

## RESUMEN

El presente estudio tiene como finalidad buscar una alternativa de adaptación en el ensayo establecido para el análisis de coliformes totales y *E. coli* en agua potable, para reemplazar el medio de cultivo empleado en el método de filtración por membrana (m-Colibblue24), con la utilización de las 3M placas Petrifilm EC (*E. coli* – coliformes). Comparando los resultados obtenidos así como también todos los pasos previos a la realización del ensayo.

Para la comparación se eligió un rango A (alto), Rango B (medio) y Rango C (bajo), la determinación de cada uno de los rangos, se tomó como base los recuentos preestablecidos por la casa comercial Millipore para el recuento de coliformes totales entre 20 y 80, *E. coli* entre 20 y 60; se utilizaron un total de 180 muestras; 60 en cada uno de los rangos y 30 para cada uno de los medios.

Se trabajó con una cepa ATCC y una nativa, proporcionadas por el personal encargado del cepario de la Escuela de Bioanálisis, las cepas fueron *E. coli* ATCC 25922 como representante del grupo coliforme fecal y *Enterobacter cloacae* EB- I-8 representante del grupo de coliformes totales.

- Rango A con 80 UFC/100 mL de coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB- I-8 + *E. coli* ATCC 25922), donde 50 UFC/100 mL son de *E. coli* ATCC 25922.
- Rango B con 50 UFC/100 mL de coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB- I-8 + *E. coli* ATCC 25922), donde 25 UFC/100 mL son de *E. coli* ATCC 25922.
- Rango C con 25 UFC /100 mL de coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB- I-8 + *E. coli* ATCC 25922), donde 10 UFC/ 100 mL son de *E. coli* ATCC 25922.

Se evaluó a los medios de cultivo en estudio de acuerdo con la metodología, para el recuento de coliformes totales y *E. coli* para filtración por membrana, según el Método Oficial APHA 9222D.

Los resultados obtenidos mediante el análisis estadístico ANOVA, indican que en el rango B tiene una estrecha relación de reproducibilidad en cuanto a número de unidades formadoras de colonia obtenidas en los dos medios comparados, además demostró un alto porcentaje de

recuperación del 97% con el medio m-Colibblue24 tanto para *E. coli* ATCC 25922 y *Enterobacter cloacae* EB-I-8 como grupo de coliformes totales e individualmente para *E. coli* ATCC 25922 como representante del grupo coliforme fecal, debido a la coloración para cada grupo de microorganismos que permite este medio ;colonias rojas grupo coliformes total y azules grupo coliforme fecal y un 92% con las 3M placas Petrifilm únicamente para *E. coli* ATCC 25922.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio debemos recalcar que el medio m-Colibblue24 sigue siendo la mejor alternativa para la detección de coliformes totales y *E. coli* en matriz agua potable por el método de filtración por membrana, considerado el método oficial para este tipo de análisis, además de sus ventajas en la visualización macroscópica de las colonias con sus características insuperables, evitando de esta manera errores en la lectura para el reporte, su facilidad en el manejo, preparación y descarte del material lo hacen ser el método de elección para la rutina diaria del trabajo en laboratorios.

## ABSTRACT

The present study aims to find an alternative to the established method to analyze total coliforms and *E. Coli* in drinking water, to replace the culture media used in the membrane filtration method (m-Colibblue24) by 3M Petrifilm EC plates (*E. coli* – coliforms). Comparing the results obtained as well as all the steps prior to the completion of assay.

For comparison we choose three ranges: A (high), B (medium) and C (low). Each range was fixed according with preset values reported by Millipore for total coliforms from 20 to 80 UFC/100 mL; and for *E. coli* from 20 to 60 UFC/100 mL. To this study we used 180 samples as total population: 60 samples for each range and 30 samples for each media.

We worked with ATCC strain and another native strain obtained from strain collection of our School of Bionalysis. Those strains were *E. coli* ATCC 25922 from fecal coliforms group and *Enterobacter cloacae* EB-I-8 from total coliforms group.

Ranges were established as follows:

- Range A: 80 UFC/100 mL total coliforms (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922), where 50 UFC/100mL corresponding to *E. coli* ATCC 25922.
- Range B: 50 UFC/100 mL total coliforms (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922), where 25 UFC/100mL corresponding to *E. coli* ATCC 25922.
- Range C: 25 UFC/100 mL total coliforms (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922), where 10 UFC/100mL corresponding to *E. coli* ATCC 25922.

For this study we followed Oficial Method APHA 9222D to colony counting of total coliforms and *E. coli* using membrane filtration method.

The results obtained by the ANOVA statistical analysis indicates that in the range B there is a close relationship for reproducibility in the number of colony forming units obtained in the two comparative media; also those results showed a high recovery rate 97% with m-Colibblue24 media for *E. coli* ATCC 25922 and *Enterobacter cloacae* EB-I-8 as representative from total coliforms group and individually for *E. coli* ATCC 25922 as representative of fecal coliforms group, due to the staining of each group of microorganisms that allows this medium; red colonies

for total coliforms group and blue colonies for fecal coliform; and 92% of recovery rate with 3M Petrifilm plates for *E. coli* ATCC 25922 only.

According to the results obtained in this study should be emphasized that m-Colibblue24 media remains the best alternative for the detection of total coliforms and *E. coli* in drinking water matrix by membrane filtration method, considered the official method for this type of analysis. In addition to its advantages for easy to view the macroscopic colonies with unsurpassed features, thus avoiding errors in reading of the report, ease in handling, preparation and disposal of material make this the method the best choice for routine work in laboratories.

## INTRODUCCION

El recuento de los microorganismos indicadores que pertenecen al grupo coliformes (coliformes totales y coliformes fecales) nos muestran las condiciones de salubridad del agua, por esta razón la presencia de estas bacterias son indicadoras de que el agua no es apta para el consumo en general.

Desde 1985, *Standard Methods for the Examination of water and Wastewater* implementó el método de filtración por membrana; el cual se basa en filtrar una muestra de agua que concentra todas sus células viables sobre una membrana, la cual se lleva a condiciones específicas (Medio de cultivo, temperatura y tiempo de incubación) dependiendo del microorganismo a analizar. Una de las ventajas que brinda este método, es la de examinar grandes volúmenes de agua principalmente cuando se sospecha que el conteo de microorganismos es bajo.

Los laboratorios de análisis microbiológico, buscan técnicas que permitan obtener resultados fiables y de una manera más sencilla (preparación de medios, tiempo de incubación, lectura e interpretación de resultados) en el análisis microbiológico de agua.

Las 3M Placas Petrifilm se utilizan en los métodos de recuento o enumeración de colonias. Estas placas vienen listas para usarse, no requieren pasos posteriores, para su inoculación se requiere tan solo 1 mL de la muestra, además son muy fáciles de interpretar y satisfacen las necesidades para análisis.

Hay que recalcar que las 3M Placas Petrifilm proporcionan en un mismo medio la diferenciación tanto de coliformes totales y *E. coli* con sus respectivas características.

Las 3M placas Petrifilm están validadas por la AOAC<sup>®</sup> (Asociación de científicos dedicados a la excelencia en métodos analíticos), AFNOR (Asociación francesa de normalización) por esta razón se puede confiar en la calidad, fiabilidad y la constancia de los resultados.

Además, proporciona un ahorro en costos y tiempo en el proceso, el cual resultaría muy beneficioso al momento de realizar análisis de agua en cualquier laboratorio, al reducir así algunos pasos y obtener resultados de una manera sencilla y rápida, pero segura.

Solo existen 2 estudios comparativos, realizados en los países de Argentina y Canadá por el método de filtración por membrana, utilizando 3M placas Petrifilm en los que obtuvieron una correlación, entre el recuento y el número de bacterias que inocularon. En nuestro país no existen estudios relacionados o parecidos a los mencionados anteriormente. **Ver anexo 1 y 2.**

## **PROBLEMA**

El método de filtración por membrana, es considerado el método gold estándar para el análisis microbiológico de agua, pero tomando en cuenta los múltiples beneficios que poseen las 3M Placas Petrifilm en microbiología de alimentos, se quiso comparar los resultados obtenidos entre ambos medios (m-Colibblue 24 y 3M Placas Petrifilm) por el método filtración por membrana, para determinar si se podría llegar a sustituir al medio empleado en este método (m-ColiBlue24).

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Demostrar que las placas 3M Placas Petrifilm tienen la misma utilidad que los medios de cultivo m-ColiBlue24 empleados para la identificación de Coliformes totales y *E. coli*

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar Coliformes totales y *E. coli* con el medio m-ColiBlue24 por el método de filtración por membrana.

- Determinar Coliformes totales y *E. coli* con el medio 3M Placas Petrifilm por el método de filtración por membrana.
- Comparar los resultados obtenidos con los 2 medios.
- Análisis estadístico de los resultados.

# CAPITULO I

## MARCO TEORICO

En 1955 la décima edición de los *Standard Methods for the Examination of water and Wastewater* incluye un método tentativo en la determinación de coliformes totales.

En la 16ª Edición del año introduce por primera vez la filtración por membrana, para el recuento de bacterias. Actualmente la prueba de filtración por membrana está siendo utilizada como un método normalizado para evaluar la calidad sanitaria del agua.<sup>1</sup>

La filtración por membrana es una de las tecnologías más modernas utilizadas, la membrana permite recuperar concentraciones menores de microorganismos en mayores volúmenes de agua. Siendo útil en aguas muy poco contaminadas, se puede realizar un conteo directo de colonias en el medio empleado (m-Colibblue24) en el método de filtración por membrana, debido a que el petri pad posee una cuadrícula que facilita el recuento, lo que permite la obtención resultados más precisos.<sup>2</sup>

En Argentina, se realizó una comparación entre las 3M placas Petrifilm y el método APHA (Número Más Probable) determinando que las 3M placas Petrifilm sirven como método alternativo para el análisis de agua potable. **Ver anexo 1.**

---

<sup>1</sup> **ANDREW D. EATON, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater,**  
American Public Health Association (APHA), 20th Edition, 2005.

<sup>2</sup> **Método de filtración por membrana para la determinación de coliformes totales.**

<http://www.cepis.org.pe/bvsacd/scan2/032981-I-II/032981-I-07b.pdf>

El estudio realizado en Canadá, tuvo como objetivo evaluar 4 tipos de membranas para el método de filtración por membrana, con las 3M placas Petrifilm, se observó que hubo crecimiento óptimo de *E. coli* con estas mismas. **Ver anexo 2.**

En Ecuador, no existen estudios acerca de la utilización de las 3M placas Petrifilm con el método de filtración por membrana, siendo esta investigación la primera que se realizó.

## **1.1 CALIDAD DEL AGUA**

La falta de agua adecuada para el consumo, es una fuente directa de enfermedades, por lo que para proteger la salud no basta con tener agua. La capacidad del agua para transmitir enfermedades depende de su calidad microbiológica.<sup>3</sup>

El agua es esencial para la vida y todas las personas deben disponer de un suministro satisfactorio es decir suficiente, inocuo y accesible. La mejora del acceso al agua potable puede proporcionar beneficios tangibles para la salud, por esta razón debe realizarse el máximo esfuerzo para lograr la inocuidad del agua.<sup>3</sup>

La carga bacteriana influye directamente en la potabilidad del agua, en las características y condiciones que, la hacen aptas para el consumo humano.

En muchos lugares especialmente a nivel rural, se consume el agua sin ningún control de calidad y sin un tratamiento. Las enfermedades relacionadas con la insalubridad del agua y la falta de saneamiento constituyen problemas de salud pública. En los países en vías de desarrollo, las

---

<sup>3</sup> GUTIÉRREZ DE GAMBOA SOFÍA, PEDRIQUE DE AULACIO MAGALY, **AGUA. Indicadores de la calidad microbiológica de las aguas de consumo y de proceso. Tratamientos. Métodos de control microbiológico,** Enero 2002, Revisada Julio 2003.  
[http://www.ucv.ve/Farmacia/Micro\\_web/Catedras02/tema16.pdf](http://www.ucv.ve/Farmacia/Micro_web/Catedras02/tema16.pdf)

enfermedades producidas por estos patógenos coliformes totales, en especial *E. coli* son los causantes directos más importantes de muertes prematuras, sobre todo en niños.

En la evaluación microbiológica de la calidad del agua, sistemáticamente se realizan pruebas de laboratorio que permiten estimar la magnitud de la contaminación<sup>4</sup>. Los requisitos bacteriológicos según los *Standard Methods for the Examination of water and Wastewater* consideran como indicadores de contaminación a las bacteria del grupo coliformes (coliformes totales). Sin embargo, se considera conveniente que los laboratorios establezcan la diferenciación entre coliformes totales y coliformes fecales con el objeto de controlar y mejorar sus sistemas de tratamiento de agua.

## **1.2 MICROORGANISMOS INDICADORES**

El principal objetivo de la utilización de bacterias como indicadores de prácticas no sanitarias, es revelar defectos de tratamiento del agua, que llevan consigo un peligro potencial.

### **1.2.1 COLIFORMES TOTALES**

Los coliformes totales son un grupo de microorganismos que comprende varios géneros de la familia *Enterobacteriaceae*. Se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, son oxidasa negativa, no forman esporas y son capaces de fermentar lactosa con producción de ácido y gas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en un tiempo máximo de 48 horas.

---

<sup>4</sup> FELICIA HIX, **Detection and Enumeration of Escherichia coli in Wastewater Effluent.**

[www.mtas.tennessee.edu/citydept/sewer/newecolipresentation.pdf](http://www.mtas.tennessee.edu/citydept/sewer/newecolipresentation.pdf)

## **Bacterias que integran el grupo**

El grupo coliforme está formado por los siguientes géneros:

- ✓ *Escherichia*
- ✓ *Klebsiella*
- ✓ *Enterobacter*
- ✓ *Citrobacter*

El grupo de bacterias coliformes ha sido siempre el principal indicador de calidad de los distintos tipos de agua; el número de coliformes en una muestra se usa como criterio de contaminación y por lo tanto, de calidad sanitaria de la misma.<sup>5</sup>

Desde hace tiempo se reconoce que el grupo de Coliformes son un buen indicador microbiano de la calidad del agua potable, debido a que son de fácil de detección, y se los puede enumerar.

### **1.2.2 COLIFORMES FECALES**

Los coliformes fecales también son denominados termotolerantes, se caracterizan por soportar temperaturas hasta 45°C; comprenden un grupo muy reducido, entre los que se destaca *E. coli*, siendo esta especie la más reconocida como representante de contaminación por origen fecal, por lo tanto, es el principal indicador de higiene tanto en alimentos, como en aguas.

---

<sup>5</sup> Microbiología de Agua: Coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli*. Laboratorio de Microbiología aplicada, 2007. [www.uprh.edu/.../Microbiología%20de%20Agua-II%5B1%5D.pdf](http://www.uprh.edu/.../Microbiología%20de%20Agua-II%5B1%5D.pdf)

*Escherichia coli* fue aislada por primera vez en 1885 por el pediatra alemán *Theodore Escherich*, quien la denominó bacteria *Coli Comunne* para indicar su aparición universal en el intestino de individuos sanos.

En los últimos 100 años *E. coli* se ha estudiado de manera tal que es actualmente la forma de vida libre más perfectamente comprendida sobre la tierra.<sup>6</sup>

*Escherichia coli*, se caracteriza por ser una bacilo Gram negativo, capaz de fermentar la lactosa a una temperatura entre 44°C a 44.5°C, es indol positivo y tiene un origen específicamente fecal, pues está siempre presente en grandes cantidades en las heces en seres vivos de sangre caliente y rara vez se encuentra en agua o suelo que no haya sufrido algún tipo de contaminación fecal.<sup>7</sup>

La detección de *E. coli* en muestras de agua potable, indica la existencia de fallas en la eficiencia y eficacia de tratamiento de la misma.

## **2.3 CEPAS DE REFERENCIA**

Un laboratorio de microbiología debe contar con cultivos de referencia, a fin de certificar o conservar la acreditación de un ensayo.

Las cepas de referencia son utilizadas para demostrar, que los medios poseen características aceptables, para validar métodos, la evaluación de los medios de cultivo, control de calidad interno durante la evaluación de los ensayos, para las pruebas confirmatorias y para controlar que se mantengan sus características.

---

<sup>6</sup>**Examen de Coliformes por la Técnica de Filtración de Membrana.** [www.cepis.ops-oms.org/bvsacd/scan/004691/004691-07.pdf](http://www.cepis.ops-oms.org/bvsacd/scan/004691/004691-07.pdf)

<sup>7</sup>**Coliformes fecales.** <http://www.cepis.ops-oms.org/bvsacd/scan/013761/013761-04.pdf>

Una Cepas de referencia debe cumplir con varios requisitos como:

- Viabilidad: Las células microbianas sean capaces de crecer
- Pureza: Ser cultivo puro.
- Estabilidad: Genéticamente estables.

En el momento de la manipulación y conservación se debe prevenir:

- El deterioro de las cepas,
- La contaminación cruzada.,
- Las mutaciones,
- Deterioro o alteración de las características típicas de las cepas.

Las cepas de referencia, pueden ser subcultivadas, dependiendo del número de pase que consta en su certificado de calidad, se decide cuantos pases se pueden realizar, generalmente las cepas de referencia deben ser subcultivadas por 5 veces. Al realizar los pases se obtiene cepas de reserva, y de estas cepas de trabajo, se conservan utilizando técnicas que mantengan las características deseadas de la cepa de referencia (liofilización, ultracongelación, conservación en nitrógeno líquido).

Las cepas de trabajo se deben conservar en refrigeración, por un período de tiempo que asegure la viabilidad del microorganismo, no deben ser subcultivadas para obtener cepas de reserva. El número, la elección del género y especie dependerán de los ensayos que se efectúan y las necesidades.

## 1.4 METODO FILTRACION POR MEMBRANA

Para la determinación de coliformes totales y coliformes fecales (*E. coli*) se utiliza este método, el cual es altamente reproducible, puede usarse para analizar volúmenes de muestra relativamente grandes y se obtiene resultados en menor tiempo.

### Fundamento o Principio

El método filtración de membrana, se basa en hacer pasar la muestra de agua problema a través de un filtro de membrana microporosa, en cuya superficie quedan retenidos los microorganismos. Se utilizan membranas Millipore tipo HA que tienen un tamaño de poro 0.45 micras, ya que la mayoría de los microorganismos a analizar tienen un diámetro superior a 0.45 micras. Se incubó la membrana sobre el medio de cultivo adecuado a la temperatura 37°C por 24 horas, para posteriormente contar directamente las colonias desarrolladas en la superficie de la membrana.<sup>8</sup>

### Ventajas

- ✓ Es un método ágil
- ✓ Los resultados son obtenidos rápidamente, principalmente para bacterias del grupo coliformes.
- ✓ Volúmenes de 100mL de muestra para agua potable pueden ser examinados.
- ✓ Los equipos y materiales necesarios ocupan menor espacio con relación a otras técnicas.
- ✓ Proporciona recuentos directos.

---

<sup>8</sup> GRANDA ELENA, **Manual de Prácticas Para Control Microbiológico en la Industria Alimenticia**, Recopilación de Técnicas, Licenciatura en Microbiología Clínica y Aplicada, Octavo Nivel, Febrero, 2009.

- ✓ Es más preciso (se obtienen resultados más reproducibles) que la prueba de NMP.

## 1.5 Medios de Cultivo

### 1.5.1 Caldo m- ColiBlue24 para coliformes totales y *E. coli*

El Caldo m-ColiBlue24 constituye una de las mejores alternativas para detectar simultáneamente colonias de coliformes totales y *E. coli*.

Una combinación única de indicadores en el medio distingue, los coliformes totales de *E. coli*. Las colonias rojas y azules indican coliformes totales, mientras que las colonias azules solamente especifican *E. coli*.

El caldo m-Coliblu 24 contiene un indicador de alta sensibilidad para *E. coli* (1UFC/ 100ml), es muy selectivo, elimina los pasos de confirmación que se necesitan al utilizar los medios tradicionales. Después de sólo 24 horas, se puede identificar al menos el 95% de todas las *E. coli*.

Este medio nutritivo incrementa al máximo la tasa de crecimiento de las bacterias coliformes y ofrece una recuperación óptima de los organismos dañados o bajo estrés. El medio no contiene desoxicolato o sales biliares, los cuales se ha comprobado que inhiben el desarrollo de los coliformes bajo estrés. Pero los inhibidores específicos en el medio, reducen eficazmente el crecimiento de las bacterias no coliformes. **Ver Anexo 6**

### 1.5.2 3M Placas Petrifilm EC

Las 3M Placas Petrifilm para el recuento de *E. coli*/coliformes totales contienen nutrientes de Bilis Rojo Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de actividad de la glucuronidasa y un indicador que facilita la enumeración de las colonias. La mayoría de las *E. coli* (cerca del 97%) produce beta-glucuronidasa, la que a su vez produce una precipitación azul asociada con la colonia. La película superior atrapa el gas producido por *E. coli* y coliformes fermentadores de lactosa. Cerca del 95% de las *E. coli* producen gas, representado por colonias

entre azules y rojo-azules asociadas con el gas atrapado en la 3M Placas Petrifilm™ EC (dentro del diámetro aproximado de una colonia). **Ver Anexo 5.**

**Ventajas:**

- ✓ Las 3M Placas Petrifilm™ son muy fáciles de interpretar.
- ✓ Es un medio listo para usarse; no requiere preparación previa ni pasos posteriores.
- ✓ Los resultados son confirmativos.
- ✓ Las 3M Placas Petrifilm™ proporcionan datos seguros y confiables, además de contar con diversas aprobaciones internacionales para su aplicación<sup>18</sup>.

## **CAPITULO II**

### **MATERIALES Y METODOLOGIA**

#### **2.1 LOCALIZACIÓN**

La fase experimental se realizó en los laboratorios de Microbiología de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.

#### **2.2 METODOLOGÍA**

La metodología que se utilizó en este estudio consistió en comparar recuentos de Coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB- I-8 + *E. coli* ATCC 25922) y *E. coli* ATCC 25922 en el medio m-Colibblue24 y 3M Placas Petrifilm por el método de filtración por membrana.

#### **2.3 MATERIALES**

##### **2.3.1 Equipos**

- Autoclave (Marquet Forge)
- Portafiltros de polisulfona estériles (PALL)
- Bomba eléctrica de vacío y presión. (PALL)
- Incubadora (Mettler) a  $35^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$
- Colector de filtración de 3 puestos (PALL)
- Jarra de recolección (SM)
- Turbidímetro (MicroScan TurbidityMeter)
- Mechero (SM)
- Contador de colonias (Galaxy 230)
- Pipeta automática (DROPTek)1 – 1000  $\mu\text{l}$

### **2.3.2 Soluciones**

- Agua peptonada estéril al 0.1 %
- Agua destilada estéril
- Tiosulfato sódico al 3%

### **2.3.3 Medios de Cultivo**

- Ampollas con medio m-Colibblue24
- Placas Petrifilm para recuento de *E. coli* / Coliformes totales
- Medio TSA (Trypticase Soja Agar)
- Medio Mac Conkey

### **2.3.4 Cepas de referencia**

- Cepa *Escherichia coli* ATCC 25922
- Cepa *Enterobacter cloacae* EB – I- 8

### **2.3.5 Materiales varios**

- Asa calibrada (10µl descartable)
- Frascos Schott de vidrio de 2000 ml
- Frascos Schott de vidrio de 1000 ml
- Erlenmeyer de 500ml
- Erlenmeyer 250 ml
- Frascos Schott de vidrio de 200 ml
- Tubos de ensayo
- Membranas o Filtros Sartorius 0.45 micras
- Cajas de plástico Millipore vacías
- Pad adsorbentes (óxido de etileno) específicas para el medio de m-ColiBlue24
- Pinza de bordes planos

- Alcohol al 75%
- Puntas estériles

### **2.3.6 Material de desinfección**

- Tego 51 al 2%
- Toallas absorbentes

### **2.3.7 Equipo de bioseguridad**

- Mandil
- Guantes
- Mascarillas desechables
- Gorros desechables
- Zapatos desechables

## **2.4 PROTOCOLO DE TRABAJO**

### **2.4.1 Neutralización de cloro en muestras de agua potable para análisis microbiológico (Standard Methods)**

- Se utilizó 4 frascos Schott de vidrio de 2000 mL autoclavables, en cada uno se añadió 2 mL de Tiosulfato sódico al 3%. **Ver Anexo 7.**
- Se autoclavó el envase para que el Tiosulfato sódico al 3% quede impregnado en las paredes del frasco.

### **2.4.2 Recolección del agua potable**

Se utilizó agua potable para preparar la suspensión de bacterias, la cual fue recolectada del domicilio ubicado en la Machala N60-92 Sector Quito Norte.

### 2.4.3 Toma de la muestra ( agua potable)

- Se verificó que la llave de agua se encuentre en buen estado, es decir que no esté oxidada, que se abra y se cierre sin dificultad.
- El operador se lavó correctamente las manos con agua y jabón.
- Con una torunda de algodón humedecida con alcohol, se desinfectó el orificio de salida de la llave de agua, de la que se recolectó.
- Se dejó correr el agua por 3 minutos a fuerte chorro.
- Posteriormente se disminuyó el chorro de agua y se recogió la muestra.
- Se llenó las  $\frac{3}{4}$  partes de las botellas de vidrio con Tiosulfato al 3% previamente autoclavadas, no fueron llenadas totalmente para poder homogenizar la matriz (agua potable).

### 2.4.4 Transporte de la Matriz

Las botella de vidrio una vez llenas con la matriz, se las transportó refrigeradas entre 0° y 10°C como máximo (no congelar) en un cooler con pilas de hielo, hasta llegar al laboratorio. El tiempo máximo que puede transcurrir entre la toma de muestra y el análisis es de 24 horas, siempre que la muestra se mantenga refrigerada.

### 2.4.5 Preparación de las diluciones (*Enterobacter cloacae* EB- I-8 y *E. coli* ATCC 25922).

Se preparó suspensiones de *Enterobacter cloacae* EB-I-8 y *E. coli* con el agua potable como matriz, basándose en la escala MacFarland 0.5 hasta llegar a la concentración deseada.

Los rangos de lectura según Millipore para el método estándar de filtración por membrana con el medio m- Colibblue24 son:

- Coliformes totales: 20 – 80 UFC/100mL
- *E.coli* : 20 – 60 UFC/100 mL

Se trabajó con tres rangos, basándose en la técnica estándar de filtración por membrana, para el conteo de microorganismos:

- ✓ Rango A: 80 UFC/mL de Coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8+ *E. coli* ATCC 25922), donde 50 UFC/mL son de *E. coli* ATCC 25922.
- ✓ Rango B: 50 UFC/mL de Coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8+ *E. coli* ATCC 25922), donde 25 UFC/mL son de *E. coli* ATCC 25922.
- ✓ Rango C: 25 UFC /ml. de Coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8+ *E. coli* ATCC 25922), donde 10 UFC/ml son de *E. coli* ATCC 25922.

### **Preparación de la suspensión y diluciones bacterianas.**

#### **Paso 1**

#### **Preparación de las diluciones a partir de la suspensión bacteriana:**

- a. Se incubaron los viales congelados que contenían 1mL de *E. coli* ATTC 25922 y *Enterobacter cloacae* EB-I-8 por 10 minutos a 37°C.
- b. Se colocó 1mL de cada vial en un tubo con 5ml de BHI (Caldo infusión cerebro corazón), se incubó por 3horas a 37°C. **Ver anexo 8.**
- c. Se observó crecimiento bacteriano por turbidez en el medio inoculado, se sembró por agotamiento a partir del BHI con *E. coli* ATTC 25922 y *Enterobacter cloacae* EB-I-8 en el medio sólido TSA (Trypticase Soja Agar) y Agar Mac Conkey a 37°C por 24 horas. **Ver Anexo 9 y 10.**
- d. Se realizó identificación macroscópica de las colonias y tinción Gram para cada una de las cepas. **Ver Anexo 11.**

## Paso 2

### Preparación de la Escala MacFarland 0.5

Para la preparación de la escala MacFarland 0.5 se necesitó 0.05 ml de Cloruro de bario (1%) y 9.95 ml de Acido sulfúrico concentrado (1%) **Ver Tabla N°1.**

**Tabla N°1 Preparación del tubo 0.5 de la Escala MacFarland**

Escala MacFarland	Cl <sub>2</sub> Ba 1%	SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> 1%	UFC/mL
0.5	0.05	9.95	15 x 10 <sup>8</sup>



**Fig. 1** Turbidímetro utilizado para realizar la Solución Madre.

## Paso 3:

- Se preparó en base a la escala MacFarland 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) la solución madre de *E. coli* ATCC 25922 y *Enterobacter cloacae* EB-I-8
- A partir de la solución madre se realizó las diluciones respectivas.

A continuación en la Tabla N°2 – N°7 se detalla las suspensiones bacterianas preparadas para cada uno de los rangos:

### Rango A

80 UFC/100 mL de coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922),  
donde 50 UFC/100 mL son de *E. coli* ATCC 25922.

**Tabla N°2 Preparación de la suspensión de *Enterobacter cloacae* EB-I-8 para el Rango A**

# de Bacterias iniciales	Dilución	Volumen Final	# de Bacterias resultantes
<p>Colonia de <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 con 3mL de agua peptonada</p> <p>Basado en la Escala MacFarland 0.5</p> <p><math>1.5 \times 10^8</math> UFC/mL</p>	<p>1/100</p> <p>1 mL de la <u>solución</u> <u>madre</u> con 99 mL de agua potable.</p>	<p>100 mL</p> <p><b>DILUCION 1</b></p>	<p><math>1.5 \times 10^6</math> UFC/mL</p>
<p><math>1.5 \times 10^6</math> UFC/mL</p>	<p>1/100</p> <p>1mL de la <u>dilución 1</u> con 99 mL de agua potable.</p>	<p>100 mL</p> <p><b>DILUCION 2</b></p>	<p><math>1.5 \times 10^4</math> UFC/mL</p>
<p><math>1.5 \times 10^4</math> UFC/mL</p>	<p>1/100</p> <p>1 mL de la <u>dilución</u> <u>2</u> con 99 mL de agua potable.</p>	<p>100 mL</p> <p><b>DILUCION 3</b></p>	<p><math>1.5 \times 10^2</math> UFC/ mL</p>
<p><math>1.5 \times 10^2</math> UFC/mL</p>	<p>1/5</p> <p>20 mL de la <u>dilución</u> <u>3</u> con 80 mL de agua potable.</p>	<p>100 mL de <i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i> EB-I-8</p>	<p>30 UFC/ mL</p>

**Tabla N° 3 Preparación de la suspensión *E. coli* ATCC 25922 para el Rango A**

# de Bacterias iniciales	Dilución	Volumen Final	# de Bacterias resultantes
<p>Colonia de <i>E. coli</i> ATCC 25922 con 3mL de agua <i>peptonada</i></p> <p>Basado en la Escala MacFarland 0.5</p> <p><math>1.5 \times 10^8</math> UFC/mL</p>	<p>1/100</p> <p>1 mL de la <u>solución madre</u> con 99 mL de agua potable.</p>	<p>100 mL</p> <p><b>DILUCION 1</b></p>	<p><math>1.5 \times 10^6</math> UFC/mL</p>
<p><math>1.5 \times 10^6</math> UFC/mL</p>	<p>1/100</p> <p>1mL de la <u>dilución 1</u> con 99 mL de agua potable.</p>	<p>100 mL</p> <p><b>DILUCION 2</b></p>	<p><math>1.5 \times 10^4</math> UFC/mL</p>
<p><math>1.5 \times 10^4</math> UFC/mL</p>	<p>1/100</p> <p>1 mL de la <u>dilución 2</u> con 99 mL de agua potable.</p>	<p>100 mL</p> <p><b>DILUCION 3</b></p>	<p><math>1.5 \times 10^2</math> UFC/mL</p>
<p><math>1.5 \times 10^2</math> UFC/ml</p>	<p>1/3</p> <p>30 mL de la dilución 3 con 60 ml de agua potable.</p>	<p>90 mL</p> <p>de <i>E. coli</i> ATCC 25922</p>	<p>50 UFC/mL</p>

- Se mezcló 1 mL de la dilución de *Enterobacter cloacae* EB-I-8 + 1mL de la dilución *E. coli* ATCC 25922 + 98 mL de la matriz (agua potable).
- Se filtró los 100 mL de cada muestra; 30 repeticiones para cada medio (m-Colibblue24 y 3M placas Petrifilm); con un total de 60 muestras para el rango A.

### Rango B

50 UFC/100mL de Coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8+ *E. coli* ATCC 25922), donde 25 UFC/100mL son de *E. coli* ATCC 25922.

**Tabla N°4 Preparación de la suspensión *Enterobacter cloacae* EB-I-8 para el Rango B**

# de Bacterias iniciales	Dilución	Volumen Final	# de Bacterias resultantes
Colonia de <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 con 3mL de agua peptonada Basado en la Escala MacFarland 0.5 $1.5 \times 10^8$ UFC/mL	$1/100$ 1 mL de la <u>solución</u> <u>madre</u> con 99 mL de agua potable.	100 mL <b>DILUCION 1</b>	$1.5 \times 10^6$ UFC/mL
$1.5 \times 10^6$ UFC/mL	$1/100$ 1mL de la <u>dilución 1</u> con 99 mL de agua potable.	100 mL <b>DILUCION 2</b>	$1.5 \times 10^4$ UFC/mL

1.5 x 10 <sup>4</sup> UFC/mL	1/100 1 mL de la <u>dilución 2</u> con 99 mL de agua potable.	100 mL <b>DILUCION 3</b>	1.5 x 10 <sup>2</sup> UFC/mL
150 UFC/mL	1/6 15 mL de la <u>dilución 3</u> con 75 mL de agua potable.	90 mL de <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8	25 UFC/ mL

**Tabla N° 5 Preparación de la suspensión *E. coli* ATCC 25922 para el Rango B**

# de Bacterias iniciales	Dilución	Volumen Final	# de Bacterias resultantes
Colonia de <i>E. coli</i> ATCC 25922 con 3mL de agua <i>peptonada</i> Basado en la Escala MacFarland 0.5 1.5 x 10 <sup>8</sup> UFC/mL	1/100 1 mL de la <u>solución madre</u> con 99 mL de agua potable.	100 mL <b>DILUCION 1</b>	1.5 x 10 <sup>6</sup> UFC/mL
1.5 x 10 <sup>6</sup> UFC/mL	1/100 1mL de la <u>dilución 1</u> con 99 mL de agua potable (Matriz)	100 mL <b>DILUCION 2</b>	1.5 x 10 <sup>4</sup> UFC/mL

1.5 x 10 <sup>4</sup> UFC/mL	1/100 1 mL de la <u>dilución</u> <u>2</u> con 99 mL de agua potable (Matriz)	100 mL <b>DILUCION 3</b>	1.5 x 10 <sup>2</sup> UFC/mL
1.5 x 10 <sup>2</sup> UFC/mL	1/6 15 mL de la <u>dilución</u> <u>3</u> con 15 mL de agua potable.	90 mL de <i>E. coli</i> ATCC 25922	25 UFC/1mL

- Se mezcló 1 mL de la dilución de *Enterobacter cloacae* EB-I-8 + 1mL de la dilución *E. coli* ATCC 25922 + 98 mL de la matriz (agua potable).
- Se filtró los 100 mL de cada muestra; 30 repeticiones para cada medio (m-Colibblue24 y 3M placas Petrifilm); con un total de 60 muestras para el rango B.

**Rango C:**

25 UFC /100 mL de Coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922),  
 donde 10 UFC/100 mL son de *E. coli* ATCC 25922.

**Tabla N°6 Preparación de la suspensión *Enterobacter cloacae* EB-I-8 para el Rango C**

# de Bacterias iniciales	Dilución	Volumen Final	# de Bacterias resultantes
Colonia de <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 con 3mL de agua peptonada Basado en la Escala MacFarland 0.5 $1.5 \times 10^8$ UFC/mL	1/100 1 mL de la <u>solución</u> <u>madre</u> con 99 mL de agua potable.	100 mL <b>DILUCION 1</b>	$1.5 \times 10^6$ UFC/mL
$1.5 \times 10^6$ UFC/mL	1/100 1mL de la <u>dilución 1</u> con 99 mL de agua potable.	100 mL <b>DILUCION 2</b>	$1.5 \times 10^4$ UFC/mL
$1.5 \times 10^4$ UFC/mL	1/100 1 mL de la <u>dilución</u> <u>2</u> con 99 mL de agua potable.	100 mL <b>DILUCION 3</b>	$1.5 \times 10^2$ UFC/mL

1.5 x 10 <sup>2</sup> UFC/mL	1/10 10 mL de la <u>dilución 3</u> con 90 mL de agua potable.	100 mL de <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8	15 UFC/100 mL
------------------------------	--	--	---------------

**Tabla N° 7 Preparación de la suspensión *E. coli* ATCC 25922 para el Rango C**

# de Bacterias	Dilución	Volumen Final	# de Bacterias resultantes
Colonia de <i>E. coli</i> ATCC 25922 con 3mL de agua peptonada Basado en la Escala MacFarland 0.5 1.5 x 10 <sup>8</sup> UFC/mL	1/100 1 mL de la <u>solución madre</u> con 99 mL de agua potable.	100 mL <b>DILUCION 1</b>	1.5 x 10 <sup>6</sup> UFC/mL
1.5 x 10 <sup>6</sup> UFC/mL	1/100 1mL de la <u>dilución 1</u> con 99 mL de agua potable.	100 mL <b>DILUCION 2</b>	1.5 x 10 <sup>4</sup> UFC/mL
1.5 x 10 <sup>4</sup> UFC/mL	1/100 1 mL de la <u>dilución 2</u> con 99 mL de agua potable.	100 mL <b>DILUCION 3</b>	1.5 x 10 <sup>2</sup> UFC/mL

1.5 x 10 <sup>2</sup> UFC/mL	1/15 6 mL de la <u>dilución</u> <u>3</u> con 84 mL de agua potable.	90 mL  de <i>E. coli</i> ATCC 25922	10 UFC/1 mL
------------------------------	--	--	-------------

- Se mezcló 1 mL de la dilución de *Enterobacter cloacae* EB-I-8 + 1 mL de la dilución *E. coli* ATCC 25922 + 98 mL de la matriz (agua potable).
- Se filtró los 100 mL de cada muestra; 30 repeticiones para cada medio (m-Colibblue24 y 3M placas Petrifilm); con un total de 60 muestras para el rango B.

#### 2.4.6 Método de Filtración por Membrana

##### Condiciones de Trabajo

Se trabajó en condiciones asépticas, libre de microorganismos contaminantes para la protección de la muestra y del operador, en el laboratorio se contó con un mesón plano y mecheros a los dos lados del mismo, además se utilizó para la desinfección TEGO 51 al 2% con un tiempo de contacto de 5 minutos.

##### Paso 1

Se utilizaron un total de 180 muestras matriz, 60 para cada uno de los rangos, 30 para el medio m-Colibblue24 y 30 para 3M placas Petrifilm.

##### Preparación de las Placas de PetriPad para el medio m-Colibblue24:

1. Se abrió la placa PetriPad (placas de petri estériles cargadas con un cartón absorbente estéril).
2. Se abrió una ampolla de 2 mL del medio m-ColiBlue24.
3. Se vertió el medio sobre el cartón absorbente, junto al mechero.

4. Se distribuyó el medio por toda la superficie.
5. Se cerró la placa de petri.

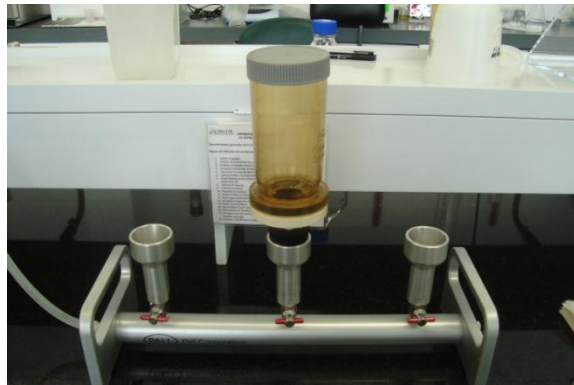
### **Preparación de las 3M Placas Petrifilm**

1. Las placas fueron hidratadas con 1 mL de agua destilada estéril
2. Las placas hidratadas fueron almacenadas en refrigeración durante 1 hora para que el gel pueda gelificar.

### **Paso 2**

#### **Filtración de la muestra:**

1. Se montó el equipo de filtración de membrana.
2. Se colocó el vaso de filtración estéril en la rampa. **Fig. 2**



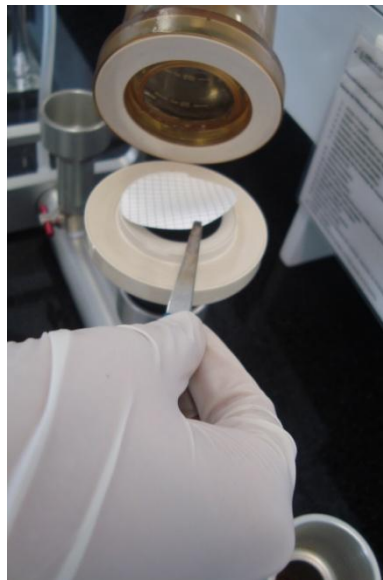
**Fig. 2** Rampa con el portafiltros.

3. Se lavó las paredes del portafiltro con agua peptonada estéril al 0.1%. **Fig. 3**



**Fig.3** Agua peptonada al 0.1% estéril.

4. Se eliminó el agua de lavado por aspiración al vacío.
5. Se mantuvo las pinzas sumergidas en alcohol.
6. Se flameó los bordes de las pinzas antes de manipular la membrana.
7. Se colocó con la pinza de bordes planos la membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro con la cuadrícula de la membrana hacia arriba sobre el soporte de filtración con la pinza. **Fig. 4**



**Fig. 4** Colocación de la membrana en el portafiltros.

8. Se ubicó en la posición correcta el portafiltros.

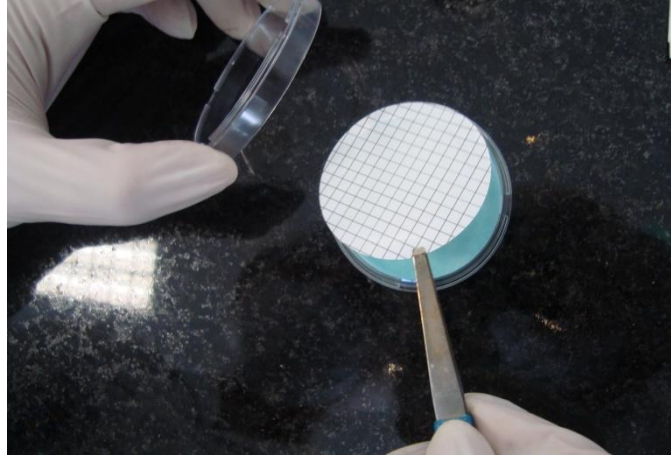
9. Se colocó una pequeña cantidad agua peptonada estéril al 0,1% para que la membrana esté totalmente húmeda y se eliminó por aspiración y así lograr la dispersión uniforme de los microorganismos que pueden encontrarse en la muestra.
10. Se homogenizó la muestra.
11. Se colocó los 100 ml de la muestra en el portafiltros. **Fig. 5**



**Fig.5** Colocar 100 ml de la muestra.

12. Se conectó la fuente de vacío y filtrar la muestra.
13. Se desconectó el vacío.
14. Se desmontó el portafiltros cuidando de no mover, arrugar o romper la membrana.
15. Para cada medio se realizó el mismo procedimiento de los puntos 1 al 14.

**16.** Para el medio m-colibblue24 se tomó la membrana con la pinza flameada y se colocó con la cuadrícula hacia arriba sobre la caja petriPad preparada como se indicó en el método de filtración por membrana paso#1. **Fig. 6**

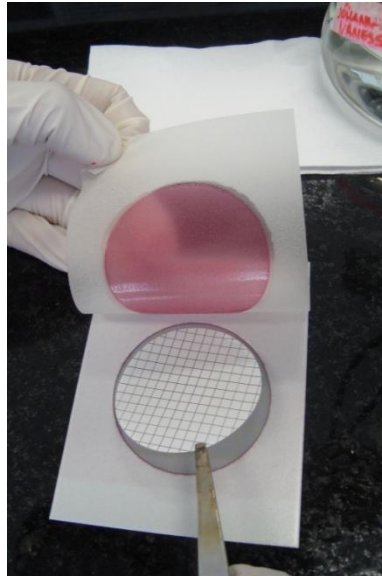


**Fig.6** Membrana siendo colocada en la Caja petripad.

**17.** Se evitó que se formen burbujas entre la membrana y el cartón, pues esto provocaría que se formen zonas en la membrana sin empapar de medio de cultivo, dificultando el crecimiento bacteriano.

**18.** Se cerró la placa petriPad.

**19.** Para las placas Petrifilm se tomó la membrana con la pinza flameada y se colocó con la cuadrícula hacia arriba en la placa previamente hidratada. **Fig. 7**



**Fig. 7** Membrana colocada en la 3M placa Petrifilm previamente hidratada.

**20.** Se aseguró que la membrana este en total contacto con el medio y se evitó que se formen burbujas entre la membrana y la placa. **Fig. 8**



**Fig. 8** Membrana lista para incubar.

### **Paso 3**

#### **Incubación y Lectura**

##### **Para el medio m-Colibblue 24**

Se incubó  $24 \pm 4$  horas a  $35^\circ\text{C} \pm 5$ .

Se observó:

- **coliformes totales:** Colonias rojas (sumar colonias azules mas las rojas).
- ***E. coli*:** Colonias azules.

### Para 3M placas Petrifilm

Las placas fueron incubadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24-48 horas.

Se observó:

- **coliformes totales:** Colonias rojas, con zona de enrojecimiento alrededor y burbuja(s) de gas asociada.
- *E. coli:* Colonias azules, con burbuja(s) de gas asociadas.

**Expresión de los resultados para los 2 medios:** Se expresan el número de coliformes totales o *E. coli* (UFC) por cada 100mL de la muestra.

#### 2.4.7 Análisis Estadístico

Con los datos que se obtuvieron en el recuento para los 3 rangos tanto m-Colibblue24 como para las placas Petrifilm se realizó el siguiente análisis:

- ANOVA (Análisis de la varianza) de 1 factor. Análisis de los resultados obtenidos de colonias azules (*E. coli* ATCC 25922), colonias rojas (otras coliformes *Enterobacter cloacae* EB-I-8) y coliformes totales entre el medio m-Colibblue24 y Petrifilm para cada uno de los rangos.
- Prueba de correlación para cada medio utilizado. (m-Colibblue24 y Petrifilm).
- Además, se calculó el porcentaje de recuperación en las suspensiones bacterianas para cada medio utilizado.

## Capítulo III



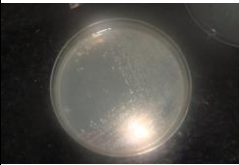

### RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1 ENSAYOS PREVIOS

##### 3.1.1 Identificación de las cepas (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 y *E. coli* ATCC 25922)

A partir de la siembra en los medios TSA (Trypticase Soja Agar) y agar Mac Conkey se realizó una identificación macroscópica de las colonias obtenidas, se comprobó las características de cada una de ellas en cada medio y adicionalmente una tinción Gram (Ver Anexo 11) donde se observó que el cultivo era puro. Ver Tabla N°8

**TABLA N°8 Identificación de *E. coli* ATCC 25922 y *Enterobacter cloacae* EB-I-8**

Bacteria	Identificación Macroscópica de la Colonia	Gram	TSA	McK
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Color crema, redondas, bordes regulares, 2-4 mm de diámetro.	Bacilos -		
<i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8	Grandes 4-5 mm d diámetro, color crema, redondas y de bordes reglares.	Bacilos -		

### 3.1.2 Ensayos para determinar la utilización de Tiosulfato de sodio 3% en la recolección de la muestra.

Se realizaron varias tomas de la matriz (agua potable) en frascos estériles de orina impregnados con 0,1 ml de tiosulfato de sodio 3% y recipientes estériles de orina sin el inhibidor, comprobando la inactivación del cloro por la acción del tiosulfato en los recipientes tratados, observando el crecimiento de microorganismos sin ningún inconveniente. **Ver tabla N°8.**

**TABLA N°8 Ensayos realizados con/sin Tiosulfato de sodio 3%.**

<b>Fecha</b>	<b>Muestra</b>	<b>Resultado</b>
Día 1 15 de marzo	Con tiosulfato de sodio 3%	Crecimiento excesivo de bacterias
Día 2 16 de marzo	Con tiosulfato de sodio 3%	Crecimiento excesivo de bacterias
Día 3 15 de marzo	Sin tiosulfato de sodio 3%	Sin crecimiento bacteriano
Día 4 16 de marzo	Sin tiosulfato de sodio 3%	Sin crecimiento bacteriano

### 3.1.3 Pre ensayo (Diluciones).

Se realizó un preensayo para asegurar que las concentraciones preparadas fueron realizadas de forma adecuada, obteniendo el número de bacterias esperadas.

A continuación se presenta los resultados de los datos obtenidos en el pre ensayo.

**Ver Tabla N°10**

**TABLA N°10 Datos obtenidos del Preensayo (Diluciones)**

# de Bacterias	Dilución	Volumen Final	# de Bacterias resultantes. <i>E. coli</i> ATCC 25922 UFC/ml	Recuento Obtenido(inoculando 1 ml de la dilución) <i>E. coli</i> ATCC 25922 UFC/ml
1.5 x 10 <sup>8</sup> UFC/mL 0.5 Escala MacFarland (Solución Madre)	1/100 1 mL de la <u>solución madre</u> con 99 mL de agua peptonada.	100 mL <b>DILUCION 1</b>	1.5 x 10 <sup>6</sup> UFC/mL	-
1.5 x 10 <sup>6</sup> UFC/MI	1/100 1mL de la <u>dilución 1</u> con 99 mL de agua peptonada.	100 mL <b>DILUCION 2</b>	1.5 x 10 <sup>4</sup> UFC/mL	-
1.5 x 10 <sup>4</sup> UFC/mL	1/100 1mL de <u>dilución 2</u> con 99 ml de agua peptonada.	100 mL <b>DILUCION 3</b>	1.5 x 10 <sup>2</sup> UFC/mL	<b>Placa N°1 : 149</b> <b>Placa N°2: 150</b> <b>Placa N°3: 149</b>
1.5 x 10 <sup>2</sup> UFC/mL	1/10 1 mL de la <u>dilución 3</u> con 9 mL de agua peptonada.	10 mL	15 UFC/mL	<b>Placa N°1 : 13</b> <b>Placa N°2: 15</b> <b>Placa N°3: 15</b>

- Se obtuvo el número de bacterias esperadas mediante las suspensiones realizadas, hay que recalcar que no se realizó el ensayo por el método de filtración de membrana, únicamente se sembró 1 mL en placas Petrifilm EC/coliformes.

**3.2 RESULTADOS DEL RECUENTO DE COLIFORMES TOTALES  
(*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) Y *Escherichia coli* ATCC  
25922 CON LOS MEDIOS M-COLIBLUE24 Y 3M PLACAS PETRIFILM.**

**RANGO A**

**80 UFC/100 mL de Coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922),  
donde 50 UFC/100 mL son de *E. coli* ATCC 25922.**

- A continuación se presenta la tabla de resultados del recuento de coliformes totales y *E. coli* con el medio m-Colibblue24 para el rango A, en valores reales y transformados a logaritmo base 10. **Ver Tabla N°11.**

**TABLA N°11 Contaje de *E. coli* ATCC, *Enterobacter cloacae* EB-I-8 y coliformes totales  
(*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) con el medio  
m -Colibblue24.**

RANGO A Colibblue	Valores Reales UFC/ 100mL			Transformación Log10		
	Grupo coliforme fecal. <i>E. coli</i> ATCC 25922 (Colonias azules)	Grupo coliforme total. <i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i> EB- I-8 (Colonias rojas)	<b>coliformes totales</b> ( <i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)	Grupo coliforme fecal. <i>E. coli</i> ATCC 25922 (Colonias azules)	Grupo coliforme total. <i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i> EB-I- 8 (Colonias rojas)	<b>coliformes totales</b> ( <i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)
1	51	29	80	1,71	1,46	1,90
2	47	25	72	1,67	1,40	1,86
3	52	27	79	1,72	1,43	1,90
4	48	28	76	1,68	1,45	1,88
5	50	31	81	1,70	1,49	1,91
6	46	30	76	1,66	1,48	1,88
7	48	28	76	1,68	1,45	1,88
8	50	30	80	1,70	1,48	1,90
9	47	29	76	1,67	1,46	1,88
10	42	28	70	1,62	1,45	1,85
11	45	29	74	1,65	1,46	1,87
12	52	31	83	1,72	1,49	1,92
13	50	28	78	1,70	1,45	1,89
14	42	34	76	1,62	1,53	1,88
15	51	29	80	1,71	1,46	1,90
16	49	28	77	1,69	1,45	1,89
17	47	26	73	1,67	1,41	1,86

18	51	30	81	1,71	1,48	1,91
19	48	28	76	1,68	1,45	1,88
20	48	28	76	1,68	1,45	1,88
21	49	30	79	1,69	1,48	1,90
22	50	29	79	1,70	1,46	1,90
23	47	31	78	1,67	1,49	1,89
24	48	28	76	1,68	1,45	1,88
25	50	26	76	1,70	1,41	1,88
26	48	31	79	1,68	1,49	1,90
27	52	28	80	1,72	1,45	1,90
28	49	30	79	1,69	1,48	1,90
29	49	29	78	1,69	1,46	1,89
30	51	27	78	1,71	1,43	1,89

- A continuación se presenta la tabla de resultados del recuento de coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) y *E. coli* ATCC 25922 con 3M Placas Petrifilm para el rango A, en valores reales y transformados a logaritmo base 10. **Ver Tabla N°12.**

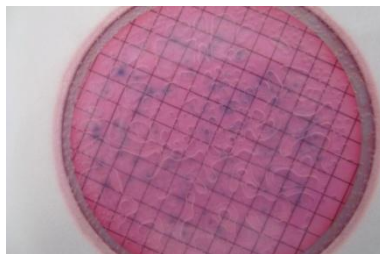
**TABLA N°12 Contaje de *E. coli* ATCC 25922, *Enterobacter cloacae* EB-I-8 y coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) con 3M Placas Petrifilm.**

RANGO A Petrifilm	Valores Reales UFC/ 100mL			Transformación Log10		
	Grupo coliforme fecal. <i>E. coli</i> ATCC 25922 (Colonias azules)	Grupo coliforme total. <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 (Colonias rojas)	coliformes totales ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)	Grupo coliforme fecal. <i>E. coli</i> ATCC 25922 (Colonias azules)	Grupo coliforme total. <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 (Colonias rojas)	coliformes totales ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)
1	50	5	55	1,70	0,70	1,74
2	43	7	50	1,63	0,85	1,70
3	43	3	46	1,63	0,48	1,66
4	43	5	48	1,63	0,70	1,68
5	45	4	49	1,65	0,60	1,69
6	45	7	52	1,65	0,85	1,72
7	49	3	52	1,69	0,48	1,72
8	43	4	47	1,63	0,60	1,67
9	45	6	51	1,65	0,78	1,71

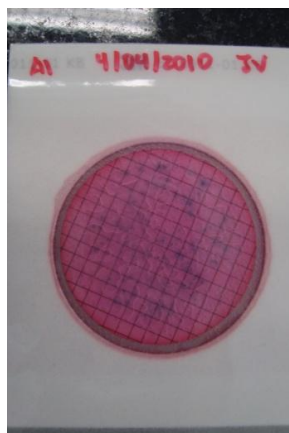
10	49	4	53	1,69	0,60	1,72
11	42	4	46	1,62	0,60	1,66
12	41	4	45	1,61	0,60	1,65
13	49	3	52	1,69	0,48	1,72
14	45	4	49	1,65	0,60	1,69
15	42	5	47	1,62	0,70	1,67
16	41	4	45	1,61	0,60	1,65
17	39	6	45	1,59	0,78	1,65
18	40	6	46	1,60	0,78	1,66
19	31	3	34	1,49	0,48	1,53
20	41	6	47	1,61	0,78	1,67
21	43	3	46	1,63	0,48	1,66
22	42	1	43	1,62	0,00	1,63
23	39	4	43	1,59	0,60	1,63
24	46	5	51	1,66	0,70	1,71
25	49	3	52	1,69	0,48	1,72
26	48	3	51	1,68	0,48	1,71
27	49	4	53	1,69	0,60	1,72
28	46	5	51	1,66	0,70	1,71
29	47	6	53	1,67	0,78	1,72
30	45	5	50	1,65	0,70	1,70

- A continuación se observa una de las 3M Placas Petrifilm utilizadas para el rango A, en la cual se observan colonias *E. coli* ATCC 25922 difusas de color azul, mientras que *Enterobacter cloacae* EB-I-8 (Colonias rojas) no se observan. **Ver Figura N°9 y 10.**

**FIGURA N°9** 3M placa Petrifilm utilizada en el Rango A.

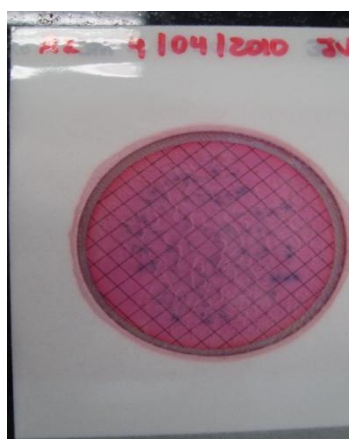


**FIGURA N° 10** 3M placa Petrifilm utilizada en el Rango A.



- A continuación se observa la presencia de exceso de gas en las placas para el rango A, lo cual causó dificultad al momento de la lectura. **Ver Figura N°11.**

**FIGURA N° 11** 3M placa Petrifilm con exceso de gas.



### **3.2.1 Análisis Estadístico**

Utilizando las tablas N° 11 y 12, se realizó el análisis estadístico para determinar la media, la desviación estándar para el medio m-Colibblue24 y las 3M placas Petrifilm. **Ver Tabla N°13.**

**TABLA N°13 Análisis Estadístico para el Rango A.**

80 UFC/100 mL de coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922), donde 50 UFC/100mL son de *E. coli* ATCC 25922.

Variable	Medio m-Colibblue24		3M Placas Petrifilm	
	Media Log <sub>10</sub>	Desviación estándar	Media Log <sub>10</sub>	Desviación estándar
<i>E. coli</i> ATCC 25922 (Colonias Azules)	1.89	0.02	1.68	0.04
<i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 (Colonias Rojas)	1.68	0.02	1.64	0.04
coliformes Totales ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)	1.46	0.03	0.61	0.16

### 3.2.2 Análisis de varianza (ANOVA) de un factor.

**ANOVA REALIZADO ENTRE RECUENTOS DE *E. coli* ATCC 25922, *Enterobacter cloacae* EB-I-8 Y COLIFORMES TOTALES (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) ENTRE M-COLIBLUE24 Y 3M PLACAS PETRIFILM.**

#### **RANGO A**

80 UFC/100 mL de coliformes totales ((*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922), donde 50 UFC/100 mL son de *E. coli* ATCC 25922.

Para el análisis de Anova se utilizaron los datos obtenidos en el recuento de *E. Coli* ATCC 25922, *Enterobacter cloacae* EB-I-8 y coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) entre m-Colibblue24 y 3M placas Petrifilm. **Ver tablas N° 14 – N°19.**

**TABLA N° 14 Datos obtenidos en el Análisis de varianza ANOVA para *E. coli* ATCC 25922 con ambos medios.**

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Valor F</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>TOTAL</b>	59	0.09			
<b>m-Colibblue24/ 3M placas Petrifilm</b>	1	0.03	0.03	24.97	<b>&lt;.0001</b>
<b>Error</b>	58	0.07	0.00		
<b>CV= 2.06</b>					

- El valor obtenido para el coeficiente de variación en la Tabla N° 14 nos indica una alta precisión en el recuento de *E. coli* ATCC 25922, debido a que el porcentaje se encuentra por debajo del 8 % para ser considerados precisos.

**TABLA N° 15 PRUEBA DE TUKEY.**

<b>Descripción</b>	<b>Media Log<sub>10</sub></b>	<b>R de Significancia</b>	<b>Media Valor Real</b>
<b>m- Colibblue24</b>	1.68	A	48.53
<b>3M placas Petrifilm</b>	1.64	B	44.00

**TABLA N° 16 Datos obtenidos en el Análisis de varianza ANOVA para *Enterobacter cloacae* EB-I-8 con ambos medios.**

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Valor F</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>TOTAL</b>	59	11.43			
<b>m-Colibblue24/ 3M placas Petrifilm</b>	1	10.62	10.62	755.16	<b>&lt;.0001</b>
<b>Error</b>	58	0.81	0.01		
<b>CV= 11.42</b>					

- El valor obtenido para el coeficiente de variación en la Tabla N° 16 nos indica una precisión aceptable en el recuento de *Enterobacter cloacae* EB-I-8 en ambos medios, debido a que el porcentaje se encuentra dentro del 8 a 14% para ser considerado aceptable, entre más bajos sean los valores obtenidos son más precisos los valores.

**TABLA N° 17 PRUEBA DE TUKEY.**

<b>Descripción</b>	<b>Media Log<sub>10</sub></b>	<b>R de Significancia</b>	<b>Media Valor Real</b>
<b>m- Colibblue24</b>	1.46	A	28.83
<b>3M placas Petrifilm</b>	0.62	B	4.40

**Tabla N° 18 Datos obtenidos en el Análisis de varianza ANOVA para coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) con ambos medios.**

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F cal</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>TOTAL</b>	59	0.69			
<b>m-Colibblue24/ 3M placas Petrifilm</b>	1	0.63	0.63	658.08	<b>&lt;.0001</b>
<b>Error</b>	58	0.05	0.00		
<b>CV= 1.74</b>					

- El valor obtenido para el coeficiente de variación en la Tabla N° 18 nos indica una alta precisión en el recuento de coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922), debido a que el porcentaje se encuentra por debajo del 8 % para ser considerados precisos.

**TABLA N° 19 PRUEBA DE TUKEY.**

<b>Descripción</b>	<b>Media Log<sub>10</sub></b>	<b>R de Significancia</b>	<b>Media Valor Real</b>
<b>m- Colibblue24</b>	1.89	A	77.40
<b>3M placas Petrifilm</b>	1.68	B	48.40

- El análisis de varianza nos muestra que existe una alta significancia, es decir que hay diferencia entre los recuentos obtenidos entre el medio m-Colibblue 24 y 3M Placas Petrifilm para el Rango A. Rechazando la hipótesis nula y aceptando la hipótesis

alternativa. Ver Tablas N° 14, 16,18.

- Posteriormente se realizó una prueba de Tukey, la cual permite demostrar que grupo de datos está dentro del rango esperado. Los datos revelaron que los recuentos cercanos a los rangos esperados: 80 UFC/100 mL de Coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922); donde 50 UFC/100 mL son de *E. coli* ATCC 25922.) se encuentran aproximados al grupo “A” perteneciente al medio m-Colibblue 24. Ver Tablas N° 15, 17,19.

### 3.2.3 Porcentaje de Recuperación.

A continuación se observa el porcentaje de recuperación que se obtuvo con el medio m-Colibblue24 y 3M placas Petrifilm para el rango A.

**TABLA N° 20 Porcentaje de recuperación con el medio m –Colibblue24 y 3M Placas Petrifilm para el Rango A.**

	Valores experimentales (media)	Valores Teóricos	% de Recuperación
<b>m-Colibblue24</b>			
<i>E. coli</i> ATCC 25922	49	30	162
<i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8	29	50	58
coliformes Totales ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922).	77	80	97
<b>3M placas Petrifilm</b>			
<i>E. coli</i> ATCC 25922	44	30	147
<i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8	4	50	9
coliformes Totales ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922).	48	80	61

- Los porcentajes de recuperación son **aceptables** debido a que puede estar entre el 80 y 110% valor teórico para el recuento de *E. coli* ATCC 25922 tanto para medio m-Colibblue 24 y 3M placas Petrifilm, *Enterobacter cloacae* EB-I-8 y coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) con los 2 medios están por debajo del valor teórico siendo estas no aceptables en el porcentaje de recuperación.

### 3.2.4 Prueba de correlación

A continuación se observa la prueba de correlación la cual demostró que el recuento de *E. coli* ATCC 25922 y *Enterobacter cloacae* EB-I-8 tiene una baja correlación con las coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922), es decir que no se encuentran relacionadas con el recuento total. **Ver Tabla 21.**

**TABLA N°21 Prueba de correlación Pearson con el medio m-Colibblue24. Rango A.**

	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i> EB-I-8
<b>coliformes totales</b> <b>(<i>Enterobacter cloacae</i></b> <b>EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC</b> <b>25922).</b>	<b>0.76882</b>	<b>0.48428</b>
	<.0001	0.0067

A continuación se observa la prueba de correlación la cual demostró que el recuento de *E. coli* ATCC 25922 tiene una alta correlación con las coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922), contrario a *Enterobacter cloacae* EB-I-8 que no tiene una correlación, no resulta suficiente el recuento de *Enterobacter cloacae* EB-I-8 para relacionar con el número total de coliformes. **Ver Tabla N° 22.**

**TABLA N° 22 Prueba de correlación de Pearson con las 3M placas Petrifilm. Rango A.**

	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i> EB-I-8
<b>coliformes totales</b> <b>(<i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-</b> <b>8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922).</b>	<b>0.95132</b>	<b>0.31526</b>
	<.0001	0.0897

**3.3 RESULTADOS DEL RECUENTO DE COLIFORMES TOTALES  
(*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) Y *Escherichia coli* ATCC  
25922 CON LOS MEDIOS M-COLIBUE24 Y 3M PLACAS PETRIFILM.**

**RANGO B**

**50 UFC/100mL de coliformes totales ((*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922),  
donde 25 UFC/100mL son de *E. coli* ATCC 25922.**

- A continuación se presenta la tabla de resultados del recuento de coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) y *E. coli* ATCC 25922 con el medio m-Colibblue24 para el rango B, en valores reales y transformados a logaritmo base 10. Ver Tabla N°23.

**TABLA N°23 Contaje de *E. coli* ATCC 25922, *Enterobacter cloacae* EB-I-8 y coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) con m - Colibblue24.**

RANGO B /m-Colibblue24	Valores Reales UFC/100mL			Transformación Log10		
	Grupo coliforme fecal. <i>E. coli</i> ATCC 25922 (Colonias azules)	Grupo coliforme total. <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 (Colonias rojas)	coliformes totales ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)	Grupo coliforme fecal. <i>E. coli</i> ATCC 25922 (Colonias azules)	Grupo coliforme total. <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 (Colonias rojas)	coliformes totales ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)
1	24	24	48	1,38	1,38	1,68
2	23	25	48	1,36	1,40	1,68
3	25	23	48	1,40	1,36	1,68
4	24	26	50	1,38	1,41	1,70
5	22	24	46	1,34	1,38	1,66
6	26	26	52	1,41	1,41	1,72
7	25	24	49	1,40	1,38	1,69
8	24	25	49	1,38	1,40	1,69
9	23	25	48	1,36	1,40	1,68
10	24	24	48	1,38	1,38	1,68
11	24	23	47	1,38	1,36	1,67
12	22	26	48	1,34	1,41	1,68
13	24	22	46	1,38	1,34	1,66
14	25	22	47	1,40	1,34	1,67

15	27	24	51	1,43	1,38	1,71
16	23	23	46	1,36	1,36	1,66
17	24	23	47	1,38	1,36	1,67
18	25	25	50	1,40	1,40	1,70
19	25	24	49	1,40	1,38	1,69
20	25	23	48	1,40	1,36	1,68
21	24	24	48	1,38	1,38	1,68
22	25	26	51	1,40	1,41	1,71
23	23	24	47	1,36	1,38	1,67
24	22	25	47	1,34	1,40	1,67
25	25	25	50	1,40	1,40	1,70
26	25	22	47	1,40	1,34	1,67
27	24	24	48	1,38	1,38	1,68
28	25	25	50	1,40	1,40	1,70
29	26	25	51	1,41	1,40	1,71
30	25	24	49	1,40	1,38	1,69

- A continuación se presenta la tabla de resultados del recuento de coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) y *E. coli* ATCC 25922 con 3M Placas Petrifilm para el rango B, en valores reales y transformados a logaritmo base 10. Ver Tabla N° 24.

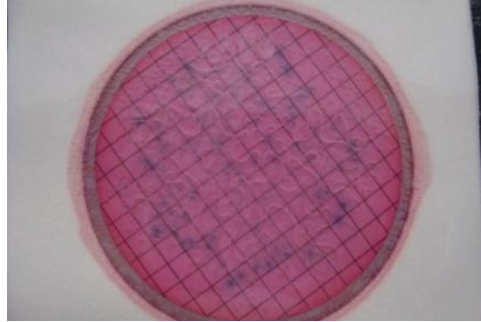
**TABLA N° 24 Contaje de *E. coli* ATCC 25922, *Enterobacter cloacae* EB-I-8 y coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) con 3M placas Petrifilm.**

RANGO B /Petrifilm	Valores Reales			Transformación Log10		
	Grupo coliforme fecal. <i>E. coli</i> ATCC 25922 (Colonias azules)	Grupo coliforme total. <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 (Colonias rojas)	coliformes totales ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)	Grupo coliforme fecal. <i>E. coli</i> ATCC 25922 (Colonias azules)	Grupo coliforme total. <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 (Colonias rojas)	coliformes totales ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)
1	23	4	27	1,36	0,60	1,43
2	25	2	27	1,40	0,30	1,43
3	23	3	26	1,36	0,48	1,41
4	20	1	21	1,30	0,00	1,32
5	23	2	25	1,36	0,30	1,40
6	18	4	22	1,26	0,60	1,34

7	26	6	32	1,41	0,78	1,51
8	24	2	26	1,38	0,30	1,41
9	20	4	24	1,30	0,60	1,38
10	22	3	25	1,34	0,48	1,40
11	25	4	29	1,40	0,60	1,46
12	26	1	27	1,41	0,00	1,43
13	25	3	28	1,40	0,48	1,45
14	23	2	25	1,36	0,30	1,40
15	22	2	24	1,34	0,30	1,38
16	24	3	27	1,38	0,48	1,43
17	25	0	25	1,40	0	1,40
18	24	2	26	1,38	0,30	1,41
19	26	4	30	1,41	0,60	1,48
20	22	2	24	1,34	0,30	1,38
21	24	2	26	1,38	0,30	1,41
22	25	3	28	1,40	0,48	1,45
23	22	4	26	1,34	0,60	1,41
24	20	3	23	1,30	0,48	1,36
25	21	2	23	1,32	0,30	1,36
26	23	4	27	1,36	0,60	1,43
27	22	2	24	1,34	0,30	1,38
28	20	3	23	1,30	0,48	1,36
29	21	2	23	1,32	0,30	1,36
30	24	3	27	1,38	0,48	1,43

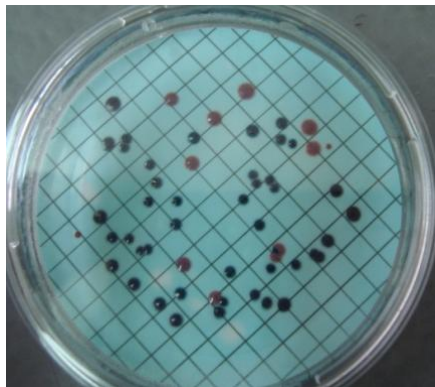
- A continuación se puede observar en la Figura N°12 *E. coli* ATCC 25922 colonias azules con presencia de gas pero son poco visibles resultando difícil su conteo. No se observó colonias rojas (*Enterobacter cloacae* EB-I-8).

**Figura N°12:** 3M placa Petrifilm colonias azules (*E. coli* ATCC 25922) con poca visibilidad.

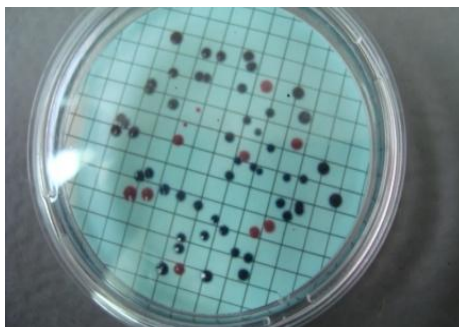


- A continuación se puede observar el crecimiento *E. coli* ATCC 25922 y *Enterobacter cloacae* EB-I-8 con medio m-Colibblue24 muy claramente facilitando el contaje. **Ver Figura N°13 y 14.**

**Figura N° 13** Crecimiento *E. coli* ATCC 25922 (Colonias azules) y *Enterobacter cloacae* EB-I-8 (Colonias rojas) en medio m-Colibblue24 muy bien definidas.



**Figura N°14** Crecimiento con el Medio m- Colibblue24 de *E. coli* ATCC 25922(Colonias azules)  
*Enterobacter cloacae* EB-I-8 (Colonias Rojas) muy bien definidas debido al medio, que nos  
proporciona los componentes adecuados para el crecimiento.



### 3.3.1 Análisis Estadístico

Utilizando las tablas N° 23 y 24, se realizó el análisis estadístico para determinar la media, la desviación estándar para el medio m-Colibblue 24 y las 3M placas Petrifilm. **Ver tabla N° 25.**

**TABLA N°25 Análisis Estadístico para el Rango B.**

50 UFC/100mL de coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922),  
donde 25 UFC/100mL son de *E. coli* ATCC 25922.

Variable	Medio m- Colibblue24		3M Placas Petrifilm	
	Media Log <sub>10</sub>	Desviación estándar	Media Log <sub>10</sub>	Desviación estándar
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1.68	0.014	1.41	0.040
<i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8	1.38	0.021	1.36	0.040
coliformes Totales ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)	1.38	0.021	0.41	0.18

### 3.3.2 Análisis de varianza (ANOVA) de un factor.

#### **ANOVA REALIZADO ENTRE RECUENTOS DE *E. coli* ATCC 25922, *Enterobacter cloacae* EB-I-8 Y COLIFORMES TOTALES (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) ENTREM-COLIBLUE 24 Y 3M PLACAS PETRIFILM.**

##### **RANGO B**

50 UFC/100mL de coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922), donde 25 UFC/100mL son de *E. coli* ATCC 25922.

Para el análisis de Anova se utilizaron los datos obtenidos en el recuento de *E. coli* ATCC 25922, *Enterobacter cloacae* EB-I-8 y coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) entre el medio m-Coliblu 24 y las 3M placas Petrifilm. **Ver tablas N° 26, 27 y 29.**

**TABLA N° 26 Datos obtenidos en el Análisis de varianza ANOVA para *E. coli* ATCC 25922 con ambos medios.**

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F cal</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>TOTAL</b>	59	0.07			
<b>m-Coliblu24/3M placas Petrifilm</b>	1	0.01	0.01	9.48	<b>0.004</b>
<b>Error</b>	58	0.06	0.00		
<b>CV= 2.37</b>					

- El análisis de varianza para la Tabla N° 26 nos muestra que no existe una alta significancia, es decir que no hay diferencia entre los recuentos obtenidos de *E. Coli* ATCC 25922 con el medio m-Coliblu 24 y 3M placas Petrifilm para el Rango B.
- El valor obtenido para el coeficiente de variación en la Tabla N° 26 nos indica una alta precisión en el recuento de *E. Coli* ATCC 25922, debido a que el porcentaje se encuentra por debajo del 8 % para ser considerados precisos.

**TABLA N° 27 Datos obtenidos en el Análisis de varianza ANOVA para *Enterobacter cloacae* EB-I-8 con ambos medios.**

Fuente	GL	SC	CM	F cal	Pr > F
<b>TOTAL</b>	59	14.63			
<b>m-Colibblue24/ 3M placas Petrifilm</b>	1	13.72	13.72	861.64	<b>&lt;.0001</b>
<b>Error</b>	58	0.91	0.01		
<b>CV= 13.89</b>					

- El valor obtenido para el coeficiente de variación en la Tabla N° 27 nos indica una precisión aceptable en el recuento de *Enterobacter cloacae* EB-I-8 en ambos medios, debido a que el porcentaje se encuentra dentro del 8 a 14% para ser considerado aceptable, entre más bajos sean los valores obtenidos son más precisos los valores.

**TABLA N° 28 PRUEBA DE TUKEY.**

Descripción	Media Log <sub>10</sub>	R. de Significancia	Media Valor Real
<b>m-Colibblue24</b>	1.38	A	24.16
<b>3M placas Petrifilm</b>	0.42	B	2.73

**TABLA N° 29 Datos obtenidos en el Análisis de varianza ANOVA Para coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922).**

Fuente	GL	SC	CM	F cal	Pr > F
<b>TOTAL</b>	59	1.21			
<b>m-Colibblue24/ 3M placas Petrifilm</b>	1	1.15	1.15	1252.09	<b>&lt;.0001</b>
<b>Error</b>	58	0.05	0.00		
<b>CV= 1.96</b>					

- El valor obtenido para el coeficiente de variación en la Tabla N° 29 nos indica una alta precisión en el recuento de coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC

25922), debido a que el porcentaje se encuentra por debajo del 8 % para ser considerados precisos.

**TABLA N°30 PRUEBA DE TUKEY.**

<b>Descripción</b>	<b>Media Log<sub>10</sub></b>	<b>R de Significancia</b>	<b>Media Valor Real</b>
<b>m-Colibblue24</b>	1.68	A	48.43
<b>3M placas Petrifilm</b>	1.41	B	25.66

- El análisis de varianza nos muestra que existe una alta significancia, es decir que hay diferencia entre los recuentos obtenidos entre el medio m-Colibblue 24 y 3M placas Petrifilm para el Rango B. Rechazando la hipótesis nula y aceptando la hipótesis alternativa. **Ver tablas 27, 29.**
- Posteriormente se realizó una prueba de Tukey, la cual permite demostrar que grupo de datos está dentro del rango esperado. Los datos revelaron que los recuentos cercanos a los rangos esperados 50 UFC/100mL de coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922), donde 25 UFC/100mL son de *E. coli* ATCC 25922, se encuentran aproximados al grupo “A” perteneciente al medio m-Colibblue24. **Ver Tablas 28, 30.**

### **3.3.3 Porcentaje de Recuperación**

A continuación se observa el porcentaje de recuperación que se obtuvo con el medio m-Colibblue24 y 3M placas Petrifilm para el rango B.

**TABLA N° 31 Porcentaje de recuperación con el medio m-Colibblue24 y 3M Placas Petrifilm**

**para el Rango B.**

	<b>Valores experimentales (media)</b>	<b>Valores Teóricos</b>	<b>% de Recuperación</b>
<b>Colibblue</b>			
<i>E. coli</i> ATCC 25922	24	25	97
<i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8	24	25	97
coliformes Totales ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)	48	50	97
<b>Petrifilm</b>			
<i>E. coli</i> ATCC 25922	23	25	92
<i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8	3	25	11
coliformes Totales ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)	26	50	51

- Los porcentajes de recuperación para el medio de m-Colibblue24 y 3M placas Petrifilm son **aceptables** debido a que están dentro del rango entre el 80 y 110% valor teórico para ser considerado como Aceptable para el recuento de *E. coli* ATCC 25922, *Enterobacter cloacae* EB-I-8 y coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922). Con 3M placas Petrifilm para el recuento de *Enterobacter cloacae* EB-I-8 el porcentaje de recuperación **no es aceptable** debido a que no cumple con el valor requerido, por esta razón coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) tiene un % de recuperación no esperado.

### 3.3.4 Prueba de correlación

Se demostró que el recuento de *E. coli* ATCC 25922 y *Enterobacter cloacae* EB-I-8 tiene una baja correlación con las coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922), es decir que no se encuentran relacionadas con el recuento total. Ver Tabla 32.

**TABLA N°32 Prueba de correlación Pearson.**

#### **Prueba de correlación con el medio m-Colibblue24. Rango B.**

	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i> EB-I-8
<b>coliformes totales</b> ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)	<b>0.67786</b>	<b>0.66930</b>
	<.0001	<.0001

La prueba de correlación demostró que el recuento de *E. coli* ATCC 2592 tiene una alta correlación con las coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922), al contrario con *Enterobacter cloacae* EB-I-8 que no tienen una correlación con respecto al conteo de coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922). Ver Tabla 33.

**TABLA N° 33 Prueba de correlación de Pearson.**

#### **Prueba de correlación con las 3M placas Petrifilm. Rango B.**

	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i> EB-I-8
<b>coliformes totales</b> ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)	<b>0.87164</b>	<b>0.46628</b>
	<.0001	0.0108

**3.4 RESULTADOS DEL RECUENTO DE COLIFORMES TOTALES  
(*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) Y *Escherichia coli* ATCC  
25922 CON LOS MEDIOS M-COLIBUE 24 Y 3M PLACAS PETRIFILM.  
RANGO C**

**25 UFC /100 mL de coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922),  
donde 10 UFC/100 mL son de *E. coli* ATCC 25922.**

- A continuación se presenta la tabla de resultados del recuento de coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) y *E. coli* ATCC 25922 con el medio m-Colibblue 24 para el rango C, en valores reales y transformados a logaritmo base 10. **Ver Tabla N° 34**

**TABLA N°34 Contaje de *E. coli* ATCC 25922, *Enterobacter cloacae* EB-I-8 y Coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) con m-Colibblue24.**

RANGO C /m-Colibblue24	Valores Reales UFC/100mL			Transformación Log10		
	Grupo coliforme fecal. <i>E. coli</i> ATCC 25922 (Colonias azules)	Grupo coliforme total. <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 (Colonias rojas)	coliformes totales ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)	Grupo coliforme fecal. <i>E. coli</i> ATCC 25922 (Colonias azules)	Grupo coliforme total. <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 (Colonias rojas)	coliformes totales ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)
1	35	10	45	1,54	1,00	1,65
2	41	18	59	1,61	1,26	1,77
3	56	10	66	1,75	1,00	1,82
4	46	10	56	1,66	1,00	1,75
5	43	15	58	1,63	1,18	1,76
6	43	12	55	1,63	1,08	1,74
7	35	8	43	1,54	0,90	1,63
8	42	18	60	1,62	1,26	1,78
9	37	10	47	1,57	1,00	1,67
10	35	12	47	1,54	1,08	1,67
11	37	10	47	1,57	1,00	1,67

12	44	12	56	1,64	1,08	1,75
13	43	9	52	1,63	0,95	1,72
14	40	9	49	1,60	0,95	1,69
15	40	10	50	1,60	1,00	1,70
16	51	6	57	1,71	0,78	1,76
17	52	3	55	1,72	0,48	1,74
18	55	9	64	1,74	0,95	1,81
19	46	9	55	1,66	0,95	1,74
20	49	11	60	1,69	1,04	1,78
21	47	11	58	1,67	1,04	1,76
22	44	12	56	1,64	1,08	1,75
23	42	17	59	1,62	1,23	1,77
24	51	9	60	1,71	0,95	1,78
25	48	14	62	1,68	1,15	1,79
26	41	9	50	1,61	0,95	1,70
27	44	7	51	1,64	0,85	1,71
28	50	12	62	1,70	1,08	1,79
29	26	9	35	1,41	0,95	1,54
30	49	11	60	1,69	1,04	1,78

- A continuación se presenta la tabla de resultados del recuento de coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) y *E. coli* ATCC 25922 con 3M placas Petrifilm para el rango C, en valores reales y transformados a logaritmo base 10. Ver Tabla N°35.

**TABLA N°35 Contaje de *E. coli* ATCC 25922, *Enterobacter cloacae* EB-I-8 y coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) con 3M placas Petrifilm.**

RANGO C /Petrifilm	Valores Reales UFC/100mL			Transformación Log10		
	Grupo coliforme fecal. <i>E. coli</i> ATCC 25922 (Colonias azules)	Grupo coliforme total. <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 (Colonias rojas)	coliformes totales ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)	Grupo coliforme fecal. <i>E. coli</i> ATCC 25922 (Colonias azules)	Grupo coliforme total. <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 (Colonias rojas)	coliformes totales ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)
1	40	4	44	1,60	0,60	1,64
2	40	10	50	1,60	1,00	1,70
3	45	7	52	1,65	0,85	1,72
4	38	5	43	1,58	0,70	1,63
5	41	7	48	1,61	0,85	1,68

6	32	5	37	1,51	0,70	1,57
7	33	4	37	1,52	0,60	1,57
8	27	3	30	1,43	0,48	1,48
9	32	5	37	1,51	0,70	1,57
10	29	2	31	1,46	0,30	1,49
11	38	7	45	1,58	0,85	1,65
12	27	5	32	1,43	0,70	1,51
13	35	7	42	1,54	0,85	1,62
14	40	4	44	1,60	0,60	1,64
15	28	4	32	1,45	0,60	1,51
16	40	6	46	1,60	0,78	1,66
17	36	3	39	1,56	0,48	1,59
18	39	5	44	1,59	0,70	1,64
19	42	4	46	1,62	0,60	1,66
20	38	3	41	1,58	0,48	1,61
21	25	5	30	1,40	0,70	1,48
22	42	4	46	1,62	0,60	1,66
23	28	6	34	1,45	0,78	1,53
24	28	5	33	1,45	0,70	1,52
25	34	5	39	1,53	0,70	1,59
26	32	3	35	1,51	0,48	1,54
27	24	4	28	1,38	0,60	1,45
28	37	7	44	1,57	0,85	1,64
29	26	5	31	1,41	0,70	1,49
30	26	1	27	1,41	0,00	1,43

### 3.4.1 Análisis Estadístico

Utilizando las tablas N° 34 y 35, se realizó el análisis estadístico para determinar la media, la desviación estándar para el medio m-Colibblue24 y las 3M placas Petrifilm. **Ver tabla N°36.**

**Tabla N° 36 Análisis Estadístico para el Rango C.**

**RANGO C**

25 UFC /100 mL de coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922),  
donde 10 UFC/100 mL son de *E. coli* ATCC 25922.

Variable	Medio m-Colibblue24		3M Placas Petrifilm	
	Media Log <sub>10</sub>	Desviación estándar	Media Log <sub>10</sub>	Desviación estándar
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1.73	0.05	1.58	0.08
<i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8	1.63	0.07	1.53	0.08
coliformes Totales ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)	1.00	0.15	0.65	0.19

**3.4.2 Análisis de varianza (ANOVA) de un factor.**

**RESULTADOS DEL RECUENTO DE *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter cloacae* EB-I-8 CON LOS MEDIOS M-COLIBUE 24 Y 3M PLACAS PETRIFILM.**

**RANGO C**

25 UFC /100 mL de coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922),  
donde 10 UFC/100 mL son de *E. coli* ATCC 25922.

Para el análisis de Anova se utilizaron los datos obtenidos en el recuento de *E. coli* ATCC 25922, *Enterobacter cloacae* EB-I-8 y coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) entre el medio m-Colibblue24 y las 3M placas Petrifilm. **Ver tablas N° 37, 39 y**

**41.**

**TABLA N° 37 Datos obtenidos en el Análisis de varianza ANOVA para *E. coli* ATCC 25922 para ambos medios.**

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F cal</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>TOTAL</b>	59	0.51			
<b>m-Colibblue24/3M placas Petrifilm</b>	1	0.18	0.18	32.26	<.0001
<b>Error</b>	58	0.33	0.00		
<b>CV= 4.75</b>					

- El valor obtenido para el coeficiente de variación en la Tabla N° 37 nos indica una alta precisión en el recuento de *E. coli* ATCC 25922, debido a que el porcentaje se encuentra por debajo del 8 % para ser considerados precisos.

**TABLA N° 38 PRUEBA DE TUKEY**

<b>Descripción</b>	<b>Media Log<sub>10</sub></b>	<b>R. de Significancia</b>	<b>Media Valor Real</b>
<b>m-Colibblue24</b>	1.63	A	43.73
<b>3M placas Petrifilm</b>	1.52	B	34.07

**TABLA N° 39 Datos obtenidos en el Análisis de varianza ANOVA para *Enterobacter cloacae* EB-I-8 para ambos medios.**

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F cal</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>TOTAL</b>	59	3.62			
<b>m-Colibblue24/3M placas Petrifilm</b>	1	1.93	1.93	66.44	<.0001
<b>Error</b>	58	1.69	0.03		
<b>CV= 20.56</b>					

- El valor obtenido para el coeficiente de variación en la Tabla N° 39 nos indica una poca precisión en el recuento de *Enterobacter cloacae* EB-I-8 en ambos medios, debido a que el porcentaje se encuentra mayor al 20% para ser considerado aceptable, entre más bajos sean los valores obtenidos son más precisos los valores.

**TABLA N° 40 PRUEBA TUKEY.**

Descripción	Media Log <sub>10</sub>	R. de Significancia	Media Valor Real
<b>m- Colibblue24</b>	1.00	A	10.73
<b>3M placas Petrifilm</b>	0.64	B	4.83

**TABLA N°41 Datos obtenidos en el Análisis de varianza ANOVA para coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922).**

Fuente	GL	SC	CM	F cal	Pr > F
<b>TOTAL</b>	59	0.62			
<b>m-Colibblue24/ 3M placas Petrifilm</b>	1	0.33	0.33	67.33	<.0001
<b>Error</b>	58	0.29	0.00		
<b>CV= 4.26</b>					

- El valor obtenido para el coeficiente de variación en la Tabla N° 41 nos indica una alta precisión en el recuento de coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922), debido a que el porcentaje se encuentra por debajo del 8 % para ser considerados precisos.

**TABLA N° 42 PRUEBA TUKEY**

Descripción	Media Log <sub>10</sub>	R. de Significancia	Media Valor Real
<b>m-Colibblue24</b>	1.73	A	54.47
<b>3M placas Petrifilm</b>	1.58	B	38.90

- El análisis de varianza nos muestra que existe una alta significancia, es decir que hay diferencia entre los recuentos obtenidos entre el medio m-Colibblue24 y 3M Placas Petrifilm para el Rango B. Rechazando la hipótesis nula y aceptando la hipótesis alternativa. **Ver tablas 37, 39,41.**

- Posteriormente se realizó una prueba de Tukey, la cual permite demostrar que grupo de datos está dentro del rango esperado. Los datos revelaron que los recuentos cercanos a los rangos 25 UFC /100 mL de coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922), donde 10 UFC/100 mL son de *E. coli* ATCC 25922 no se encuentran aproximados a ningún grupo. Ver tablas 38, 40,42.

### 3.4.3 Porcentaje de Recuperación con el medio m-Colibblue24 y 3M Placas Petrifilm para el Rango C.

A continuación se observa el porcentaje de recuperación que se obtuvo con el medio m-Colibblue24 y 3M placas Petrifilm para el rango C.

**TABLA N°43 Porcentaje de recuperación con el medio m-Colibblue24 y 3M placas Petrifilm para el Rango C.**

	Valores experimentales (media)	Valores Teóricos	% de Recuperación
<b>Colibblue</b>			
<i>E. coli</i> ATCC 25922	44	10	437
<i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8	11	15	72
coliformes Totales ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)	54	25	218
<b>Petrifilm</b>			
<i>E. coli</i> ATCC 25922	34	10	341
<i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8	5	15	32
coliformes Totales ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)	39	25	155

El porcentaje de recuperación para el medio de m-Colibblue24 y 3M placas Petrifilm para *E. coli* ATCC 25922 y coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) supera los valores, es decir hay un sobrecrecimiento de bacterias, por lo cual no entran dentro de la categoría de “**acceptable**”, al igual que *Enterobacter cloacae* EB-I-8 tanto para m-Colibblue24 y 3M placas Petrifilm que se encuentran por debajo de los valores, siendo estos valores no aceptables.

#### 3.4.4 Prueba de correlación

A continuación se observa la prueba de correlación la cual demostró que el recuento de *E. coli* ATCC 25922 tiene una alta correlación con las coliformes totales (*Enterobacter cloacae* EB-I-8 + *E. coli* ATCC 25922) para el medio de m-Colibblue24 y 3M placas Petrifilm a lo contrario de *Enterobacter cloacae* EB-I-8 que no existe una correlación. Ver Tablas N° 44 y 45.

**Tabla N°44 Prueba de correlación Pearson.**

**Prueba de correlación con el medio m-Colibblue24. Rango C.**

	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8
<b>coliformes totales</b> ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)	<b>0.90722</b>	<b>0.24929</b>
	<.0001	0.1840

**Tabla N°45 Prueba de correlación de Pearson.**

**Prueba de correlación con las placas Petrifilm. Rango C.**

	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8
<b>coliformes totales</b> ( <i>Enterobacter cloacae</i> EB-I-8 + <i>E. coli</i> ATCC 25922)	<b>0.97239</b>	<b>0.58163</b>
	<.0001	0.0007

## CONCLUSIONES

- Los porcentajes obtenidos para el coeficiente de variación muestran en general que los 30 recuentos realizados para cada rango (A, B y C) y con cada medio (m-Colibblue24 y 3M placas Petrifilm) son precisos, es decir que no existe variación.
- La prueba de ANOVA indicó que existe diferencias significativas en los recuentos entre los medios m – Colibblue24 y 3M Placas Petrifilm; ya que la probabilidad es  $<0.05$  por esta razón se rechaza la hipótesis nula (contaje de colonias con m-Colibblue 24 es igual al conteo de colonias de placas Petrifilm), aceptando la hipótesis alternativa.
- En base a los porcentajes de recuperación en el rango B para el conteo de bacterias: *E. coli* (colonias azules); *Enterobacter cloacae* (colonias rojas) y coliformes totales se obtuvo un 97% de recuperación para el medio m-Colibblue24, demostrando que la recuperación es satisfactoria en relación con el rango B esperado.
- En el crecimiento de *Enterobacter cloacae* (colonias rojas) en placas Petrifilm, no se obtuvo una recuperación satisfactoria para los 3 rangos debido a que no hay definición de detalles macroscópicos y esto dificulta al momento de realizar el conteo.
- En el recuento de *E. coli* en las placas Petrifilm no se visualizó claramente las características de las colonias (Colonias azules, con burbuja(s) de gas asociadas), observado únicamente manchas difusas de color azul, interpretando dichas colonias como *E. coli*.
- En el recuento de *Enterobacter cloacae* en las 3M placas Petrifilm se observó un escaso crecimiento, sus características (colonias rojas, con zona de enrojecimiento alrededor y burbuja(s) de gas asociada), no fueron visualizadas correctamente, debido a que solo se desarrolló una coloración roja muy débil, casi imperceptible.

- Las 3M Placas Petrifilm están validadas por la AOAC® (Asociación de científicos dedicados a la excelencia en métodos analíticos), AFNOR (Asociación francesa de normalización) para el análisis microbiológico de alimentos, sin embargo para el análisis de agua potable no existen un registro de validación.
- De acuerdo a este estudio se considera al medio m- Coliblu24 como el más adecuado para el análisis de agua potable con el método de filtración por membrana.

## **RECOMENDACIONES**

- Se recomienda trabajar con materiales de referencia como cepas ATCC, las cuales nos garantiza que se utilizan bacterias fenotípicas y genotípicamente no variables para asegurar resultados confiables y reales.
- Para todo análisis microbiológico de agua potable se debe neutralizar el cloro con tiosulfato de sodio al 3%, para evitar obtener resultados errados debido la inhibición del crecimiento bacteriano, recalamos esta recomendación debido a que en la mayoría de laboratorios de ensayo para aguas desconocen de esta reglamentación.

## GLOSARIO DE TERMINOS

**Agua:** Líquido incoloro, inodoro, e insípido, compuesto por oxígeno e hidrógeno (H<sub>2</sub>O) combinados, que ocupa tres cuartas partes de la Tierra y es indispensable para el desarrollo de la vida

**Coliformes Totales:** La denominación genérica coliformes designa a un grupo de especies bacterianas que tienen ciertas características bioquímicas en común e importancia relevante como indicadores de contaminación del agua y los alimentos.

***E. coli:*** una bacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales y por ende en las aguas negras. Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich. Además produce vitaminas B y K. Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram (Gram. negativo), es anaeróbico facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa

**Filtración por membrana:** técnica en la cual consiste en separar, mediante una superficie permeable (filtro), los microorganismos de los fluidos en cuyo seno están suspendidos

**Medios de cultivo:** es el conjunto de nutrientes y sustratos que permiten el crecimiento la multiplicación y el aislamiento de las diferentes especies bacterianas para llegar a su identificación

**3M Placas Petrifilm<sup>TM</sup>:** medios de cultivo en formato listo para usar para el monitoreo microbiológico de alimentos, ambientes y superficies vivas e inertes. Hay diferentes tipos de placas que nos permiten cultivar y cuantificar.

**UFC:** unidad formadora de colonias.

**ATCC:** american type culture collection

**Repetibilidad:** Es la precisión más pequeña esperada, da una idea de la variabilidad que se espera cuando los resultados de una técnica independiente son obtenidos con el mismo método, sobre ítems de ensayo idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operador usando el mismo equipo, dentro de un intervalo corto de tiempo.

**SM:** Sin Marca

**BHI:** Agar infusión de cerebro y corazón

**GL:** Grados de libertad

**SC:** Suma de cuadrados

**CM:** Cuadrado de la media

**F cal:** F Calculado

## BIBLIOGRAFIA

1. ANDREW D. EATON, **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, American Public Health Association (APHA), 20th Edition, 2005.
2. **Análisis de Aguas Parámetros: Análisis Microbiológico III.**  
<http://prueba2.aguapedia.org/master/analisis/protopdf/COLFECAL.pdf>
3. APOLO YAGUAL PAMELA ELIZABETH, **Validación del método de Filtración Por Membrana para el Recuento de Mesófilos Aerobios empleando un 1ml de muestra de agua**, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, 2008, Disertación.
4. **Coliformes fecales.**  
<http://www.cepis.ops-oms.org/bvsacd/scan/013761/013761-04.pdf>
5. **Coliformes totales y Fecales en Aguas de Consumo Humano.**  
<http://www.azc.uam.mx/cbi/quimica/microbiologia/p17.pdf>
6. **Examen de Coliformes por la Técnica de Filtración de Membrana.**  
[www.cepis.ops-oms.org/bvsacd/scan/004691/004691-07.pdf](http://www.cepis.ops-oms.org/bvsacd/scan/004691/004691-07.pdf)
7. ESPINOSA MEIER, **Recuento de Coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas mediante la técnica de filtración utilizando placas Petrifilm**, Argentina.
8. FERRÁN RIBAS, **Ejercicios de equivalencia ente métodos de análisis de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas de consumo**, Comisión de Normalización y Validación de la SEM, Aiguës de Barcelona.
9. FERNÁNDEZ, RODRÍGUEZ, ***Escherichia coli* como causa de diarrea infantil**, Revista Cubana de Pediatría, v.75 n.3, Ciudad de la Habana, Jul.-Sep, 2003.

10. FELICIA HIX, **Detection and Enumeration of Escherichia coli in Wastewater Effluent.** [www.mtas.tennessee.edu/citydept/sewer/newecolipresentation.pdf](http://www.mtas.tennessee.edu/citydept/sewer/newecolipresentation.pdf)
11. GOEZ LOPEZ MARIANO, VÁZQUEZ GARCÍA MARÍA JOSÉ; PENA CAAMAÑO, PILAR, **Determinación y diferenciación de Escherichia coli y Coliformes totales usando un mismo sustrato cromogénico.** Laboratorio central, España.
12. GONZALES ANA MARÍA, RUTH MARIEN PALMA, ORTIZ JAIME, **Validación de Metodologías Alternas para Análisis Bacteriológico de Aguas para Consumo Humano.** Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, Santa Fe de Bogotá. DC., Enero, 1988
13. GRANDA ELENA, **Manual de Practicas Para Control Microbiológico en la Industria Alimenticia.** Recopilación de Técnicas, Licenciatura en Microbiología Clínica y Aplicada, Octavo Nivel, Febrero, 2009.
14. **Guía para la calidad del agua potable.**  
[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3\\_es\\_full\\_lowres.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf)
15. GUTIÉRREZ DE GAMBOA SOFÍA, PEDRIQUE DE AULACIO MAGALY, **AGUA. Indicadores de la calidad microbiológica de las aguas de consumo y de proceso. Tratamientos. Métodos de control microbiológico.** Enero 2002, Revisada Julio 2003.  
[http://www.ucv.ve/Farmacia/Micro\\_web/Catedras02/tema16.pdf](http://www.ucv.ve/Farmacia/Micro_web/Catedras02/tema16.pdf)
16. J. A. CHÁVEZ CÁRDENAS, J. A. RODRÍGUEZ CASTRO, R. RUIZ CHÁVEZ, R. GARCÍA ACEVEDO, M. SERRANO MEDRANO, **La Importancia De La Verificación De Coliformes En El Agua, Para Consumo Humano, Y En Las Aguas De Desecho.** Facultad de Ingeniería Civil DES Ingenierías Arquitectura,

UMSNH, 6 al 8 de diciembre 2006. Morelia, Michoacán, México.  
[www.des\\_ia.umich.mx/~des\\_ia/fades06/C15.pdf](http://www.des_ia.umich.mx/~des_ia/fades06/C15.pdf)

**17. Microbiología de Agua: Coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli*.**

Laboratorio de Microbiología aplicada, 2007.

[www.uprh.edu/.../Microbiología%20de%20Agua-II%5B1%5D.pdf](http://www.uprh.edu/.../Microbiología%20de%20Agua-II%5B1%5D.pdf)

**18. Millipore catalogue, Análisis Microbiológico, Madrid, España, Millipore  
Corporación, 2005.**

**19. Método de filtración por membrana para la determinación de Coliformes  
Totales.** <http://www.cepis.org.pe/bvsacd/scan2/032981-I-II/032981-I-07b.pdf>

**20. Método de la Membrana Filtrante.**

<http://desastres.usac.edu.gt/documentos/pdf/spa/doc7715/doc7715-7.pdf>

**21. Normas Oficiales para la Calidad del Agua, NORMA CHILENA OFICIAL  
409/1.Of. 84, Ministerio de Salud, Enero, 1984**

**22. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, Guías para la calidad del agua  
potable, Volumen 1.**

[www.who.int/water\\_sanitation.../es/index.html](http://www.who.int/water_sanitation.../es/index.html).

**23. PÁEZ LILIAN, Validación Secundario del método de Filtración por Membrana  
para la detección de Coliformes Totales y *Escherichia coli* en muestras de agua  
para consumo humano analizadas en el laboratorio de Salud Publica de Huila,  
Bogotá, Noviembre, 2008.**

**24. Prevención de Enfermedades Transmitidas por el Agua.**

<http://www.panalimentos.org/comunidad/educacion1.asp?cd=323&id=102>

25. PONCE ESPERANZA, **Manual de potabilización del agua.**  
<http://inge.uasnet.mx/files/MANUAL%20DE%20POTABILIZACION%20DE%20AGUAS.pdf>
26. **Placas Petrifilm™ EC.**  
<http://www.microbiologiamx.com.mx>
27. SERGIO CHIROLES RUBALCABA, **Bacterias indicadoras de contaminación fecal en aguas del río Almendares (Cuba),** Hig. Sanid. Ambient, (2007).  
[www.ugr.es/.../Hig%20Sanid%20Ambient%207%20222-227%20\(2007\).pdf](http://www.ugr.es/.../Hig%20Sanid%20Ambient%207%20222-227%20(2007).pdf)
28. SCHRAFT, WATTERWORTH, **Enumeration of heterotrophs, fecal coliforms and Escherichia coli in water: comparison of 3Mk Petrifilm plates with standard plating procedures,** Journal of Microbiological Methods, November, 2004.  
[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
29. VARGAS CARMEN, **Curso sobre métodos bacteriológicos para el análisis de Agua Potable,** Octubre, Lima-Perú, 2000.  
[www.cepis.org.pe/bvsala/e/fulltext/curso/curso.pdf](http://www.cepis.org.pe/bvsala/e/fulltext/curso/curso.pdf)
30. ZABALA PARREÑO ANDRÉS ESTEBAN, **Precisión y Exactitud del Método de recuento de coliformes totales y Escherichia coli utilizando la técnica de Petrifilm para análisis de agua potable,** Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, 2008, Disertación.

# **ANEXOS**

# Anexo 1

## Recuento de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas mediante la técnica de filtración utilizando 3M Placas Petrifilm™

### RECuento DE COLIFORMES TOTALES Y ESCHERICHIA COLI EN AGUAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE FILTRACIÓN UTILIZANDO PLACAS PETRIFILM.

Espinosa V.1, Meier C.E.2, Pérez J.1.2  
 1 3M Argentina, Olga Cossetini 1031 - Cap. Fed. - Argentina. vespinosa@3mm.com  
 2 Zormex S.A. Constituyentes 4740 - Cap. Fed. - Argentina. zormex@bertel.com.ar

#### Introducción

La técnica de filtración, en comparación a la de Número Más Probable (NMP), tiene la ventaja de requerir menor cantidad de medios de cultivo y optimizar el espacio en las estufas de incubación. La utilización de las placas Petrifilm agrega a estas, las ventajas de no requerir la preparación de medios, de reducir los tiempos de incubación y el espacio en estufas. Además no es necesaria la confirmación de colonias y permite la posibilidad de informar un recuento de *Escherichia coli*.

#### Objetivos

El objetivo del presente trabajo fue comparar los resultados de coliformes y *E. coli* en muestras de agua obtenidos mediante la técnica de filtración utilizando las placas Petrifilm y el método de referencia de la APHA. Para esto se analizaron 37 muestras en paralelo mediante ambos métodos. 31 de estas muestras fueron inoculadas artificialmente con cepas de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*.

#### Inoculación de Muestras

Se prepararon repiques de las cepas utilizadas en caldo triptosa soya, que fueron incubados a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$  durante  $18 \pm 2$  horas. Se prepararon diluciones decimales en agua peptonada al 0,1 % y de acuerdo al inóculo que se deseaba utilizar se eligió la dilución y el volumen a sembrar. Se utilizó como matriz agua de red inactivada con bisulfito de sodio (0,1 mL de una solución 3% por cada 120 mL). Para conocer el inóculo teórico se sembró el volumen inoculado en una placa a la que se agregó agar para recuento en placa y se incubó a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$  durante 40-48 horas.

#### Método APHA 9222 B

Se filtraron 100 mL de cada muestra a través de una membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  de poro utilizando un equipo Microfil de Millipore. La membrana fue colocada sobre una placa con agar LES Endo. Las placas fueron incubadas invertidas a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$  durante 22-24 horas. Se contaron las colonias típicas y atípicas y se sembraron al menos 5 colonias típicas y 5 atípicas en caldo Brila para confirmar la presencia de coliformes. Los tubos de caldo Brila fueron incubados a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$  durante  $48 \pm 3$  horas. Para la detección de *E. coli* los tubos de caldo Brila con producción de gas fueron sembrados en caldo EC y estos fueron incubados a  $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 2$  horas. Los tubos de caldo EC con producción de gas fueron sembrados en agar EMB, las placas fueron incubadas a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 2$  horas. Al menos una colonia típica fue sembrada en agar nutritivo y este fue incubado a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 2$  horas. Se sembraron las pruebas del IMWC en caldo triptona, caldo MR-VP y agar citrato de Simmons. Los resultados fueron expresados en ufc en 100 mL de muestra. Coliformes: Si no se detectan coliformes se informa:  $< 1$  ufc en 100 mL de muestra. Si no se confirma el total de colonias sospechosas de coliformes se aplica la ecuación correspondiente para calcular el total de colonias de coliformes.

*Escherichia coli*: Si no se detecta *E. coli* se informa "No se detecta en 100 mL de muestra". Si se confirma al menos una colonia sospechosa como *E. coli* se informa: "Se detecta en 100 mL de muestra".

### Método Placas PetrifilmMR



Paso 1: Las placas son hidratadas con 1 mL de agua destilada estéril



Paso 2: Las placas hidratadas son almacenadas en refrigeración durante al menos 1 hora para que el gel pueda gelificar.



Paso 3: Se coloca una membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  de poro sobre el equipo de filtración



Paso 4: Se coloca un vaso de filtración estéril



Paso 5: Se colocan 100 mL de la muestra de agua en el vaso de filtración estéril



Paso 6: Se aplica vacío al equipo de filtración



Paso 7: Se retira la membrana y se coloca en la parte inferior de la placa Petrifilm (el gel queda en la parte superior)



Paso 8: Las placas son incubadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24-48 horas.



Paso 9: Lectura de placas: *E. coli*: colonias azules asociadas a gas; Coliformes: Colonias rojas y azules asociadas a gas. Expresión de los resultados: ufc en 100 mL de muestra para Coliformes o *E. coli*.

Tabla 1. Resultados de coliformes y *Escherichia coli* en aguas de diferentes métodos para 1 muestra.

Muestra	Método	Coliformes	<i>E. coli</i>	Método	Coliformes	<i>E. coli</i>
1	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
2	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
3	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
4	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
5	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
6	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
7	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
8	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
9	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
10	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
11	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
12	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
13	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
14	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
15	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
16	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
17	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
18	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
19	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
20	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
21	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
22	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
23	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
24	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
25	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
26	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
27	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
28	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
29	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
30	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
31	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
32	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
33	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
34	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
35	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
36	APHA	1	1	Petrifilm	1	1
37	APHA	1	1	Petrifilm	1	1

#### Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó con los datos de coliformes; se utilizaron aquellos cuyos valores eran  $> 1$  ufc en ambos métodos (31 datos). Previo al análisis estadístico se calculó el logaritmo de los datos. Se aplicó la prueba estadística de t-Student utilizando el programa Minitab, arrojando los siguientes resultados:

#### Two-sample T for APHA vs Petrifilm

N Mean StDev SE Mean  
 APHA 31 1,470 0,430 0,077  
 Petrifilm 31 1,466 0,428 0,077

Difference =  $\mu$  (APHA) -  $\mu$  (Petrifilm)  
 Estimate for difference: 0,003774  
 95% CI for difference: (-0,214272, 0,221820)  
 T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = 0,03 P-Value = 0,972 DF = 59

#### Resultados y Discusión

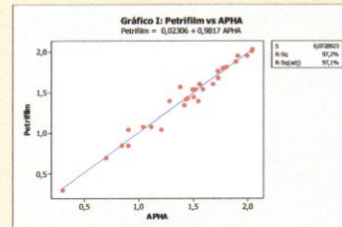
Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1. El análisis estadístico muestra que para un nivel de confianza del 95 % ambos métodos no presentan diferencias significativas en los recuentos de Coliformes. Ver Gráfico 1. Los resultados de *E. coli* no pudieron ser comparados estadísticamente ya que con el método de la APHA se obtuvieron resultados cualitativos. Sin embargo hubo coherencia de resultados en la detección de este microorganismo entre ambos métodos. En la muestra 8 no se detectó la presencia de coliformes y *E. coli* mediante el método de la APHA, lo cual puede deberse a que se trataba de un inóculo muy pequeño (4 ufc en 100 mL).

#### Conclusiones

El método de recuento de coliformes y *E. coli* en aguas mediante las placas Petrifilm puede ser utilizado como un método alternativo más rápido y sencillo que el tradicional, con la posibilidad de realizar un recuento de *E. coli* en 24-48 horas.

#### Referencias Bibliográficas

- American Public Health Association (APHA). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th Edition. 1998.
- 3M Petrifilm *E. coli*/coliform count plate. Interpretation Guide. 2001





**ABSTRACT**

Testing was conducted to evaluate the performance of 3M™ Petrifilm™ E. coli/Coliform count plates in comparing count conditions of *Escherichia coli* in water samples. The membrane filtration method specified by the American Public Health Association (APHA 9222B) was adapted to four different membrane filter materials. Growth medium, four commercially available membrane filter types were assessed. All filters showed statistically similar recoveries at a low level of inoculation (100-150 CFU/100 mL). This demonstrates (P<0.05) was observed for inoculum level in the range of 100-150 CFU/100 mL. This demonstrates that although there may be variability amongst membrane filter materials, the Petrifilm™ platform is an adequate culture media for the recovery and enumeration of *E. coli* from water samples.

**INTRODUCTION**

The American Public Health Association Standard drinking-water requires filtration of 100 mL water through a membrane filter, followed by plating the filter onto a selective and differential growth medium. This method is used by the bottled water industry, but no method validations for use in drinking or bottled water.

**OBJECTIVES**

- The goals of this project were to:
  - Investigate the feasibility of using 3M Petrifilm EC Plates coupled with membrane filters to detect and enumerate *E. coli* in drinking water samples.
  - Compare performance of commercially available membrane filters in the above plating application.

**METHODS**

Membrane filters from four manufacturers were evaluated as candidates for use with 3M Petrifilm EC Plates. The following filters (all 0.45 µm pore size and 47 mm diameter) were utilized for this study:
 

- Pall (GK Metric) Grid
- Hydrophilic mixed cellulose ester membrane
- Cuno NM4708 BNA045
- Polyethersulfone membrane
- Whatman Nuclepore
- Polycarbonate track etch membrane
- Millipore S-PAK Membrane
- Mixed cellulose

A total of 264 corresponding samples of water were prepared and inoculated into 100 mL of buffered saline (pH 7.0) was incubated at a "low" concentration of 10 to 50 CFU/100 mL and the other half of the samples were inoculated at a "high" concentration of 100 to 500 CFU/100 mL. Inoculum levels were confirmed via spread plating appropriate dilutions on Tryptic Soy Agar (with incubation under the same conditions as specified in SM 9222B).

**Evaluation of Four Membrane Filter Materials for Use with 3M™ Petrifilm™ E. coli/Coliform Count Plates to Enumerate *Escherichia coli* in Water Samples**  
 Robert S. Donofrio<sup>1</sup>, Amy Harrison<sup>1</sup>, Robin Beclianko<sup>1</sup>, DeAnn L. Beresh<sup>1</sup> and Cynthia Zook<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> NSF International, Ann Arbor, MI 48105, <sup>2</sup> 3M, St. Paul, MN 55144

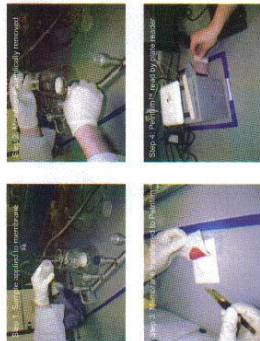


Figure 1. Illustration of the work flow process for coupling membrane filtration with 3M Petrifilm™ EC Plates. All plates were incubated at 20-25°C for 24-48 hr.

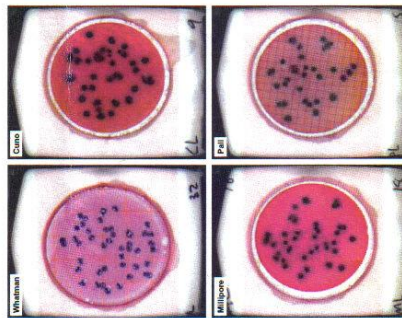


Figure 3. Examples of 3M Petrifilm EC Plates with membrane filters of each of the filter types evaluated. All images were captured via the 3M™ Petrifilm™ Reader. The images demonstrate minimal coloration and colony morphologies can be observed.

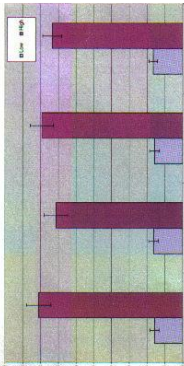


Figure 2. Comparison of *E. coli* recovery using membrane filtration coupled to 3M Petrifilm EC Plates for the low and high concentration samples. The mean log<sub>10</sub> CFU/100 mL for low and high concentration samples were not statistically different for low count samples (P > 0.05). When comparing all 4 filter materials at the high range, a small, but significant difference (P < 0.05) was observed (ANOVA). Student T-tests revealed that the four filter materials could be grouped into two statistically similar pairs. Review of images captured by the Petrifilm Reader revealed that the membrane filters may potentially affect results; membrane appearance (transparent versus opaque); incubation conditions such as height of plate stacks, location of plate within the stack, and plate orientation. These factors will be investigated in future studies.

**LOW CONCENTRATION E. COLI COMPARISON**

Filter	Mean	SD	SE	95% CI	Min	Max
Cuno	3.1	0.3	0.1	2.8-3.4	2.0	4.2
Pall	3.1	0.3	0.1	2.8-3.4	2.0	4.2
Whatman	3.1	0.3	0.1	2.8-3.4	2.0	4.2
Millipore	3.1	0.3	0.1	2.8-3.4	2.0	4.2
Total	3.1	0.3	0.1	2.8-3.4	2.0	4.2

**HIGH CONCENTRATION E. COLI COMPARISON**

Filter	Mean	SD	SE	95% CI	Min	Max
Cuno	5.1	0.4	0.1	4.8-5.4	4.0	6.2
Pall	5.1	0.4	0.1	4.8-5.4	4.0	6.2
Whatman	5.1	0.4	0.1	4.8-5.4	4.0	6.2
Millipore	5.1	0.4	0.1	4.8-5.4	4.0	6.2
Total	5.1	0.4	0.1	4.8-5.4	4.0	6.2

Table 1. ANOVA results for filter comparison study. Results from low and high *E. coli* concentration spikes are presented. The results demonstrate that the mean log<sub>10</sub> CFU/100 mL concentration and mean log<sub>10</sub> CFU/100 mL are not significantly different at the edge of the upper limit of the method.

Filter Comparison	T Critical (one tailed)	T Stat Value	P Value (α = 0.05)
Millipore vs. Whatman	1.669	1.041	0.15
Pall vs. Cuno	1.669	-1.478	0.07
Cuno vs. Whatman	1.669	-5.038	2.05 x 10 <sup>-4</sup>
Millipore vs. Cuno	1.669	5.787	1.17 x 10 <sup>-7</sup>
Pall vs. Whatman	1.669	-4.031	7.51 x 10 <sup>-5</sup>
Millipore vs. Pall	1.669	4.886	3.61 x 10 <sup>-4</sup>

Table 2. Student T-test results for filter comparison study. Results from the high *E. coli* concentration spikes are presented. α = 0.05.



**METHODS**

Samples were filtered through each of the four membrane filter materials onto 3M Petrifilm EC plates, incubated onto the 3M Petrifilm EC plates, and enumerated both manually and using the 3M Petrifilm Plate Reader (Figure 1). Comparison of the filter materials was conducted using Student T-tests and ANOVA (α = 0.05).

**RESULTS**

The results are presented in Figure 2 and 3 as well as Tables 1 and 2. Analysis of data (both pre and post logarithmic transformation) revealed that the mean log<sub>10</sub> CFU/100 mL were not statistically different for low count samples (P > 0.05). When comparing all 4 filter materials at the high range, a small, but significant difference (P < 0.05) was observed (ANOVA). Student T-tests revealed that the four filter materials could be grouped into two statistically similar pairs. Review of images captured by the Petrifilm Reader revealed that the membrane filters may potentially affect results; membrane appearance (transparent versus opaque); incubation conditions such as height of plate stacks, location of plate within the stack, and plate orientation. These factors will be investigated in future studies.

**DISCUSSION**

The differences observed between filters at the high inoculum spike level may be due to the membrane filter material used, but not necessarily to the filters themselves.

- Preferred counting range for 3M Petrifilm EC Plates is 15-150 CFU per plate?
- These preliminary studies indicate that the 3M Petrifilm EC Plate coupled with membrane filtration shows promise for consideration as an acceptable (ATP) Protocol for Drinking Water, Tap Water, and Wastewater Monitoring Methods.

**REFERENCES**

1. American Public Health Association. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th edition, Washington, DC.
2. USEPA. 2004. EPA 821-B-03-004 - EPA Microbiological Alternate Test Procedure (ATP) Protocol for Drinking Water, Tap Water, and Wastewater Monitoring Methods.
3. American Public Health Association. 2001. Comprehensive Manual for the Microbiological Examination of Food, 7th Edition, Washington, D.C.

**CONTACT INFORMATION**

Robert S. Donofrio, M.S., Ph.D.  
 Director of Microbiology  
 NSF International  
 790 York Road  
 Ann Arbor, MI 48105-0001  
 Office: 734.767.0884  
 www.nsf.org

DeAnn L. Beresh  
 3M Food Safety Department  
 3M Center, Bldg. 390-08-01  
 St. Paul, MN 55144  
 Office: 651.724.3544  
 donofrio@nsf.com

### Anexo 3

## Registro de la cepa *Enterobacter cloacae* EB-I-8

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR  
 ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
 COLECCIÓN DE CULTIVOS MICROBIANOS

Av. 12 de Octubre 1076 y Roca. Laboratorio de Microbiología DISerlab – PUCE. Telf. (593)22991677.

E-mail:

#### Registro de cepas preservadas.

Tipo de microorganismo				Uso exclusivo de CCEB	
Bacteria	<input checked="" type="checkbox"/>	Arquea	<input type="checkbox"/>	CCEB # de acceso: 8	
Hongo	<input type="checkbox"/>	Levadura	<input type="checkbox"/>	Fecha de recepción: 18/V/2008	
				Fecha de acceso: 18/V/2009	

Código: <b>EB-I-8</b>	Especie: <i>Enterobacter cloacae</i> .
-----------------------	--

Depósito interno:  Depósito externo:

Depósito para acceso público:  Depósito con acceso restringido:

Designación de la cepa utilizada por el depositante:		
¿Es cepa tipo?	No	# de Acceso en otras colecciones:

Estado en que se recibe la cepa			
Metabólicamente activa	<input checked="" type="checkbox"/>	Preservada	<input type="checkbox"/>
Medio y condiciones para recuperar la cepa:			

Origen de la cepa.	
Fuente de aislamiento:	Herida de pierna Traumatología – Ortopedia HCAM
Laboratorio /Institución:	Laboratorio Microbiología HCAM.
Origen geográfico (Ciudad/Provincia/País):	Quito/Pichincha/Ecuador

Identificación	
Medios de cultivo en que se aísla a partir de la muestra.	Aislado por: Lcda. Isabel Narváez
	Fecha aislamiento: V / 2009
Agar Chocolate, sangre de cordero y Mc Conkey	Identificado por: Lcda. Isabel Narváez
	Método identificación: Sistema Vitek.
	Fecha identificación: V / 2009
Nivel Bioseguridad: 2	Medios y condiciones adecuadas para cultivo: 35° C, TSA, Agar nutritivo, o medios de cultivo semejantes + β lactámico a consideración .

<b>Caracterización:</b>
Sensibilidad: SXT (23), IPM (26), ATM (26), FEP (28), TPZ (27), AK (22), GN (20), SXT (23), CRO (26), CAZ (25), CIP (34)
Resistencia: SAM (6), AMP (6), AMC (6)

Preservación (Uso exclusivo CCEB)			
Fecha de preservación: 19/V/2009			
Cepa de reserva	<input checked="" type="checkbox"/>	Método: leche descremada 12%, glucosa 2%, -70°C	# viales: 3 viales
			Ubicación: CR1 (naranja) D4 – D6
Cepa de distribución	<input checked="" type="checkbox"/>	Método: BHI caldo con 20% Glicerol -20°C	# viales: 5 viales
			Ubicación: CT1 (amarilla) G1 – G5
Medios de cultivo utilizados antes de preservación: TSA			
Preservado por: Martín Marcial			

## Anexo 4

### Registro de la cepa *E. coli* ATCC 25922

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
COLECCIÓN DE CULTIVOS MICROBIANOS**

Av. 12 de Octubre 1076 y Roca. Laboratorio de Microbiología DISerlab – PUCE. Telf. (593)22991677.  
E-mail:

#### Registro de cepas preservadas.

Tipo de microorganismo				Uso exclusivo de CCEB	
Bacteria	<input checked="" type="checkbox"/>	Arquea	<input type="checkbox"/>	CCEB # de acceso: 8	
Hongo	<input type="checkbox"/>	Levadura	<input type="checkbox"/>	Fecha de recepción: 18/V/2008	
				Fecha de acceso: 18/V/2009	

Código: <b>EB-I-8</b>	Especie: <i>Enterobacter cloacae</i> .
-----------------------	--

Depósito interno:  Depósito externo:

Depósito para acceso público:  Depósito con acceso restringido:

Designación de la cepa utilizada por el depositante:		
¿Es cepa tipo?	<input type="checkbox"/> No	# de Acceso en otras colecciones:

Estado en que se recibe la cepa			
Metabólicamente activa	<input checked="" type="checkbox"/>	Preservada	<input type="checkbox"/>
Medio y condiciones para recuperar la cepa:			

Origen de la cepa.	
Fuente de aislamiento:	Herida de pierna Traumatología – Ortopedia HCAM
Laboratorio /Institución:	Laboratorio Microbiología HCAM.
Origen geográfico (Ciudad/Provincia/País):	Quito/Pichincha/Ecuador

Identificación	
Medios de cultivo en que se aísla a partir de la muestra.	Aislado por: Lcda. Isabel Narváez
	Fecha aislamiento: V / 2009
Agar Chocolate, sangre de cordero y Mc Conkey	Identificado por: Lcda. Isabel Narváez
	Método identificación: Sistema Vitek. Fecha identificación: V / 2009
Nivel Bioseguridad: 2	Medios y condiciones adecuadas para cultivo: 35° C, TSA, Agar nutritivo, o medios de cultivo semejantes + $\beta$ lactámico a consideración .

Caracterización:
Sensibilidad: SXT (23), IPM (26), ATM (26), FEP (28), TPZ (27), AK (22), GN (20), SXT (23), CRO (26), CAZ (25), CIP (34)
Resistencia: SAM (6), AMP (6), AMC (6)

Preservación (Uso exclusivo CCEB)			
Fecha de preservación: 19/V/2009			
Cepa de reserva	<input checked="" type="checkbox"/>	Método: leche descremada 12%, glucosa 2%, -70°C	# viales: 3 viales
			Ubicación: CR1 (naranja) D4 – D6
Cepa de distribución	<input checked="" type="checkbox"/>	Método: BHI caldo con 20% Glicerol -20°C	# viales: 5 viales
			Ubicación: CT1 (amarilla) G1 – G5
Medios de cultivo utilizados antes de preservación: TSA			
Preservado por: Martín Marcial			

## Anexo 5

### Placas Petrifilm para el Recuento de *E. coli*/coliformes

**3M**

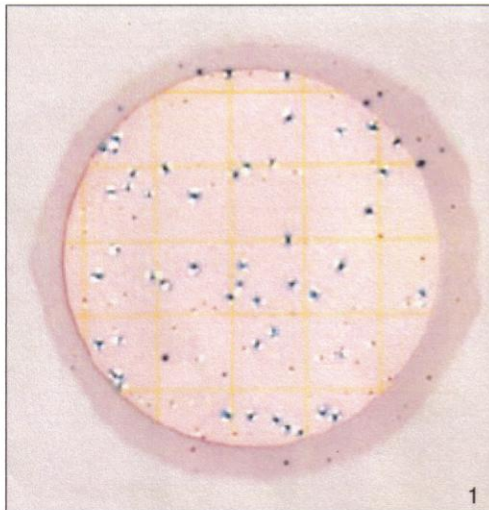
Guía de interpretación

## Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli*/Coliformes

Esta guía lo familiarizará con los resultados de las Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli*/Coliformes. Para mayor información, contacte al representante autorizado de productos de 3M Microbiología más cercano.

Las Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli*/Coliformes (Placa Petrifilm EC) contienen nutrientes de Bilis Rojo Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de actividad de la glucuronidasa y un indicador que facilita la enumeración de las colonias. La mayoría de las *E. coli* (cerca del 97%) produce beta-glucuronidasa, la que a su vez produce una precipitación azul asociada con la colonia. La película superior atrapa el gas producido por *E. coli* y coliformes fermentadores de lactosa. Cerca del 95% de las *E. coli* producen gas, representado por colonias entre azules y rojo-azules asociadas con el gas atrapado en la Placa Petrifilm EC (dentro del diámetro aproximado de una colonia).

La AOAC Internacional y el Manual de Análisis Bacteriológico de la FDA de los Estados Unidos definen los coliformes como colonias de bastoncillos gram-negativos que producen ácido y gas de la lactosa durante la fermentación metabólica de la lactosa. Las colonias coliformes que crecen en la Placa Petrifilm EC, producen un ácido que causa el oscurecimiento del gel por el indicador de pH. El gas atrapado alrededor de las colonias rojas de coliformes confirma su presencia.



La identificación de la *E. coli* puede variar de país a país (ver en "Recomendaciones de uso" tiempos de incubación y temperaturas).

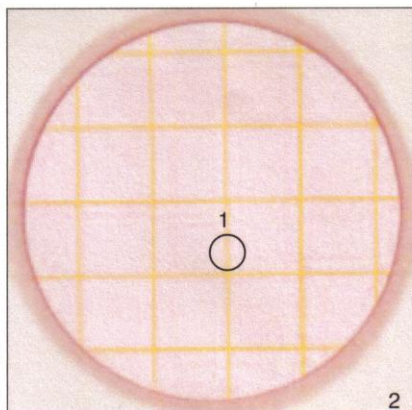
Método validado por la AOAC Internacional

***E. coli* = 49** (colonias azules con gas)

**Total coliformes = 87** (colonias rojas y azules con gas)

(NO use esta placa sola para la detección de *E. coli* O157. Como la mayoría de otros medios para enumeración de *E. coli* coliformes, esta placa no señalará específicamente si está presente algún O157).

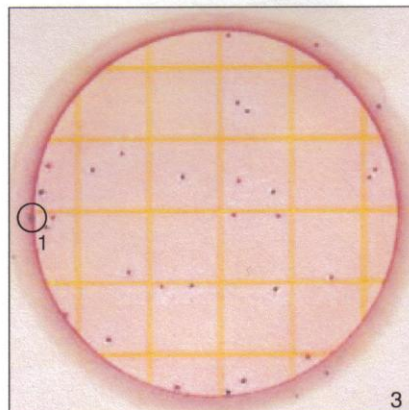
## 3M™ Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli* / Coliformes



**No crecimiento = 0**

Observe el cambio de color del gel de las figuras 2 a 8. Mientras el recuento de *E. coli* o coliformes aumenta, el color del gel se vuelve rojo oscuro o púrpura azulado.

Las burbujas del fondo son características del gel y no son el resultado del crecimiento de *E. coli* o coliformes. Ver el círculo 1.

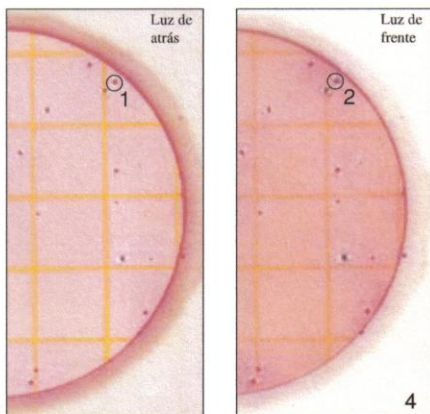


**Recuento de *E. coli* = 13**

**Total de recuento de coliformes = 28**

El rango de recuento de la población en las Placas Petrifilm EC es de 15 a 150.

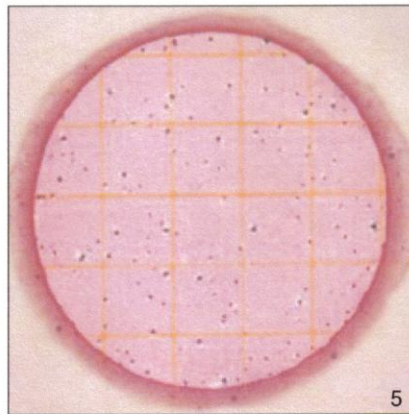
No cuente las colonias que aparecen sobre la barrera de espuma, ya que han sido removidas de la influencia del medio selectivo. Ver el círculo 1.



**Recuento de *E. coli* = 3**

Cualquier azul en una colonia (de azul a rojo-azul) indica la presencia de *E. coli*. La luz de frente mejorará la detección del precipitado azul formado por una colonia.

El círculo 1 muestra una colonia rojo-azul cuyo conteo se hizo con luz de atrás. El círculo 2 muestra la misma colonia con luz de frente. El azul precipitado es más evidente en el círculo 2.

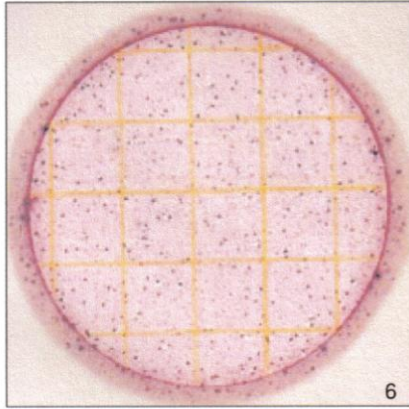


**Recuento de *E. coli* = 17**

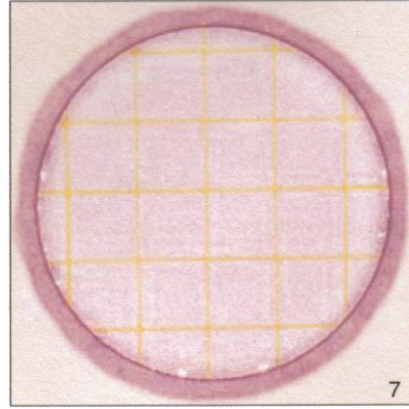
**Recuento total estimado de coliformes = 150**

El área circular de crecimiento es de aproximadamente 20 cm<sup>2</sup>. El recuento estimado se puede hacer en las placas que contienen más de 150 colonias, al contar el número de colonias en uno o más de los cuadrados representativos y al determinar el promedio por cuadrado. Multiplique el número promedio por 20 y determine el conteo estimado por placa.

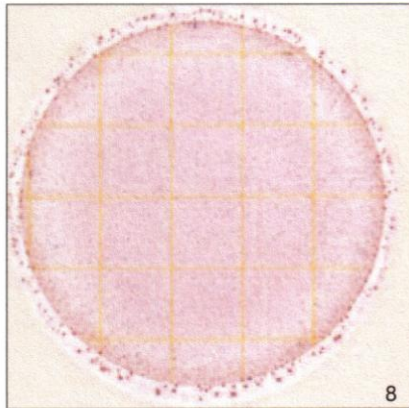
**MNPC** (Muy Numerosas Para Contar): para obtener un recuento más preciso, diluya más la muestra



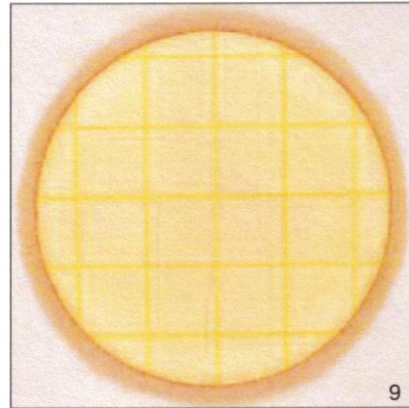
**Recuento actual aprox.  $\sim 10^6$**   
Las Placas Petrifilm EC con colonias que son MNPC, tienen una o más de las siguientes características:  
Muchas colonias pequeñas, muchas burbujas de gas y el oscurecimiento del gel de un color rojo a un azul púrpura.



**Recuento actual aprox.  $\sim 10^8$**   
Una alta concentración de *E. coli* puede causar que el área de crecimiento se haga azul púrpura.

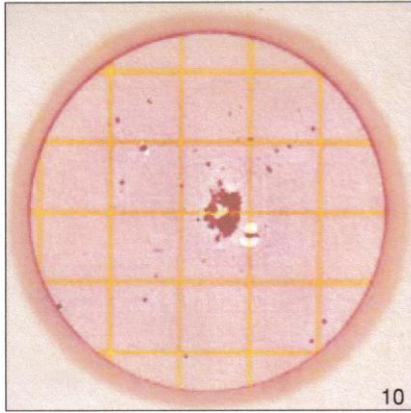


**Recuento presuntivo de *E. coli*  $\sim 8$**   
**Recuento total estimado de coliformes aprox.  $\sim 10^8$**   
Cuando existen cifras altas de coliformes ( $10^8$ ), algunos tipos de *E. coli* presuntiva pueden producir menos gas y las colonias azules pueden ser menos definitivas. Cuente todas las colonias azules sin gas y/o zonas azules como *E. coli*. Si es necesaria la confirmación, aisle las colonias azules con gas para su posterior identificación.



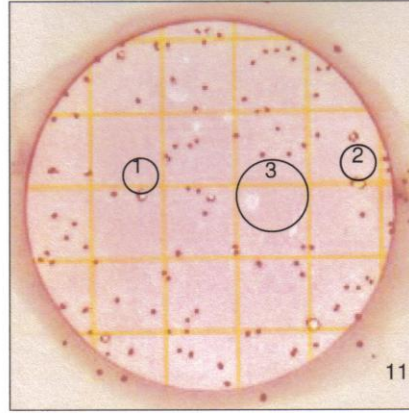
**Recuento actual aprox. de  $\sim 10^8$**   
Cuando un número alto de organismos no-coliformes, como las *Pseudomonas*, estén presentes en las Placas Petrifilm EC, el gel puede volverse amarillo.

## Burbujas



**Recuento total de coliformes = 3**

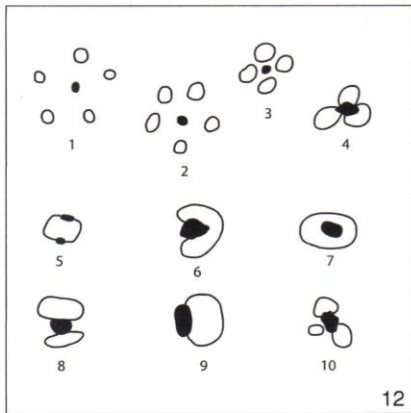
Las partículas de alimento tienen forma irregular y no tienen burbujas de gas.



**Recuento total de coliformes = 78**

Los patrones de burbujas pueden variar. El gas puede romper la colonia y así, esta última 'delinea' a la burbuja. Vea los círculos 1 y 2.

Las burbujas pueden aparecer como resultado de una inoculación impropia o de aire atrapado dentro de la muestra. Tienen forma irregular y no se asocian con una colonia. Vea el círculo 3.



Los ejemplos 1 a 10 muestran varios patrones de burbujas asociados con colonias que producen gas. Todas deben ser enumeradas.

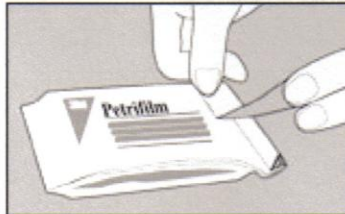
## 3M Placas Petrifilm™ para el Recuento de E. coli / Coliformes Recomendaciones de uso

Para información detallada sobre ADVERTENCIAS, PRECAUCIONES, COMPENSACIONES POR GARANTÍA / GARANTÍA LIMITADA, LIMITACIONES POR RESPONSABILIDAD DE 3M, ALMACENAMIENTO Y ELIMINACIÓN, e INSTRUCCIONES DE USO, remítase al inserto de producto en el paquete.

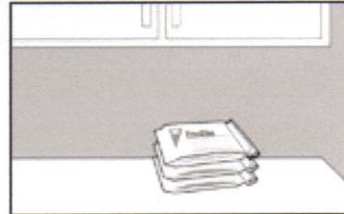
### Almacenamiento



**1** Almacene los paquetes cerrados a una temperatura  $\leq 8^{\circ}\text{C}$  ( $\leq 46^{\circ}\text{F}$ ). Las placas deben usarse antes de su fecha de caducidad. En áreas de alta humedad, donde la condensación puede ser un inconveniente, es recomendable que los paquetes se atemperen al ambiente del lugar de trabajo antes de abrirlos. Las Placas Petrifilm tienen un tiempo de vida útil de 18 meses desde su fecha de elaboración. Observe la fecha de caducidad en la parte superior de la placa.



**2** Para cerrar un paquete abierto, doble el extremo y séllelo con cinta adhesiva para evitar el ingreso de humedad y, por lo tanto, la alteración de las placas.



**3** Mantenga los paquetes cerrados (según se indica en el punto 2) a temperatura  $\leq 25^{\circ}\text{C}$  ( $\leq 77^{\circ}\text{F}$ ) y una humedad relativa  $\leq 50\%$ . **No refrigere** los paquetes que ya hayan sido abiertos. Utilice las Placas Petrifilm máximo un mes después de abierto el paquete.

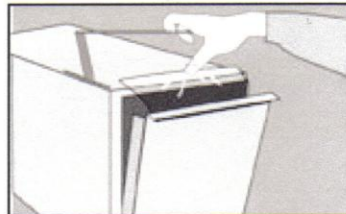
### Preparación de la muestra



**4** Prepare una dilución de una muestra de alimento.\* Pese o pipeteo la muestra en un recipiente adecuado, como una bolsa Stomacher, una botella de dilución o cualquier otro contenedor estéril apropiado. \*Vea las indicaciones para Productos Lácteos y Jugos.



**5** Adicione la cantidad apropiada de uno de los siguientes diluyentes estériles: tampón Butterfield (tampón IDF fosfato, 0,0425 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y con pH ajustado a 7.2); agua de peptona al 0.1%; diluyente de sal peptonada (método ISO 6887); *buffer* de agua peptonada (método ISO 6579); solución salina (0.85 a 0.90%); caldo letheen libre de bisulfato o agua destilada.



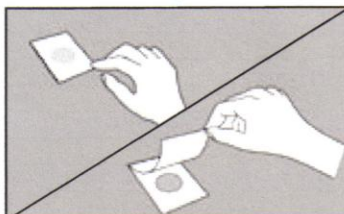
**6** Mezcle u homogenice la muestra mediante los métodos usuales.

Ajuste el pH de la muestra diluida entre 6.6 y 7.2:

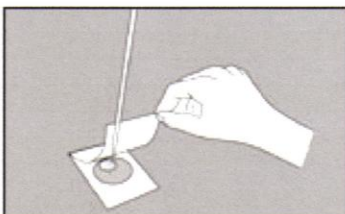
- Para productos ácidos: use solución 1N de NaOH.
- Para productos básicos: use solución 1N de HCl.

No utilice *buffers* que contengan citrato, bisulfato o tiosulfato de sodio, porque pueden inhibir el crecimiento.

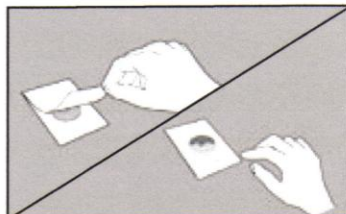
### Inoculación



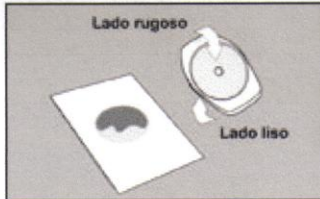
**7** Coloque la Placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada. Levante la película superior.



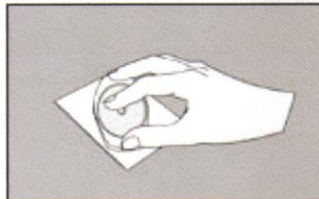
**8** Con la Pipeta Electrónica 3M™, o una pipeta equivalente **perpendicular** a la Placa Petrifilm, coloque 1 ml. de la muestra en el centro de la película inferior.



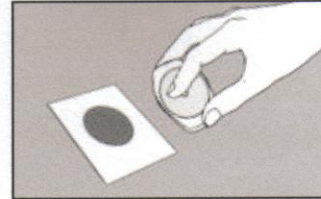
**9** Baje con cuidado la película superior para evitar que atrape burbujas de aire. **No** la deje caer.



10 Con el lado liso hacia abajo, coloque el dispersor en la película superior sobre el inóculo.

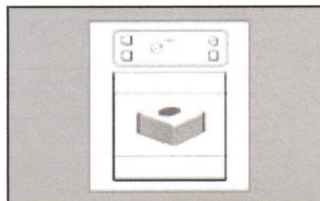


11 Presione suavemente el dispersor para distribuir el inóculo sobre el área circular. No gire Ni deslice el dispersor.



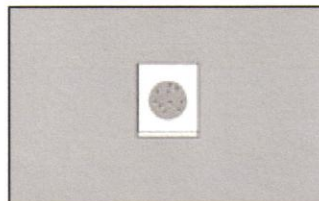
12 Levante el dispersor. Espere, por lo menos un minuto, a que solidifique el gel.

### Incubación

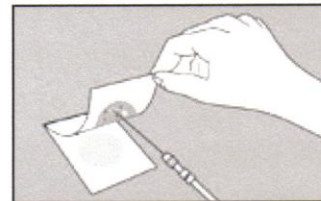


13 Incube las placas cara arriba en grupos de no más de 20 piezas. Puede ser necesario humectar el ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente con agua estéril, para minimizar la pérdida de humedad.

### Interpretación



14 Las Placas Petrifilm pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz. Consulte la Guía de Interpretación para leer los resultados.



15 Las colonias pueden ser aisladas para su posterior identificación. Levante la película superior y tome la colonia del gel.

El tiempo de incubación y la temperatura varían según el método.  
Los métodos aprobados más conocidos son:

- **AOAC método oficial 991.14**  
Para coliformes:  
Incubar 24 h ± 2 h a 35 °C ± 1 °C.  
Para *E. coli*:  
Incubar 48 h ± 2 h a 35 °C ± 1 °C.
- **AOAC método oficial 998.08**  
Para *E. coli* (carnes, aves, marinos):  
Incubar 24 h ± 2 h a 35 °C ± 1 °C.
- **Método NMKL (147.1993)**  
Para coliformes:  
Incubar 24 h ± 2 h a 37 °C ± 1 °C.  
Para *E. coli*:  
Incubar 48 h ± 2 h a 37 °C ± 1 °C.

### Comentarios adicionales

- Nota: Recuerde inocular y poner el aplicador antes de pasar a la siguiente placa.
- Para contactar localmente a 3M Microbiología en Latinoamérica, visítenos en nuestra página de internet: [www.3M.com/microbiology](http://www.3M.com/microbiology)
- Para servicio técnico en Latinoamérica, contacte la dirección [serviciotecnicomicro@mmm.com](mailto:serviciotecnicomicro@mmm.com) o llame al 5255-5270-2223.



**3M Microbiology**  
3M Center, Bldg. 275-5W-05  
St. Paul, MN 55144-1000  
USA  
1800-228-3957  
[microbiology@mmm.com](mailto:microbiology@mmm.com)  
[www.3M.com/microbiology](http://www.3M.com/microbiology)

**3M México**  
Av. Santa Fe 190  
Col. Santa Fe, C.P. 01210  
México, D.F.  
Tel. (55-52) 5270-0454  
01 800-712-2527  
[microbiologiamx@mmm.com](mailto:microbiologiamx@mmm.com)

**3M Argentina**  
Olga Cossetini 1031  
Buenos Aires,  
CP C1107CEA  
Argentina  
Tel. (54-11) 4339-2400  
[microbiologia-ar@mmm.com](mailto:microbiologia-ar@mmm.com)

Petrifilm es una marca registrada de 3M.  
Impreso en México.  
Revisión: 2006-01  
Referencia: 70-2008-8105-3.

## Anexo 6

### m- Colibblue24

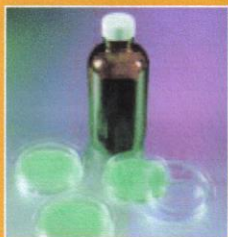
¡Método  
aprobado por  
la USEPA\* para  
registrar  
coliformes  
totales y *E. coli*  
en agua potable!



Las ampollas PourRite™ contienen el medio necesario para una prueba - ¡sin desperdicios ni complicaciones!



Estas NUEVAS ampollas plásticas son ideales para laboratorios en las industrias de los alimentos y las bebidas.

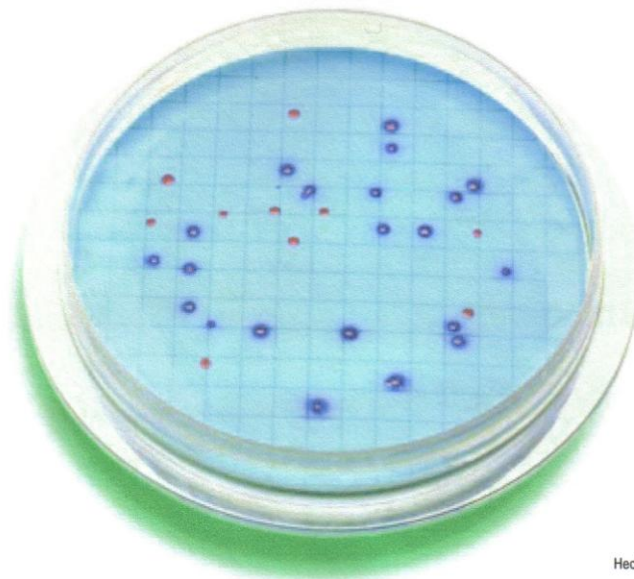


El Caldo m-ColiBlue24 también se encuentra disponible en botellas de 100 mL para realizar pruebas de gran volumen con una buena relación de costo-efectividad.



## Caldo m-ColiBlue24®

Método de detección de coliformes totales y de *E. coli*, económico y fácil de usar



Hecho en EE.UU.

Después de sólo 24 horas, el Caldo m-ColiBlue24® de Hach ofrece simultáneamente resultados de coliformes totales y de *E. coli*. Usando el equipo estándar de filtración por membrana (FM) y el Caldo preparado, usted podrá:

- Distinguir fácilmente las colonias - rojo y azul indican coliformes totales y azul específica *E. coli*.
- Leer y confirmar resultados en 24 horas
- Contar los coliformes totales y *E. coli* en una placa de petri
- Obtener superior sensibilidad - 1 CFU/100 mL (unidades formadoras de colonias)
- Lograr la recuperación óptima de organismos dañados o bajo estrés
- Reducir al mínimo la proliferación de organismos no coliformes
- Eliminar la necesidad de equipo especial y de lámpara ultravioleta
- Efectuar análisis de emergencia y monitoreo de rutina

\*United States Environmental Protection Agency (Agencia para la protección del ambiente de EE.UU.)  
m-ColiBlue24® es una marca registrada de Hach Company.

# Caldo m-ColiBlue24®

Cuente los coliformes totales y *E. coli* simultáneamente

## Asegure precisión con un medio único

El Caldo m-ColiBlue24® patentado es el primer caldo nutritivo de FM que detecta simultáneamente los coliformes totales y *E. coli*. Una combinación única de indicadores en el medio distingue los coliformes totales del *E. coli*. Las colonias rojas y azules indican coliformes totales, mientras que las colonias azules especifican *E. coli*.

El indicador enzimático altamente selectivo de *E. coli* elimina los pasos de confirmación que se necesitan al utilizar los medios tradicionales. Después de sólo 24 horas, usted puede identificar al menos el 95% de todos los *E. coli*.

Este medio nutritivo incrementa al máximo la tasa de crecimiento de las bacterias coliformes y ofrece una recuperación óptima de los organismos dañados o bajo estrés. El medio no contiene deoxicolato o sales biliares, los cuales se ha comprobado inhiben el desarrollo de los coliformes bajo estrés. Pero los inhibidores especiales en el medio reducen eficazmente el crecimiento de las bacterias no coliformes.

## Pruebas más rápidas con el medio preparado

El Caldo m-ColiBlue24® viene preparado y envasado en Ampollas PourRite™, ampollas plásticas y botellas de 100 mL. Las ampollas eliminan los pasos de medición, mezcla y autoclave que eran necesarios para preparar un medio deshidratado. Las ampollas PourRite están diseñadas con una boca ancha sin obstrucciones que permite verter el medio con facilidad. Simplemente quiebre la parte superior de la ampolla y vierta el medio sobre una almohadilla absorbente en una placa de petri. Estas ampollas plásticas son ideales para laboratorios en

las industrias de los alimentos y las bebidas. Todas las ampollas contienen la cantidad necesaria de medio selectivo para una prueba. El medio m-ColiBlue24® tiene una vida útil de un año.

## Cómo realizar su pedido

26084-20	Ampollas PourRite de m-ColiBlue24®, 20/paq
26084-10	Ampollas plásticas PourRite de m-ColiBlue24®, 20/paq
26084-42	Botella de m-ColiBlue24® de 100 mL
24846-00	Abridores de ampollas PourRite

### Juegos económicos

27792-00	Juego de ampollas de vidrio m-ColiBlue24® FM, 200 pruebas
27792-01	Juego de caldo m-ColiBlue24® FM, 200 pruebas
27792-02	Juego de caldo m-ColiBlue24® FM, 1000 pruebas

### Juegos convenientes\*\*

27793-00	Juego de ampollas de vidrio m-ColiBlue24® FM con embudos, 200 pruebas
27793-01	Juego de caldo m-ColiBlue24® FM con embudos, 200 pruebas
27793-02	Juego de caldo m-ColiBlue24® FM con embudos, 1000 pruebas

Aparato estándar de filtración por membrana y equipo requerido.

Para recibir una copia gratuita del Procedimiento m-ColiBlue24® para la determinación de coliformes totales y *E. coli*, solicite la literatura 8433.

\*United States Environmental Protection Agency (Agencia para la protección del ambiente de EE.UU)

\*\*Los juegos convenientes incluyen embudos con filtro desechable. m-ColiBlue24® es una marca registrada de Hach Company. PourRite™ es una marca registrada de Hach Company.



**HACH COMPANY**  
P.O. Box 389  
Loveland, Colorado 80539-0389  
U.S.A.  
Teléfono: 970-669-3050  
Fax: 970-669-2932  
E-mail: intl@hach.com  
<http://www.hach.com>

En Europa, hacer contacto con:  
**HACH COMPANY**  
c/o Dr. Bruno Lange GmbH.  
Willstätterstr. 11  
D-40549 Düsseldorf, Germany  
Teléfono: (49)(211)(52) 880  
Fax: (49)(221)(52) 88231  
E-mail: Hach@drlange.de  
<http://www.dr lange.de>

Para obtener mayor información, **Distribuidor Autorizado Local:** póngase en contacto con el Distribuidor autorizado local o Hach Company.

Literatura número 2510  
D03 Impreso en EE.UU.  
© Hach Company, 2000. Todos los derechos reservados.  
Patente 5,650,290 y 5,849,515



## ¡Aprobado por la USEPA!

El método m-ColiBlue24® de Hach para la detección de coliformes totales y *E. coli* está aprobado por la USEPA para realizar registros bajo la Reglamentación de coliformes totales (CFR 40 141.21).

## Analice diferentes muestras

El Caldo m-ColiBlue24® está aprobado por la USEPA para registrar la presencia/ausencia de coliformes totales y *E. coli* en agua potable.

Dado que m-ColiBlue24® ofrece resultados simultáneos cuantitativos, sin necesidad de confirmación, usted puede utilizarlo para determinar con precisión la contaminación en:

- Aguas embotelladas
- Bebidas
- Aguas superficiales, subterráneas y de pozo
- Aguas de recreación
- Agua de procesos para agua ultrapura, procedimientos químicos y farmacéuticos.

## Especificaciones

Incubación: 24 horas a 35 ± 0,5° C

Sensibilidad: 1 CFU/100 mL

Selectividad: Detecta coliformes totales y *E. coli*

Vida útil: 1 año refrigerado de 2° a 8° C

Proteger contra la luz

## Anexo 7

### Tiosulfato sódico al 3%

- Se coloca 3 gr. De Tiosulfato sódico en 100 mL de agua destilada para obtener tiosulfato sódico al 3%

$$3\text{gr} \quad 100 \text{ mL}$$

$$X \quad 20 \text{ mL}$$

X= 0.6 gr para un volumen de 20 mL.

- Se utiliza 0.1 mL de la solución Tiosulfato sódico al 3% por cada 100 mL de agua potable.

## **Anexo 8**

### **CALDO INFUSION CEREBRO CORAZON (BHI)**

El caldo de Infusión Cerebro Corazón es una modificación de las formulaciones desarrolladas por Rosenow y Hayden en las que se adicionó infusión de cerebro de ternera y difosfato de sodio.

Está especificado en varios procedimientos estándares para la industria alimenticia y el análisis de aguas. También es recomendado por la NCCLS para preparar el inóculo para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

En este medio la infusión de carne de corazón y de cerebro de ternera así como la peptona proveen la fuente de carbono, nitrógeno sulfuro y vitaminas. La dextrosa actúa como fuente de energía. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico del medio. El fosfato disódico actúa como buffer.

#### **Fórmula**

Infusión de Cerebro de Ternera 200.0 gr

Cloruro de Sodio 5.0 gr

Infusión de Corazón de Res 250.0 gr

Fosfato Disódico 2.5 gr

Peptona de Gelatina 10.0 gr

Dextrosa 2.0 gr

pH  $7.4 \pm 0.2$

#### **Preparación**

Suspender 37g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Dispensar en tubos de vidrio, tapar y esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

#### **BIBLIOGRAFIA**

[www.mcd.com.mx](http://www.mcd.com.mx)

## Anexo 9

### TRIPTICASE SOJA AGAR (TSA)

Tryptic Soy Agar is a general purpose culture medium for cultivation, isolation of fastidious or nonfastidious microorganisms or for maintenance of stock culture. Used for the precultivation and enumeration (E. coli) acc. to membrane-filter technique. It is suitable for the cultivation both of aerobes and anaerobes.

<b>Composition: Ingredients</b>	<b>Grams/Litre</b>
Casein peptone (pancreatic)	15.0
Soya peptone (papainic)	5.0
Sodium chloride	5.0
Agar	15.0

#### **Directions:**

Suspend 40 g of dehydrated media in 1 litre of purified filtered water. Sterilize at 121°C for 15 minutes. Cool to 45-50°C. Mix gently and dispense into sterile Petri dishes or sterile culture tubes.

#### **BIBLIOGRAFIA**

[www.bd.com](http://www.bd.com)

## **Anexo 10**

### **AGAR MAC CONKEY**

El Agar MacConkey es un medio selectivo y diferencial recomendado para el cultivo y aislamiento de microorganismos Gram negativos a partir de muestras clínicas, de alimentos, agua, productos lácteos y productos farmacéuticos. En este medio se aíslan y diferencian bacilos entéricos Gram negativos fermentadores y no fermentadores de la lactosa.

#### **Fórmula**

- Digerido Pancreático de Gelatina 17.0 g
- Sales Biliares 1.5 g
- Digerido Péptico de Tejido Animal 1.5 g
- Cloruro de Sodio 5.0 g
- Digerido Pancreático de Caseína 1.5 g
- Cristal Violeta 0.001g
- Lactosa 10.0 g
- Agar Bacteriológico 13.5 g
- Rojo Neutro 0.03 g
- pH  $7.1 \pm 0.2$

#### **Preparación:**

Suspender 50g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles.

#### **BIBLIOGRAFIA**

[www.mcd.com.mx](http://www.mcd.com.mx)

## **Anexo 11**

### **Tinción Gram según Hucker.**

1. Se toma la placa fijada con la muestra del cultivo y se procede a cubrirla completamente con cristal violeta por un minuto, luego se elimina el exceso con abundante agua.
2. Con el portaobjetos escurrido se procede a llenarlo con solución de lugol completamente por encima de la muestra fijada por un minuto y luego se elimina el exceso con abundante agua.
3. Se procede entonces a cubrir la placa con alcohol-acetona por 10 segundos para lavar con abundante agua.
4. Por último el portaobjetos con la muestra se le añade suficiente tinción de safranina por un minuto para entonces proceder a lavar el exceso de la tinción.
5. La placa teñida se procede a secar y a observar en el microscopio.