



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA**  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIAS ALIMENTARIAS

---

---

---

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SANITARIA DE AGUA  
EMBOTELLADA A GRANEL QUE SE CONSUME EN  
CIUDAD OBREGÓN, SONORA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO**

**QUÍMICO**

**PRESENTA:**

**JANETH GUADALUPE ZAZUETA HERNÁNDEZ**

**CD. OBREGÓN, SONORA.**

**OCTUBRE DE 2005**

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología de la Dirección de Recursos Naturales del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON). Fue asesorados por el M.I. Anacleto Félix Fuentes.

# DEDICATORIAS

**A DIOS:** Por darme la vida y permitirme terminar mis estudios gracias por acompañarme.

**A MI MAMA:** Margarita Hernández Rodríguez, gracias por estar siempre conmigo, por darme la oportunidad de estudiar, por tanto amor que me das, por dejarme cumplir mi sueño y por ser un ejemplo a seguir ( Te quiero mama.)

**A MI HERMANO:** Antonio de Jesús Zazueta Hernández ( mi gordito ), por estar conmigo cada vez que te necesitaba y apoyarme en todo lo que hago, ( Te quiero mucho hermanito.)

**A MI NANA:** Juanita Rodríguez Ozuna ( mi viejita del alma ), por desvelarte conmigo esas noches pesadas y cuidarme como me cuidas mi viejita hermosa por eso y muchas cosas más te quiero.

**A MI SOBRINA:** Ángela Andrea Zazueta López ( Angelita ), gracias mi vidita por estar siempre conmigo y darle alegría a mi vida con tu sonrisa encantadora y tu cariño incondicional te quiero mucho mi pedacito de amor.

**A MI CUÑADA:** Delia Lucía López Mongoy, por el apoyo que me has dado y por ser la esposa de mi hermano.

**A MI NOVIO:** José Seferino Félix Quintero (POLLO), gracias mi amor por siempre apoyarme, por estar conmigo y no dejarme sola en los momentos difíciles te amo mi pollito.

# AGRADECIMIENTOS

**Al ITSON:** Por dar darme la oportunidad de ampliar mi conocimiento, para así poder darme paso en el terreno profesional.

**A M.I. Anacleto Félix Fuentes.** Por apoyarme y asesorarme en la realización de este trabajo, por los consejos que me da, por tanto conocimiento que me brinda y por ser un gran amigo lo aprecio mucho.

**A ING. Andrés Francisco Chávez Almanza.** Gracias por apoyarme en la revisión de mi trabajo, por esas mayúsculas perdidas, y por sacarme de tantas dudas durante la realización de mi trabajo 👍.

**A ING. Rafael Angulo Inzunza.** Gracias por brindarme su tiempo para la revisión de mi trabajo y por sus recomendaciones.

**A DRA. Maria Mercedes Meza Montenegro.** Gracias por su dedicación tan detallada en la revisión de mi trabajo y sus recomendaciones.

**A TODOS MIS MAESTROS:** Ana Rentería, Olga Campas, Dalia Sánchez, Rosa Amelia Beltrán, Jaime López, Guadalupe Aguilar, Ernesto García, Roberto García, Rosario Gálvez y todos los maestros que ayudaron a mi formación, gracias maestros.

**A MIS TÍOS:** Tomaza Hernández, Aurora Hernández, Berta Hernández, Erica Hernández, Eulalio Hernández. Gracias tíos.

**A MIS PADRINOS:** Vicente Basurto y Clara Núñez, Joel Hernández y Elsa Miranda, Rubén Rojas y Geña Briones, Agustín García y Delia Ramos, Teresa Vázquez, Cristina Salazar. Gracias padrino por estar siempre con migo.

**A MI AMIGA:** Diana Gabriela López Padilla, por apoyarme siempre y ayudarme en los momentos difíciles cuando más te necesitaba por eso mil gracias amiga te quiero.

**A MIS AMIGAS:** Dania Denisse Leiva Ortega, Dulce Maria Martínez Félix y Denisse Fabiola Martines Méndez, gracias por acompañarme en tantas aventuras escolares.

**A MIS COMPAÑEROS TESISISTAS:** Ramón Soto, Iván Acosta, Cristel Salas, Cristina Villalobos, Dulce Maria Martínez, Ricardo meza.

**A MIS COMPAÑERO DE GENERACIÓN:** Rafael Torres Gabby Soto, Alejandro Serna, Mirna Renteria, Walter Díaz, Michael Pérez, Dante Ruiz, Lupita Arellanes, Mario Macias, Gladis Espinoza, Karla Rojo, Luis Amavisca, Karla Dorame, Nancy Valdez.

**A MIS AMIGOS DE TENNIS:** Deisy Espinoza, Lupita Duron, Karla Rivas, Alex García, Pablito Riva, Raúl Rivera, Memo Angulo, Iván Gómez, Carmen Arredondo, gracias por apoyarme.

**A MIS AMIGOS DE PREPA:** Diana López, Maritza Soto, Gisela Gaxiola, Adrián Sandoval, Saín Torres, Carlos Cañes, Esther Ballestero, Felisa Galavis, Leonardo Calderón (+).

# ÍNDICE

	Pagina
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>ii</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>iii</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>v</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>vii</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>viii</b>
<b>OBJETIVO GENERALES.....</b>	<b>x</b>
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO .....</b>	<b>xi</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>xii</b>
<b>I. MARCO TEORICO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Generalidades del agua.....	1
1.2. Importancia del agua.....	2
1.3. La importancia de realizar el análisis microbiológicos al agua purificada....	2
1.4. Purificación del agua. ....	3
1.5. Métodos utilizados para la purificación del agua. ....	3
1.5.1 Desinfección por rayos ultravioleta (UV).....	3
1.5.2. Purificación por ozono. ....	4
1.5.3. Purificación por ósmosis inversa. ....	4
1.5.4. Filtro de carbón activado. ....	5
1.5.5. Suavizadores de agua. ....	5
1.6. Agua embotellada, ¿qué tan pura es? .....	6
1.7. Norma mexicana para agua purificada envasada.....	7
1.8. Enfermedades transmitidas por el agua.....	7
1.9. Organismos del grupo coliformes.....	8
1.9.1. Definición.....	8
1.9.2. Conformación del grupo.....	8

1.9.3. Cultivo y desarrollo.....	9
1.9.4. Coliformes totales .....	9
1.9.5. Coliformes fecales.....	9
1.10. Mesofilos aerobios . .....	10
1.11. Vibrio cholerae . .....	11
1.12. Pruebas bioquímicas.....	12
1.12.1. Medio basal Oxidativo Fermentativo (OF).....	12
1.12.2. Agar Triple Sugar Iron (TSI).....	12
1.12.3. Agar Lisien Iron (LIA).....	13
1.12.4. Agar Citrato de Simmons.....	13
1.12.5. Gelatina nutritiva.....	14
1.12.6. Caldo urea.....	14
1.12.7. Caldo malonato de Ewing modificado.....	14
1.12.8. Caldo Rojo de metilo y Voges proskauer ( RM–VP ).....	15
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS. ....</b>	<b>16</b>
2.1. Zona de estudio y características de los sitios de estudio.....	16
2.2. Ubicación de los sitios de muestreo. ....	17
2.3. Muestreo y frecuencia. ....	17
2.4. Características de la muestra. ....	19
2.5. Recolección de muestra. ....	19
2.6. Análisis de la muestra. ....	19
2.6.1. Cuenta total viable de mesófilos aerobios por la técnica de vaciado en placa.....	20
2.6.2. Determinación del numero mas probable (NMP) de coliformes totales por la técnica de tubos de fermentación múltiple .....	20
2.6.2.1. Prueba presuntiva. ....	20
2.6.2.2. Prueba confirmativa. ....	21
2.6.2.3. Determinación del NMP de coliformes totales.....	21
2.6.3. Determinación de coliformes fecales por la técnica de tubos de fermentación múltiple por el numero mas probable (NMP) .....	21
2.6.3.1. Prueba presuntiva. ....	21

2.6.3.2. Prueba confirmativa. ....	22
2.6.3.3. Determinación del NMP de coliformes fecales. ....	22
2.6.4. Aislamiento e identificación de Vibrio cholerae.. ....	24
2.6.4.1. Aislamiento e identificación. ....	24
2.6.5. Pruebas bioquímicas para identificación. ....	24
<b>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>31</b>
3.1. Cuenta total viable de microorganismos mesofilos aerobios.....	32
3.2. Numero más probable de coliformes totales.....	33
3.3. Numero más probable de coliformes fecales.....	35
3.4. Aislamiento e identificación de Vibrio cholerae .....	36
<b>IV. CONCLUSIONES.....</b>	<b>38</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>BIBLIOGRAFÍAS. ....</b>	<b>42</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Sitios de muestreo.....	17
2	Fechas de muestreo.....	17
3	Número Mas Probable (NMP) de coliformes totales y fecales.....	23
4	Resultados de la cuenta total viable de microorganismos mesofilos aerobios expresados en UFC/100ml .....	33
5	Resultados del Número Más Probable de coliformes totales.....	34
6	Resultados del Número Más Probable de coliformes fecales.....	36
7	Aislamiento e identificación de <i>Vibrio cholerae</i> .....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1	Localización de los sitios de muestra en ciudad Obregón, Sonora.....18

## RESUMEN

La calidad del agua es muy importante, debido a que todos los seres vivos la utilizan, uno de los problemas que presenta la calidad del agua es contaminación microbiológica que afecta las condiciones sanitarias del agua y que puedan causar daños a la salud de los consumidores.

El presente trabajo se desarrolló en los Laboratorio de Microbiología de la Dirección de Recursos Naturales del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON). En el período que comprende del 16 de mayo al 21 de junio de 2005, los muestreos se llevaron a cabo semanalmente y el objetivo del estudio fue evaluar la calidad sanitaria del agua purificada que se venden a granel en ciudad de Obregón, Sonora.

Los análisis microbiológicos que se realizaron fueron: cuenta total viable de microorganismos mesofilos aerobios por el método de vaciado en placa, Número Mas Probable (NPM) de coliformes fecales y coliformes totales por la técnica de tubos de fermentación múltiple y aislamiento e identificación por pruebas bioquímicas de *Vibrio cholerae* (NOM-041-SSA1-1993).

Los resultados obtenidos en las 36 muestras analizadas, indica que un 44.4 % de estas rebasaron las 100 UFC/ml de organismos mesofilos aerobios permitidos por la norma (NOM-041-SSA1-1993), el 22.2 % de las aguas presentaron incidencia de coliformes totales rebasando la norma de no detectable y el 11.1 % de las aguas analizadas sobrepasaron el parámetro establecido de cero UFC/100 ml para coliformes fecales y presento ausencia total de *Vibrio cholerae* en cada una de las muestras.

Por los resultados obtenidos se puede concluir desde el punto de vista microbiológicos que el agua analizada no es de buena calidad ya que se encontraron coliformes de origen fecal, considerando que no es apta para consumo humano, por lo tanto se recomienda llevar acabo un buen lavado de los garrafones, limpiar constantemente los equipos de purificación y además de mantener limpio el establecimiento.

## INTRODUCCIÓN

El agua es un líquido incoloro e insípida que puede encontrarse en la naturaleza en sus tres estados físicos. Entre algunas de sus propiedades y características son; ser el origen de la vida, cubrir tres cuartas partes de la tierra y una muy importante ser el solvente universal (Huerta, 2003).

El comercio internacional de agua embotellada ha aumentado durante los últimos años, tanto en cantidad como en diversidad. Debido a la mayor capacidad de transporte, actualmente es posible distribuir el agua embotellada no sólo por barco, ferrocarril o vía terrestre, sino también por vía aérea, si bien esta última posibilidad se utiliza principalmente en situaciones de crisis debido a su alto costo. La disponibilidad de todos estos medios de transporte ha permitido remediar los problemas de escasez de agua cuando los sistemas de suministro local fallan por causas naturales (como las sequías o los terremotos) o catástrofes sociales (como asedios o sabotajes). Tanto el agua mineral natural como de otro tipo, se ha utilizado para satisfacer las necesidades en esas situaciones de urgencia (Huerta, 2003).

Los controles microbiológicos rutinarios para determinar la potabilidad del agua no se basan en el aislamiento e identificación de microorganismos patógenos sino que se basan en la búsqueda de microorganismos que indique la posibilidad de la presencia de este tipo de microorganismos, los cuales nos sirven como un sistema de alarma. Un microorganismo indicador es un tipo de microorganismo cuya presencia en el agua es una evidencia de que el agua está contaminada con materia fecal de humanos u otros animales de sangre caliente. Este tipo de contaminación fecal significa que cualquier microorganismo patógeno que exista en el tracto intestinal de estos animales puede estar presente también en el agua. El microorganismo utilizado como indicador es *Escherichia coli* y su detección se puede hacer mediante el cultivo en caldo lactosado y determinación del número más probable (NMP) o mediante filtración en membrana usando medios selectivos y diferenciales (Mateos, 2000).

El agua contaminada sirve de vehículo en la transmisión de numerosas enfermedades, entre las que podemos mencionar: el cólera y la fiebre tifoidea, causadas por bacterias.

En muchos casos, los brotes de estas enfermedades entran a las casas por los conductos del agua que no han sido desinfectados (Chavarrias, 2005).

Por lo antes mencionado en el presente trabajo se determinará la calidad microbiológica del agua embotellada a granel expedida en Ciudad Obregón Sonora, con el fin de evaluar su calidad sanitaria y comprobar si es apta para consumo humano.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El agua purificada empleada en el llenado a granel que se vende en ciudad Obregón, Sonora, actualmente es muy consumida por las personas debido a su bajo costo, por eso es necesario emplear un estudio microbiológico con el fin de evaluar su calidad microbiológica y así saber si contiene algún tipo de contaminante que pueda causar daño a la salud.

El presente estudio se realizó debido a que se ha presentado cierta desconfianza con este tipo de agua, ya que han presentado en algunas ocasiones sedimentos blancos en esta agua, mal sabor y dolores de estómagos leves en las personas que consumen esta agua.

## JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con un estudio realizado por la Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO), la calidad de las aguas envasadas de 310 marcas diferentes analizadas y evaluadas en diversas regiones de la república mexicana, desde un punto de vista sanitario, es poco satisfactoria. Es importante mencionar que en muchas de las aguas se encontró que los resultados de parámetros relacionados con la presencia de minerales fueron muy bajos, similares a los que presenta el agua destilada usada para otros fines (industriales y farmacéuticos), y que no es recomendable para el consumo humano (PROFECO, 2000).

En 1997, se llevo acabo el estudio titulado: Análisis fisicoquímicos y bacteriológicos de las diferentes marcas de aguas purificadas, vendidas en Cd. Obregón, Sonora, México . Los resultados del mismo mostraron un gran porcentaje de incidencia de bacteria mesofilas aerobias, como también de la presencia de *E. coli* y pero no encontró presencia de *Vibrio cholerae* (Zapuche 1997).



Con el presente estudio se generara nueva información ya que en ciudad Obregón, Sonora, no existen estudios microbiológicos en las aguas purificadas utilizadas para el llenado a granel.

## **OBJETIVO GENERAL**

Realizar el análisis microbiológico en aguas purificadas que se envasan a granel en ciudad Obregón Sonora, con el fin de evaluar su calidad sanitaria y comprobar si es apta para consumo humano.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 🎓 Cuantificar conteo total de microorganismos mesofilos aerobios.
- 🎓 Determinar número mas probable de coliformes fecales y coliformes totales.
- 🎓 Aislar e identificar por pruebas bioquímicas *Vibrio cholerae*.
- 🎓 Evaluar la calidad microbiológica comparando con la Norma Oficial Mexicana **NOM-041-SSA1-1993**.

## **HIPÓTESIS**

El agua purificada empleada para el llenado a granel , que se consume en ciudad Obregón, no cumple con la calidad sanitaria para consumo humano, debido a que no se tiene un proceso de purificación adecuado.

## **I. MARCO TEORICO**

### **1.1. Generalidades del agua.**

El agua es un componente la naturaleza que ha estado presente en la Tierra desde hace más de 3.000 millones de años, ocupando tres cuartas partes de la superficie del planeta y una muy importante ser el solvente universal. Su naturaleza esta compuesta de tres átomos, dos de hidrógeno y uno de oxígeno, que están unidos entre si para forman una molécula de agua, H<sub>2</sub>O, la unidad mínima en que ésta se puede encontrar. La forma en que estas moléculas se unen entre sí determinará la forma en que encontramos el agua en nuestro entorno; como líquidos, en lluvias, ríos, océanos, entre otros, como sólidos en témpanos y nieves o como gas en las nubes.

El agua dulce está surgiendo como uno de los problemas más críticos de los recursos naturales que enfrenta la humanidad. El agua dulce disponible mundialmente no está distribuida de forma homogénea, como lo demuestran las extensas regiones áridas y semiáridas que no cuentan con suficiente agua y en otros lugares se tiene demasiada agua (Díaz y Antón, 2002).

## **1.2. Importancia del agua.**

El agua tiene un papel fundamental como motor de la actividad biológica en el planeta. Así lo demuestra el que la vida se haya iniciado en su seno. A medida que las formas de vida evolucionaban, se hicieron más complejas y especializadas (Díaz y Antón, 2002).

Solo hay dos fuentes de agua a disposición del hombre, a saber: las de la superficie, que comprende los lagos, ríos que envía el agua hacia los embalses y los procedimientos que permiten captar y retener el agua de lluvia y las subterráneas, que no siempre están separadas. Las aguas de superficie puede convertirse en aguas subterráneas y salir de nuevo como agua superficial ( Zapuche, 1997).

## **1.3. La importancia de realizar el análisis microbiológicos al agua purificada.**

La purificación y calidad del agua potable es una de las principales preocupaciones del mundo. El crecimiento, la población, eventos del clima y desequilibrio ecológico comprometen los suministros del agua (ANPCAPAC, 2004).

Todas las personas corren riesgo de contraer enfermedades propagadas a través del agua, pero los ancianos, bebés y niños así como las personas enfermas son los que corren mayor riesgo. Se calcula que de cada cuatro camas de hospital a nivel mundial, dos se encuentran ocupadas por personas que bebieron agua contaminada con microorganismos (ANPCAPAC, 2004).

De acuerdo a datos oficiales, las enfermedades diarreicas que se originan por el agua contaminada matan aproximadamente a 2 millones de niños en todo el mundo anualmente (ANPCAPAC, 2004).

#### **1.4. Purificación del agua.**

La purificación “se refiere a hacer pura el agua, y se utiliza como sinónimo de potabilización. Consiste en eliminar del agua todas las sustancias que la hagan inadecuada para beberla sin riesgos a la salud”. Debe entenderse que la purificación es un proceso en el que intervienen los métodos de desinfección y de filtración en sus primeras fases, aunque después deba someterse el agua a otros tratamientos para lograr su potabilización. Es por ello que este término se definiría mejor como un sistema (ANPCAPAC, 2005).

#### **1.5. Métodos utilizados para la purificación del agua.**

El agua que se suministra por la red pública del país es agua potable, es decir, está libre de sustancias y microorganismos que puedan afectar la salud. Sin embargo, una gran parte de esa agua se contamina en el trayecto o en el interior de los domicilios: muchas cisternas tienen filtraciones o grietas que permiten la entrada de insectos y animales portadores de bacterias. A su vez, muchos tinacos están mal tapados y permanecen expuestos a la intemperie (Huerta, 2003).

Debido a esto, en muchos casos una parte importante del gasto familiar se destina a la compra de agua purificada embotellada, que tiene un mejor sabor y es segura para beber. Desafortunadamente, existen empresas comercializadoras de agua clandestinas que no cumplen con los requisitos mínimos para purificarla o, incluso, simplemente llenan los garrafones con agua de la llave y les ponen “etiquetas” y “sellos de garantía” (Huerta, 2003).

##### **1.5.1 Desinfección por rayos ultravioleta (UV).**

En la primera etapa el agua pasa por un filtro que retiene las partículas en suspensión. Después pasa por un filtro de carbón activado, que elimina el mal sabor, olor y color. Por último el agua es purificada por el medio de luz UV, que se

encarga de destruir las bacterias y virus. El método ultravioleta es mas efectivo cuando las aguas han sido parcialmente tratadas. (ANPCAPAC, 2005).

### **1.5.2.Purificación por ozono.**

Como purificador de agua, el ozono es un gas muy efectivo porque mata los organismos vivos sin dejar residuos químicos que puedan dañar la salud o alterar el sabor del agua. En general, se considera que sus ventajas son las siguientes: reduce de manera importante el aspecto turbio, el mal olor y sabor del agua, así como la cantidad de sólidos en suspensión (Huerta, 2003).

No sólo elimina las bacterias causantes de enfermedades, sino que también inactiva virus y otros microorganismos que el cloro no puede destruir. El equipo consta de un generador de ozono, dos válvulas y un secador de aire, y tiene la capacidad para purificar aproximadamente 300 litros de agua diarios (Huerta, 2003).

### **1.5.3. Purificación por ósmosis inversa.**

El proceso de ósmosis inversa utiliza una membrana semipermeable que separa y elimina los sólidos, sustancias orgánicas, virus y bacterias disueltas en el agua. Puede eliminar alrededor de 95% de los sólidos disueltos totales (SDT) y 99% de todas las bacterias. Las membranas sólo dejan pasar las moléculas de agua, atrapando incluso las sales disueltas. Por cada litro que entra a un sistema de ósmosis inversa se obtienen 500 ml de agua de la más alta calidad. Durante la operación, la misma agua limpia la membrana, lo que disminuye los gastos, con un mantenimiento adecuado, puede utilizarse hasta por 10 años (Huerta, 2003).



#### **1.5.4. Filtro de carbón activado.**

En este sistema el agua pasa por un filtro de carbón activado, el cual contiene millones de agujeros microscópicos que capturan y rompen las moléculas de los contaminantes. Este método es muy eficiente para eliminar el cloro, el mal olor, los sabores desagradables. También retiene algunos contaminantes orgánicos, como insecticidas, pesticidas y herbicidas. El riesgo que tienen los filtros de carbón activado es que pueden saturarse y contaminarse con microorganismos deben cambiarse cada cinco meses (Huerta, 2003).

#### **1.5.5. Suavizadores de agua.**

Es un proceso de intercambio iónico, que tiene la finalidad de remover la dureza del agua, esto quiere decir que el calcio, magnesio, hierro y el manganeso que produce la dureza, serán removidos casi por completo del agua que se va tratar. El agua atraviesa una cama de resina con carga iónica, removiendo los minerales contenidos en el fluido para una buena calidad de agua (Huerta, 2003).

## 1.6. Agua embotellada, ¿qué tan pura es?.

¿Quién no acostumbra a traer su botella de agua en la bolsa o en la mochila? De unos años a la fecha esto se ha convertido en una moda, algunos por salud, otros por apariencia física y a fin de cuentas es una necesidad (Delgadillo y Ramírez, 2002).

Aquel famoso refrán: "El agua no se le niega a nadie" ha quedado en el olvido. Ahora se vende en distintas presentaciones y precios (Delgadillo y Ramírez, 2002).

Generalmente los envases indican algún atributo o la técnica utilizada en su purificación. Sin embargo, un estudio realizado por el Fondo Mundial para la Naturaleza asegura que el agua embotellada no es más saludable o segura para beber que el agua común y corriente (Delgadillo y Ramírez, 2002).

Agrega el análisis, que la gran demanda por este producto causa problemas ambientales y además trae consigo un desembolso considerable, ya que llega a superar el valor del agua de consumo de la red pública entre 500 y mil veces más por ella (Delgadillo y Ramírez, 2002).

El negocio del agua embotellada ha mostrado un crecimiento constante. Se calcula que en todo el planeta se consumen 126 mil millones de litros de agua embotellada al año y que el mercado podría situarse en 22 mil millones de dólares. México es el cuarto consumidor, después de tres países europeos, con 13 mil millones de litros de agua embotellada que se consumen al año. El 88.5 % de ese total, es consumido en garrafón y el resto en botella personalizada (Delgadillo y Ramírez, 2002).

## 1.7. Norma mexicana para agua purificada envasada

La secretaria de salud establece la norma oficial NOM-041-SSA1-1993. Bienes y servicios. Agua purificada envasada. Especificaciones sanitarias.

### Limites máximos permitidos

Mesófilos aerobios 100 UFC/ml
Coliformes totales* NMP/100 ml no detectable
Coliformes totales** NMP/100 ml cero
Vibrio cholerae*** Negativo

\* Técnica de número más probable.

\*\* Método de filtración por membrana.

\*\*\* Bajo situaciones de emergencia sanitaria la Secretaría de Salud, sin perjuicio de las atribuciones de otras Dependencias del Ejecutivo establecerá los casos en los que se habrá de determinar la presencia de este agente biológico.

## 1.8. Enfermedades transmitidas por el agua

Las enfermedades transmitidas por el agua son producidas por "agua sucia", las cuales son causadas por agua que se ha contaminado con desechos humanos, animales o químicos. Millones de personas tienen poco acceso a servicios sanitarios de evacuación de desechos o agua limpia para la higiene personal.

Las enfermedades transmitidas por el agua son el cólera, fiebre tifoidea, shigellosis, poliomiелitis, meningitis y hepatitis A y E. Los seres humanos y los animales pueden actuar de huéspedes de bacterias, virus o protozoos que causan estas enfermedades.

Las enfermedades diarreicas son, las principales enfermedades transmitidas por el agua, prevalecen en numerosos países en los que el tratamiento de las aguas

consumidas es inadecuado. Los desechos humanos se evacuan en letrinas abiertas, canales y corrientes de agua (OMS, 2004).

## **1.9. Organismos del grupo coliformes**

### **1.9.1. Definición**

Los organismos coliformes han sido descritos como bacilos Gram negativos no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos que fermentan la lactosa con producción de gas, dentro de las 48 horas de incubación a 35°C (Fernández, 1981).

### **1.9.2. Conformación del grupo**

Dentro de la definición anterior se puede incluir un grupo heterogéneo de microorganismos con hábitat primordialmente intestinal; aunque también, se incluyen bacterias de origen intestinal, que cumplen con las características de la definición. Por lo tanto, los organismos coliformes no necesariamente guardan una relación con una contaminación de origen fecal y en consecuencia, tampoco con la presencia de patógenos entéricos. Los géneros típicos del grupo coliformes se encuentran dentro de la familia de la enterobacterias. *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter* son las mas comunes, aunque algunas de sus especies no fermentan la lactosa antes de 48 horas, por lo que se descartan del grupo (Zapuche 1997).

### **1.9.3. Cultivo y desarrollo**

Los organismos coliformes se desarrollan favorablemente en medio de cultivos simples, por lo que no es necesario la utilización de compuestos complejos para su cultivo. En cuanto a la temperatura óptima y los límites para su desarrollo, corresponde a los de las bacterias mesófilas, es decir, una óptima entre 32 y 37 °C, con un límite superior cercano a los 45 a 46°C. De hecho, se han clasificado los coliformes en aquellos que se desarrollan a temperaturas superiores a 40°C (coliformes fecales) . Una temperatura de 4°C a menor impedirán la propagación de coliformes; temperaturas superiores de refrigeración mantienen su número o permiten ligeros incrementos. Si el tiempo de conservación a 4°C se propaga, los coliformes pueden entrar en actividad. El PH óptimo para que se desarrollen los organismos coliformes se encuentran próximos a la neutralidad (Cantú, 2000).

### **1.9.4. Coliformes totales**

La mayoría de estos organismos se encuentran en vida libre es decir en el medio ambiente y materia en descomposición, excepto el género *Escherichia* que vive solo en organismos como el hombre y animales de sangre caliente (Delmonte, 2000).

En conjunto, los coliformes están representados por cuatro géneros de la familia *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*. *E. coli* es más indicativo de contaminación fecal que los otros géneros y especies indicados (Jay, 1992).

### **1.9.5. Coliformes fecales**

Las objeciones hechas a los coliformes como indicadores de contaminación fecal en los alimentos han llevado a los microbiólogos al empleo de *E.coli*, como el indicador más exacto. Esta especie es la principal representante de los coliformes fecales debido a que se ha descubierto como el representante más genuino de la flora intestinal del hombre y animales de sangre caliente. La característica principal que

diferencia a este grupo de microorganismos, es su capacidad de desarrollar a temperaturas superiores a 40°C. La temperatura mas recomendada en el laboratorio es de 44.5°C, en baño maría, a la cual va a quedar incluido un pequeño porcentaje de coliformes no fecales y se va a excluir pocas cepas de coliformes fecales, partiendo de un medio selectivo.

Los coliformes fecales son también bacterias no termodúricas, susceptibles a la congelación y descongelación, desecación y acidez excesiva, es decir muestra patrones de sobrevivencia similares a los de los coliformes totales (Fernández, 1981).

Las bacterias de éstas familias son indicadoras por excelencia de contaminación fecal del agua por heces de origen humano principalmente a la hora de analizar las situaciones en las que hay la posibilidad de contacto con agentes peligrosos para la salud-población no se debe referir sólo a la ingestión de agua residual depurada o al contacto con la piel y mucosas. En los sistemas de reutilización pueden resultar afectadas diversas matrices ambientales, entre las cuales se deben destacar el aire, las aguas subterráneas, la tierra y los vegetales (Delmonte, 2000).

### **1.10. Mesofilos aerobios**

Al grupo de organismos mesofílicos aerobios pertenece una gran variedad de microorganismos, están incluidos todos aquellos microorganismos capaces de desarrollarse entre las temperaturas de 20 y 37 °C, que son los extremos de temperaturas a las cuales suele realizarse este recuento en condiciones de aerobiosis (vida sostenida por un organismo en presencia de oxígeno) . En algunos alimentos, este grupo de microorganismos presenta máximos recuentos, pero eso dependerá del predominio de otros grupos como lo son psicofílicos, anaerobios, entre otros. Dentro de la flora mesofílica aerobia se tienen a los bacilos, cocos, gram positivos y gram negativos, aislados o agrupados en todas las variedades que son familiares. Desde el punto de vista fisiológico y de su patogenicidad se encuentran:

cromógenos, proteolíticos, lipolíticos, sacarolíticos, saprofiticos, patógenos, entre otros (López, 2005).

La utilidad de las bacterias mesofílicas aeróbicas en la microbiología sanitaria se ha recomendado para los siguientes objetivos:

- 🚩 Como indicador de la posible presencia de microorganismos patógenos.
- 🚩 Como indicador del valor comercial de un alimento
- 🚩 Como indicador de las condiciones higiénicas en que ha sido manejado el producto.
- 🚩 Como indicador de la idoneidad de un ingrediente cuando se va a incorporar a un alimento
- 🚩 Para seguir la eficiencia de un proceso germicida o de preservación
- 🚩 Para predecir la vida de anaquel de un alimento.

### **1.11. *Vibrio cholerae***

El genero *Vibrio* de la familia *Vibrionaceae* se compone de un grupo de microorganismos relacionados que se caracterizan por ser bacilos cortos, rectos o curvos gram negativos que algunas veces se ven en los cultivos formando cadenas como una “S” en espiral, generalmente móviles por poseer flagelos polares (Cantu,2000).

El *Vibrio del cholerae* es anaerobio facultativo, posee ambos metabolismos, respiratorios y fermentativos. Crecen en temperaturas de 16 a 42 °C, siendo la óptima de 37 °C. Es indispensable la reacción alcalina para su desarrollo; crecerá dentro de un rango de pH que va de 6.4 a 9.6 y por lo regular se cultiva en un medio alcalino con PH de 7.8 a 8.0. Esta gran tolerancia para los álcalis resulta ventajosa al preparar medios selectivos para aislar el *Vibrio cholerae*. No plantea problema de nutrición y puede desarrollarse en agua peptona. Muchas cepas crecen en medios

sintéticos simples que contienen sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, otras también requieren purina.

El *Vibrio cholerae* se transmite de los enfermos y portadores a través del alimento, agua, moscas y manos sucias. Los gérmenes pasan de la boca al intestino delgado. La acidez del contenido gástrico representa, por lo común, un medio desfavorable para estos microorganismos, pero en algunos casos esta barrera es superada, como resultado de la acción de distintos factores que neutralizan o reproducen las propiedades bactericidas del jugo gástrico (Zapuche, 1997).

## **1.12. Pruebas bioquímicas**

### **1.12.1. Medio basal Oxidativo Fermentativo (OF)**

Este medio tiene como función primordial determinar el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono. Se utiliza para diferenciar géneros intestinales no entéricos, gram negativos de enterobacterias, también ayuda a la diferenciación entre los géneros de la *Micrococcaceae* y *Staphylococcus* (Mac Faddin, 1984).

### **1.12.2 Agar Triple Sugar Iron (TSI)**

Este medio se determina la capacidad de un organismo de atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gases, junto con la determinación de posibles producción de ácido sulfhídrico.

Es un medio diferencial muy usado en la identificación de enterobacterias patógenas. Su modo de acción es semejante al medio de Kligler que contiene dos azúcares, adicionales además con 1% de sacarosa. Esto permite el reconocimiento y exclusión de *proteus*, *Hafnia* y *Providencia*,, no fermentan la lactosa o lo hacen muy lentamente



y si en cambio fermenta la sacarosa con bastantes rapidez, lo cual permite excluir a este grupo de bacterias de *Salmonella* y *Shigella* (Mac Faddin, 1984).

### **1.12.3. Agar Lisien Iron (LIA)**

Este medio se emplea para determinar la descarboxilación y desaminación de la lisina. La lisina puede ser descarboxilada por microorganismos LD- positivos (Lisina descarboxilasa positivos), que la transforman en amina Cadaverina. Esto produce un viraje a violeta del indicador pH Púrpura de bromocresol. Para que ocurra la descarboxilación es necesario que se acidifique el medio por la fermentación de la glucosa. Por este motivo este medio de cultivo solo puede utilizarse para diferenciar de cultivos que fermentan la glucosa, como *Klebsiella*, *Arizona*, *Salmonella*.

Las cepas del grupo *Proteus* – *Providencia*, con excepción de algunas cepas de *Proteus morganii*, desaminan a la lisina a ácido  $\alpha$  - Cetocarboxílico. Este último forma compuestos pardo – rojizo en la región superficial del medio de cultivo con la sal de hierro y bajo la influencia del oxígeno (Mac Faddin, 1984).

### **1.12.4. Agar Citrato de Simmons**

Este medio se utiliza para determinar si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para su metabolismo, provocando alcalinidad. Ayuda a la diferenciación entre los géneros: *Edwardsiella* (-) de *Salmonella* por lo general (+), *Serratia liquefaciens* (+) de *Yersinia pseudotuberculosis* por lo general (-), grupos *Klebsiella-Enterobacter* por lo general (+) de *Escherichia coli* (-) (Mac Faddin, 1984).

### **1.12.5. Gelatina nutritiva**

Este medio se utiliza para la determinar la capacidad de un organismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que licuan la gelatina. Ayuda a la diferenciación entre los géneros: *Staphylococcus aureus* (+) del *Staphylococcus epidermidis* (+, lento). Ayuda también a la identificación de *Serratia liquefaciens* (+), *Pseudomonas aeruginosa*K (+, rápida), especies de *Flavobacterium* (+) (Mac Faddin, 1984).

### **1.12.6. Caldo urea**

Se utiliza para determinar la capacidad de un organismo de desdoblar la urea, formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa, esta actividad enzimática es característica de todas las especies de *Proteus*, se usa sobre todo para diferenciar los organismos *Proteus* rápidamente positivos de miembros de la Enterobacteriaceae. Ayuda a la diferenciación de especies: *Yersinia pestis* (+) de *Yersinia pseudotuberculosis* (+) y *Yersinia enterocolitica* (+) ( Mac Faddin, 1984).

### **1.12.7. Caldo malonato de Ewing modificado**

Este medio determina la capacidad de un microorganismo de utilizar al malonato de sodio como la única fuente de carbono, con la consiguiente alcalinidad; ayuda a la diferenciación entre los géneros; *Alcalligenes faecalis* (+) de *Acinetobacter* por lo general (+) de *Escherichia coli* (-) (Mac Faddin, 1984).

### **1.12.8. Caldo Rojo de metilo y Voges proskauer ( RM–VP )**

En este caldo determina la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estable los productos terminales ácido de la fermentación de la glucosa, y vencer la capacidad amortiguadora del sistema, así como también es una prueba cualitativa de la producción de ácido. La reacción es positiva principalmente para *E.coli* y negativa para *Enterobacter* y *Klebsiella*.

También en este caldo se determinan la capacidad de algunos microorganismos de producir un producto final neutro llamado acetil-metil carbinol (acetoina), a partir de la fermentación de la glucosa (Mac Faddin, 1984).

## **II. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Zona de estudio y características de los sitios de estudio.**

Los análisis se realizaron en el laboratorio de Microbiología de la Dirección de Recursos Naturales del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON), las muestras se tomaron en establecimientos de agua embotellada a granel que se expende en Ciudad Obregón, Sonora.

## 2.2. Ubicación de los sitios de muestreo.

Los sitios de muestreo fueron tomados estratégicamente del lado norte, sur, este, oeste y centro de ciudad Obregón, Sonora, para que la muestra fuera representativa, ( Tabla 1 y Figura 1)

**Tabla 1. Sitios de muestreo**

<b>SITIO</b>	<b>UBICACIÓN</b>
I	Paseo Miravalle esquina con Av. Asturias
II	300 entre Tabasco y California
III	Salcido entre paseo Miravalle y Calleja
IV	Jesús García esquina con Av. Edmundo Taboada
V	Jalisco entre Zaragoza y No reelección
VI	Cajeme entre Miguel Alemán y Sinaloa

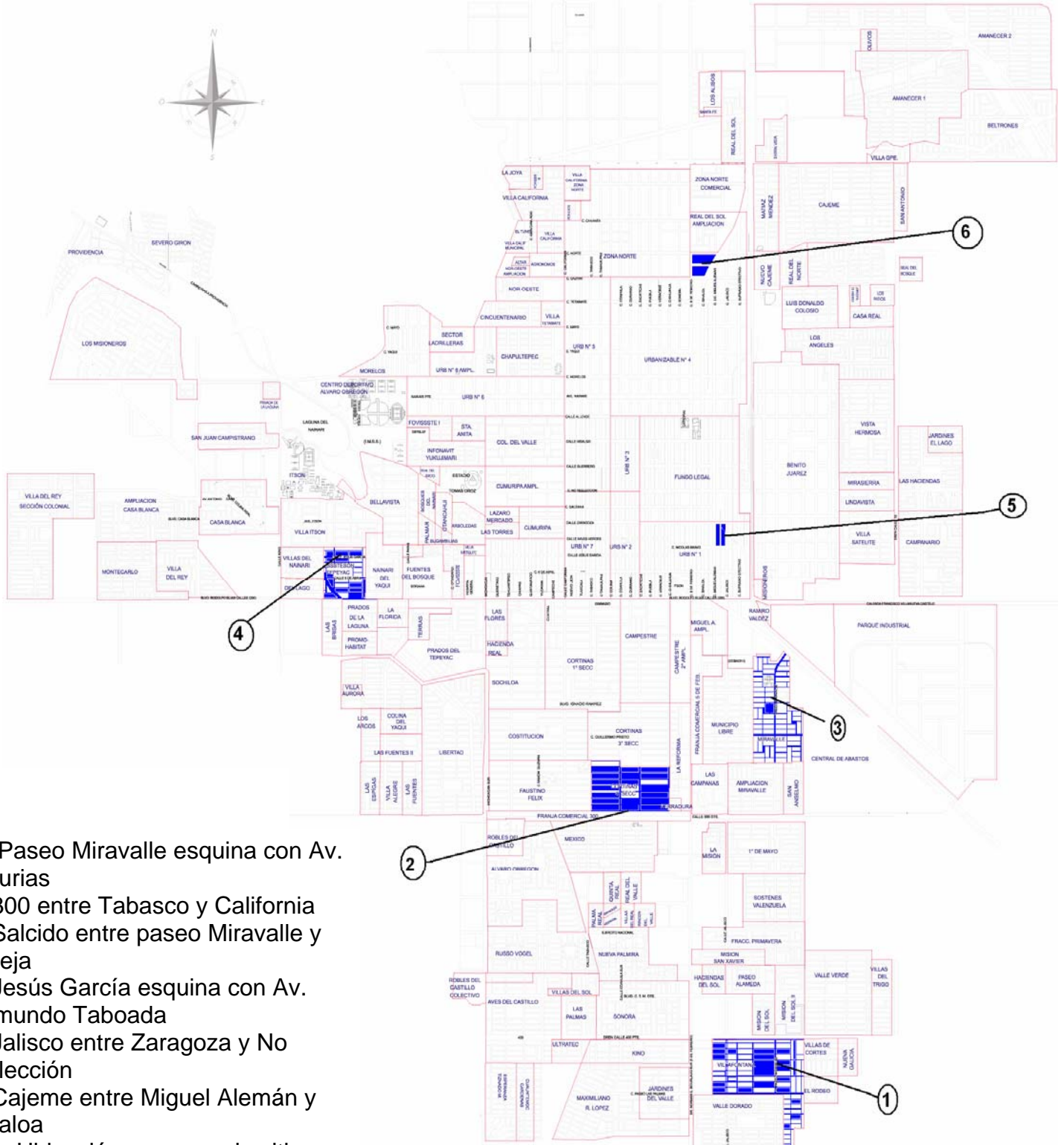
## 2.3 Muestreo y frecuencia

La investigación se llevó acabo en el período de 16 mayo a 21 de junio de 2005, los muestreos se realizaron cada 7 días, obteniendo un total de 36 muestras. En la tabla 2 se muestran las fechas en las cuales se realizaron los muestreos.

**Tabla 2. Fechas de muestreo**

<b>Muestreo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Meses</b>						
<b>Mayo</b>	16	23	29			
<b>Junio</b>				7	14	21

**Figura 1. Localización de los sitios de muestra en ciudad Obregón, Sonora**



1. Paseo Miravalle esquina con Av. Asturias
2. 300 entre Tabasco y California
3. Salcido entre paseo Miravalle y calleja
4. Jesús García esquina con Av. Edmundo Taboada
5. Jalisco entre Zaragoza y No reelección
6. Cajeme entre Miguel Alemán y Sinaloa

■ Ubicación en mapa de sitios de muestreo

## **2.4. Características de la muestra.**

Las muestras a analizar son aguas purificadas para el llenado en garrafón a granel, que es obtenida por medio de un proceso de purificación.

## **2.5. Recolección de muestra.**

La recolección de la muestra se realizaba en los seis establecimientos el mismo día, se utilizaron garrafones limpios con una capacidad de 6 litros, se llegaba al establecimiento, el trabajador recibía el garrafón al cual le daban un lavado antes de llenarlo, se realizaba la compra y posteriormente se transportaba la muestra a temperatura ambiente al laboratorio, para realizarle los análisis correspondientes en un tiempo no mayor de 6 horas.

## **2.6. Análisis de la muestra.**

Al total de muestra recolectada se le realizaran los análisis que exige la norma oficial NOM-041-SSA1-1993, Bienes y servicios. Agua purificada envasada. Especificaciones sanitarias:

- ☞ Cuantificar conteo total de microorganismos mesofilos aerobios.
  
- ☞ Determinar número más probable de coliformes fecales y coliformes totales.
  
- ☞ Analizar e identificar por pruebas bioquímicas *Vibrio cholerae*.

### **2.6.1. Cuenta total viable de mesofilos aerobios por la técnica de vaciado en placa.**

La cuenta total viable se realizó por el método de vaciado en placa. Primeramente se agita la muestra vigorosamente alrededor de 25 veces con el fin de lograr una completa homogenización. Se toman 10 ml de la muestra y se agregan a un frasco que contenga 90 ml de agua destilada estéril obteniendo así la dilución  $10^{-1}$ , de esta dilución se toma 1 ml y se agregaba a un tubo con 9 ml de agua destilada estéril obteniendo la dilución  $10^{-2}$ . De cada una de las diluciones se le agrega 1 ml a caja petri estériles y se agrega de 15 a 20 ml de agar estándar método, se homogeniza la muestra con el agar y se deja solidificar el medio, una vez solidificado el medio, se incubó a 35- 37°C durante 24 a 48 horas, pasado este tiempo se realiza un conteo de las colonias en contador de colonias Québec. Los resultados se expresan seleccionando la dilución donde la cuenta sea entre 25 y 250 colonias y reportar la colonia en UFC/ml

### **2.6.2. Determinación del numero mas probable (NMP) de coliformes totales por la técnica de tubos de fermentación múltiple.**

#### **2.6.2.1. Prueba presuntiva.**

Para esta prueba se utiliza como medio caldo lactosado. Con la muestra se inoculan 5 tubos de cada dilución que contiene 10 ml de medio con doble concentración y a cada tubo se le colocan 10 ml de muestra y dos tubos con simple concentración, a uno se le coloca 1 ml y al otro 0.1 ml de muestra, todos los tubos deben contener campana Durham. Después de inoculados, los tubos se incuban a 35-37°C por 24-48 horas. A las 48 horas los tubos en los que se produce gas y turbidez se consideran como positivos, lo cual se puede apreciar cuando se forma la burbuja dentro de la campana Durham. Se recomienda que antes de incubar se verifique que la campana no tenga burbuja con el fin de evitar tubos positivos erróneos. Los tubos positivos en los que no se produce gas se consideran negativos y se descartan.



### **2.6.2.2. Prueba confirmativa.**

A partir de los tubos que dan positivos en la prueba presuntiva, se inoculan dos asadas en los tubos que contienen 8 y 10 ml de caldo verde bilis brillante con campana Durham. Se incuban a 35-37°C durante 24-48 horas y se consideran positivos los tubos en los que se presenta producción de gas y turbidez. La producción de gas y turbidez en caldo bilis verde brillante es una confirmación de la presencia de organismos coliformes en la muestra analizada.

### **2.6.2.3. Determinación del NMP de coliformes totales.**

Los resultados de la prueba para organismos coliformes totales se expresan por la técnica del número más probable (NMP). A cada una de las series se le determina el número más probable de tubos que fueron positivos en su producción de gas y turbidez (Prueba confirmativa).

Esta cifra significativa, se llevan a la tabla del Número Mas Probable (NMP) y se determina el índice de coliformes por 100 ml de muestra (Tabla 3).

## **2.6.3. Determinación de coliformes fecales por la técnica de tubos de fermentación múltiple por el número más probable (NMP).**

### **2.6.3.1. Prueba presuntiva.**

La prueba presuntiva para la determinación de coliformes fecales es exactamente igual que la utilización para los coliformes totales .

### **2.6.3.2. Prueba confirmativa.**

Se realiza igual que para coliformes totales con la diferencia de que en este caso se empleo medio EC, el cual es específico para la recuperación de *E. Coli* además, la incubación se realiza en el baño María a temperatura de 44.5°C durante 18-24 horas. Igualmente se considera positiva la prueba al observar turbidez en el medio y producción de gas en la campana Durham.

### **2.6.3.3. Determinación del NMP de coliformes fecales.**

El Numero Mas Probable (NMP) de coliformes fecales se calcula con la misma tabla que para coliformes totales ( tabla 3).

**Tabla 3 .Numero Mas Probable (NMP) de coliformes totales y fecales**

Numero mas probables (NMP) de microorganismos y limites de confianza para diferentes combinaciones de tubos positivos cuando se inoculan cinco tubos con 10 ml, uno con 1 ml y uno con 0.9 ml de la muestra.

Combinación de tubos positivos			NMP/100ml de muestra	Limite de confianza al 99%		Limite de confianza al 95%	
				Inferior	Superior	Inferior	Superior
0	1	0	2.0	<1.0	15.0	<1.0	11.0
1	0	0	2.0	<1.0	17.0	<1.0	12.0
1	1	0	4.0	1.0	21.0	1.0	16.0
2	0	0	5.0	1.0	24.0	1.0	19.0
2	1	0	8.0	1.0	30.0	2.0	23.0
3	0	0	9.0	2.0	35.0	3.0	28.0
3	0	1	12.0	3.0	43.0	5.0	34.0
3	1	0	12.0	3.0	44.0	5.0	35.0
4	0	0	15.0	4.0	64.0	6.0	49.0
4	0	1	20.0	6.0	77.0	8.0	60.0
4	1	0	21.0	6.0	80.0	9.0	62.0
5	0	0	40.0	10.0	500.0	20.0	360.0
5	0	1	100.0	20.0	720.0	30.0	540.0
5	1	0	200.0	<100.0	5,400.0	100.0	3,800.0
5	1	1	>200.0				

Fuente: (Fernández, 1981).

#### **2.6.4. Aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae*..**

Para el aislamiento de *Vibrio cholerae* se utiliza un matraz conteniendo 225 ml de caldo peptona alcalino al cual se le agrega asépticamente 25 ml de la muestra de agua y se incuban de 35 – 37°C, por 18-48 horas.

##### **2.6.4.1. Aislamiento e identificación.**

De cada matraz se siembra por estrías en agar TCBS, y se incuba a 35-37°C durante 24 horas, de las colonias que se desarrollan se siembran en el mismo medio para obtener colonias puras, y partir de ellas se realizan las pruebas bioquímicas.

#### **2.7. Pruebas bioquímicas para identificación.**

Para la realización de pruebas bioquímicas se utiliza los medios indicadores, los cuales están constituidos por un medio base (simple y enriquecido) adicionado de un indicador o un sistema que permite poner de manifiesto un cambio o la generación de alguna sustancia que es característica de la fisiología de un microorganismo, como lo puede fermentar un determinado carbohidratos, producir ácido sulfhídrico o indol, Etc, y esto nos permite la identificación bioquímica, la cual permite la identificación genética de los cultivos microbianos.

##### **🎓 Utilización del carbono del citrato de sodio**

Para llevar a cabo esta prueba se utiliza el medio de cultivo agar citrato de simmons (inclinado), este es inoculado por picadura en el fondo y por estría en la superficie, se incuba a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por  $96 \pm 2$  horas.

**Prueba positiva:** Crecimiento acompañado de un cambio de color de verde a azul.

**Prueba negativa:** Ausencia de crecimiento y sin cambio de color.

## **Prueba de movilidad, producción de indol y ácido sulfhídrico.**

En esta prueba se utiliza el medio SIM, vertical, es sembrado por picadura en el centro del tubo perpendicular a la base; se incuba 24 horas a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , la interpretación es de la siguiente manera:

- **Movilidad.**

**Prueba positiva:** Crecimiento a lo largo de la punción y en el seno del medio de cultivo.

**Prueba negativa:** Crecimiento a lo largo de la punción exclusivamente.

- **Producción de ácido sulfhídrico.**

**Prueba positiva:** Desarrollo de color negro a lo largo de la punción que puede extenderse a todo el medio.

**Prueba negativa:** Ausencia de color negro.

- **Producción de indol**

Adicionar al tubo con medio SIM que presente crecimiento, 5 gotas de éter, para extraer el indol y 5 gotas de reactivo Kovac.

**Prueba positiva:** Desarrollo de un anillo de color rojo .

**Prueba negativa:** Sin cambió de color.

## Prueba del rojo de metilo y Voges–Proskauer

Esta prueba se realiza en caldo RM–VP y la inoculación se lleva a cabo por medio de una asada simple y es incubado de 72 a 120 horas a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y los resultados son los siguientes:

- **Prueba de Voges–Proskauer**

Adicionar 0.6 ml de solución de alfa naftol, adicionar 0.2 ml de solución de hidróxido de potasio al 40 %. Interpretar los resultados después de incubar 2 horas a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  o 4 horas a temperatura ambiente.

**Prueba positiva:** Desarrollo de color rojo ladrillo.

**Prueba negativa:** Sin cambio de color.

- **Prueba de rojo de metilo (RM)**

Adicionar al medio de cultivo de 96 horas de incubación de dos a tres gotas de solución de rojo de metilo. Interpretar los resultados inmediatamente.

**Prueba positiva:** Desarrollo de color rojo.

**Prueba negativa:** Desarrollo de color amarillo.

## Utilización del malonato

El caldo malonato de Edwing es utilizado para realizar esta prueba, el cual es inoculado por medio de una asada simple y es inoculado a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por  $40 \pm 2$  horas, los resultados son los siguientes:

**Prueba positiva:** Desarrollo de color azul.

**Prueba negativa:** Sin cambio de color.

## Prueba de la movilidad, producción de indol y ornitina

El medio utilizado para esta prueba es MIO, se pone a solidificar en un tubo en posición vertical y es sembrado por picadura en el centro del tubo, Perpendicular a la base, es incubado a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas, los resultados se interpretan de la siguiente manera:

- **Movilidad**

**Prueba positiva:** Crecimiento a lo largo de la punción y en el seno del medio de cultivo.

**Prueba negativa:** Crecimiento solo picadura.

- **Descarbolixación de la ornitina**

**Prueba positiva:** Cambio de color en el medio de violeta a púrpura.

**Prueba negativa:** Presencia de color amarillo en el medio.

- **Producción de indol**

Adicionar al tubo con medio SIM que presente crecimiento, 5 gotas de éter, para extraer el indol y 5 gotas de reactivo Kovac.

**Prueba positiva:** Desarrollo de un anillo de color rojo .

**Prueba negativa:** Sin cambió de color.

## Aprovechamiento de Lisina

Para el aprovechamiento de lisina se utiliza el medio agar de hierro y lisina (LIA), es un medio vaciado en forma inclinada en el tubo y se inocular por picadura en el fondo y estrías en la superficie, es incubado a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas, los resultados se interpretan de la siguiente manera:

**Descarboxilación positiva:** Fondo de color púrpura.

**Descarboxilación negativa:** Fondo del tubo de color amarillo.

**Desaminación positiva:** Superficie del tubo de color rojo.

**Desaminación negativa:** Superficie púrpura o sin cambio de color.

### **Utilización de carbono de glucosa y lactosa, producción de gas y ácido sulfhídrico**

El agar hierro triple azúcar (TSI) es utilizado para esta prueba, este medio es sembrado por picadura en el fondo y por estría en la superficie es incubado a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas, y los resultados son los siguientes:

- **Fermentación de glucosa**

**Prueba positiva:** Se observa un color amarillo en el fondo y un color rojo en la superficie.

**Prueba negativa:** No hay cambio de color.

- **Fermentación de lactosa**

**Prueba Positiva:** Se observa un color amarillo en la superficie y un color rojo en el fondo.

**Prueba negativa:** No hay cambio de color.

- **Producción de gas**

**Prueba positiva:** Se manifiesta mediante burbujas en el medio o una sola burbuja.

**Prueba negativa:** No hay burbuja en el medio.



- **Producción de ácido sulfhídrico**

**Prueba positiva:** La presencia de un precipitado de color negro (Sulfuro ferroso).

**Prueba negativa:** No se observa precipitado negro.

### **Prueba de fermentación de carbohidratos**

Esta prueba es realizada en el medio OF, en la cual se inoculan dos tubos por picadura profunda, al cual a uno de ellos se le agrega un ml de aceite mineral e incubado a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 48 horas, y su interpretación es la siguiente:

**Prueba Positiva:** cambio de color del medio a amarillo

**Prueba negativa:** No hay cambio de color.

### **Prueba de la hidrólisis de gelatina**

El medio gelatina nutritiva es sembrada por picadura y se lleva a incubación a  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por  $48 \pm 2$  horas, y una vez pasado el tiempo de incubación refrigerarlo por 20 minutos, la interpretación de resultados es:

**Prueba Positiva:** licuefacción de la gelatina .

**Prueba negativa:** La gelatina permanece sólida.

### **Aprovechamiento del nitrógeno de la urea**

Esta prueba se realiza en caldo urea, el cual es inoculado por asada simple e incubado a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por  $48 \pm 2$  horas, la prueba se interpreta de la siguiente manera:

**Prueba positiva:** viraje a color Rosado.

**Prueba negativa:** No hay cambio de color.

### **Prueba de la oxidasa**

Se toma un poco de muestra y se coloca en las placas reactivas “Dry slide oxidase”, se espera 20 segundos, la interpretación de la prueba es :

**Prueba positiva:** Color púrpura dentro de los 20 segundos .

**Prueba negativa:** No hay cambio de color.

### **Prueba de la catalasa**

Se realiza en un porta objeto colocando una colonia y añadiendo una gota de peroxido de hidrógeno al 3 %, la interpretación de la prueba es :

**Prueba positiva:** Formación inmediata de burbujas bien visibles.

**Prueba negativa:** No hay formación de burbuja.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se dan los resultados obtenidos en el análisis experimental de las 36 muestras de agua purificadas utilizadas para el llenado a granel que se consumen en Ciudad Obregón, Sonora, las cuales se obtuvieron en el periodo del 16 de mayo al 21 de junio de 2005, siendo los muestreos cada 7 días.

Las aguas que se analizaron fueron de distintos establecimientos y se ubicaron al lado norte, sur, este, oeste y centro de la ciudad, para que la muestra fuera representativa.

Se presentan los resultados de los análisis de cuenta total viable de mesofilos aerobios con vaciado en placa, número más probable de coliformes fecales y totales, aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae*.

Los resultados obtenidos se compararon con la Norma Oficial Mexicana, establecida por la secretaria de salud para agua purificada.

### **3.1. Cuenta total viable de microorganismos mesofilos aerobios**

En la tabla 4 se muestran los resultados de la cuenta total viable de microorganismos mesofilos aerobios en las aguas expeditas a granel en ciudad Obregón, Sonora, como se puede apreciar, de las 36 muestras analizadas un 44.4 % de las mismas rebasaron las 100 UFC/ ml permitidas, según la Norma Oficial Mexicana (NOM-041-SSA1-1993), en donde el sitio IV fue el que mayor incidencia de bacterias mesofilas presento, ya que un 66.6 % de las muestras rebaso los limites permitidos por la norma. La muestra I y V el 50 % de las muestras rebasaron los limites establecidos, en cambio los sitios II, III y VI fueron los que menor incidencia de bacterias mesofilas presentaron ya que el 33.3 % de las muestras rebasaron las 100 UFC/ ml permitidas.

Por lo observado se nota que este tipo de aguas no cumple con el parámetro de microorganismos mesofilos aerobios ya que cada una de las muestras analizadas sobrepasan los limites establecidos por menos en una ocasión, por lo que pueden causar riesgo a la salud.

Los resultados obtenidos, nos lleva a cuestionar la eficacia de los establecimientos en cuanto al agua embotellada a granel que ellos venden.

**Tabla 4. Resultados de la cuenta total viable de microorganismos mesofilos aerobios expresados en 100 UFC/ ml**

Muestra	Fecha	Sitios de muestreo					
		I	II	III	IV	V	VI
1	16 mayo 2005	20	10	10	156*	92	20
2	23 mayo 2005	182*	50	10	50	30	7
3	9 mayo 2005	26	37	700*	25	13	10
4	7 junio 2005	204*	325*	102*	501*	286*	230*
5	14 junio 2005	29	33	24	345*	248*	938*
6	21 junio 2005	124*	190*	13	262*	1230*	93

\* No cumple norma

Numero de muestras = 36

### 3.2. Numero más probable (NMP) de coliformes totales

En la tabla 5, se muestran los resultados de coliformes totales en las muestras de aguas embotelladas a granel que se consumen en ciudad Obregón, Sonora.

El 22.2 % de las aguas analizadas presentaron incidencia de coliformes totales rebasando la norma que es de 0 NMP/100ml.

En el sitio IV fue el que presentó mayor incidencia en cuanto a coliformes totales ya que un 83.3 % de la muestra presenta contaminación de coliformes totales lo cual indicó que rebaso los limites establecidos por la norma, y esto nos indica que no es apta para consumo ya que puede causar daño a la salud.

Esta contaminación se explica debido a que este establecimiento no esta adecuado únicamente para la planta purificadora, si no que también ofrece los servicios de una papelería, un local para fiesta que no se encuentra pavimentado y además que tienen una venta de sodas en el mismo establecimiento y las personas que ahí

laboran pasan constantemente por el área de purificación del agua, por lo que se encuentra con mucha suciedad.

Por otra parte se puede apreciar que en los sitios de muestreo III, V y VI, el 16.6 % de cada una de las muestras sobrepasan la norma de 0 coliformes totales.

En la muestra I y II se puede notar que no hubo presencia de coliformes totales, por lo tanto cumple con la norma.

En los establecimientos que sobrepasaron la norma se pudo notar que el llenado de garrafón no se efectuaba con la sanidad adecuada ya que los trabajadores no se lavaban las manos, no desinfectaban correctamente los garrafones, no limpiaban las válvulas del agua al momento de llenarlos los garrafones y los establecimientos no contaban con limpieza adecuada.

**Tabla 5. Resultados del Numero más probable (NMP) de coliformes totales (NMP/100 ml )**

Muestreo	Fecha	Sitios de muestreo					
		I	II	III	IV	V	VI
1	16 mayo 2005	0	0	2*	0	0	0
2	23 mayo 2005	0	0	0	40*	9*	0
3	9 mayo 2005	0	0	0	2*	0	0
4	7 junio 2005	0	0	0	200*	0	0
5	14 junio 2005	0	0	0	200*	0	0
6	21 junio 2005	0	0	0	15*	0	2*

\* No cumple norma

Numero de muestras = 36

### **3.3. Número más probable (NMP) de coliformes fecales**

En tabla 6 se muestran los resultados de coliformes fecales obtenidos en las muestras de aguas embotelladas a granel que se consumen en ciudad Obregón, Sonora.

En lo que respecta al número más probable de coliformes fecales se muestra que el 11.1 % de las mismas sobrepasaron el parámetro establecido por la norma que es cero NMP/100 ml.

Se puede notar en la tabla 6 que la muestra IV el 66.66% de los muestreos sobrepasaron el parámetro establecido por la norma que nos indica que debe presentar ausencia de coliformes fecales. Esta muestra no es apta para consumo humano ya que puede causar grave daño a las personas que consumen esta agua.

Cabe mencionar que el sitio IV presentaba en su establecimiento bastante suciedad y desorden en toda el área de trabajo, también se encontraban negocios distintos al llenado de garrafón, lo cual da muy mal aspecto al negocio.

El personal que ahí labora al realizar el llenado de garrafón no lo hace con una limpieza adecuada, ya que no se lavan las manos para realizar esta labor.

**Tabla 6. Resultados del Número más probable (NMP) de coliformes fecales (NMP/100 ml )**

Muestreo	Fecha	Sitios de muestreo					
		I	II	III	IV	V	VI
1	16 mayo 2005	0	0	0	0	0	0
2	23 mayo 2005	0	0	0	21*	0	0
3	9 mayo 2005	0	0	0	2*	0	0
4	7 junio 2005	0	0	0	0	0	0
5	14 junio 2005	0	0	0	2*	0	0
6	21 junio 2005	0	0	0	15*	0	0

\*No cumple norma

Numero de muestras = 36

### **3.4. Aislamiento e identificación de *vibrio cholerae***

En la tabla 7 se muestran los resultados del aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* en las aguas expeditas a granel en ciudad Obregón, Sonora.

La norma que establece la secretaria de salud determina que el agua purificada debe de estar libre de este microorganismo, por lo cual debe de haber ausencia total de *Vibrio cholerae* en cada una de las muestras.

Los resultados indican el aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae*, pudiéndose observar que el 100% de las muestras analizadas presentaron ausencia, cumpliendo con el criterio establecido por la norma de ausencia total de *Vibrio cholerae*.



**Tabla 7. Aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae***

Muestreo	Fecha	Sitios de muestreo					
		I	II	III	IV	V	VI
1	16 mayo 2005	-	-	-	-	-	-
2	23 mayo 2005	-	-	-	-	-	-
3	9 mayo 2005	-	-	-	-	-	-
4	7 junio 2005	-	-	-	-	-	-
5	14 junio 2005	-	-	-	-	-	-
6	21 junio 2005	-	-	-	-	-	-

- Ausencia

Numero de muestras = 36

#### IV. CONCLUSIONES

Según los datos obtenidos en el presente estudios, se llegaron a las siguientes conclusiones:

- Para la cuenta total viable de microorganismos mesofilos aerobios se detecto que el 44.4% de las muestras rebasaron los límites de 100 UFC/ml.
- Para el número mas probable de coliformes totales el 22.2% de las muestras sobrepasó la norma establecida la cual indica que no se debe detectar coliformes totales en las muestras.
- Para el número mas probable de coliformes fecales el 11.1% de las muestras analizadas excede los limites establecidos por la norma ya que deben presentar ausencia de coliformes fecales.
- En el caso del *Vibrio cholerae* si cumplió con los criterios de la norma, ya que en todas la muestras se presentó ausencia de este microorganismo.



Por los resultados obtenidos se puede concluir desde el punto de vista microbiológicos que el agua analizada no es de buena calidad ya que se encontraron coliformes de origen fecal, considerando que no es apta para consumo humano, por lo tanto se recomienda llevar acabo un buen lavado de los garrafones, limpiar constantemente los equipos de purificación y además de mantener limpio el establecimiento.

## RECOMENDACIONES

- ☞ Que los establecimientos se encuentren ubicados en lugares pavimentados libres de polvo.
- ☞ Mantener limpia el área de trabajo.
- ☞ Utilizar desinfectantes para el lavado de los garrafones.
- ☞ Procurar que la persona que llene los garrafones tenga limpia su ropa, manos y porten equipo de seguridad de limpieza.
- ☞ No dejar que haya moscas en los establecimientos.

☞ Revisar periódicamente los equipos de purificación del agua.

☞ Tapar válvula de salida del agua cuando no se utilice.

## BIBLIOGRAFÍA

- 🎓 ANPCAPAC (Asociación Nacional de Productores y Distribuidores de Agua Purificada).(2004). **La importancia de la aplicación de análisis microbiológicos al agua purificada** revista Notiagua No 118.
  
- 🎓 ANPCAPAC (Asociación Nacional de Productores y Distribuidores de Agua Purificada).(2005). **Desinfectar, filtrar o purificar el agua**, revista Notiagua No 127.
  
- 🎓 Cantu Soto E. (2000). **Evaluación microbiológica del agua y sedimentos de la presa Álvaro Obregón (Oviachi)**. TESIS ITSON, Cd. Obregón, sonora.

- 🎓 Chavarrias Marta. (2005). **El acceso a agua potable como fuente de seguridad.** Revista sociedad y consumo del diario en la seguridad alimentaria. [http://www.consumaseguridad.com/web/es/sociedad\\_y\\_consumo/2005/03/31/17430\\_print.php](http://www.consumaseguridad.com/web/es/sociedad_y_consumo/2005/03/31/17430_print.php).
- 🎓 Delgadillo Hernández A., Ramírez Méndez O. (2002), **AQUA PURIFICACION SYSTEMS** , aguas purificadas Bonatura. ([http://mx.geocities.com/agua\\_cosmos/aguas-embotelladas-mexico.htm](http://mx.geocities.com/agua_cosmos/aguas-embotelladas-mexico.htm)).
- 🎓 Delmonte D. (2000). **Estudio preliminar de la calidad de las aguas y los vertidos industriales en la ciudad de Libertad (San José)** Revista N° 28, Volumen 1.
- 🎓 Díaz Delgado C. y Antón D. (2002). **Se nos acaba el agua. ¿ahora qué?**. Universidad de los Andes. <http://tecnologiasysociedad.uniandes.edu.co/html/agua/a8.html>.
- 🎓 Fernández E. Eduardo. (1981). **Microbiología sanitaria: agua y sus alimentos** Vol 1. Universidad de Guadalajara.
- 🎓 Huerta Mendoza L.(2003). **Métodos para purificar agua** revista del consumidor (Procuraduría Federal del Consumidor). Numero 325, México.

- 🎓 Jay, James ( 1992). **Microbiología Moderna de los Alimentos.** Editorial ACRIBIA, 4ta. Ed., España.
- 🎓 López Padilla D. (2005). **Evaluación de la calidad sanitaria del arroz cantones de distintos restaurantes de cd. Obregón, Sonora.** Tesis. ITSON., Cd. Obregón, Sonora, México.
- 🎓 Mac Faddin Jean. (1984). **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.** Editorial panamericana. México, D.F.
- 🎓 Mateos F. Pedro. (2000). **ECOLOGIA MICROBIANA** Departamento de Microbiología y Genética. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. edición-  
micro.usal.es/web/educativo/micro2/tema31.
- 🎓 OMS(Organización Mundial de la Salud).(2004), **Agua, saneamiento y salud,** volumen 1.
- 🎓 PROFECO(Procuraduría Federal del Consumidor).(2000). **Calidad de filtros purificadores de agua,** Revista del Consumidor No. 281
- 🎓 Zapúche Moreno I. (1997) Análisis fisicoquímico y bacteriológico de las diferentes marcas de agua purificada vendida en Cd. Obregón, Sonora, México. Tesis. ITSON. Cd. Obregón, Sonora.



