente por comparación con una escala de color. También permite la determinación de ambos tipos de cloro residual, esto mediante la adición de

ioduro potásico en exceso con el objetivo de liberar el cloro residual combinado y así medirlo de la misma manera que al cloro residual libre (Fernández-Crehuet et al., 2001; Suárez, Hernández, & López, 2013). Ya que esta técnica se basa en cambios de coloración los principales interferentes son el color, turbidez y la presencia de materia orgánica en la muestra de agua, otros interferentes pueden ser manganeso oxidado, cobre y halógenos libres (Fernández-Crehuet et al., 2001; Aguirre, González, & Guerrero, 2015).

## **4.2 CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA**

La calidad del agua puede verse afectada por diversos factores entre los cuales están incluidos factores químicos, físicos y microbiológicos. Los factores microbiológicos son de especial importancia ya que estos pueden conllevar a la transmisión de enfermedades, es por ello que se requiere la verificación microbiológica del agua para lo cual se realizan análisis de esta, generalmente mediante el uso de microorganismos indicadores de contaminación fecal (OMS, 2006).

### **4.2.1 MICROORGANISMOS INDICADORES**

Los microorganismos indicadores son aquellos que pueden ser utilizados para evaluar la calidad microbiológica del agua debido que estos son más resistentes a la muerte que los microorganismos causantes de enfermedades (Willey et al., 2008). Además poseen un comportamiento similar al de los patógenos frente a factores ambientales y en cuanto a cuantía (Arcos, Ávila, Estupiñán, & Gómez, 2005). Los microorganismos indicadores son organismos o grupos de organismos utilizados como un índice de una posible contaminación por patógenos humanos (Willey et al., 2008; Universidad Nacional Autónoma de México, 2012).

El uso de microorganismos indicadores de manera rutinaria en los laboratorios se debe a que la detección de cada uno de los posibles patógenos presentes en las muestras resultaría muy costoso, laborioso y/o lento (Arcos et al., 2005; Universidad Nacional Autónoma de México, 2012). Además la detección de un microorganismo patógeno puede verse afectada por diversos motivos, tales como factores climáticos o el escaso número del patógeno presente en la muestra (Analiza Calidad, 2005; Universidad Nacional Autónoma de México, 2012).

El microorganismo indicador ideal debería cumplir con los siguientes criterios: debe ser

adecuado para el análisis de todos los tipos de agua, debe estar presente siempre que los patógenos entéricos estén presentes, debe ser capaz de sobrevivir más que el patógeno entérico más resistente, no debe reproducirse en el agua contaminada y producir un valor aumentado; el método utilizado debe ser específico para el microorganismo buscado y altamente sensible para detectar valores bajos del microorganismo indicador, además dicho método debe ser fácil de realizar, el microorganismo indicador debe ser inofensivo para los humanos, la cantidad del microorganismo indicador en el agua debe tener relación directa con el grado de contaminación fecal (Willey et al., 2008).

#### **4.2.1.1 COLIFORMES TOTALES**

Los coliformes son un grupo de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (Bridgewater et al., 2012), que pueden encontrarse tanto en ambientes terrestres y acuáticos, como en materia fecal debido a que son heterótrofos (*World Health Organization* [WHO], 2011). Este grupo comparte ciertas características como ser aerobios o anaerobios facultativos, Gram negativos, de forma bacilar, no forman esporas, oxidasa negativa y fermentan lactosa con la formación de gas y ácido en 24-48 horas a 35°C (Ashbolt, Grabow, & Snozzi, 2001; Bridgewater et al., 2012; Quintos-Escalante, Méndez, & Herrera, 2012), además son capaces de crecer en cantidades altas de sales biliares. Estas bacterias son capaces de fermentar lactosa gracias a la producción de una enzima conocida como  $\beta$ -galactosidasa (OMS, 2006).

Los géneros bacterianos que convencionalmente pertenecen a este grupo son *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter* (WHO, 2011).

Los coliformes totales pueden ser empleados como microorganismos indicadores, su presencia demuestra falencias en los procesos de limpieza y desinfección de equipos, procesos de producción; además de revelar la posible presencia de biofilms o contaminación de fuentes externas (OMS, 2006; Quintos-Escalante et al., 2012). Su uso como indicadores se debe a que se comportan de manera similar a los patógenos en los sistemas de desinfección además de permanecer más tiempo que estos en el agua (Arcos et al., 2005).

##### **4.2.1.1.1 Coliformes Fecales o Termotolerantes**

Los coliformes fecales son un subgrupo de los coliformes totales que se caracteriza por

fermentar lactosa a temperaturas de 44-45°C (Ashbolt et al., 2001; OMS, 2006; Willey et al., 2008). Este grupo de bacterias son excretadas en las heces de humanos y animales de sangre caliente (Willey et al., 2008). Las especies incluidas en este grupo pueden encontrarse en cualquiera de los 4 géneros de coliformes totales, pero el género de mayor importancia es *Escherichia*; específicamente, la especie *E. coli*. La detección de coliformes fecales indica una contaminación reciente de materia fecal (OMS, 2006).

### **4.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA**

El análisis microbiológico del agua es el conjunto de técnicas empleadas en el laboratorio para determinar la presencia/ausencia, cantidad y tipo de microorganismos presentes en una muestra (Ministerio de la Protección Social y de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 2007). Debido a que la cantidad de microorganismos que pueden estar en una muestra es muy grande se utilizan microorganismos indicadores donde el principal grupo son los coliformes totales y fecales. Las técnicas utilizadas para la identificación de este grupo de microorganismos son número más probable (NMP), filtración por membrana, técnicas de presencia/ausencia, la prueba del sustrato definido Colilert y diversas técnicas moleculares (Willey et al., 2008).

#### **4.3.1 TÉCNICA DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA**

La técnica de filtración por membrana se ha convertido en la técnica utilizada con mayor frecuencia para evaluar la calidad microbiológica del agua (Willey et al., 2008). Esta técnica consiste en hacer pasar una cantidad determinada de agua por una membrana en cuya superficie quedan atrapadas las bacterias, posteriormente esta membrana es transferida a un medio que permita el desarrollo de las bacterias (Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, 2007; Willey et al., 2008).

Esta técnica tiene varias ventajas entre las cuales se puede destacar que es reproducible, permite la evaluación de grandes cantidades de agua, los resultados pueden ser obtenidos en un solo paso, puede utilizar diferentes medios lo que permite evaluar diversos tipos bacterianos y el costo es menor que al realizar la técnica de número más probable (NMP). Por otro lado se pueden encontrar algunas desventajas como que el volumen de la muestra puede ser limitado por la turbidez de la misma, si la cantidad de bacterias presentes en la muestra es muy grande existirá sobre crecimiento impidiendo así el recuento de las

bacterias, además, metales y fenoles pueden ser absorbidos por el filtro causando la inhibición del crecimiento bacteriano (Willey et al., 2008). La principal desventaja encontrada al evaluar bacterias del grupo coliformes, es que esta técnica no evidencia la producción de gas al fermentar la lactosa (Ashbolt et al., 2001).

#### **4.4 MEDIO DE CULTIVO M-COLIBLUE24**

El medio m-Colibblue24 ha sido aprobado por EPA para su uso en el análisis de diversos tipos de agua tales como potable, embotellada, subterránea, recreacional, agua ultrapurificada y agua residual. Este medio se caracteriza por ser un medio nutritivo, utilizado en el método de filtración por membrana, que permite la detección simultánea de bacterias coliformes totales y *E. coli* en 24 horas. Las bacterias coliformes son de color azul y rojo, mientras que las colonias azules son específicas para *E. coli* (HACH, 2001; HACH, 2003). Esto se debe a un indicador enzimático presente en el medio.

La composición del medio permite el crecimiento de las bacterias estresadas y dañadas, de la misma manera que inhibe el crecimiento de bacterias no coliformes (HACH, 2001), para lo cual no contiene deoxicolato o ácidos biliares en su composición (Andrade & Benavides, 2010).

#### **4.5 PLACAS PETRIFILM™ AQUA DE 3M™ PARA RECuento DE COLIFORMES**

Las placas 3M™ Petrifilm™ Aqua representan un nuevo método para el análisis de agua embotellada. Presentan algunas ventajas frente a los métodos tradicionales debido a su disminución de tiempo, espacio y desechos. Éstas se encuentran listas para su uso evitando invertir tiempo en la preparación del medio de cultivo y deshaciéndose de la variabilidad causada por las personas que elaboran los medios de cultivo. Además su vida útil es más larga y evitan el paso de confirmación en bacterias coliformes ya que la producción de gas de estas se evidencia en la película superior de las placas Petrifilm™ (3M Food Safety, 2011a).

#### **4.5.1 Composición de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes**

Las placas Petrifilm™ Aqua contienen el medio de cultivo deshidratado (3M Food Safety, 2011c) que en este caso es Violeta Cristal Rojo Neutro Bilis (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, y tetrazolio que es el indicador que permite el fácil recuento de las colonias (3M Food Safety, 2011d; 3M, 2012).

#### **4.5.2 Modo de Empleo de las Placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes**

El uso de las Placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes requiere de un tratamiento previo conocido como prehidratación, para ello se debe posicionar la placa sobre una superficie plana, levantar la película superior y con una pipeta ubicada perpendicularmente colocar 1mL del diluyente estéril (3M Food Safety, 2011d; 3M, 2012), este puede ser agua destilada o desionizada (3M, 2012), bajar delicadamente la película para evitar el ingreso de aire, colocar el esparcidor sobre la placa con la cara plana hacia arriba y presionar. Esperar 1 hora mínimo antes de usar.

La muestra debe ser filtrada a través de una membrana de éster celulosa de 47mm con poros de 0,45µm, posteriormente se levanta la película superior de la placa y se coloca el filtro en el lugar donde la placa está hidratada, bajar cuidadosamente la película y presionar delicadamente.

La incubación se realiza a 35 o 36 °C ± 1°C por 24 ± 2 horas. Las placas deben estar ubicadas de manera horizontal (3M Food Safety, 2011d).

#### **4.5.3 Interpretación de las Placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes**

Se deben enumerar las colonias de color rojo que se encuentren asociadas a burbujas de gas. La producción de ácido se puede apreciar por un halo color rosa tenue asociado a las colonias. Aquellas colonias que no se encuentren asociadas a burbujas de gas pueden ser colonias de coliformes por lo que se recomienda realizar la confirmación de estas (3M Food Safety, 2011d).

## **5 MATERIALES Y MÉTODOS**

La presente investigación es de tipo descriptiva experimental, la cual fue realizada en el laboratorio de tesis de la Carrera de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

La empresa 3M-Ecuador, representada por el Ing. Víctor Campos, gerente de consultoría técnica, proporcionó las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes, las membranas de éster celulosa de 47 mm con poros de 0,45 µm y el caldo Lethen.

### **5.1 MATERIALES Y EQUIPOS**

#### **5.1.1 MATERIALES DE LA FASE DE MUESTREO**

- Envases plásticos estériles aptos para el muestreo con capacidad de 120 mL
- Caldo Lethen
- Tiosulfato de sodio al 3%
- Marcador permanente
- Porta muestras (Cooler)
- Pilas de refrigerante
- Mandil
- Guantes
- Zapatones
- Mascarilla
- Gorro

#### **5.1.2 MATERIALES DE LA FASE DE LABORATORIO**

- Mandil
- Guantes
- Zapatones
- Mascarilla
- Gorro
- Marcador Permanente

- Pipetas serológicas de 1 mL
- Pipetas serológicas de 10 mL
- Pipeta automática de 100 a 1000 µl Droptek, Serie N° DR44450
- Puntas desechables azules
- Probetas graduadas
- Tubos de vidrio con tapa rosca de 10 mL
- Tubos de vidrio con tapa rosca de 5 mL
- Frasco con tapa de 500 mL
- Gradillas
- Placas Petri
- Almohadillas absorbentes
- Membrana estériles
- Pinzas
- Medio de cultivo m-ColiBlue24
- Placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes
- Medio TSA (Agar Trypticase Soya)
- Caldo BHI (Brain and Heart Infusion)
- Peptona
- Agua estéril
- Asas bacteriológicas desechables de 100 y 10 µL
- Esparcidor para las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™
- Tubos Eppendorf
- Hisopos de madera
- Glicerol
- Cubetas para lectura en el espectrofotómetro
- Cinta indicadora de esterilización
- Termómetro
- Olla Pequeña
- Cuaderno
- Esferográfico
- Cepas de referencia
  - *Escherichia coli* ATCC 25922

- *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

### 5.1.3 EQUIPOS

- Balanza ADAM
- Autoclave Market Forge Eq-DIS-16
- Incubadora Memmert
- Incubadora Memmert Eq-DIS-47
- Mechero de Bunsen FISHER
- Espectrofotómetro PerkinElmer Eq-DIS-94
- Refrigeradora con congeladora Ecasa
- Contador de colonias microbiológicas TODAY'S galaxy 230 Eq-DIS-50
- Sistema de Filtración de Membranas Pall Eq-DIS-58
  - Bomba
  - Portafiltros completo (Embudo, base, pinza o elemento de unión)
  - Unidades de Filtración estériles

## 5.2 MÉTODOS

### 5.2.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

La recolección de las muestras fue de tipo intencional dado que se tomó treinta muestras únicamente de agua potable en horas de la mañana provenientes de un punto de tres sistemas de distribución de la EPMAPS ubicadas al Norte, Sur y Valles de la ciudad de Quito. Los sistemas de distribución fueron escogidos en consenso con el representante de la empresa 3M-Ecuador por la cercanía al sitio de análisis. Estos sistemas fueron la planta de tratamiento Bellavista (Figura 1), El Placer (Figura 2) y Puengasí (Figura 3), de las cuales en cada planta se tomó diez muestras de un solo punto en días diferentes.



**Figura 1.** Recolección de muestras en la planta de tratamiento Bellavista.



**Figura 2.** Recolección de muestras en la planta de tratamiento El Placer.



**Figura 3.** Recolección de muestras en la planta de tratamiento Puengasí.

La recolección de las muestras se la realizó siguiendo el procedimiento recomendado por Bridgewater et al. (2012) y por la norma NTE INEN 1105 (2012). Para lo cual se empleó envases plásticos, limpios y estériles con una solución de tiosulfato de sodio al 3%, para el método convencional. El método convencional o tradicional se refiere al método descrito en *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* para el análisis de agua potable (Filtración por membrana), utilizando el medio de cultivo m-ColiBlue24. Mientras que las muestras que se emplearon para el análisis mediante las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes fueron tomadas en envases plásticos, limpios y estériles con 1 mL de caldo Lethen. Todas las muestras fueron identificadas con datos correspondientes a la empresa y muestra tales como nombre del sistema o sitio, tipo de muestra, punto de recogida, profundidad de muestreo, fecha, hora, nombre de la persona que muestreó, análisis realizado (recuento de coliformes), cloro residual, agentes reductores.

Debido a que el agua proviene de una tubería se dejó correr durante 2 o 3 minutos antes de su recolección (INEN, 2012). Para el estudio se tomó 100 mL de agua potable en un envase con capacidad de 120 mL de acuerdo a las recomendaciones de Bridgewater et al. (2012) que sugiere que la cantidad de agua potable para filtración por membrana debe ser de 100 a 1000 mL; además, el envase no debe ser llenado totalmente (INEN, 2012).

### 5.2.1.1 Desactivación del cloro residual

La desactivación del cloro residual se realizó en todas las muestras. Los envases para recolección de las muestras usadas en el método convencional (Filtración por membrana con m-Colibblue24) poseen un agente declorinador que es tiosulfato de sodio al 3%.

El agente declorinador utilizado para las placas Petrifilm™ fue caldo Letheen (V., Campos, comunicación personal, septiembre, 2013). La cantidad de caldo Letheen utilizado fue 1 mL, dato sugerido por la empresa 3M después de realizar un preensayo.

### 5.2.2 TRANSPORTE DE MUESTRAS

Las muestras fueron transportadas en un porta muestras con pilas refrigerantes (Figura 4) para mantener la temperatura inferior a 10°C (INEN, 2012).



**Figura 4.** Transporte de las muestras.

### 5.2.3 CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad se debe realizar para garantizar la correcta elaboración del análisis microbiológico de manera que sea posible detectar errores y problemas en los equipos, reactivos, medios de cultivo, cepas microbiológicas y procedimientos para poder corregirlos (Herrera & Campos, 2005; Instituto de Salud Pública de Chile, 2009).

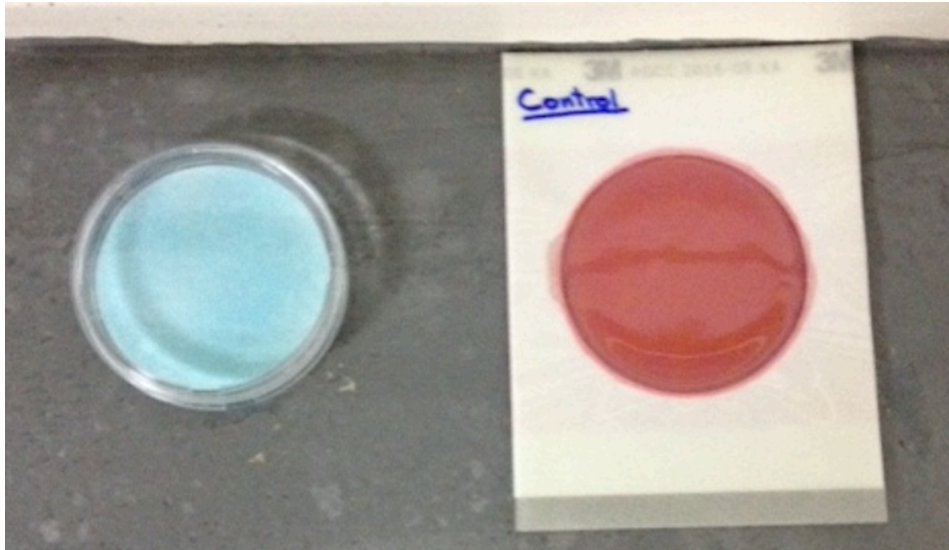
#### 5.2.3.1 Medio de cultivo

##### 5.2.3.1.1 Verificación de características

Las características de los medios de cultivo fueron verificadas antes de su primer uso. Para lo cual fue necesario utilizar cepas bacterianas de referencia certificadas y específicas para el medio de cultivo, en este caso se utilizó cepas de *American Type Culture Collection* (ATCC). La respuesta del medio de cultivo fue probada sembrando cultivos microbianos incubados de acuerdo a las condiciones indicadas para el microorganismo buscado en cada medio de cultivo, los cuales resultaron positivos y negativos de acuerdo al medio de cultivo a probar (Herrera & Campos, 2005; Bridgewater et al., 2012). En este estudio se utilizó *Escherichia coli* ATCC 25922 (Anexo 1) como control positivo para coliformes fecales, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 (Anexo 2) como control positivo para coliformes totales y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Anexo 3) como control negativo.

##### 5.2.3.1.2 Prueba de esterilidad

La prueba de esterilidad se realizó a los medios de cultivo antes de su primer uso. Para ello se incubó el medio de cultivo en las condiciones adecuadas para el microorganismo buscado. El resultado fue el medio de cultivo sin crecimiento microbiano en él (Figura 5) (Instituto de Salud Pública de Chile, 2009; Bridgewater et al., 2012).



**Figura 5.** Control de esterilidad de los medios de cultivo.

#### **5.2.3.2 Control de equipos**

Para asegurar el funcionamiento adecuado de los equipos utilizados en el laboratorio se llevó un registro diario de cada equipo. Se midió diariamente la temperatura de la refrigeradora (Anexo 4) y de la incubadora a 35°C (Anexo 5) con el dispositivo integrado a cada equipo o con un termómetro (Herrera & Campos, 2005).

#### **5.2.3.3 Esterilización de materiales**

Como método de control de calidad de la esterilización se utilizó una cinta indicadora del proceso de esterilización, la misma que fue colocada en los materiales que fueron enviados al autoclave. Terminado el proceso de autoclavado, las líneas presentes en la cinta cambiaron su color de blanco a café oscuro (3M, s.f.c; Instituto Nacional de Gestión Sanitaria, 2013).

#### **5.2.3.4 Características de las cepas a diferentes temperaturas de incubación**

Parte del ensayo fue verificar la capacidad de las placas Petrifilm<sup>TM</sup> Aqua de 3M<sup>TM</sup> para diferenciar las bacterias coliformes fecales del resto de coliformes, únicamente variando la temperatura de incubación. Por esta razón se comprobó las características de las cepas

incubadas a 35°C y a 44,5°C, tanto en el medio m-Colibblue24 como en las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes.

Para ello se utilizaron los siguientes inóculos:

- ~ Inóculo 1.- *E. coli* ATCC 25922
- ~ Inóculo 2.- *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048
- ~ Inóculo 3.- *E. coli* ATCC 25922 y *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1.

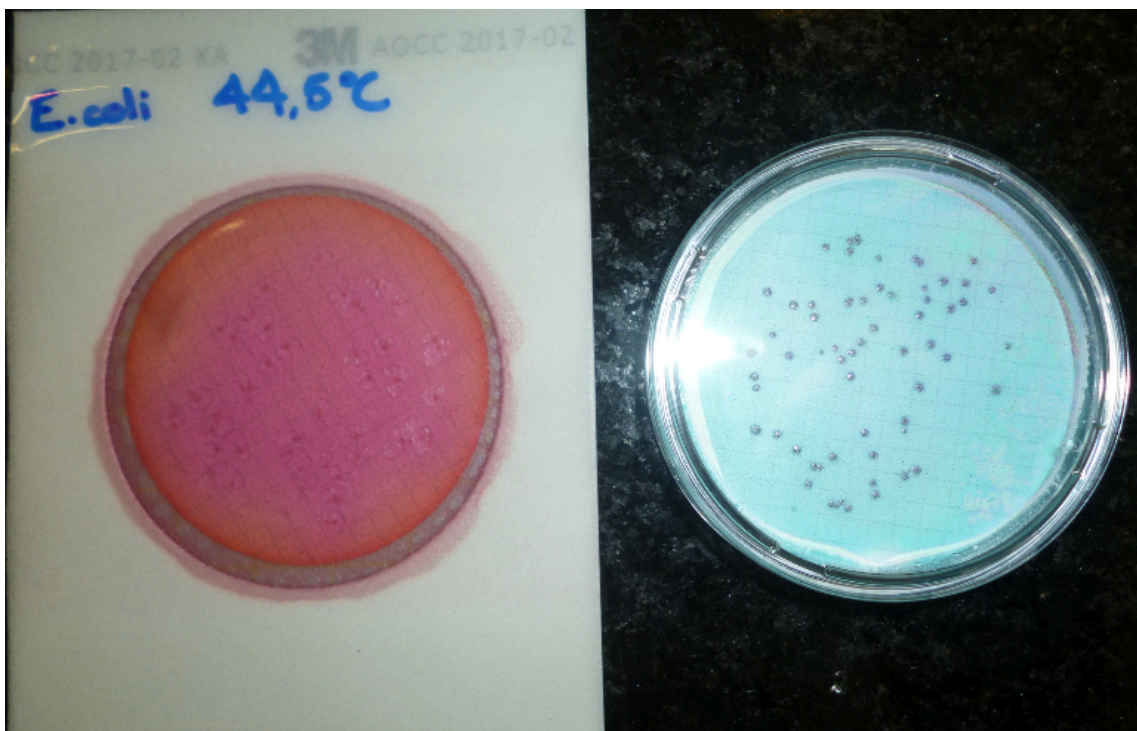
**Tabla 1. Características de las cepas incubadas a diferentes temperaturas.**

	<b>Características en m-Colibblue24</b>	<b>Características en Petrifilm™ Aqua</b>
Inóculo 1 a 35°C	Colonias de color azul	Colonias rojas con halo rosa tenue asociadas a burbujas
Inóculo 1 a 44,5°C	Colonias de color azul	Colonias rojas con halo rosa tenue asociadas a burbujas
Inóculo 2 a 35°C	Colonias de color rojo	Colonias rojas con halo rosa tenue asociadas a burbujas
Inóculo 2 a 44,5°C	Colonias de color rojo	Colonias rojas pequeñas con halo rosa tenue pequeño
Inóculo 3 a 35°C	Colonias de color rojo y colonias de color azul	Colonias rojas con halo rosa tenue asociadas a burbujas
Inóculo 3 a 44,5°C	Colonias de color rojo y colonias de color azul	Colonias rojas con halo rosa tenue asociadas a burbujas y colonias rojas pequeñas con halo rosa tenue pequeño

Las características de las colonias de *E. coli* en ambos medios de cultivo, incubadas a 35°C y a 44,5°C pueden ser apreciadas en las figuras 6 y 7, en ellas se observa que el crecimiento de las colonias es igual independientemente de la temperatura de incubación.

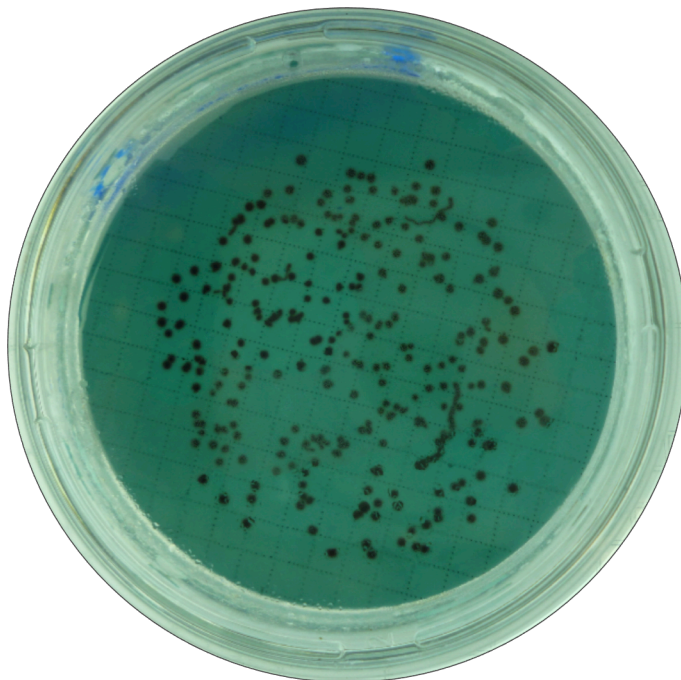


**Figura 6.** Colonias de *E. coli* incubadas a 35°C en los medios m-Colibblue24 (Derecha) y placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ (Izquierda).

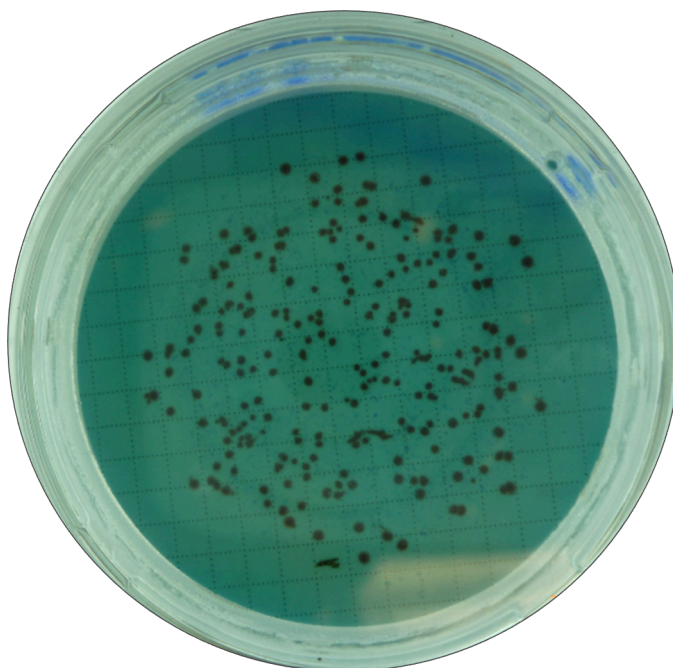


**Figura 7.** Colonias de *E. coli* incubadas a 44,5°C en los medios m-Colibblue24 (Derecha) y placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ (Izquierda).

Las figuras 8 y 9 muestran que las características de *E. aerogenes* no se ven afectadas por la temperatura de incubación.

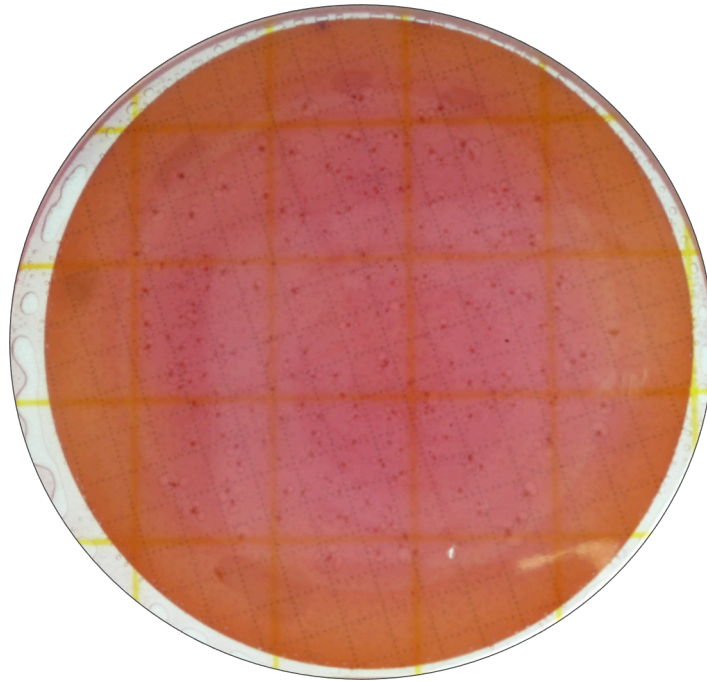


**Figura 8.** Colonias de *E. aerogenes* incubadas a 35°C en el medio m-Colibblue24.

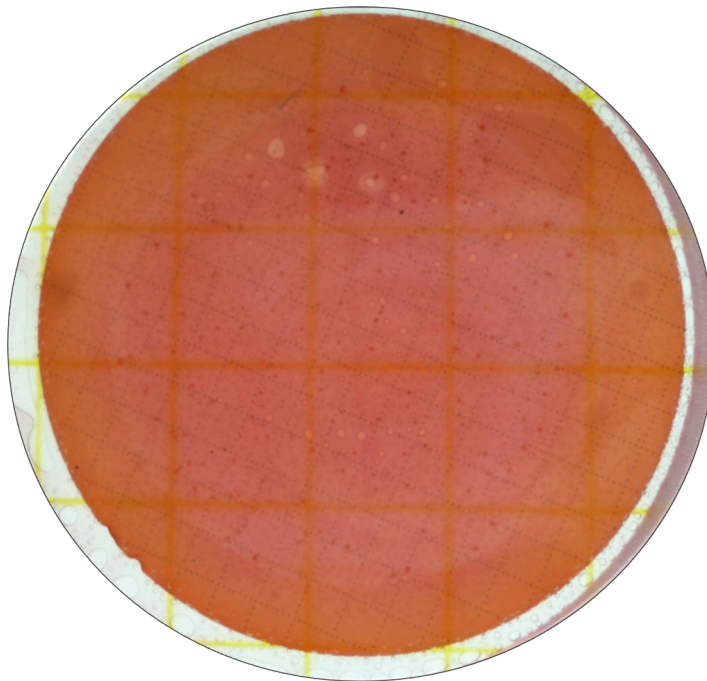


**Figura 9.** Colonias de *E. aerogenes* incubadas a 44,5°C en el medio m-Colibblue24.

Las figuras 10 y 11 muestran las diferencias entre las características de crecimiento de *E. aerogenes* en las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ al ser incubadas a 35°C y a 44,5°C.



**Figura 10.** Colonias de *E. aerogenes* incubadas a 35°C en Petrifilm™ Aqua de 3M™.



**Figura 11.** Colonias de *E. aerogenes* incubadas a 44,5°C en Petrifilm™ Aqua de 3M™.

## 5.2.4 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

### 5.2.4.1 Procedimientos pre-Analíticos

Antes de comenzar el trabajo en el laboratorio se debe tomar en cuenta los parámetros de seguridad recomendados por Bridgewater et al. (2012).

- Durante el proceso aséptico las puertas y ventanas deben estar cerradas.
- Lavarse las manos con agua y jabón después de retirar los guantes y de manipular material viable, y antes de salir del laboratorio.
- Las superficies de trabajo deben ser desinfectadas con Tego51 o hipoclorito a concentraciones del 2%, antes y después de su uso.
- No pipetear con la boca.
- Los desechos deben ser decontaminados antes de su eliminación.
- No comer, fumar, beber, maquillarse o manipular lentes de contacto dentro del laboratorio.
- Usar mandil o uniformes y guantes.

### 5.2.4.2 Inoculación de las muestras

En principio el agua potable no debe contener bacterias coliformes, por ello las muestras fueron inoculadas con una cantidad conocida de microorganismos. Cada muestra fue procesada con dos inóculos distintos para cumplir con los objetivos establecidos.

De esta manera, para poder comprobar el límite de detección y especificidad de las placas Petrifilm™ Aqua se inoculó las muestras con *Escherichia coli* ATCC 25922 como cepa objetivo y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 como cepa interferente (3M Food Safety, 2011c).

Con el objetivo de conocer si las placas Petrifilm™ Aqua pueden ser selectivas para bacterias coliformes fecales y diferenciarlas del resto de bacterias coliformes únicamente variando la temperatura de incubación, se inoculó las muestras con una cantidad conocida de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048.

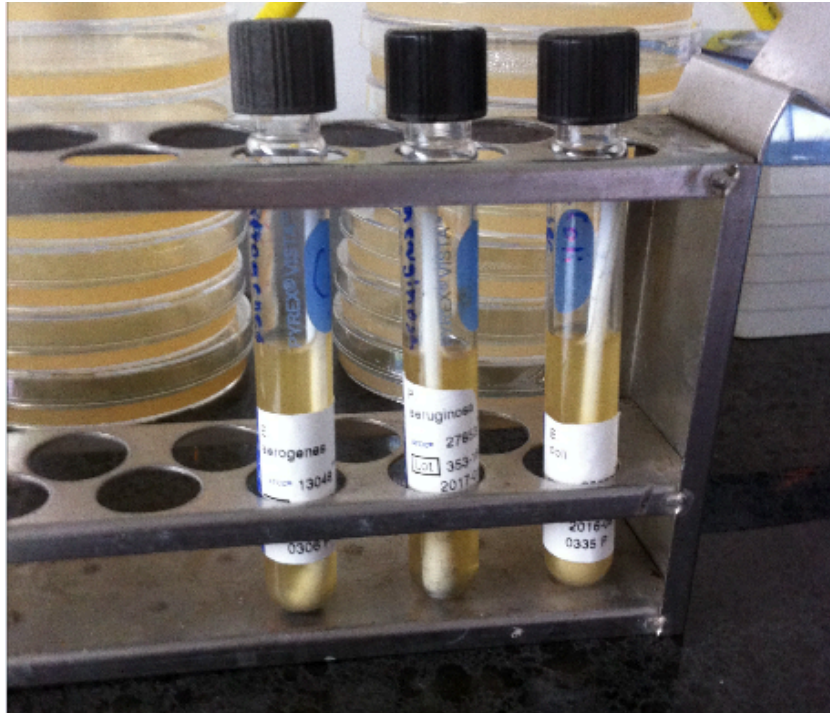
Dichas cepas fueron seleccionadas por ser utilizadas tradicionalmente como controles en muestras de agua potable. *E. coli* es reconocida por representar al grupo de bacterias coliformes, especialmente a coliformes fecales. Debido a que este estudio requiere

contrastar entre coliformes fecales y no fecales, existe la necesidad de tener un representante de las bacterias coliformes no fecales, el microorganismo escogido puede pertenecer a cualquiera de los cuatro géneros bacterianos que conforman al grupo de coliformes, sin embargo, *E. aerogenes* fue escogida por su uso frecuente como control negativo para coliformes fecales.

#### 5.2.4.2.1 Preparación de las cepas de trabajo

El inóculo se realizó a partir de cepas puras de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (3M Food Safety, 2011c).

Las cepas provenían de KWIK-STIK™, las cuales se encontraban liofilizadas, para usarlas se rompió la ampolla que contenía el líquido hidratante y de esta manera hidratar el “pellet”, se presionó dicho “pellet” para homogenizarlo y se empapó el hisopo en esta suspensión (Scharlab, s.f.; MicroBiologics, 2007), a continuación se colocó dicho hisopo en caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (Figura 12) y se incubó por 24 horas a 35-37 °C (MicroBiologics, 2007). Terminado este tiempo se inoculó 500 µL en Agar Tripteina Soya (TSA), se sembró masivamente y se incubó por 24 horas a 35-37 °C. Para conservar la cepa de trabajo se realizó una suspensión bacteriana en 1 mL de BHI con glicerol cuya relación fue 1:5 y se conservó en congelación hasta su uso (Sacsquispe & Velásquez, 2002).



**Figura 12.** Cepas bacterianas en BHI.

#### 5.2.4.2.2 Preparación de la escala McFarland

La determinación de la cantidad microbiana se realizó utilizando como base la escala McFarland que es un patrón de turbidez estándar comparable con la cantidad de bacterias presentes en un caldo. Esta escala utiliza diferentes cantidades de cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2$  1%) y ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  1%) para obtener la turbidez requerida. La escala que se utilizará es McFarland 0,5 que corresponde a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Para comprobar que el estándar sea el correcto se midió la turbidez en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm y su absorbancia fue de 0,08 a 0,10 (Sacsquispe & Velásquez, 2002; Pasterán & Galas, 2008).

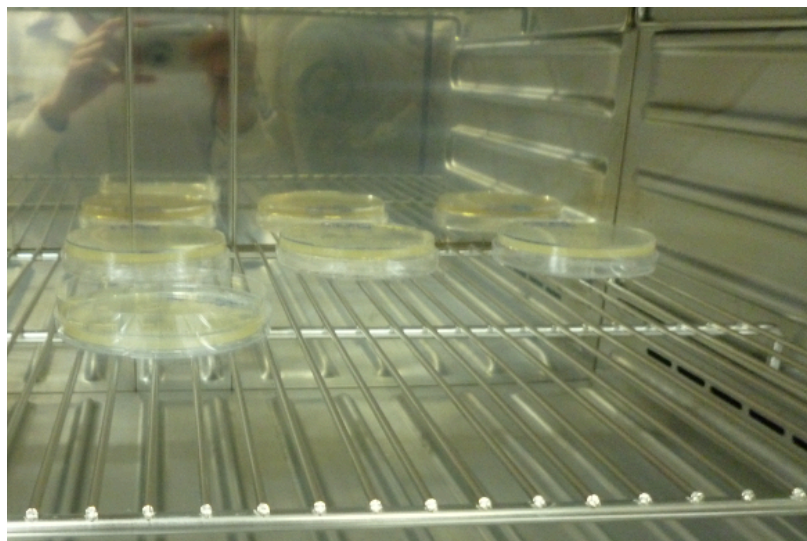
#### 5.2.4.2.3 Preparación del Inóculo

Las cepas de trabajo se encontraban congeladas por lo que antes de su uso estas permanecieron 30 minutos a 35-37°C para ser temperadas, a continuación se colocó cada cepa en 5 mL de caldo BHI (Figura 13) y se incubó por 2 horas a 35-37 °C (Redondo, 2008; Instituto de Salud Pública de Chile, 2012).



**Figura 13.** Transferencia de las cepas a BHI.

Terminado ese tiempo se sembró cada cepa en TSA y se incubó por 24 horas a 35-37°C (Figura 14), del cultivo obtenido se colocó 2 o 3 colonias en 3 mL de caldo BHI para obtener una turbidez comparable con la escala McFarland 0,5 (Figura 15 y 16) (Picazo, 2000; Malbrán, 2001; Carrillo & Lozano, 2008; Taroco, Seija, & Vignoli, 2008).



**Figura 14.** Incubación de las cepas por 24 horas a 35-37 °C.



**Figura 15.** Transferencia de las cepas a cubetas para medir la turbidez.



**Figura 16.** Lectura de la turbidez de cada cepa.

A partir de la escala McFarland 0,5 se realizó diluciones seriadas en base 10 en agua peptonada estéril al 0,1% hasta  $10^0$  (Redondo, 2008; Redondo-Solano & Arias, 2011). Se

utilizó las tres últimas diluciones para obtener inóculos de 150, 15 y 1,5 UFC/mL (Figura 17).



**Figura 17.** Diluciones seriadas en base 10.

#### 5.2.4.2.4 Inoculación de las muestras

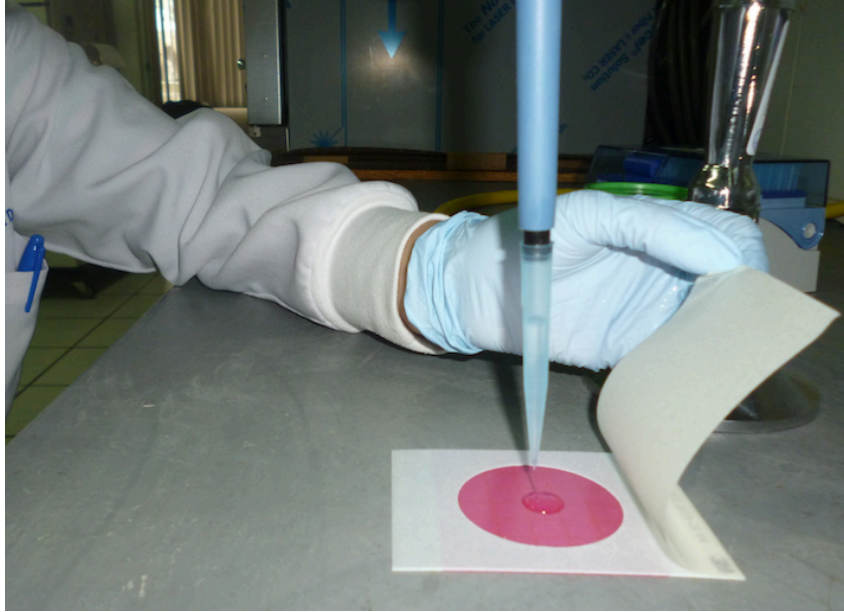
La inoculación de las muestras se realizó antes de que transcurrieran 15 minutos de ajustado el inóculo (Picazo, 2000; Malbrán, 2001), se colocó 1 mL de cada cepa bacteriana en las muestras (Figura 18). Para comprobar la productividad y selectividad de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ se colocó 1 mL de *Escherichia coli* ATCC 25922 y 1 mL de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Para verificar la capacidad de diferenciación de bacterias coliformes fecales de las no fecales se colocó 1 mL de *E. coli* ATCC 25922 y 1 mL de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048.



**Figura 18.** Inoculación de las muestras.

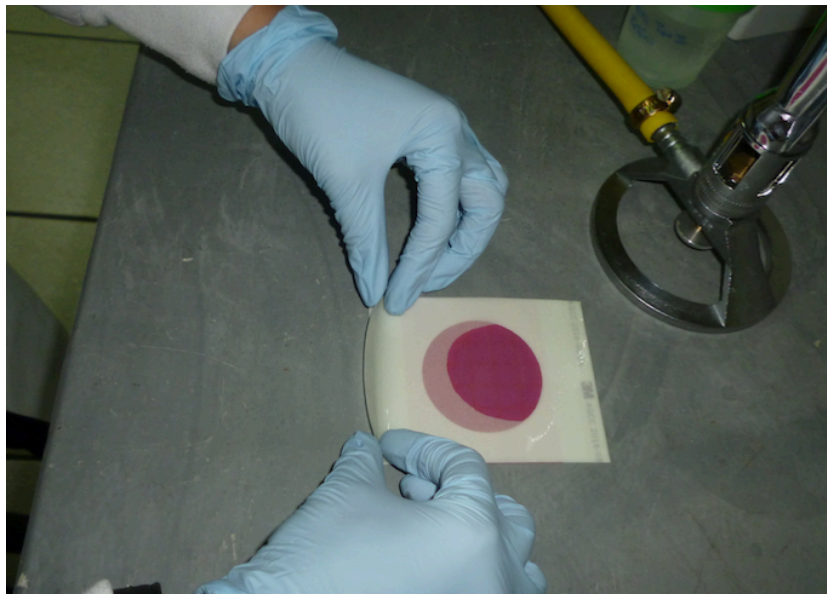
#### **5.2.4.3 Prehidratación de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™**

El uso de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes requiere de un tratamiento previo conocido como prehidratación. Para ello se posicionó la placa sobre una superficie plana, se levantó la película superior y con una pipeta ubicada perpendicularmente se colocó 1 mL del diluyente estéril (3M Food Safety, 2011d; 3M, 2012) el cual puede ser agua destilada o desionizada, en este caso se utilizó agua destilada (Figura 19) (3M, 2012).

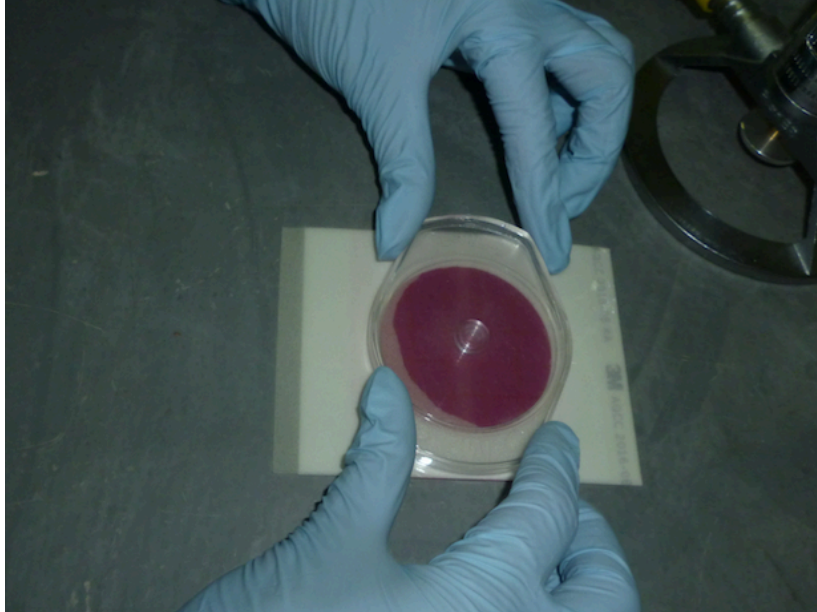


**Figura 19.** Adición de 1 mL de agua destilada en las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™.

Realizado esto se bajó delicadamente la película para evitar el ingreso de aire (Figura 20), se colocó el esparcidor sobre la placa con la cara plana hacia arriba y se presionó (Figura 21). Se esperó mínimo 1 hora antes de usar, para permitir la correcta formación del gel (3M Food Safety, 2011d).



**Figura 20.** Descenso de la película superior de la placa Petrifilm™ Aqua de 3M™.



**Figura 21.** Presión del esparcidor sobre la placa Petrifilm™ Aqua de 3M™.

#### **5.2.4.4 Filtración de las muestras**

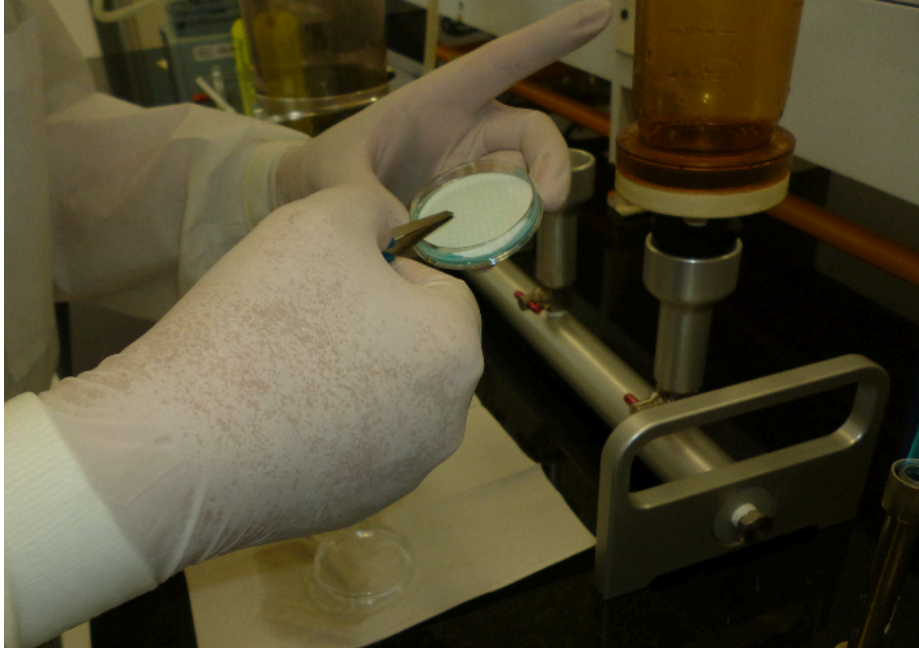
El proceso de filtración lo realizó el laboratorio DISerLAB-PUCE en el área Microbiología de aguas y alimentos, puesto que no se cuenta con equipo de filtración en el área de docencia y dicho proceso se encuentra acreditado en el laboratorio DISerLAB-PUCE.

La cantidad de muestra que se filtró fue de 100 mL (Millipore, 2005), se utilizó membranas de éster celulosa de 47 mm con poros de 0,45  $\mu\text{m}$  (Figura 22) (Millipore, 2005; Instituto de Salud Pública de Chile, 2011; Bridgewater et al., 2012).

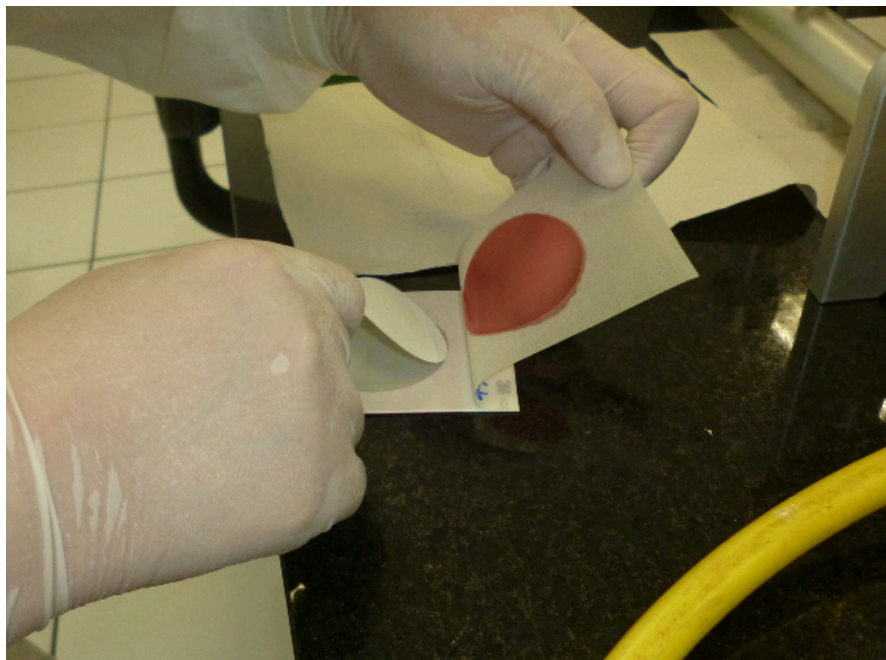


**Figura 22.** Posicionamiento de la membrana de éster celulosa de 47 mm con poros de 0,45  $\mu\text{m}$  para la filtración de la muestra.

Finalizado el proceso de filtración se colocó la membrana en el medio de cultivo adecuado (Millipore, 2005; Bridgewater et al., 2012). El medio de cultivo utilizado para el método convencional fue m-ColiBlue24 (Figura 23) (HACH, 2001; EPA, 2003; HACH, 2012). En el caso de la placa Petrifilm<sup>TM</sup> Aqua se levantó la película superior de la placa y se colocó el filtro en el lugar donde la placa estaba hidratada, se bajó cuidadosamente la película y se presionó delicadamente (Figura 24) (3M Food Safety, 2011d).



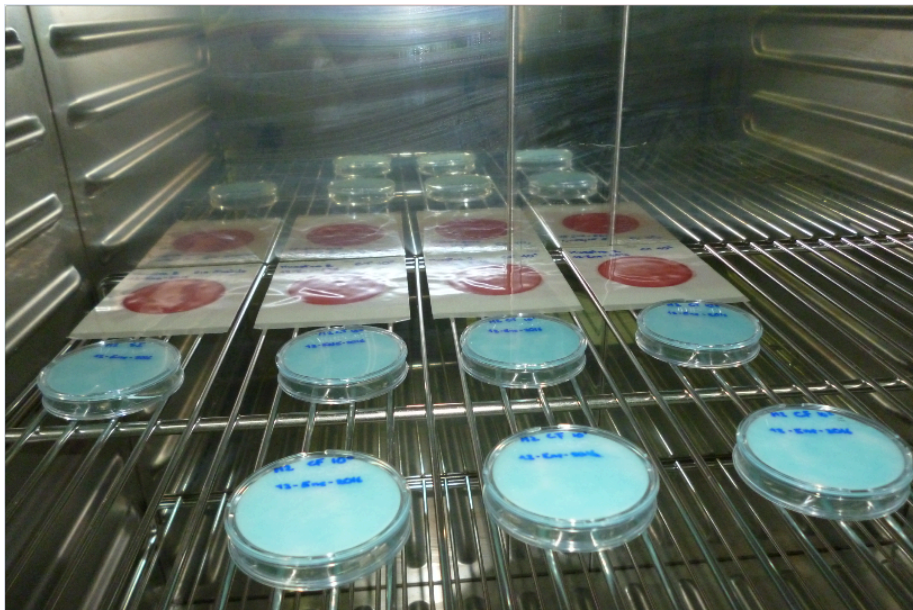
**Figura 23.** Transferencia de la membrana después de filtrar la muestra al medio m-ColiBlue24.



**Figura 24.** Localización de la membrana después de la filtración de la muestra en las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™.

#### 5.2.4.5 Incubación y análisis de las colonias

Se incubó las placas Petri con el medio convencional invertidas (HACH, 2001; EPA, 2003; HACH, 2012; Bridgewater et al., 2012) a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 22 a 24 horas (Bridgewater et al., 2012). Las placas Petrifilm™ Aqua fueron incubadas de manera horizontal (3M Food Safety, 2011d), para la determinación de la productividad y selectividad de las placas Petrifilm™ Aqua se utilizó una temperatura de  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  (Figura 25) y para la diferenciación de coliformes fecales y no fecales la temperatura fue de  $44,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas (Figura 26) (Bridgewater et al., 2012).



**Figura 25.** Incubación a  $35^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 26.** Incubación a 44,5 °C.

El medio m-ColiBlue24, después del tiempo indicado, presentó colonias de color rojo y azul, las colonias de color azul son específicas para *E. coli* y las de color rojo para el resto de bacterias coliformes totales (HACH, 2001; EPA, 2003; HACH, 2012). En las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ las colonias de coliformes totales son de color rojo asociadas a burbujas de gas, además la producción de ácido se ve representado por un halo rosa tenue asociado con las colonias (3M Food Safety, 2011d). El recuento de las colonias se realizó con la ayuda del contador de colonias microbiológicas TODAY'S galaxy 230 (Eq-DIS-50).

### 5.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-student utilizando el paquete estadístico SPSS (García, González, & Jornet, 2010; Rubio & Berlanga, 2012). Este análisis permite la comparación del método tradicional con el método de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™, esto nos indicará si existe diferencia significativa entre ellos (García et al., 2010; Rubio & Berlanga, 2012; Sánchez, 2015). Los resultados obtenidos determinarán si las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes pueden ser empleadas en agua potable.

Es importante mencionar que con fines estadísticos se reemplazó MNPC (muy numeroso para contar) por 1000 UFC/mL y los recuentos estimados estándar (RES) se presentaron con números enteros.

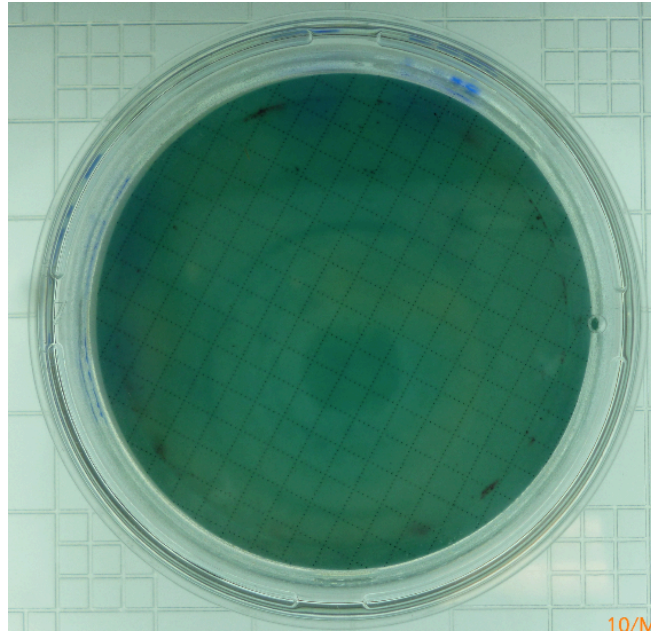
## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se recolectó y analizó 30 muestras de agua potable provenientes de tres sistemas de distribución de la EPMAPS. Cada una de las muestras fue procesada por dos métodos, el método tradicional (Filtración por membrana con m-Colibblue24) y el método de placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes, con el fin de evaluar la productividad y selectividad de dichas placas.

Además, cada una de las muestras fue procesada con dos inóculos distintos en cada uno de los métodos con el objetivo de determinar si, las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes son capaces de diferenciar coliformes fecales de los coliformes totales únicamente variando la temperatura de incubación.

Se realizó un control de cada una de las muestras de agua potable en ambos métodos, con el fin de asegurar que la muestra no presenta microorganismos coliformes que pudiera alterar los resultados obtenidos. Todos los controles de las muestras resultaron sin crecimiento bacteriano.

Sin embargo la muestra 24, incluida aquella sin inóculo, presentó el crecimiento de algunas colonias pequeñas de color rojo en el medio m-Colibblue24 (Figura 27), estas colonias no fueron contabilizadas ya que se presume que no corresponden a bacterias coliformes. HACH (2010) indica que el medio m-Colibblue24 permite el crecimiento de bacterias estresadas por el tratamiento de potabilización del agua por lo cual es posible el crecimiento de bacterias no coliformes que poseen características metabólicas similares a las bacterias coliformes, tales como especies de *Serratia*, especies de *Staphylococcus*, *Providencia stuartii*, entre otras.



**Figura 27.** Crecimiento de bacterias no coliformes en m-Colibblue24.

### **6.1 EVALUACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD Y SELECTIVIDAD DE LAS PLACAS PETRIFILM™ AQUA DE 3M™**

La evaluación se realizó mediante la comparación de los recuentos obtenidos en cada uno de los métodos empleados, para ello se utilizó un inóculo conocido el cual contiene como microorganismo representante de bacterias coliformes a *Escherichia coli* ATCC 25922 y como microorganismo interferente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos en el método convencional (Filtración por membrana con m-Colibblue24) y el método de placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes. En ella se observa que no existió crecimiento de la cepa interferente (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) en ninguno de los dos métodos, esto demuestra la selectividad que poseen ambos métodos. Los recuentos obtenidos del microorganismo deseado también pueden ser apreciados en la tabla 2.

**Tabla 2. Datos para la evaluación de productividad y selectividad.** En la tabla se indica los recuentos obtenidos en ambos métodos además del inóculo colocado y el número de muestra.

Muestra	Inóculo (UFC/mL)	Método Convencional (UFC/mL)		Método Petrifilm™ Aqua (UFC/mL)	
		<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>
N° 1	$1,5 \times 10^0$	< 1	< 1	< 1	< 1
	$1,5 \times 10^1$	< 1	< 1	< 1	< 1
	$1,5 \times 10^2$	1	< 1	4	< 1
N° 2	$1,5 \times 10^0$	4	< 1	1	< 1
	$1,5 \times 10^1$	27	< 1	18	< 1
	$1,5 \times 10^2$	230	< 1	< 1	< 1
N° 3	$1,5 \times 10^0$	3	< 1	5	< 1
	$1,5 \times 10^1$	31	< 1	29	< 1
	$1,5 \times 10^2$	256	< 1	247	< 1
N° 4	$1,5 \times 10^0$	< 1	< 1	3	< 1
	$1,5 \times 10^1$	24	< 1	19	< 1
	$1,5 \times 10^2$	161	< 1	156	< 1
N° 5	$1,5 \times 10^0$	2	< 1	2	< 1
	$1,5 \times 10^1$	32	< 1	29	< 1
	$1,5 \times 10^2$	268	< 1	285	< 1
N° 6	$1,5 \times 10^0$	6	< 1	6	< 1
	$1,5 \times 10^1$	33	< 1	25	< 1
	$1,5 \times 10^2$	234	< 1	229	< 1
N° 7	$1,5 \times 10^0$	1	< 1	< 1	< 1
	$1,5 \times 10^1$	18	< 1	24	< 1
	$1,5 \times 10^2$	250	< 1	246	< 1
N° 8	$1,5 \times 10^0$	1	< 1	< 1	< 1
	$1,5 \times 10^1$	20	< 1	27	< 1
	$1,5 \times 10^2$	183	< 1	132	< 1

**Tabla 2. Datos para la evaluación de la productividad y selectividad.**  
(Continuación...)

Muestra	Inóculo (UFC/mL)	Método Convencional (UFC/mL)		Método Petrifilm™ Aqua (UFC/mL)	
		<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>
Nº9	1,5 x 10 <sup>0</sup>	1	< 1	4	< 1
	1,5 x 10 <sup>1</sup>	23	< 1	22	< 1
	1,5 x 10 <sup>2</sup>	159	< 1	160	< 1
Nº10	1,5 x 10 <sup>0</sup>	1	< 1	15	< 1
	1,5 x 10 <sup>1</sup>	20	< 1	260	< 1
	1,5 x 10 <sup>2</sup>	172	< 1	161	< 1
Nº11	1,5 x 10 <sup>0</sup>	3	< 1	3	< 1
	1,5 x 10 <sup>1</sup>	20	< 1	21	< 1
	1,5 x 10 <sup>2</sup>	189	< 1	157	< 1
Nº12	1,5 x 10 <sup>0</sup>	2	< 1	< 1	< 1
	1,5 x 10 <sup>1</sup>	30	< 1	9	< 1
	1,5 x 10 <sup>2</sup>	225	< 1	134	< 1
Nº13	1,5 x 10 <sup>0</sup>	3	< 1	1	< 1
	1,5 x 10 <sup>1</sup>	14	< 1	17	< 1
	1,5 x 10 <sup>2</sup>	158	< 1	162	< 1
Nº14	1,5 x 10 <sup>0</sup>	1	< 1	2	< 1
	1,5 x 10 <sup>1</sup>	27	< 1	25	< 1
	1,5 x 10 <sup>2</sup>	264	< 1	1	< 1
Nº15	1,5 x 10 <sup>0</sup>	34	< 1	76	< 1
	1,5 x 10 <sup>1</sup>	68	< 1	RES 434	< 1
	1,5 x 10 <sup>2</sup>	MNPC	< 1	MNPC	< 1
Nº16	1,5 x 10 <sup>0</sup>	2	< 1	2	< 1
	1,5 x 10 <sup>1</sup>	24	< 1	27	< 1
	1,5 x 10 <sup>2</sup>	224	< 1	238	< 1
Nº17	1,5 x 10 <sup>0</sup>	2	< 1	4	< 1
	1,5 x 10 <sup>1</sup>	14	< 1	18	< 1
	1,5 x 10 <sup>2</sup>	121	< 1	109	< 1

**Tabla 2. Datos para la evaluación de la productividad y selectividad. (Continuación...)**

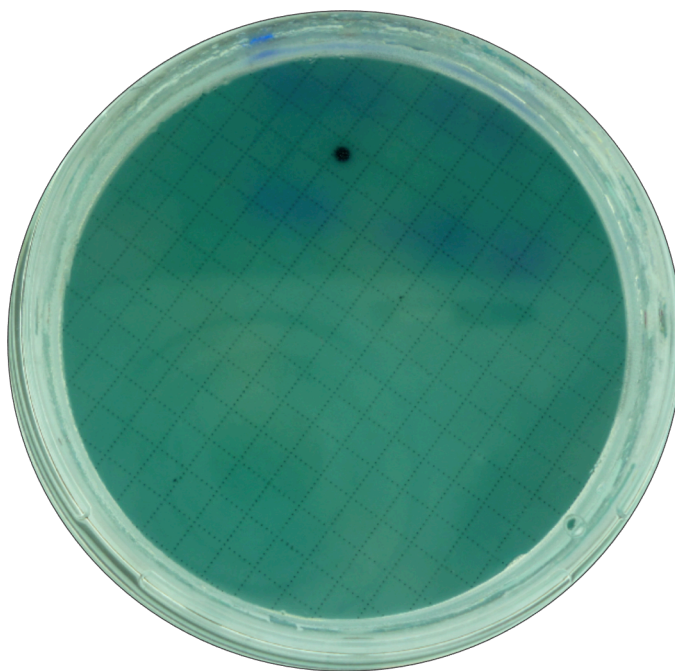
Muestra	Inóculo (UFC/mL)	Método Convencional (UFC/mL)		Método Petrifilm™ Aqua (UFC/mL)	
		<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>
Nº18	$1,5 \times 10^0$	3	< 1	2	< 1
	$1,5 \times 10^1$	23	< 1	22	< 1
	$1,5 \times 10^2$	212	< 1	184	< 1
Nº19	$1,5 \times 10^0$	64	< 1	212	< 1
	$1,5 \times 10^1$	MNPC	< 1	MNPC	< 1
	$1,5 \times 10^2$	MNPC	< 1	MNPC	< 1
Nº20	$1,5 \times 10^0$	2	< 1	< 1	< 1
	$1,5 \times 10^1$	24	< 1	< 1	< 1
	$1,5 \times 10^2$	269	< 1	< 1	< 1
Nº21	$1,5 \times 10^0$	< 1	< 1	< 1	< 1
	$1,5 \times 10^1$	22	< 1	< 1	< 1
	$1,5 \times 10^2$	160	< 1	< 1	< 1
Nº22	$1,5 \times 10^0$	1	< 1	< 1	< 1
	$1,5 \times 10^1$	25	< 1	< 1	< 1
	$1,5 \times 10^2$	166	< 1	< 1	< 1
Nº23	$1,5 \times 10^0$	4	< 1	3	< 1
	$1,5 \times 10^1$	29	< 1	20	< 1
	$1,5 \times 10^2$	266	< 1	238	< 1
Nº24	$1,5 \times 10^0$	1	< 1	1	< 1
	$1,5 \times 10^1$	15	< 1	15	< 1
	$1,5 \times 10^2$	147	< 1	131	< 1
Nº25	$1,5 \times 10^0$	5	< 1	1	< 1
	$1,5 \times 10^1$	23	< 1	19	< 1
	$1,5 \times 10^2$	195	< 1	146	< 1
Nº26	$1,5 \times 10^0$	< 1	< 1	2	< 1
	$1,5 \times 10^1$	10	< 1	19	< 1
	$1,5 \times 10^2$	222	< 1	197	< 1

**Tabla 2. Datos para la evaluación de la productividad y selectividad. (Continuación)**

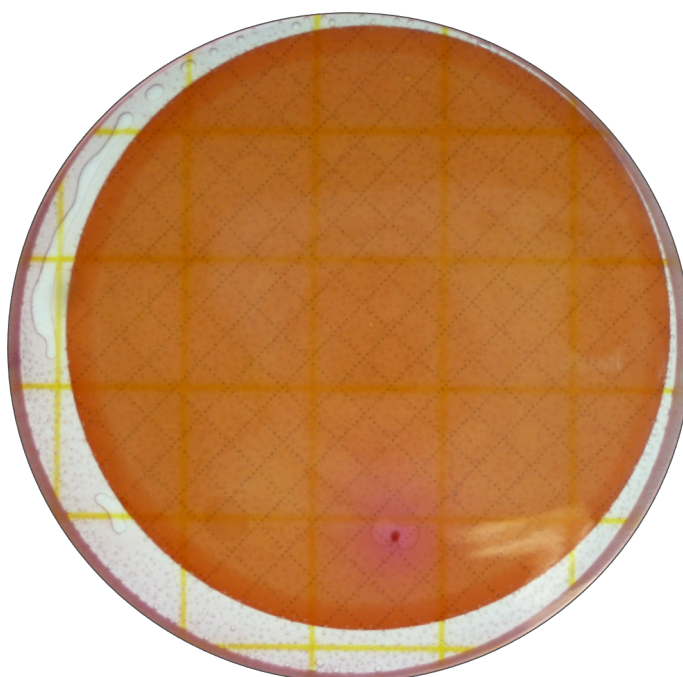
Muestra	Inóculo (UFC/mL)	Método Convencional (UFC/mL)		Método Petrifilm™ Aqua (UFC/mL)	
		<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>
N°27	$1,5 \times 10^0$	2	< 1	2	< 1
	$1,5 \times 10^1$	8	< 1	25	< 1
	$1,5 \times 10^2$	142	< 1	149	< 1
N°28	$1,5 \times 10^0$	1	< 1	1	< 1
	$1,5 \times 10^1$	15	< 1	10	< 1
	$1,5 \times 10^2$	144	< 1	130	< 1
N°29	$1,5 \times 10^0$	2	< 1	2	< 1
	$1,5 \times 10^1$	19	< 1	16	< 1
	$1,5 \times 10^2$	219	< 1	184	< 1
N°30	$1,5 \times 10^0$	3	< 1	2	< 1
	$1,5 \times 10^1$	20	< 1	15	< 1
	$1,5 \times 10^2$	215	< 1	181	< 1

RES, Recuento estimado estándar; MNPC, Muy numeroso para contar.

Las figuras 28 y 29 muestran el crecimiento bacteriano obtenido en el inóculo  $1,5 \times 10^0$  UFC/mL.

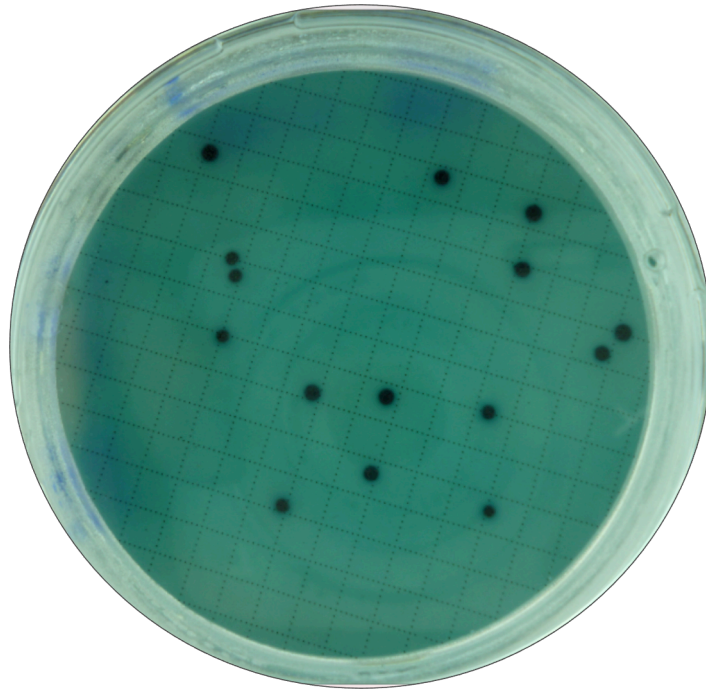


**Figura 28.** Crecimiento bacteriano en el medio m-Colibblue24 del inóculo  $1,5 \times 10^0$  UFC/mL de la muestra N° 7.

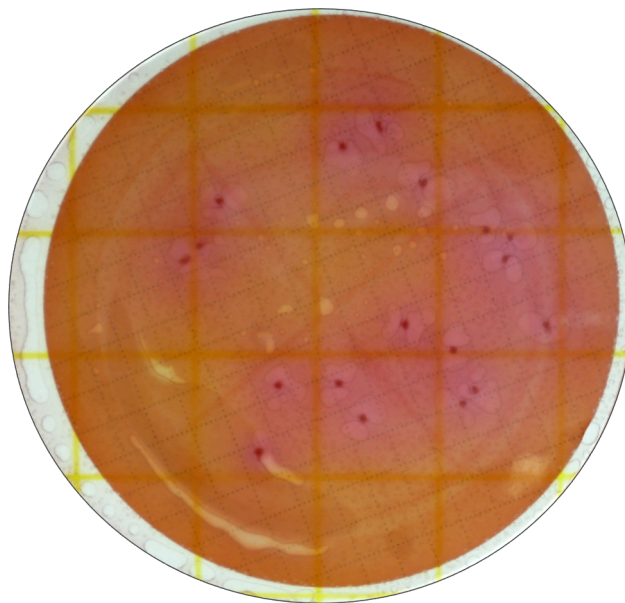


**Figura 29.** Crecimiento bacteriano en placas Petrifilm™ Aqua 3M™ del inóculo  $1,5 \times 10^0$  UFC/mL de la muestra N° 25.

Las figuras 30 y 31 indican el crecimiento bacteriano obtenido en el inóculo  $1,5 \times 10^1$  UFC/mL.

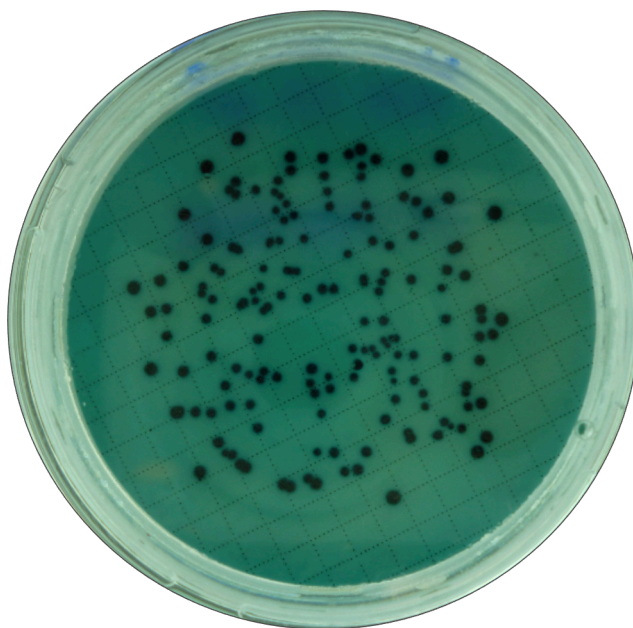


**Figura 30.** Crecimiento bacteriano en el medio m-Colibblue24 del inóculo  $1,5 \times 10^1$  UFC/mL de la muestra N° 28.

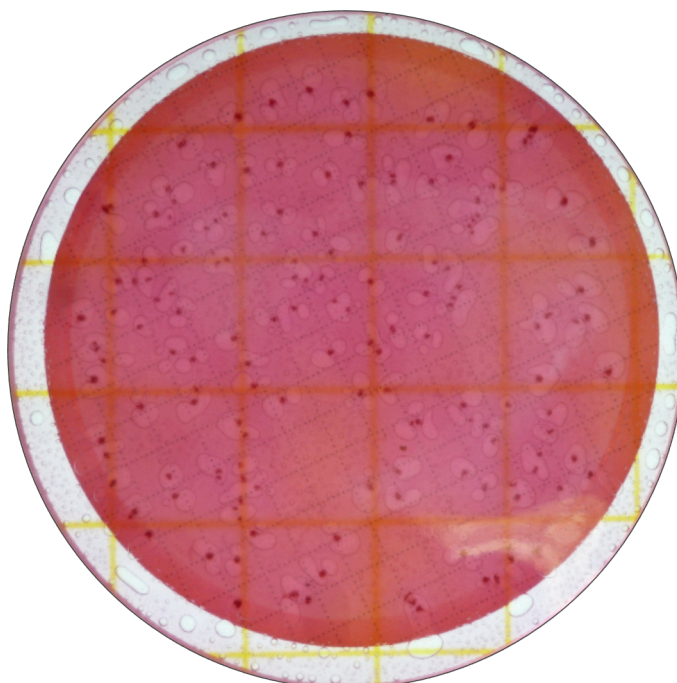


**Figura 31.** Crecimiento bacteriano en placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ del inóculo  $1,5 \times 10^1$  UFC/mL de la muestra N° 2.

En las figuras 32 y 33 se observa el crecimiento bacteriano del inóculo  $1,5 \times 10^2$  UFC/mL.

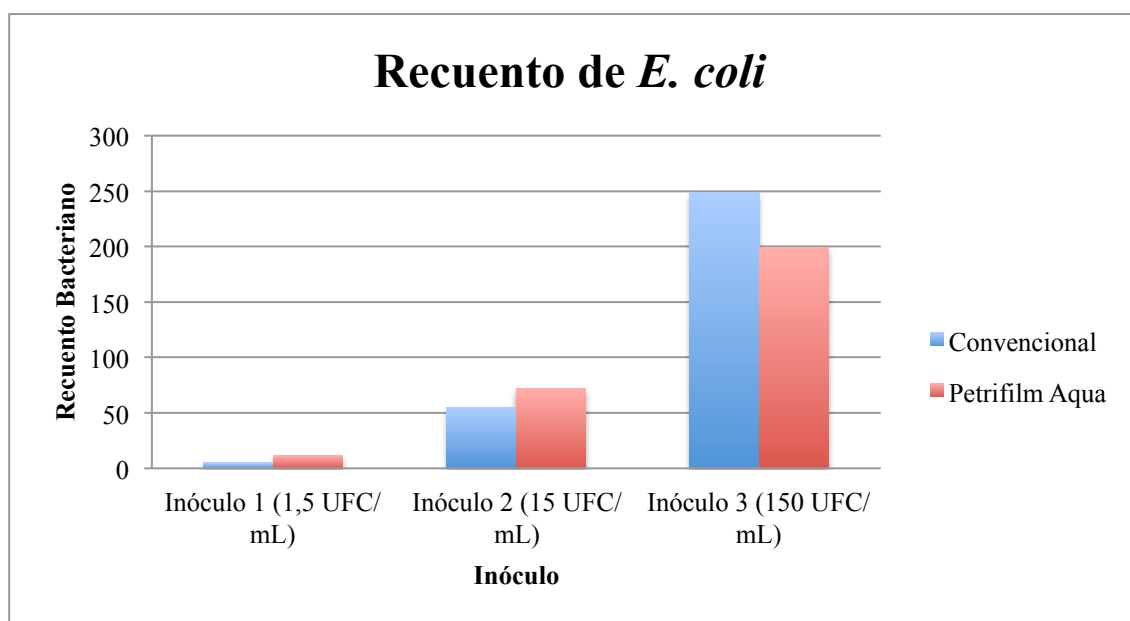


**Figura 32.** Crecimiento bacteriano en el medio m-Colibblue24 del inóculo  $1,5 \times 10^2$  UFC/mL de la muestra N° 13.



**Figura 33.** Crecimiento bacteriano en placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ del inóculo  $1,5 \times 10^2$  UFC/mL de la muestra N° 27.

La figura 34 muestra comparación de las medias de los recuentos obtenidos en los dos métodos estudiados de la cepa deseada (*E. coli* ATCC 25922) en cada uno de los inóculos. Se puede observar que en los inóculos más bajos, el recuento obtenido con las placas Petrifilm™ Aqua es mayor que el método convencional (Filtración por membrana con m-Colibblue24) y que en el inóculo más alto, el recuento obtenido con las placas Petrifilm™ Aqua es menor que en el método convencional.



**Figura 34.** Gráfico de barras comparativo de las dos técnicas.

Los análisis estadísticos muestran que no existe diferencia significativa entre los dos métodos en ninguno de los inóculos, por lo tanto la productividad de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ es comparable con la productividad del método convencional (Filtración por membrana con m-Colibblue24). Esto se puede evidenciar en la tabla 3, en ella se observa la significancia bilateral calculada mediante el uso de la prueba t de student, la cual se encarga de comparar las medias para ver si estas son estadísticamente distintas. Los tres inóculos presentan un valor mayor a 0,05 lo que indica que la diferencia no es significativa.

**Tabla 3. Prueba t de student para recuento de *E. coli* en los métodos estudiados.**

Inóculo	Concentración	Técnica	Media	Prueba t
				Sig. (bilateral)
1	1,5 x 10 <sup>0</sup> UFC/mL	Convencional	5,13	0,395
		Petrifilm™ Aqua	11,73	
2	1,5 x 10 <sup>1</sup> UFC/mL	Convencional	55,27	0,728
		Petrifilm™ Aqua	72,17	
3	1,5 x 10 <sup>2</sup> UFC/mL	Convencional	248,4	0,391
		Petrifilm™ Aqua	198,7	

Los resultados obtenidos en esta investigación fueron similares a los obtenidos por Stepenuck et al. (2010) quien realizó un estudio en el cual comparó los métodos Coliscan Easygel® y 3M™ Petrifilm™ para la evaluación de la calidad del agua superficial utilizada para consumo humano y con fines recreativos mediante el uso de *E. coli* como indicador de contaminación fecal, para ello utilizó laboratorios voluntarios los cuales utilizaban métodos aprobados por EPA. Los resultados obtenidos con las placas 3M™ Petrifilm™ son más cercanos a aquellos obtenidos en los laboratorios que los obtenidos por Coliscan Easygel®, sin embargo la eficacia de ambos métodos es superior al 80% por lo que pueden ser usados como pruebas de cribado. La preferencia de la mayoría de los laboratorios fue el método 3M™ Petrifilm™ sobre el método Coliscan Easygel®.

Existen otros estudios como el de Beloti et al. (2003), en el cual se compararon las placas Petrifilm™ EC (*E. coli*) y HS (*High Sensitivity*) con el método de número más probable (NMP) para su uso en agua clorada y agua natural, los resultados obtenidos demostraron que ambos métodos son comparables además las placas Petrifilm™ representan un método más rápido que MNP. Cabe resaltar que en este estudio se utilizó tiosulfato de sodio al 3% en las muestras cloradas, sin embargo no se apreció una inhibición de las bacterias al utilizarlo con las placas Petrifilm™.

3M Food Safety (2011c) realizó un estudio en el cual se quiso comprobar la productividad y selectividad de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes utilizando como matriz agua embotellada, para ello se utilizó 30 cepas de bacterias coliformes y 20 cepas de bacterias no coliformes. Los resultados obtenidos fueron el crecimiento de las 30 cepas de coliformes con lo cual se comprobó la productividad de las

placas 3M™ Petrifilm™ Aqua y su selectividad se comprobó ya que no existió crecimiento de ninguna cepa de bacterias no coliformes.

## **6.2 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LAS PLACAS PETRIFILM™ AQUA DE 3M™ PARA DIFERENCIAR ENTRE COLIFORMES FECALES Y TOTALES MEDIANTE VARIACIÓN DE TEMPERATURA**

La determinación se realizó mediante el uso de un inóculo conocido, el representante de coliformes fecales fue *Escherichia coli* ATCC 25922 y el representante de los coliformes totales no fecales fue *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048.

La temperatura de incubación de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ fue de  $44,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas, esta temperatura fue escogida para permitir el crecimiento de las bacterias coliformes fecales e inhibir el crecimiento del resto de coliformes totales.

La tabla 4 muestra los recuentos resultantes en el método convencional (Filtración por membrana con m-Colibblue24) y el método de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes. Se debe aclarar que en el método de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ se tomó como *E. coli* a aquellas colonias que corresponden con las características indicadas por el fabricante, ser rojas presentar halo rosa tenue y estar asociadas a burbuja. En dichas placas se presentó el crecimiento de otras colonias las cuales fueron puntiformes y presentaban un pequeño halo rosa tenue pero no se encontraban asociadas a burbujas de gas, dichas colonias se muestran en la tabla como colonias atípicas termotolerantes, estas colonias corresponden a *Enterobacter aerogenes*. Por medio de controles realizados previamente se determinó que sus características se ven alteradas por la temperatura de  $44,5^{\circ}\text{C}$ . Cabe mencionar que en el medio m-Colibblue24 se desarrollan colonias azules características de *E. coli* y colonias rojas representantes del resto de bacterias coliformes, en este caso, correspondientes a *E. aerogenes*. El control realizado al agua potable utilizada como matriz demuestra que esta no contenía bacterias coliformes.

**Tabla 4. Datos para diferenciación entre coliformes fecales y coliformes totales mediante temperatura.** En esta tabla se indica los recuentos obtenidos en ambos métodos además del inóculo colocado y el número de muestra.

Muestra	Inóculo (UFC/mL)	Método Convencional (UFC/mL)		Método Petrifilm™ Aqua (UFC/mL)	
		<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>E. coli</i>	Colonias atípicas termotolerantes
Nº 1	$1,5 \times 10^0$	< 1	8	< 1	3
	$1,5 \times 10^1$	< 1	47	< 1	31
	$1,5 \times 10^2$	< 1	RES 596	< 1	RES 226
Nº 2	$1,5 \times 10^0$	1	1	< 1	3
	$1,5 \times 10^1$	26	42	30	< 1
	$1,5 \times 10^2$	189	211	114	< 1
Nº 3	$1,5 \times 10^0$	6	6	< 1	< 1
	$1,5 \times 10^1$	27	72	27	< 1
	$1,5 \times 10^2$	232	334	160	< 1
Nº 4	$1,5 \times 10^0$	2	9	4	< 1
	$1,5 \times 10^1$	16	48	17	24
	$1,5 \times 10^2$	156	269	115	16
Nº 5	$1,5 \times 10^0$	2	11	1	3
	$1,5 \times 10^1$	23	4	5	27
	$1,5 \times 10^2$	190	305	85	11
Nº 6	$1,5 \times 10^0$	1	3	1	2
	$1,5 \times 10^1$	20	27	15	16
	$1,5 \times 10^2$	195	275	101	30
Nº 7	$1,5 \times 10^0$	1	10	2	1
	$1,5 \times 10^1$	19	49	30	11
	$1,5 \times 10^2$	143	362	126	17
Nº 8	$1,5 \times 10^0$	2	3	< 1	< 1
	$1,5 \times 10^1$	< 1	2	8	12
	$1,5 \times 10^2$	145	250	110	< 1

**Tabla 4. Datos para la diferenciación entre coliformes fecales y coliformes totales mediante temperatura. (Continuación...)**

Muestra	Inóculo (UFC/mL)	Método Convencional (UFC/mL)		Método Petrifilm™ Aqua (UFC/mL)	
		<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>E. coli</i>	Colonias atípicas termotolerantes
Nº9	$1,5 \times 10^0$	2	2	1	2
	$1,5 \times 10^1$	17	38	13	27
	$1,5 \times 10^2$	151	342	127	15
Nº10	$1,5 \times 10^0$	2	8	1	2
	$1,5 \times 10^1$	29	34	15	7
	$1,5 \times 10^2$	205	220	113	5
Nº11	$1,5 \times 10^0$	2	6	2	4
	$1,5 \times 10^1$	24	40	14	17
	$1,5 \times 10^2$	153	262	106	12
Nº12	$1,5 \times 10^0$	5	2	2	1
	$1,5 \times 10^1$	24	29	17	10
	$1,5 \times 10^2$	214	122	136	33
Nº13	$1,5 \times 10^0$	4	4	1	5
	$1,5 \times 10^1$	20	38	14	17
	$1,5 \times 10^2$	171	251	136	23
Nº14	$1,5 \times 10^0$	3	2	< 1	< 1
	$1,5 \times 10^1$	30	31	24	15
	$1,5 \times 10^2$	241	233	162	28
Nº15	$1,5 \times 10^0$	4	6	5	4
	$1,5 \times 10^1$	34	47	27	24
	$1,5 \times 10^2$	176	232	153	17
Nº16	$1,5 \times 10^0$	4	1	1	1
	$1,5 \times 10^1$	25	21	20	11
	$1,5 \times 10^2$	222	123	140	34
Nº17	$1,5 \times 10^0$	1	2	2	3
	$1,5 \times 10^1$	20	32	10	30
	$1,5 \times 10^2$	115	151	94	39

**Tabla 4. Datos para la diferenciación entre coliformes fecales y coliformes totales mediante temperatura. (Continuación...)**

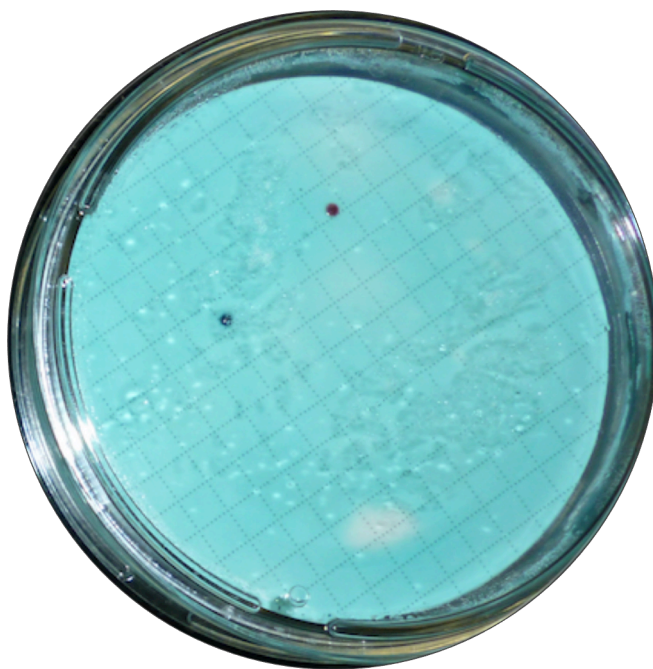
Muestra	Inóculo (UFC/mL)	Método Convencional (UFC/mL)		Método Petrifilm™ Aqua (UFC/mL)	
		<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>E. coli</i>	Colonias atípicas termotolerantes
N°18	$1,5 \times 10^0$	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC
	$1,5 \times 10^1$	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC
	$1,5 \times 10^2$	196	167	145	< 1
N°19	$1,5 \times 10^0$	53	235	MNPC	MNPC
	$1,5 \times 10^1$	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC
	$1,5 \times 10^2$	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC
N°20	$1,5 \times 10^0$	1	7	< 1	< 1
	$1,5 \times 10^1$	30	26	< 1	< 1
	$1,5 \times 10^2$	227	155	< 1	< 1
N°21	$1,5 \times 10^0$	4	4	< 1	< 1
	$1,5 \times 10^1$	17	31	< 1	< 1
	$1,5 \times 10^2$	159	229	< 1	< 1
N°22	$1,5 \times 10^0$	2	2	< 1	< 1
	$1,5 \times 10^1$	11	27	< 1	< 1
	$1,5 \times 10^2$	176	169	< 1	< 1
N°23	$1,5 \times 10^0$	3	4	5	2
	$1,5 \times 10^1$	28	28	14	15
	$1,5 \times 10^2$	225	203	119	26
N°24	$1,5 \times 10^0$	2	< 1	1	< 1
	$1,5 \times 10^1$	14	< 1	< 1	< 1
	$1,5 \times 10^2$	148	< 1	101	24
N°25	$1,5 \times 10^0$	< 1	1	1	2
	$1,5 \times 10^1$	15	26	13	6
	$1,5 \times 10^2$	173	227	96	13
N°26	$1,5 \times 10^0$	3	1	< 1	2
	$1,5 \times 10^1$	18	29	3	23
	$1,5 \times 10^2$	183	155	52	24

**Tabla 4. Datos para la diferenciación entre coliformes fecales y coliformes totales mediante temperatura. (Continuación)**

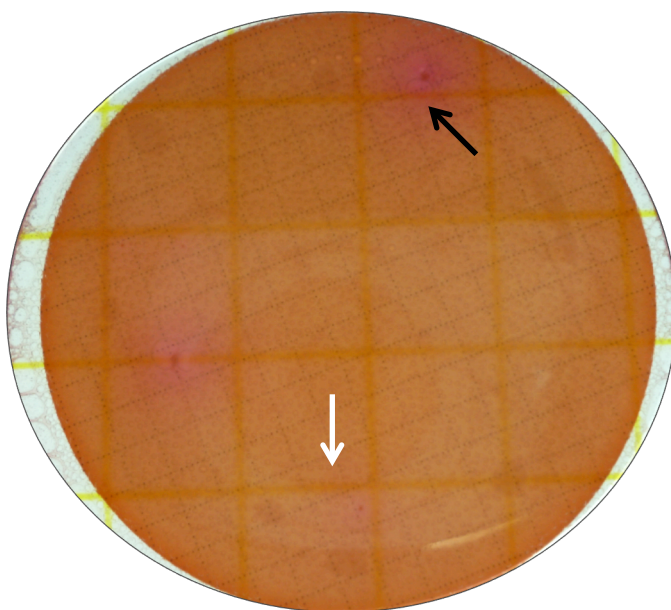
Muestra	Inóculo (UFC/mL)	Método Convencional (UFC/mL)		Método Petrifilm™ Aqua (UFC/mL)	
		<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>E. coli</i>	Colonias atípicas termotolerantes
N°27	$1,5 \times 10^0$	2	1	< 1	< 1
	$1,5 \times 10^1$	11	35	9	9
	$1,5 \times 10^2$	115	181	57	4
N°28	$1,5 \times 10^0$	1	2	1	3
	$1,5 \times 10^1$	17	33	7	16
	$1,5 \times 10^2$	144	136	80	17
N°29	$1,5 \times 10^0$	2	4	< 1	5
	$1,5 \times 10^1$	23	42	10	12
	$1,5 \times 10^2$	207	257	98	16
N°30	$1,5 \times 10^0$	1	2	2	< 1
	$1,5 \times 10^1$	19	18	7	9
	$1,5 \times 10^2$	147	207	81	24

RES, Recuento estimado estándar; MNPC, Muy numeroso para contar.

Las figuras 35 y 36 muestran el crecimiento de las colonias de *E. coli* y *E. aerogenes* en el inóculo  $1,5 \times 10^0$  UFC/mL.

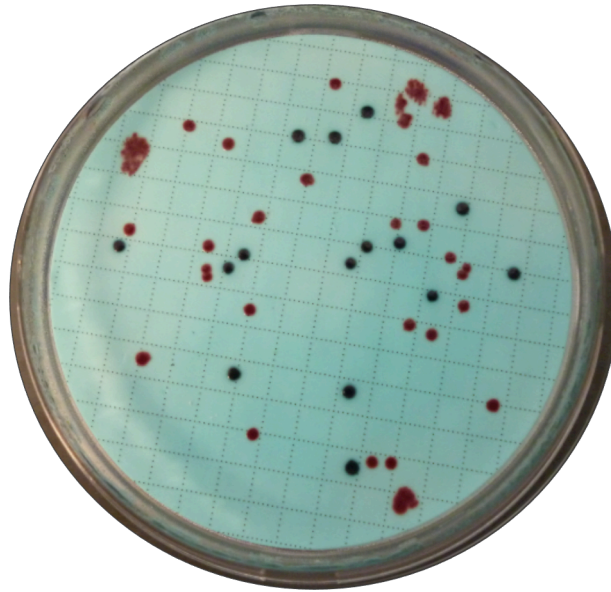


**Figura 35.** Crecimiento bacteriano de *E. coli* (colonia azul) y *E. aerogenes* (colonia roja) en m-Colibblue24 del inóculo  $1,5 \times 10^0$  UFC/mL de la muestra N° 2.

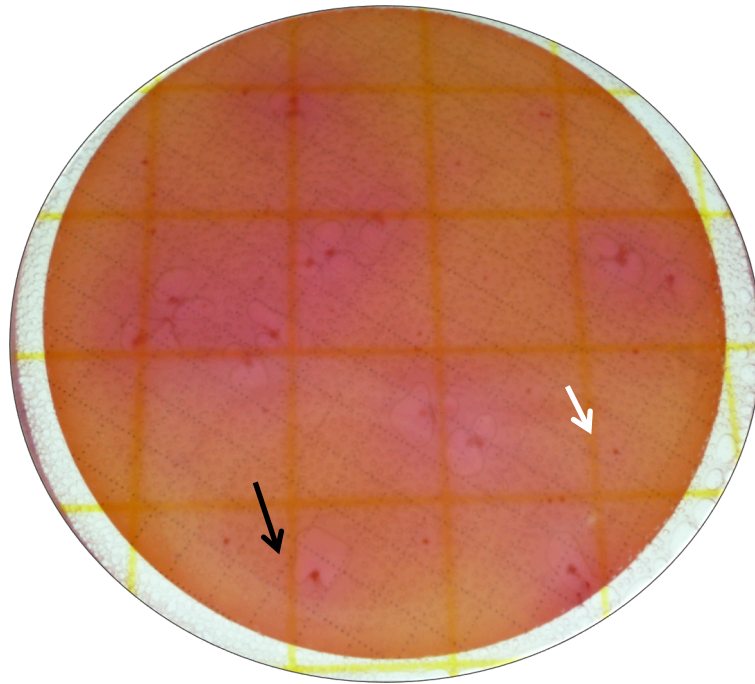


**Figura 36.** Crecimiento bacteriano de *E. coli* (flecha negra) y *E. aerogenes* (flecha blanca) en placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ del inóculo  $1,5 \times 10^0$  UFC/mL a  $44,5^\circ\text{C}$  de la muestra N° 7.

Las figuras 37 y 38 muestran el crecimiento de las colonias de *E. coli* y *E. aerogenes* en el inóculo  $1,5 \times 10^1$  UFC/mL.

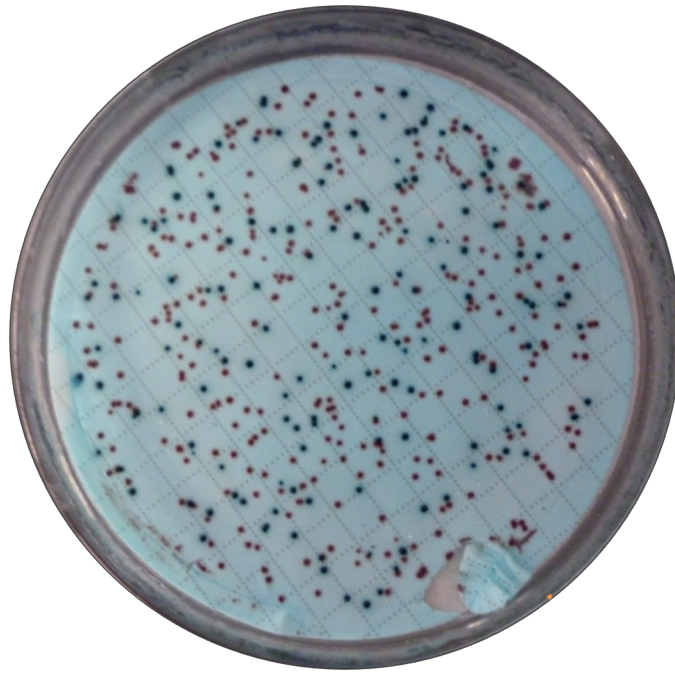


**Figura 37.** Crecimiento bacteriano de *E. coli* (colonias azules) y *E. aerogenes* (colonias rojas) en m-Colibblue24 del inóculo  $1,5 \times 10^1$  UFC/mL de la muestra N° 25.

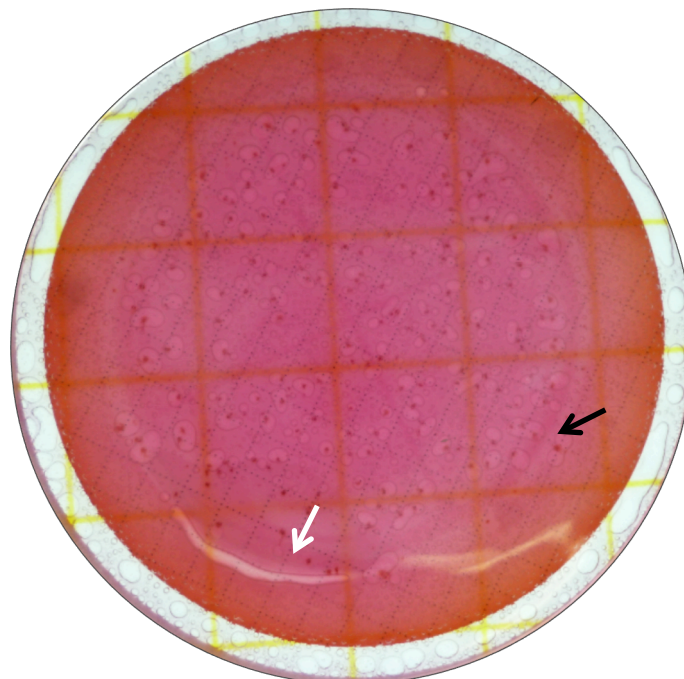


**Figura 38.** Crecimiento bacteriano de *E. coli* (flecha negra) y *E. aerogenes* (flecha blanca) en placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ del inóculo  $1,5 \times 10^1$  UFC/mL a 44,5°C de la muestra N° 6.

Las figuras 39 y 40 muestran el crecimiento de las colonias de *E. coli* y *E. aerogenes* en el inóculo  $1,5 \times 10^2$  UFC/mL.

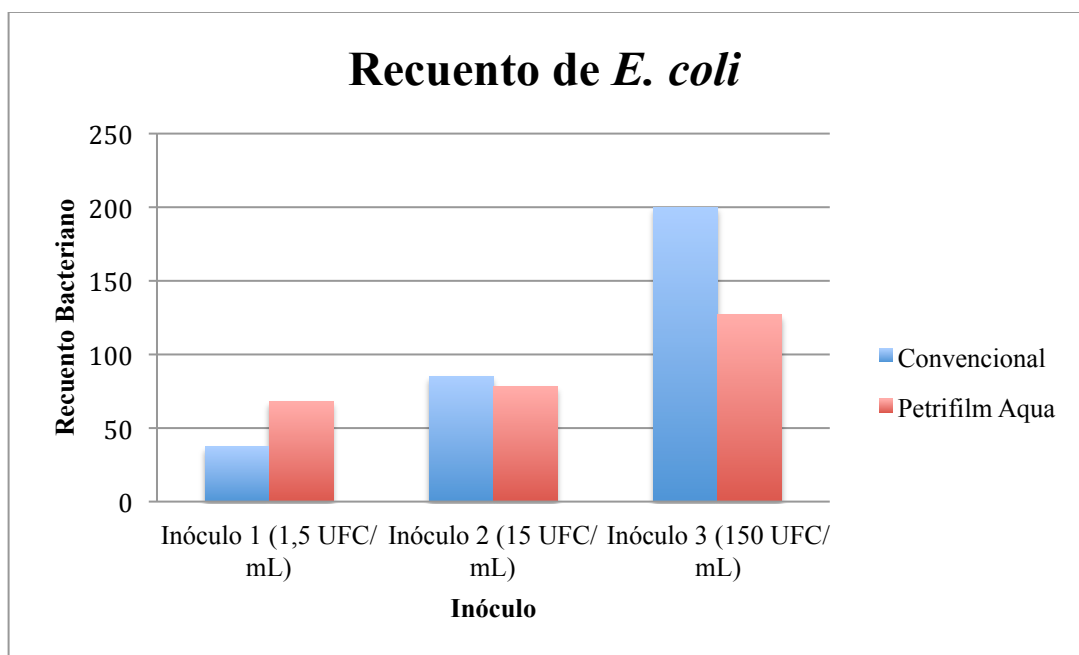


**Figura 39.** Crecimiento bacteriano de *E. coli* (colonias azules) y *E. aerogenes* (colonias rojas) en m-Colibblue24 del inóculo  $1,5 \times 10^2$  UFC/mL de la muestra N° 28.



**Figura 40.** Crecimiento bacteriano de *E. coli* (flecha negra) y *E. aerogenes* (flecha blanca) en placas Petrifilm<sup>TM</sup> Aqua de 3M<sup>TM</sup> del inóculo  $1,5 \times 10^2$  UFC/mL a 44,5°C de la muestra N° 15.

La figura 41 muestra la comparación entre las medias de los recuentos de *E. coli* en ambas técnicas, en esta se puede evidenciar que a medida que aumenta el inóculo, la capacidad de recuperación de las placas Petrifilm™ Aqua es menor.



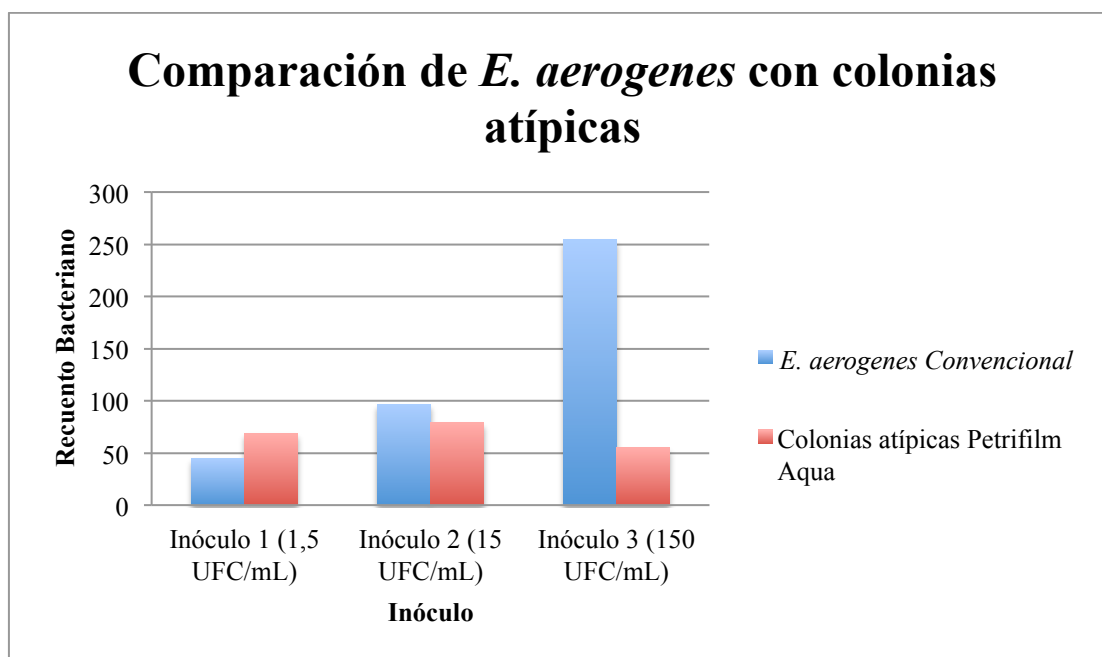
**Figura 41.** Gráfico de barras comparativo de las dos técnicas para el recuento de *E. coli*.

La Tabla 5 muestra los análisis estadísticos, en ellos se puede observar que en los tres inóculos la significancia es mayor a 0,05 por lo tanto la diferencia entre ambas técnicas para el recuento de *E. coli* no es significativa estadísticamente.

**Tabla 5.** Prueba t de student para recuento de *E. coli* en los métodos estudiados para selectividad mediante temperatura.

Inóculo	Concentración	Técnica	Media	Prueba t
				Sig. (bilateral)
1	1,5 x 10 <sup>0</sup> UFC/mL	Convencional	37,2	0,594
		Petrifilm™ Aqua	67,77	
2	1,5 x 10 <sup>1</sup> UFC/mL	Convencional	85,23	0,915
		Petrifilm™ Aqua	78,3	
3	1,5 x 10 <sup>2</sup> UFC/mL	Convencional	199,93	0,092
		Petrifilm™ Aqua	126,9	

La figura 42 muestra la comparación entre las medias de los recuentos obtenidos en el método convencional (Filtración por membrana con m-Colibblue24), las cuales corresponden a *Enterobacter aerogenes* y las medias de los recuentos obtenidos en las placas Petrifilm™ Aqua de las colonias atípicas termotolerantes. Se puede evidenciar que la capacidad de recuperación de las placas Petrifilm™ Aqua se ve afectada por el incremento en el inóculo.



**Figura 42.** Gráfico de barras comparativo entre *E. aerogenes* y colonias atípicas termotolerantes.

La comparación estadística de ambos métodos se realizó mediante la prueba t de student. La tabla 6 muestra los análisis estadísticos realizados, en ella se puede observar que no existe diferencia significativa en los inóculos 1 y 2, mientras que en el inóculo 3 la diferencia es altamente significativa. Esto indica que la productividad de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ se ve alterada por el incremento de temperatura, especialmente en inóculos altos, en los cuales no son capaces de recuperar el inóculo inicial.

**Tabla 6. Prueba t de student para recuento de *Enterobacter aerogenes* y colonias atípicas termotolerantes para selectividad mediante temperatura.**

Inóculo	Concentración	Técnica	Media	Prueba t
				Sig. (bilateral)
1	1,5 x 10 <sup>0</sup> UFC/mL	Convencional	44,9	0,685
		Petrifilm™ Aqua	68,27	
2	1,5 x 10 <sup>1</sup> UFC/mL	Convencional	96,6	0,784
		Petrifilm™ Aqua	78,97	
3	1,5 x 10 <sup>2</sup> UFC/mL	Convencional	254,13	0
		Petrifilm™ Aqua	55,13	

Allen, Dillman, & Weigl (2007) realizaron un estudio para evaluar la efectividad de métodos estandarizados para muestras de agua a temperaturas no estandarizadas, para ello usaron 15 cepas de *E. coli* de diferentes orígenes. Los métodos evaluados fueron Petrifilm™, Colilert®, método EPA 1604, Agar MacConkey II y Medio EC para múltiples posillos de fermentación; las temperaturas escogidas fueron 23, 30, 37, 40 y 45 °C. Los resultados mostraron que la mayoría de cepas de *E. coli* son capaces de crecer a 45°C, que los métodos estandarizados han sido optimizados para su uso a 35 ± 0,2 °C, sin embargo, se evidencia crecimiento en un rango de temperatura de 22 a 42 °C y que al igual que en este estudio la variación de temperatura a 45 °C afecta el desempeño de los medios utilizados.

Existen varios estudios en los que la temperatura de incubación ha sido utilizada como un método selectivo para diferenciar coliformes fecales del resto de bacterias presentes en la muestra. Sánchez-Pérez, Vargas-Morales, & Méndez-Sánchez (2000) realizaron un estudio en el cual se quiso evaluar la calidad bacteriológica del agua de consumo humano en Chiapas, México, para ello se utilizó el método de filtración por membrana en el cual se verificó la calidad bacteriológica mediante la detección de coliformes totales y coliformes fecales. El análisis de coliformes fecales se realizó incubando en baño maría a 44 ± 0,5 °C con el objetivo de aumentar la probabilidad de detectar este grupo, posteriormente se confirmó los resultados positivos mediante la prueba de fermentación de lactosa con un medio selectivo para *E. coli* el cual también fue incubado a 44 ± 0,5 °C. Los resultados obtenidos demostraron que solo el 31% contaba con una buena calidad bacteriológica del

agua, además de las 46 muestras de agua evaluadas para coliformes fecales, 36 resultaron positivas con crecimiento de *E. coli*.

De la misma manera Delgado, Hernández, Hormigo, Hardisson, & Alvarez (1992) realizaron un estudio en el cual se buscaba realizar un análisis microbiológico del agua de piscinas con dos diferentes orígenes, el uno de abastecimiento público y el otro con agua de mar. En ella se evaluaron distintos grupos bacterianos entre los cuales podemos destacar coliformes totales y fecales, ambos se realizaron con el método de filtración de membrana con el mismo medio de cultivo, únicamente se diferenció su procedimiento por la temperatura de incubación la cual fue 37 °C para coliformes totales y 44,5 °C para coliformes fecales. Los resultados mostraron que la piscina con agua proveniente del mar no cumple con las condiciones sanitarias establecidas, ya que presentó valores fuera de los límites de coliformes totales, fecales y de otras bacterias estudiadas.

## 7 CONCLUSIONES

1. La comparación del método convencional (Filtración por membrana con m-Colibblue24) con el método de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes indica que la capacidad de recuperación de dichas placas es aceptable, tomando en cuenta el inóculo empleado en cada una de las muestras. También se puede apreciar que el microorganismo interferente no se desarrolló en ninguno de los dos métodos empleados, lo que demuestra la selectividad de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes.
2. La prueba de t de student demuestra que al utilizar como matriz agua potable, la capacidad de detección de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes es comparable con el método tradicional, siendo así posible su uso en el análisis de este tipo de agua.
3. La comparación de los métodos para determinar la capacidad de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para diferenciar entre coliformes fecales y totales mediante variación de temperatura, muestra que existe una disminución de la capacidad de recuperación de las placas Petrifilm™ Aqua a medida que el inóculo aumenta. Esto sugiere que su uso en tales condiciones se ve limitado para muestras de agua cuyos antecedentes demuestren que su nivel de contaminación es bajo.
4. El aumento de la temperatura en las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ provoca que el crecimiento de algunas colonias se vea afectado. En este ensayo se utiliza un inóculo conformado únicamente de bacterias coliformes, lo cual permite la comparación de *Enterobacter aerogenes* con las colonias atípicas termotolerantes. El alterar el factor temperatura no es suficiente para que las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes, sean capaces de diferenciar entre coliformes totales y fecales.
5. Las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ establecen que las características de las bacterias coliformes debe ser: colonias rojas con halo y asociadas a burbujas. Al variar únicamente la temperatura, en el análisis de muestras de agua, no permite la diferenciación entre colonias de bacterias coliformes fecales y coliformes totales, ya que el crecimiento de las colonias coliformes no termotolerantes se ve afectado, es por ello que es factible el recuento de bacterias coliformes fecales pero no el recuento del resto de coliformes.

## 8 RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar un ensayo en el que se verifique la cantidad óptima con la que el caldo Lethen neutraliza el cloro residual, así como la posibilidad del uso de otros agentes reductores distintos a caldo Lethen y tiosulfato de sodio al 3% que puedan ser utilizados para neutralizar el cloro residual sin interferir con el desarrollo bacteriano en las placas Petrifilm<sup>TM</sup> Aqua de 3M<sup>TM</sup>.
2. El alterar el factor temperatura no es suficiente para que las placas Petrifilm<sup>TM</sup> Aqua de 3M<sup>TM</sup> diferencien entre coliformes fecales y totales por este motivo si se quiere lograr este objetivo se recomienda realizar un ensayo más profundo en el cual se utilicen diferentes cepas bacterianas no pertenecientes a coliformes que sean capaces de crecer en las placas Petrifilm<sup>TM</sup> Aqua de 3M<sup>TM</sup>.

## 9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 3M. (s.f.a). *Placa Petrifilm<sup>MR</sup> para Recuento E. coli y Coliformes Ficha Técnica*. Lima, Perú. Recuperado de [https://system.netsuite.com/core/media/media.nl?id=4019&c=3339985&h=213791686acc9e9f7d61&\\_xt=.pdf](https://system.netsuite.com/core/media/media.nl?id=4019&c=3339985&h=213791686acc9e9f7d61&_xt=.pdf)
- 3M. (s.f.b). *Quick Swab Tórula para muestreo Ficha Técnica*. Chile. Recuperado de <http://www.siaasesoria.com.mx/FICHA%20TECNICA%20QUICK%20SWAB.pdf>
- 3M. (s.f.c). *Cinta Para Autoclave Control Químico Externo Ficha Técnica*. Chile. Recuperado de <http://multimedia.3m.com/mws/media/314365O/msurg-ncintaautoclave.pdf>
- 3M Food Safety. (2011a). *Placas 3M<sup>TM</sup> Petrifilm<sup>TM</sup> Aqua para análisis de agua. Análisis de agua: Llega una nueva ola. Colombia*. Recuperado de [http://solutions.3m.com/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?lmd=1332535098000&locale=pt\\_BR&assetType=MMM\\_Image&assetId=1319223705677&blobAttribute=ImageFile](http://solutions.3m.com/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?lmd=1332535098000&locale=pt_BR&assetType=MMM_Image&assetId=1319223705677&blobAttribute=ImageFile)
- 3M Food Safety. (2011b). *Máxima productividad de técnicos. Guía de interpretación Placas 3M<sup>TM</sup> Petrifilm<sup>TM</sup> Aqua para Recuento de Enterobacterias. Placas 3M<sup>TM</sup> Petrifilm<sup>TM</sup> Aqua para Recuento de Mohos y Levaduras. Estados Unidos*. Recuperado de [http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm\\_Aqua\\_guias.pdf](http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_Aqua_guias.pdf)
- 3M Food Safety. (2011c). *Boletín Técnico. Placa 3M<sup>TM</sup> Petrifilm<sup>TM</sup> Aqua para Recuento de Coliformes resumen de desempeño. Estados Unidos de América*. Recuperado de <http://www.siaasesoria.com.mx/AQUA%20BOLETIN%20TECNICO%20DE%20COLIFORMES.pdf>
- 3M Food Safety. (2011d). *Máxima Productividad de Técnicos. Guía de Interpretación. 3M<sup>TM</sup> Petrifilm<sup>TM</sup> Aqua de Microorganismos Heterotróficos (AQHC). 3M<sup>TM</sup> Petrifilm<sup>TM</sup> Aqua Coliformes (AQCC). Estados Unidos de América*. Recuperado de [http://solutions.3m.co.uk/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?lmd=1357818779000&locale=en\\_GB&assetType=MMM\\_Image&assetId=1319245341698&blobAttribute=ImageFile](http://solutions.3m.co.uk/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?lmd=1357818779000&locale=en_GB&assetType=MMM_Image&assetId=1319245341698&blobAttribute=ImageFile)
- 3M. (2004). *Placas Petrifilm<sup>MR</sup> para el Recuento de E. coli y Coliformes Totales Recomendaciones de uso. Estados Unidos de América*. Recuperado de <http://microlabscr.com/resources/PEC.pdf>
- 3M. (2008). *Placas Petrifilm<sup>TM</sup> para Recuento de E. coli/Coliformes Recomendaciones de uso. México*. Recuperado de [http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm\\_guias.pdf](http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf)
- 3M. (2012). *3M Petrifilm<sup>TM</sup> Aqua Coliform Count Plate Product Instruccions*. Recuperado de <http://www.aniara.com/pdf/INS-A3M-6457-A3M-6458.pdf>

- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. (2012). *Código Alimentario Argentino: Capítulo XII: Bebidas Hidricas, Agua y Agua Gasificada*. Buenos Aires, Argentina. Recuperado de [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas\\_alimentos\\_caa.asp](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp)
- Agbar agua. (2014). *Cloro Residual*. Obtenido de <http://www.aquagest-regiondemurcia.es/img/contenidos/1/ficha-sobre-calidad-del-agua.pdf>
- Aguirre, C., González, E. y Guerrero, H. (2015). *Elaboración y Aplicación de Metodologías Analíticas e Instrumentales para la Cuantificación de Parámetros Físicoquímicos en Agua y su Aplicación en el Laboratorio de Ingeniería Química*, FIA / UES (Tesis de grado). Recuperado de Universidad Católica de El Salvador de: <http://ri.ues.edu.sv/7559/1/Elaboración%20y%20aplicación%20de%20metodolog%C3%ADas%20anal%C3%ADticas%20e%20instrumentales%20para%20la%20cuantificación%20de%20parámetros%20físicoqu%C3%ADmicos%20en%20agua%20y%20su%20aplicación%20en%20el%20Laboratorio%20de%20Ingenier%C3%ADa%20Qu%C3%ADmica,%20FIA%20UES.pdf>
- Alba, J. J., Ortega, J. L., Álvarez, G., Cervantes, M., Ruiz, E., Urtiz, N., & Martínez, A. (2013). Riesgos microbiológicos en agua de bebida: una revisión clínica. *Química Viva*, 3, 215-233. Recuperado de <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v12n3/martinez.pdf>
- Allen E, Dillman L, Weigl B, 2007. *Efficacy of Standard Methods for Detection of Fecal Contamination at a Range of Nonstandard Temperatures*. Seattle, WA: USAID and PATH. Recuperado de [https://www.path.org/publications/files/TS\\_allen\\_water\\_testing\\_pos.pdf](https://www.path.org/publications/files/TS_allen_water_testing_pos.pdf)
- Analiza Calidad. (2005). Microorganismos indicadores. Madrid, España. Recuperado de <http://www.analizacalidad.com/docftp/fi168arf2005-1.pdf>
- Andrade, A. M., & Benavides, E. A. (2010). *Propuesta de plan de manejo de los Manantiales ubicados en las quebradas Tumbibitze y Seca (Cantón Antonio Ante)* (Tesis). Recuperada de <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/194>
- Arcos Pulido, M. d., Ávila de Navia, S. L., Estupiñán Torres, S. M., & Gómez Prieto, A. C. (2005). Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. 69-79. Recuperado de [http://www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA/ARTREVIS2\\_4.pdf](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTREVIS2_4.pdf)
- Ashbolt, N. J., Grabow, W. O., & Snozzi, M. (2001). *Indicators of microbial water quality. World Health Organization (WHO). Water Quality: Guidelines, Standards and Health*, 289-316. Recuperado de [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/iwachap13.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/iwachap13.pdf)
- Bain, R., Bartram, J., Elliott, M., Matthews, R., McMahan, L., Tung, R., ... Gundry, S. (2012). A Summary Catalogue of Microbial Drinking Water Tests for Low and Medium Resource Settings. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9 (5), 1609-1625. doi: 10.3390/ijerph9051609
- Beloti, V., de Souza, J. A., Ferreira Barros, M. d., Nero, L. A., Rodrigues de Mattos, M., Vieira Gusmão, V., y otros. (2003). *Evaluation of Petrifilm™ EC and HS for total coliforms and Escherichia coli enumeration in water. Brazilian Journal of Microbiology* (34), 301-304. Recuperado de <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v34n4/v34n4a02.pdf>

- Benítez, S., Flores, M., Jarrín, C., Landázuri, C., Luzuriaga, S., Moreabi, M., ... Vela, M.S. (2014). Historia del Agua en Quito. *Ortiz A., Editor & Recopilador*. Quito, Ecuador.
- Bridgewater, L., Rice, E., Baird, R., Eaton, A. & Clesceri, L. (Eds.). (2012). *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater* (22 Ed.). Washington, DC, Estados Unidos de América: American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation.
- Carrillo, E.M., & Lozano, A.M. (2008). *Validación del método de detección de coliformes totales y fecales en agua potable utilizando agar Chromocult*. (Disertación de licenciatura). Recuperada de la Pontificia Universidad Javeriana de Colombia de la página: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis203.pdf>
- Casani, S., Rouhany, M., & Knöchel, S. (2005). A discussion paper on challenges and limitations to water reuse and hygiene in the food industry. *Water Research*, 39 (6), 1134-1146. doi:10.1016/j.watres.2004.12.015
- Condorchem Envitech. (2015). Historia sobre el tratamiento del agua potable. Recuperado de <http://blog.condorchem.com/historia-sobre-el-tratamiento-del-agua-potable/>
- Damikouka, I., Katsiri, A., & Tzia, C. (2007). Application of HACCP principles in drinking water treatment. *Desalination*, 210, 138-145. doi: 10.1016/j.desal.2006.05.039
- Delgado, M., Hernández García, A., Hormigo, F., Hardisson de la Torre, A., & Alvarez Marante, R. (1992). Análisis microbiológico y fisicoquímico del agua de piscinas de la isla de Tenerife. *Revista Sanidad Higiene Pública* (5-6), 281-289. Recuperado de [http://www.msssi.gob.es/eu/biblioPublic/publicaciones/recursos\\_propios/resp/revista\\_cdrom/VOL66/66\\_5\\_281.pdf](http://www.msssi.gob.es/eu/biblioPublic/publicaciones/recursos_propios/resp/revista_cdrom/VOL66/66_5_281.pdf)
- EPMAPS Agua de Quito. (s.f.). Nuestra Historia. Recuperado de <http://www.aguaquito.gob.ec/quienes-somos/nuestra-historia>
- Etienne, G. (2009). *Potabilización y Tratamiento de Agua, Diseños con Exel*. Recuperado de <http://www.bvsde.paho.org/bvsacg/fulltext/potabytrat.pdf>
- Fernández-Crehuet, M., Moreno, O., & Pérez, J. A. (2001). Determinación de cloro residual. Método del DPD. *Higiene y Sanidad Ambiental* (1), 6-7. Recuperado de <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd27/higsand13.pdf>
- García Bellido, R., González Such, J., & Jornet Meliá, J. (2010). SPSS: Prueba T. (G. d. València, Recopilador) Valencia, España. Recuperado de [http://www.uv.es/innomide/spss/SPSS/SPSS\\_0701b.pdf](http://www.uv.es/innomide/spss/SPSS/SPSS_0701b.pdf)
- Gesche, E., Vallejos, A., & Saez, M. (2003). Eficiencia de Anaerobios sulfito-reductores como indicadores de calidad sanitaria de agua. Método de Número Más Probable (NMP). *Archivos de medicina veterinaria*, 35 (1): <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2003000100011>
- HACH. (2001). *Membrane Filtration: Coliforms, Enterococci and Pseudomonas*. Estados Unidos de América. Recuperado de [http://www.watersanitationhygiene.org/References/EH\\_KEY\\_REFERENCES/WATER/Water%20Quality/Water%20Quality%20Testing/Biological%20Water%20Testing/Membrane%20Filtration%20\(Hach\).pdf](http://www.watersanitationhygiene.org/References/EH_KEY_REFERENCES/WATER/Water%20Quality/Water%20Quality%20Testing/Biological%20Water%20Testing/Membrane%20Filtration%20(Hach).pdf)

- HACH. (2003). *Bacteria, Coliform Membrane Filtration Method*. United States of America. Recuperado de <https://www.usabluebook.com/images/pdf/723392.pdf>
- HACH. (2010). *Expected reactions of various microorganisms with m-ColiBlue24*. Recuperado de [http://www.fondriest.com/pdf/hach\\_mcb24\\_trouble.pdf](http://www.fondriest.com/pdf/hach_mcb24_trouble.pdf)
- HACH. (2012). *Coliforms-Total and E. coli. USEPA Membrane Filtration Method*. Recuperado de <http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CB4QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.hach.com%2Fasset-get.download-en.jsa%3Fcode%3D56438&ei=cIfJVLbrH8P7sAT7mIGACQ&usq=AFQjCNEWdJPBTPNt8OI4FE9b5TcD2u-CUg>
- Herrera, M. L., & Campos, M. (2005). Control de la Calidad para un Laboratorio de Microbiología. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños*, 40 (1), 9-15. Recuperado de [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1017-85462005000100002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1017-85462005000100002&script=sci_arttext)
- Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. (2007). Determinación de *Escherichia coli* y coliformes totales en agua por el método de filtración por membrana en agar Chromocult. Recuperado de <http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38155/Coliformes+totales+y+E.+coli+en+Agua+Filtración+por+Membrana.pdf/5414795c-370e-48ef-9818-ec54a0f01174>
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2009). *Procedimiento control de calidad interno analitos cualitativos del área de bacteriología*. Recuperado de <http://www.ispch.cl/sites/default/files/PR%20CCI%20Bacteriolog%C3%ADa.pdf>
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2011). *Procedimiento Determinación de Acanthamoeba por membrana Filtrante en Matriz Agua*. Recuperado de [http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento\\_tecnico/2011/11/PRT-712.06.089%20V%200%20Acanthamoeba%20x%20filtracion.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2011/11/PRT-712.06.089%20V%200%20Acanthamoeba%20x%20filtracion.pdf)
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2012). *Procedimiento Evaluación de Medios de Cultivo*. Recuperado de [http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento\\_tecnico/2011/11/PRT-712.00-105%20V2%20Evaluación%20medios%20cultivo%20ISO%2011133.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2011/11/PRT-712.00-105%20V2%20Evaluación%20medios%20cultivo%20ISO%2011133.pdf)
- Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN]. (2012). Aguas. Muestreo para Exámen Microbiológico. NTE INEN 1105:1983. Primera. Quito, Ecuador.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización (2014). Agua Potable. Requisitos. NTE INEN 1108. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Instituto Nacional de Gestión Sanitaria. (2013). *Guía para el manejo del autoclave en la Central de esterilización del Hospital Universitario de Ceuta. Madrid, España*. Recuperado de <http://www.ingesa.msssi.gob.es/estadEstudios/documPublica/internet/pdf/Autoclave.pdf>
- Kilungo, A. P. (2013). *Drinking Water Quality Monitoring*. (Tesis de doctorado). Recuperado de Universidad de Arizona de la página: [https://arizona.openrepository.com/arizona/bitstream/10150/306073/1/azu\\_etd\\_12967\\_sip1\\_m.pdf](https://arizona.openrepository.com/arizona/bitstream/10150/306073/1/azu_etd_12967_sip1_m.pdf)

- LeChevallier, M., & Kwok-Keung, A. (2004). *Water Treatment and Pathogen Control: Process Efficiency in Achieving Safe Drinking Water*. World Health Organization and IWA Publishing. Recuperado de [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/en/watreatpath.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/en/watreatpath.pdf)
- Lenntech BV. (s.f.). Historia desinfección del agua. Recuperado de <http://www.lenntech.es/procesos/desinfeccion/historia/historia-desinfeccion-agua.htm>
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., & Parker, J. (2004). *Brock, Biología de los microorganismos* (10ª Ed.). Illinois, Estados Unidos de América: Prentice Hall.
- Malbrán, C. G. (2001). *Manual de Procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos*. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Buenos Aires, Argentina. Recuperado de [http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/Argentina-LevelII/Manual\\_procedimientos.pdf](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/Argentina-LevelII/Manual_procedimientos.pdf)
- MicroBiologics. (2007). *Product Insert*. Estados Unidos de América. <http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0CCwQFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww.biotrading.com%2Fen%2Fdownload%2F67&ei=ROKxVImQHYWdNuiqgcAE&usg=AFQjCNFFo0m10YO1Yj38Tj2gdXnyDB4nZg>
- Millipore. (2005). Análisis Microbiológico.
- Ministerio de la Protección Social y de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. (2007). *Resolución Conjunta 2115 de 2007*. Recuperado de <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=30008>
- Moya-Egoavil, R., Alvarado-Salinas, P., & Vásquez-Valles, N. (2013). Supervivencia de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* en agua potable de cuatro distritos de Trujillo (Perú). *REBIOLEST*, 1 (2), e34-e42. Recuperado de <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/ECCBB/article/view/475/453>
- NHMRC, NRNNC. (2011). *Australian Drinking Water Guidelines Paper 6 National Water Quality Management Strategy*. National Health and Medical Research Council & National Resource Management Ministerial Council Commonwealth of Australia, Canberra. Recuperado de [http://www.nhmrc.gov.au/\\_files\\_nhmrc/publications/attachments/eh52\\_aust\\_drinking\\_water\\_guidelines\\_update\\_131216.pdf](http://www.nhmrc.gov.au/_files_nhmrc/publications/attachments/eh52_aust_drinking_water_guidelines_update_131216.pdf)
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2006). *Guías para la calidad del agua potable. Primer apéndice de la tercera edición. Volumen 1. Suiza*. Recuperado de [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3\\_es\\_full\\_lowsres.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowsres.pdf)
- Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (1987). *Guías para la calidad del Agua Potable. 2*. Washington D.C., Estados Unidos. <http://cidbimena.desastres.hn/pdf/spa/doc8586/doc8586-a.pdf>
- OPS. (1988). *Guías para la Calidad del Agua Potable: Vol. 3. Control de calidad del agua potable en sistemas de abastecimiento para pequeñas comunidades*. Recuperado de [http://books.google.com.ec/books?id=X9QgncMbnsYC&pg=PR5&lpg=PR5&dq=Gu%C3%ADas+para+la+calidad+del+agua+Potable.+Volumen+2,+criterios+relativos+a+la+salud+y+otra+informaci%C3%B3n+base&source=bl&ots=nCHaNIpH7l&sig=\\_](http://books.google.com.ec/books?id=X9QgncMbnsYC&pg=PR5&lpg=PR5&dq=Gu%C3%ADas+para+la+calidad+del+agua+Potable.+Volumen+2,+criterios+relativos+a+la+salud+y+otra+informaci%C3%B3n+base&source=bl&ots=nCHaNIpH7l&sig=_)

RevZjiexNYzl\_QPwLN8iBU4ae0&hl=es-419&sa=X&ei=arX2U\_TXJMi\_sQTCqoGgBA&ved=0CCgQ6AEwAg#v=onepage&q=Gu%C3%ADas%20para%20la%20calidad%20del%20agua%20Potable.%20Volumen%20%2C%20criterios%20relativos%20a%20la%20salud%20y%20otra%20informaci3n%20base&f=false

- Pasterán, F., & Galas, M. (2008). *Manual de Procedimientos Sensibilidad a los antimicrobianos en Salmonella, Shigella y E. coli*. Recuperado de [http://bvs.panalimentos.org/local/File/manual\\_sensibilidad\\_salmshigecoli\\_2008.pdf](http://bvs.panalimentos.org/local/File/manual_sensibilidad_salmshigecoli_2008.pdf)
- Picazo, J. (Ed.). (2000). *Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. España. Recuperado de [http://coesant-seimc.org/documents/MétodosBásicos\\_SensibilidadAntibióticos.pdf](http://coesant-seimc.org/documents/MétodosBásicos_SensibilidadAntibióticos.pdf)
- Pozo, M. J. (2012). *Optimización de la Planta de Tratamiento de Agua Potable de "El Troje". Empresa pública metropolitana de agua potable y Saneamiento*. Recuperado de [http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CB4QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.aguaquito.gob.ec%2FRespaldoJoomla%2Findex.php%3Foption%3Dcom\\_docman%26task%3Ddoc\\_download%26gid%3D1859%26Itemid%3D197&ei=HHWCVMrWHbLIsAS-uICgCg&usq=AFQjCNGBCmvYaDUwJBfdxJwT65nBObWEoA](http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CB4QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.aguaquito.gob.ec%2FRespaldoJoomla%2Findex.php%3Foption%3Dcom_docman%26task%3Ddoc_download%26gid%3D1859%26Itemid%3D197&ei=HHWCVMrWHbLIsAS-uICgCg&usq=AFQjCNGBCmvYaDUwJBfdxJwT65nBObWEoA)
- Presidencia de la República. (s.f.). Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua. Ecuador.
- Quintos-Escalante, M., Méndez, M. E., & Herrera, A. (2012). *Determinacion de Microorganismos Coliformes en Agua para consumo humano. Durango, México*. Recuperado de <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8840/DETERMINACIÓN%20DE%20MICROORGANISMOS%20COLIFORMES%20%20EN%20AGUA%20PARA%20CONSUMO%20HUMANO.pdf?sequence=1>
- Redondo, M. (2008). *Validación de una metodología alternativa para el análisis de coliformes totales y fecales en muestras de agua mediante la técnica de Número Más Probable (NMP) y determinación de la vida útil de muestras de agua almacenadas en refrigeración* (Disertación de licenciatura). Recuperado de Universidad de Costa Rica de la página: <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/1590/1/29180.pdf>
- Redondo-Solano, M., & Arias, M. L. (2011). Comparación de métodos para el análisis de coliformes totales y fecales en muestras de agua mediante la técnica de Número Más Probable (NMP). *Cuadernos de investigación*, 3 (2), 219-225. Recuperado de <http://investiga.uned.ac.cr/revistas/index.php/cuadernos/article/view/151/43>
- República del Ecuador Asamblea Nacional. (2014). Ley Orgánica de Recursos Hídricos, Usos y Aprovechamiento del Agua. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Rios, K.R., & Riquez, I.K. (2007). *Determinación del recuento microbiano de productos derivados de la maca (Lepidium meyenii W.) utilizando placas Petrifilm y su comparación con el método convencional*. (Disertación de licenciatura). Recuperada de Universidad Nacional Mayor de San Marcos de la página: [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1095/1/riquez\\_ai.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1095/1/riquez_ai.pdf)

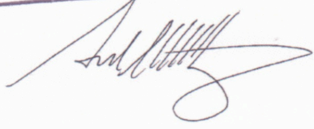
- Rubio Hurtado, M. J., & Berlanga Silvente, V. (2012). Cómo aplicar las pruebas paramétricas bivariadas t de Student y ANOVA en SPSS. Caso práctico. *Revista d'Innovació i Recerca en Educació*, V (2), 83-100. DOI:10.1344/reire2012.5.2527
- Sacsquispe, R.E. & Velásquez, J. (2002). *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión*. Lima, Perú. Recuperado de [http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/-1/manua\\_l%20sensibilidad.pdf](http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/-1/manua_l%20sensibilidad.pdf)
- Salzman, J. (2005). Thirst: A Short History of Drinking Water. Recuperado de [http://scholarship.law.duke.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=2043&context=faculty\\_scholarship](http://scholarship.law.duke.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=2043&context=faculty_scholarship)
- Sánchez-Pérez, H. J., Vargas-Morales, M. G., & Méndez-Sánchez, J. D. (2000). Calidad bacteriológica del agua para consumo humano en zonas de alta marginación de Chiapas. *Salud Pública de México*, 42 (5), 397-406. Recuperado de <http://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/6257>
- Sánchez Turcios, R. A. (2015). t-Student. Usos y abusos. *Revista Médica de Cardiología*, 26 (1), 59-61. Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmc/v26n1/v26n1a9.pdf>
- Scharlab. (s.f.). *Cepas*. Recuperado de <http://www.cienytech.com/catalogos/Microbiologia/Cepas.pdf>
- Silva, E., Ortiz, J. E., Murillo, C., Nava, G., Cárdenas, O., Peralta, A., ... Otálora, A. (2010). Estudio de caracterización de la calidad microbiológica y fisicoquímica del agua utilizada en la industria de alimentos, Colombia, 2007. *Biomédica*, 30, 421-431. Recuperado de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-41572010000300015&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-41572010000300015&script=sci_arttext)
- Stanfield, G., Lechevallier, M. & Snozzi, M. (2003). Chapter 5: Treatment Efficiency. World Health Organization and Organisation for Economic Cooperation and Development (Eds.) *Assessing Microbial Safety of Drinking Water*. IWA Publishing. Recuperado de [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/9241546301full.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/9241546301full.pdf)
- Stepenuck, K. F., Wolfson, L. G., Liukkonen, B. W., Iles, J. M., & Grant, T. S. (2010). *Volunteer monitoring of E. coli in streams of the upper Midwestern United States: a comparison of methods*. *Environ Monit Assess*. DOI 10.1007/s10661-010-1483-7
- Suárez, J., Hernández, F. y López, D. (2013). Determinación de Cloro Residual Libre por el Método DPD. Laboratorio Aguas los Patios. UFPS. Recuperado de <https://es.scribd.com/document/318571050/Informe-de-Determinacion-de-Cloro-Residual-Libre-Por-El-Metodo-Dpd>
- Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2008). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*, 663-671. Recuperado de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
- United States Environmental Protection Agency. (1999). *Drinking Water Treatment*. Recuperado de [http://www.atsdr.cdc.gov/HAC/PHA/reports/sunflowerarmy\\_03042002ks/images/ppd2.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/HAC/PHA/reports/sunflowerarmy_03042002ks/images/ppd2.pdf)
- United States Environmental Protection Agency. (2000). *The History of Drinking Water Treatment*. Recuperado de

<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/200024H9.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=2000+Thru+2005&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5Czyfiles%5CIndex%20Data%5C00thru05%5CTxt%5C0000001%5C20024H9.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL>

- United States Environmental Protection Agency. (2002). *Health Risks from Microbial Growth and Biofilms in Drinking Water Distribution Systems*. Washington DC, Estados Unidos de América. Recuperado de [http://www.epa.gov/ogwdw/disinfection/tcr/pdfs/whitepaper\\_tcr\\_biofilms.pdf](http://www.epa.gov/ogwdw/disinfection/tcr/pdfs/whitepaper_tcr_biofilms.pdf)
- United States Environmental Protection Agency. (2003). *Total Coliforms and E. coli Membrane Filtration Method*. Estados Unidos de América. Recuperado de [http://www.epa.gov/ogwdw/disinfection/lt2/pdfs/guide\\_lt2\\_mlmanual\\_appendix-o.pdf](http://www.epa.gov/ogwdw/disinfection/lt2/pdfs/guide_lt2_mlmanual_appendix-o.pdf)
- United States Environmental Protection Agency. (2012). *Water Treatment Process*. Recuperado de [http://water.epa.gov/learn/kids/drinkingwater/watertreatmentplant\\_index.cfm](http://water.epa.gov/learn/kids/drinkingwater/watertreatmentplant_index.cfm)
- Universidad Nacional Autónoma de México. (2012). Microorganismos indicadores. Obtenido de [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/2Indicadores\\_6422.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/2Indicadores_6422.pdf)
- Wiley, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2008). *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology* (7<sup>o</sup> edición ed.). New York, Estados Unidos de América: McGraw-Hill Companies.
- World Health Organization [WHO]. (2011). *Guidelines for Drinking-water Quality. Fourth edition*. Recuperado de [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151_eng.pdf)
- Yu, H., & Bruno, J. G. (1996). Immunomagnetic-Electrochemiluminescent Detection of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella typhimurium* in Foods and Environmental Water Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (2), 587–592. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167823/pdf/620587.pdf>

## 10 ANEXOS

Anexo 1. Certificado de análisis de *Escherichia coli* ATCC 25922

Performance																																																																																																	
<p><b>Specifications</b>  <b>Microorganism Name:</b> Escherichia coli  <b>Catalog Number:</b> 0335  <b>Lot Number:</b> 335-147  <b>Reference Number:</b> ATCC® 25922™*  <b>Purity:</b> &lt; 0.1% Total Pellet CFU  <b>Recovery:</b> &gt; 1000 CFUs per Pellet  <b>Passage from Reference:</b> 4</p>	<p><b>Expiration Date:</b> 2016/8/31  <b>Release Information:</b>  <b>Quality Control Technologist:</b> Carol J Stanoch  <b>Release Date:</b> 2014/9/15</p>																																																																																																
<p><b>Macroscopic Features:</b>            2 colony types, both are gray &amp; beta hemolytic; one is circular to irregular, convex, slightly erose edge &amp; smooth; other is larger, irregular, low convex, erose edge &amp; rough</p> <p><b>Microscopic Features:</b>            Gram negative straight rod</p>	<p><b>Medium:</b>            SBAP</p> <p><b>Method:</b>            Gram Stain (1)</p>																																																																																																
<p><b>ID System:</b> Vitek GN (1)</p> <p><b>Phenotypic Features</b></p> <table border="0"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Phenotypic Features</th> <th style="text-align: center;">Results</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>ADONITOL</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>L-ARABITOL</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>D-CELLOBIOSE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>BETA-GALACTOSIDASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>H2S PRODUCTION</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Glutamyl Arylamidase pNA</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>D-GLUCOSE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>FERMENTATION/GLUCOSE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>BETA-GLUCOSIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>D-MALTOSE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-MANNITOL</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-MANNOSE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>BETA-XYLOSIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>BETA-Alanine arylamidase pNA</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>L-Proline ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>LIPASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>PALATINOSE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Tyrosine ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>UREASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>D-SORBITOL</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>SACCHAROSE/SUCROSE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>D-TAGATOSE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-TREHALOSE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>CITRATE (SODIUM)</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>MALONATE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>5-KETO-D-GLUCONATE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>L-LACTATE alkalization</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>ALPHA-GLUCOSIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>SUCCINATE alkalization</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>BETA-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>ALPHA-GALACTOSIDASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>PHOSPHATASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Glycine ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>ORNITHINE DECARBOXYLASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>LYSINE DECARBOXYLASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>L-HISTIDINE assimilation</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>COURMARATE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>BETA-GLUCORONIDASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>L-MALATE assimilation</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>ELLMAN</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>L-LACTATE assimilation</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> </tbody> </table>	Phenotypic Features	Results	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-	ADONITOL	-	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-	L-ARABITOL	-	D-CELLOBIOSE	-	BETA-GALACTOSIDASE	+	H2S PRODUCTION	-	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-	Glutamyl Arylamidase pNA	-	D-GLUCOSE	+	GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	-	FERMENTATION/GLUCOSE	+	BETA-GLUCOSIDASE	-	D-MALTOSE	+	D-MANNITOL	+	D-MANNOSE	+	BETA-XYLOSIDASE	-	BETA-Alanine arylamidase pNA	-	L-Proline ARYLAMIDASE	+	LIPASE	-	PALATINOSE	-	Tyrosine ARYLAMIDASE	+	UREASE	-	D-SORBITOL	+	SACCHAROSE/SUCROSE	-	D-TAGATOSE	+	D-TREHALOSE	+	CITRATE (SODIUM)	-	MALONATE	-	5-KETO-D-GLUCONATE	-	L-LACTATE alkalization	+	ALPHA-GLUCOSIDASE	-	SUCCINATE alkalization	+	BETA-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	-	ALPHA-GALACTOSIDASE	+	PHOSPHATASE	-	Glycine ARYLAMIDASE	-	ORNITHINE DECARBOXYLASE	+	LYSINE DECARBOXYLASE	+	L-HISTIDINE assimilation	-	COURMARATE	+	BETA-GLUCORONIDASE	+	O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	-	Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	-	L-MALATE assimilation	-	ELLMAN	+	L-LACTATE assimilation	-	<p><b>Other Features / Challenges: Results</b></p> <p>(1) Oxidase(Kovacs): negative            Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive            (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 16 - 22 mm            (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 26 mm            (1) SXT (1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px 0;"> <p style="text-align: center;"><b>MEDIRAL INC S.A.</b>              Distribuidor para el Ecuador de  <b>MICROBIOLOGICS</b>              Registro Sanitario AD 541-04-13</p> </div> <p style="text-align: center;">              Brad Goskowicz, President              AUTHORIZED SIGNATURE</p>
Phenotypic Features	Results																																																																																																
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-																																																																																																
ADONITOL	-																																																																																																
L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-																																																																																																
L-ARABITOL	-																																																																																																
D-CELLOBIOSE	-																																																																																																
BETA-GALACTOSIDASE	+																																																																																																
H2S PRODUCTION	-																																																																																																
BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-																																																																																																
Glutamyl Arylamidase pNA	-																																																																																																
D-GLUCOSE	+																																																																																																
GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	-																																																																																																
FERMENTATION/GLUCOSE	+																																																																																																
BETA-GLUCOSIDASE	-																																																																																																
D-MALTOSE	+																																																																																																
D-MANNITOL	+																																																																																																
D-MANNOSE	+																																																																																																
BETA-XYLOSIDASE	-																																																																																																
BETA-Alanine arylamidase pNA	-																																																																																																
L-Proline ARYLAMIDASE	+																																																																																																
LIPASE	-																																																																																																
PALATINOSE	-																																																																																																
Tyrosine ARYLAMIDASE	+																																																																																																
UREASE	-																																																																																																
D-SORBITOL	+																																																																																																
SACCHAROSE/SUCROSE	-																																																																																																
D-TAGATOSE	+																																																																																																
D-TREHALOSE	+																																																																																																
CITRATE (SODIUM)	-																																																																																																
MALONATE	-																																																																																																
5-KETO-D-GLUCONATE	-																																																																																																
L-LACTATE alkalization	+																																																																																																
ALPHA-GLUCOSIDASE	-																																																																																																
SUCCINATE alkalization	+																																																																																																
BETA-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	-																																																																																																
ALPHA-GALACTOSIDASE	+																																																																																																
PHOSPHATASE	-																																																																																																
Glycine ARYLAMIDASE	-																																																																																																
ORNITHINE DECARBOXYLASE	+																																																																																																
LYSINE DECARBOXYLASE	+																																																																																																
L-HISTIDINE assimilation	-																																																																																																
COURMARATE	+																																																																																																
BETA-GLUCORONIDASE	+																																																																																																
O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	-																																																																																																
Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	-																																																																																																
L-MALATE assimilation	-																																																																																																
ELLMAN	+																																																																																																
L-LACTATE assimilation	-																																																																																																



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> <b>Microorganism Name:</b> Escherichia coli <b>Catalog Number:</b> 0335 <b>Lot Number:</b> 335-147 <b>Reference Number:</b> ATCC® 25922™* <b>Purity:</b> < 0.1% Total Pellet CFU <b>Recovery:</b> > 1000 CFUs per Pellet <b>Passage from Reference:</b> 4	<b>Expiration Date:</b> 2016/8/31 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Carol J Stanoch <b>Release Date:</b> 2014/9/15
--	--

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(\*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.



(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

TESTING CERT #2655.01





Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> <b>Microorganism Name:</b> Enterobacter aerogenes <b>Catalog Number:</b> 0306 <b>Lot Number:</b> 306-98 <b>Reference Number:</b> ATCC® 13048™* <b>Purity:</b> < 0.1% Total Pellet CFU <b>Recovery:</b> > 1000 CFUs per Pellet <b>Passage from Reference:</b> 4	<b>Expiration Date:</b> 2016/6/30 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Christine Condon <b>Release Date:</b> 2014/10/13
---	--

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(\*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.



(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

TESTING CERT #2655.01

### Anexo 3. Certificado de Análisis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

	
Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release	
<b>Specifications</b> Microorganism Name: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Catalog Number: 0353 Lot Number: 353-187 Reference Number: ATCC® 27853™* Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4	<b>Expiration Date:</b> 2017/1/31 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Marie M Howe <b>Release Date:</b> 2015/2/11
<b>Performance</b>	
<b>Macroscopic Features:</b> Two colony types: Large, flat, circular to irregular shaped, gray with silver sheen(98%); And small and compact <b>Microscopic Features:</b> Straight or slightly curved gram negative rod	<b>Medium:</b> SBAP  <b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System:</b> Vitek GN (1) See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Oxidase (Kovacs): positive (1) Motility B Medium: positive (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 16 - 21 mm  <div style="text-align: center;">             Brad Goskowicz, President            AUTHORIZED SIGNATURE         </div>
<p>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <p>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> <p>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p>	
   TESTING CERT #2655.01	
<p>© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303      Page 1 of 1      DOC.286</p>	

MicroBioLogics

bioMerieux Customer: 05871  
System #: C21105

Laboratory Report

Printed Feb 6, 2015 08:03 CST  
Printed by: mmh  
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: 353187-1

Bench: MH

Card Type: GN Testing Instrument: 00000A6D6328 (1116)

Bionumber: 0003443303540372  
Organism Quantity:

<b>Comments:</b>	

<b>Identification Information</b>	<b>Card:</b> GN	<b>Lot Number:</b> 241316840	<b>Expires:</b> Aug 17, 2015 13:00 CDT
	<b>Completed:</b> Feb 4, 2015 17:17 CST	<b>Status:</b> Final	<b>Analysis Time:</b> 5.75 hours
<b>Selected Organism</b>	89% Probability <b>Pseudomonas aeruginosa</b> Bionumber: 0003443303540372 <b>Confidence:</b> Good identification		
<b>SRF Organism</b>			
<b>Analysis Organisms and Tests to Separate:</b>			
<b>Analysis Messages:</b>			
<b>Contraindicating Typical Biopattern(s)</b>			
Pseudomonas aeruginosa GGAA(1),dMNE(91),URE(16),PHOS(5),			

<b>Biochemical Details</b>																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	+	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	+
23	ProA	+	26	LIP	+	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	+	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	+	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	+	61	IMLTa	+	62	ELLM	-	64	ILATa	+			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01  
MIC Interpretation Guideline:  
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:  
AES Parameter Last Modified:

**Anexo 4. Registro de Temperatura de la Refrigeradora con congeladora Ecasa**

**REGISTRO DE TEMPERATURA DE LA REFRIGERADORA**

Fecha	Temperatura
24-Sep-2015	5°C
4-Ene-2016	7°C
5-Ene-2016	13°C
6-Enero-2016	9°C
7-Ene-2016	9°C
8-Ene-2016	10°C
11-Ene-2016	8°C
12-Ene-2016	10°C
13-Ene-2016	9°C
14-Ene-2016	7°C
15-Ene-2016	10°C
18-Ene-2016	9°C
19-Ene-2016	8°C
20-Ene-2016	7°C
21-Ene-2016	9°C
22-Ene-2016	8°C
25-Ene-2016	8°C
26-Ene-2016	6°C
27-Ene-2016	7°C
28-Ene-2016	7°C
29-Ene-2016	6°C
1-Feb-2016	10°C
2-Feb-2016	7°C
3-Feb-2016	11°C
4-Feb-2016	7°C
10-Feb-2016	10°C
11-Feb-2016	11°C
12-Feb-2016	7°C

Fecha	Temperatura
15 - Feb - 2016	9°C
16 - Feb - 2016	7°C
17 - Feb - 2016	7°C
18 - Feb - 2016	8°C
19 - Feb - 2016	9°C
22 - Feb - 2016	7°C
23 - Feb - 2016	5°C
24 - Feb - 2016	8°C
25 - Feb - 2016	9°C
26 - Feb - 2016	9°C
29 - Feb - 2016	9°C
1 - Mar - 2016	9°C
2 - Mar - 2016	6°C
3 - Mar - 2016	11°C
4 - Mar - 2016	5°C
7 - Mar - 2016	8°C
8 - Mar - 2016	7°C
9 - Mar - 2016	6°C
10 - Mar - 2016	9°C
11 - Mar - 2016	10°C
14 - Mar - 2016	10°C
15 - Mar - 2016	10°C
16 - Mar - 2016	7°C
17 - Mar - 2016	10°C
18 - Mar - 2016	9°C
21 - Mar - 2016	9°C
22 - Mar - 2016	10°C
23 - Mar - 2016	8°C

### Anexo 5. Registro de Temperatura de la Incubadora Memmert

#### REGISTRO DE TEMPERATURA DE LA INCUBADORA

Fecha	Temperatura
22-Sep-2015	35°C
23-Sep-2015	35°C
24-Sep-2015	35°C
4-Ene-2016	35°C
5-Ene-2016	35°C
6-Ene-2016	35°C
7-Ene-2016	35°C
8-Ene-2016	35°C
19-Ene-2016	35°C
12-Ene-2016	35°C
13-Ene-2016	35°C
14-Ene-2016	35°C
15-Ene-2016	35°C
18-Ene-2016	35°C
19-Ene-2016	35°C
20-Ene-2016	35°C
21-Ene-2016	35°C
22-Ene-2016	35°C
25-Ene-2016	35°C
26-Ene-2016	35°C
27-Ene-2016	35°C
28-Ene-2016	35°C
29-Ene-2016	35°C
1-Feb-2016	35°C
2-Feb-2016	35°C
3-Feb-2016	35°C
4-Feb-2016	35°C
10-Feb-2016	35°C

Fecha	Temperatura
11-Feb-2016	35°C
12-Feb-2016	35°C
15-Feb-2016	35°C
16-Feb-2016	35°C
17-Feb-2016	35°C
18-Feb-2016	35°C
19-Feb-2016	35°C
22-Feb-2016	35°C
23-Feb-2016	35°C
24-Feb-2016	35°C
25-Feb-2016	35°C
26-Feb-2016	35°C
29-Feb-2016	35°C
1-Mar-2016	35°C
2-Mar-2016	35°C
3-Mar-2016	35°C
4-Mar-2016	35°C
7-Mar-2016	35°C
8-Mar-2016	35°C
9-Mar-2016	35°C
10-Mar-2016	35°C
11-Mar-2016	35°C
14-Mar-2016	35°C
15-Mar-2016	35°C
16-Mar-2016	35°C
17-Mar-2016	35°C
18-Mar-2016	35°C
21-Mar-2016	35°C
22-Mar-2016	35°C
23-Mar-2016	35°C
29-Mar-2016	35°C
30-Mar-2016	35°C
31-Mar-2016	35°C

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Acosta Duque Cynthia Carolina, con CC. 1714477807, autora del trabajo de graduación intitulado: “Determinación de la productividad y selectividad de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes en agua potable proveniente de la Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento.” Previa la obtención del grado académico de MICROBIÓLOGO en la facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 30 de Mayo del 2017

\_f)

CC# 1714477807

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Valencia Ramos Eddie Raúl, con CC. 1718878778, autor del trabajo de graduación intitulado: “Determinación de la productividad y selectividad de las placas Petrifilm™ Aqua de 3M™ para recuento de coliformes en agua potable proveniente de la Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento.” Previa la obtención del grado académico de MICROBIÓLOGO en la facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 30 de Mayo del 2017

\_f)

CC# 1718878778