

Cuando el agua es de llave o de pozo profundo extraída con bomba, la colecta se realiza después de flárear la salida y dejarla correr durante cinco minutos.

Cuando es de lagos, ríos, etc., deberá evitarse tomarla de las orillas y de las zonas superficiales o excesivamente profundas. El mejor método es destapar el frasco aproximadamente a 20 cm de profundidad y ahí llenarlo a contracorriente.

El traslado de la muestra al laboratorio deberá hacerse a la mayor brevedad y los frascos deberán sumergirse en hielo (0-10°C). En las muestras que son analizadas 48 hs después de su colecta, los resultados no se considerarán como significativos.

El análisis bacteriológico del agua comprende:

Cuentas de mesofílicos aerobios, coliformes totales y fecales y enterococos.

Cuenta de mesofílicos aerobios. (Método de difusión en placa)

Evitando todo tipo de contaminación durante la operación, se transfieren 10 ml de la muestra a un frasco conteniendo 90 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2, se agita y a partir de ésta se preparan diluciones decimales hasta 10^{-3} utilizando la misma solución diluyente.

A partir de la muestra y de cada dilución se transfiere un ml a placas Petri estériles, se agregan 15 ml de agar para cuenta estándar fundido y conservado a 45°C, se homogeneiza y se deja solidificar para posteriormente incubar las placas a 35°C/48 hs.

Utilizando un contador de colonias, se cuentan las que se hayan desarrollado en las placas, incluyendo las puntiformes. Si dos de las placas presentan entre 30-300 colonias, se determina la media aritmética de los dos valores y se multiplica por el factor de dilución a menos que uno de ellos fuera superior al doble del otro, en ese caso se considera el valor más bajo. Cuando las placas presentan cuentas menores a 30 colonias, se procede igual que en el caso anterior, sólo que en lugar de considerar el valor más bajo, se toma la menor dilución. Si las placas presentan cuentas mayores a 300 colonias, se toma el número de colonias por centímetro cuadrado y se estima el número total de colonias en la placa considerando que las placas Petri tradicionales tienen 65 cm².

Cuenta de organismos coliformes (Método del número más probable "NMP")

a) Prueba presuntiva:

A partir de la muestra se transfieren alícuotas de 10 ml a cada uno de los cinco tubos con 20 ml de caldo lactosado de concentración 150 por ciento; un ml y 0.1 ml respectivamente a dos series de cinco tubos con 10 ml de caldo lactosado de concentración normal.

Los tubos se incuban a 35°C/24-48 hs, la formación de gas en cualquier cantidad en alguno de los tubos en el tiempo de incubación hace considerar a la prueba como positiva.

b) Prueba confirmativa:

A partir de cada uno de los tubos positivos resembrar por 2-3 asadas a un tubo con caldo verde brillante bilis dos por ciento. Incubar a 35°C/24-48 hs. La formación de gas dentro de las 48 horas de incubación hace considerar la prueba como positiva.

Consultar en las tablas el NMP de organismos coliformes mediante la combinación de tubos positivos de las tres series en la prueba confirmatoria. Si se desea identificar a los microorganismos presen-

tes, se siembra a partir de los tubos positivos o negativos por estría cruzada para aislamiento de colonias en medios tales como agar-eosina azul de metileno y agar Mac Conkey se incuban a 35°C/24 hs. y se obtienen cultivos puros de los diferentes tipos de colonias desarrolladas. Posteriormente se identifican por su morfología tinción al Gram y pruebas bioquímicas.

Cuenta de coliformes fecales:

A partir de cada uno de los tubos positivos en la prueba presuntiva para organismos coliformes, resembrar por dos a tres asadas en tubos con caldo EC y caldo triptona los cuales, previamente fueron atemperados a 44.5°C ± 0.2°C. Incubar a esta misma temperatura los tubos inoculados, durante 24-48 hs.

Con los tubos de caldo EC positivos (gas en la campana de fermentación) y que a su vez son indol positivo en el caldo triptona, se determina el NMP en las tablas, en la misma forma que se hizo para coliformes totales.

Cuenta de enterococos

a) Prueba presuntiva:

A partir de la muestra transferir alícuotas de 10 ml a cada uno de cinco tubos con 20 ml de caldo azida dextrosa de concentración 150 por ciento; 1.0 y 0.1 ml respectivamente a dos series de tubos con 10 ml del mismo medio a concentración normal. Incubar a 35°C/24-48 hs. Cualquier turbidez en los tubos hace considerar a la prueba como positiva.

b) Prueba confirmatoria:

A partir de los tubos con turbidez en la prueba presuntiva, transferir 2-3 asadas a tubos conteniendo 10 ml de caldo violeta de etilo. Incubar a 35°C/24-48 hs. La presencia de enterococos se manifiesta en aquellos tubos que presentan un sedimento púrpura. La estimación del NMP se logra en la misma forma que para organismos coliformes.

REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

ALCALINIDAD

Solución indicadora de fenoftaleína

| | |
|---------------------------|--------|
| Fenoftaleína (sal sódica) | 0.5 g |
| Agua destilada | 100 ml |

Solución indicadora de naranja de metilo

| | |
|-------------------|--------|
| Naranja de metilo | 0.05 g |
| Agua destilada | 100 ml |

DUREZA Solución amortiguadora pH 10.0

| | |
|-------------------------------------------------------------|---------|
| a) Versenato de sodio "EDTA" (seco) | 1.179 g |
| Sulfato de magnesio (MgSO ₄ · 7H ₂ O) | 0.780 g |
| Agua destilada | 50 ml |
| b) Cloruro de amonio (NH ₄ Cl) | 16.9 g |
| Hidróxido de amonio (NH ₄ OH) | 143 ml |
| Disolver. | |

Mezclar las soluciones, vertiendo (a) en (b), agitar, diluir a 250 ml, con agua destilada y conservar en un frasco herméticamente cerrado.

Solución indicadora negro ericromo T

Negro Ericromo T 0.5 g
Cloruro de sodio (Na CL) 100 g

Mezclar los dos sólidos en un mortero hasta que se integren completamente. Conservar en frasco herméticamente cerrado.

Solución de EDTA

EDTA (seco) 3.723 g
Agua destilada 1000 ml

Disolver el EDTA en 150 ml, de agua destilada, verter la solución a un matraz aforado de 1000 ml; enjuagar el recipiente con tres porciones de 100 ml. de agua destilada y verterlas al matraz aforado. Diluir a 1000 ml; con agua destilada y mezclar. La solución puede ser estable durante seis meses.

OXIGENO DISUELTO "O D"

Solución de sulfato de manganeso

Mn SO₄ 4H₂O 480 g
Agua destilada 1000 ml

Solución de alcali-yoduro-nitruro

a) Na OH 500 g
Agua destilada 600 ml
b) KI 150 g
Agua destilada 150 ml

Agregar la solución (b) a la solución (a), con agitación constante y diluir a 1000 ml, con agua destilada.

c) Nitruro de sodio (Na N₃) 10 g
Agua destilada 40 ml

Agregar la solución (c) a la mezcla de (a y b), se agita y se conserva en un frasco con tapón de plástico.

Solución indicadora de almidón

Almidón 1 g
Agua destilada 10 ml

Agitar hasta formar una suspensión lechosa. Verter esta suspensión en 200 ml, de agua destilada en ebullición. Agitar la solución y dejar hervir durante tres minutos.

Se enfría la solución y se deja reposar por 12 horas. El líquido sobrenadante se vierte a un frasco, reactivo y se le agregan cuatro gotas de tolueno para preservarlo.

Solución de tiosulfato de sodio

Na₂ S₂ O₃ · 5H₂O 9.307 g
Agua destilada hervida 1000 ml

La sal se disuelve en 300 ml, de agua destilada hervida y se vierte a un matraz de aforación de 1000 ml. El recipiente en que se disolvió la sal se lava tres veces con porciones de 100 ml de agua destilada hervida, las cuales se vierten al matraz aforado. Se agrega 0.4 g de NaOH en lentejas, se mezcla hasta que éstas se disuelvan. Se diluye a 1000 ml con agua destilada hervida.

DEMANDA BIOQUIMICA DE OXIGENO "D B O"

Solución amortiguadora de fosfatos

KH₂ PO₄ 8.5 g
K₂H PO₄ 21.75 g
Na₂ HPO₄ · 7H₂O 33.4 g
NH₄Cl 1.7 g
Agua destilada 1000 ml

Disolver las sales en 500 ml de agua destilada y diluir a un litro. El pH de la solución sin ajuste alguno debe ser de 7.2.

Solución de sulfato de magnesio

MgSO₄ · 7H₂O 22.5 g
Agua destilada 1000 ml

Solución de cloruro de calcio

Ca Cl₂ anhidro 27.5 g
Agua destilada 1000 ml

Solución de cloruro férrico

Fe Cl₃ · 6H₂O 0.25 g
Agua destilada 1000 ml

Solución de Na Oh 1N

Na OH 40 g
Agua destilada 1000 ml

Solución de H₂ SO₄ 1N

H₂ SO₄ conc. 27.7 ml
Agua destilada 1000 ml

Solución de sulfito de sodio 0.25 N

Na₂ SO₃ anhidro 1.575 g
Agua destilada 1000 ml

Debe prepararse el día que se va a usar. Es muy inestable.

DEMANDA QUIMICA DE OXIGENO

Solución de dicromato de potasio 0.25 N

| | |
|-----------------------------------------------|----------|
| K ₂ Cr ₂ O ₇ | 12.259 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

El dicromato de potasio se seca por dos horas a 103°C.

Solución de sulfato ferroso amoniacal 0.25 N

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O | 98 g |
| H ₂ SO ₄ concentrado | 20 ml |
| Agua destilada | 1000 ml |

La sal se disuelve en 500 ml, de agua destilada, se agrega el H₂SO₄ y se diluye a 1000 ml. La solución debe titularse el día que se va a usar.

Titulación: Se diluyen 25 ml. de la solución valorada de dicromato de potasio a 250 ml. Se agregan 20 ml. de H₂SO₄ concentrado y se deja enfriar. Se titula con la solución de sulfato férrico amoniacal, usando dos a tres gotas del indicador ferroín.

Normalidad: $\frac{\text{ml de K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \times 0.25}{\text{ml de Fe (NH}_4)_2 \text{ (SO}_4)_2}$

Indicador de Ferroin

| | |
|----------------------------------------|---------|
| 3,10-Fenantrolina. H ₂ O | 1.485 g |
| Fe SO ₄ . 7H ₂ O | 0.695 g |
| Agua destilada | 100 ml |

MEDIOS DE CULTIVO

Agar para cuenta estándar

| | |
|----------------------|---------|
| Peptona de caseína | 5.0 g |
| Extracto de levadura | 2.5 g |
| Dextrosa | 1.0 g |
| Agar | 15.0 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Disolver los ingredientes en el agua destilada y esterilizar en autoclave a 15 lb durante 15 minutos, pH final 7.0 ± 0.1.

Caldo lactosado

| | |
|-------------------|---------|
| Peptona | 5.0 g |
| Extracto de carne | 3.0 g |
| Lactosa | 5.0 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Disolver los ingredientes en agua destilada, distribuir en tubos con campana de fermentación, Esterilizar en autoclave a 15 lb durante 15 minutos, pH final 6.9 ± 0.1.

Caldo Verde Brillante Bilis 2 por ciento

| | |
|----------------------------|----------|
| Bilis de buey deshidratada | 20.0 g |
| Lactosa | 10.0 g |
| Peptona | 10.0 g |
| Verde brillante | 0.0133 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Disolver los ingredientes en el agua destilada, distribuir en tubos con campana de fermentación. Esterilizar en autoclave a 15 lb durante 15 minutos, pH final 7.2 ± 0.2.

Caldo triptona

| | |
|----------------|---------|
| Triptona | 10 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Disolver en agua destilada, distribuir en tubos. Esterilizar en autoclave a 15 lb durante 15 minutos. pH final 6.9 ± 0.1.

Caldo azida dextrosa

| | |
|-----------------------------------|---------|
| Peptona | 15.0 g |
| Extracto de carne | 4.5 g |
| Dextrosa | 7.5 g |
| Cloruro de sodio | 7.5 g |
| Azida de sodio (nitruro de sodio) | 0.2 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Disolver los ingredientes en el agua destilada, distribuir en tubos, esterilizar en autoclave a 15 lb durante 15 minutos. NO RECALENTAR. pH final 7.2 ± 0.2.

Caldo violeta de etilo

| | |
|--------------------|-----------|
| Triptona | 20.0 g |
| Dextrosa | 5.0 g |
| Cloruro de sodio | 5.0 g |
| Fosfato de potasio | 2.7 g |
| Nitruro de sodio | 0.4 g |
| Violeta de etilo | 0.00083 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

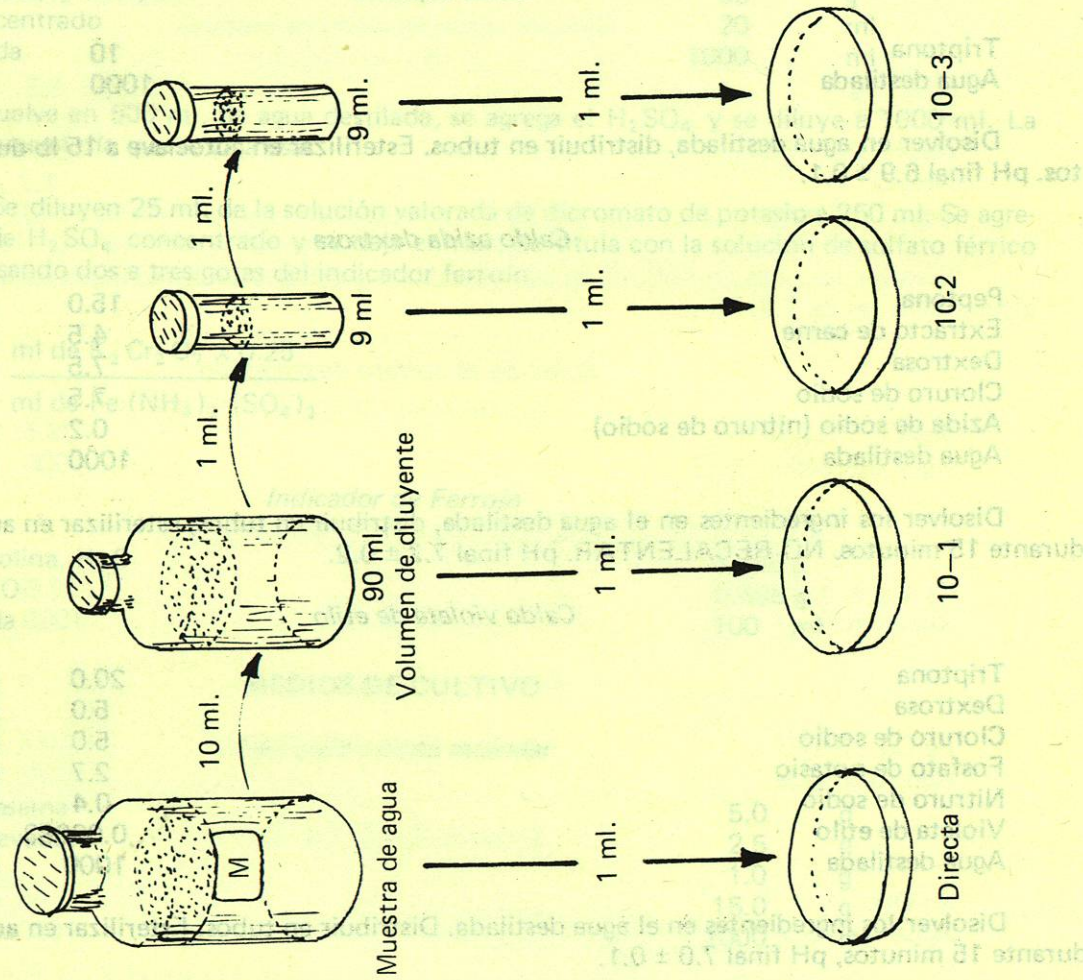
Disolver los ingredientes en el agua destilada. Distribuir en tubos. Esterilizar en autoclave a 15 lb durante 15 minutos, pH final 7.0 ± 0.1.

Caldo EC

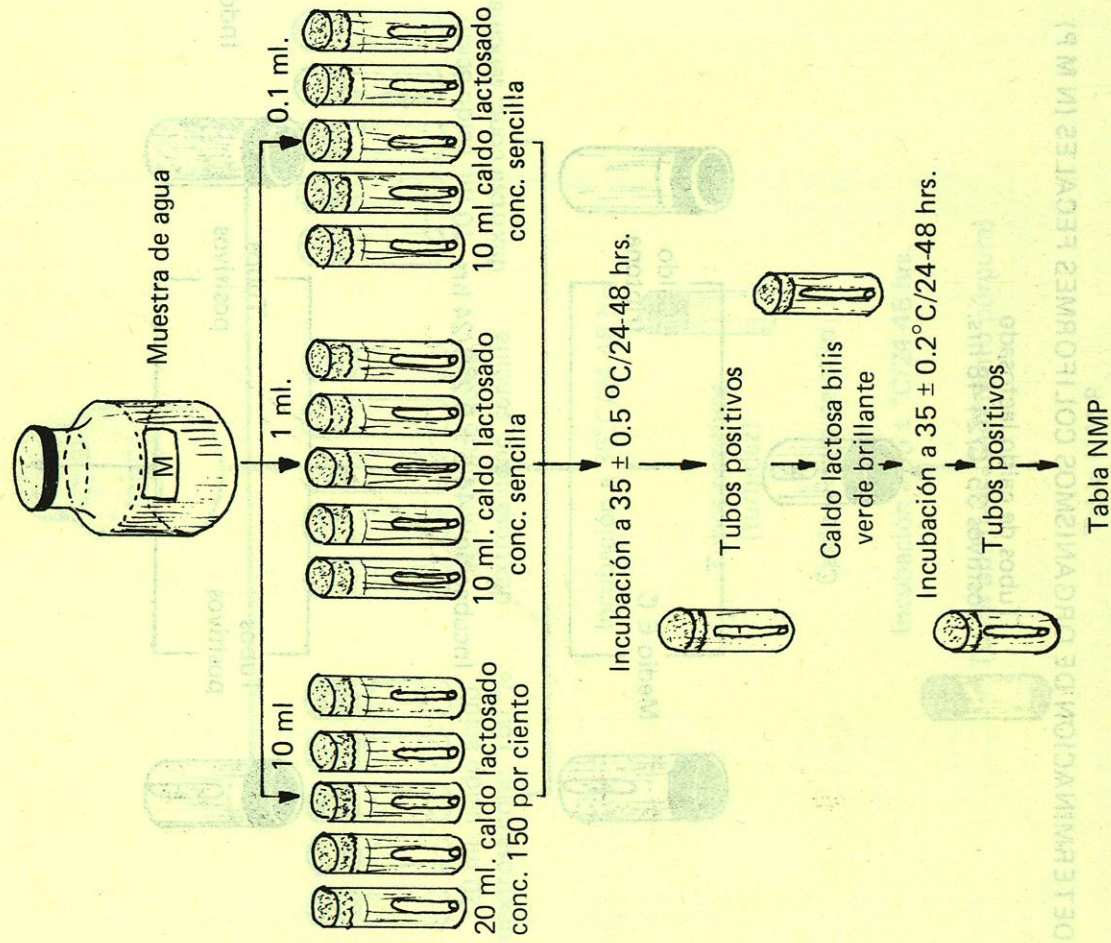
| | |
|----------------------|---------|
| Triptona | 20.0 g |
| Lactosa | 5.0 g |
| Sales biliares | 1.5 g |
| Fosfato de potasio | 2.75 g |
| Fosfato monopotásico | 1.5 g |
| Cloruro de sodio | 5.0 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Disolver los ingredientes en el agua destilada. Distribuir en tubos con campana de fermentación. Esterilizar en autoclave a 15 lb durante 15 minutos, pH final 6-9.

PREPARACION DE DILUCIONES E INOCULACION DE PLACAS PARA CUENTA DE BACTERIAS MESOFILICAS AEROBIAS



DETERMINACION DE COLIFORMES (N M P) SERIE 5(10), 5(1) Y 5(0.1)



DETERMINACION DE ORGANISMOS COLIFORMES FECALES (N M P)

Tubos de caldo lactosado positivos 35°C/24-48 hrs.

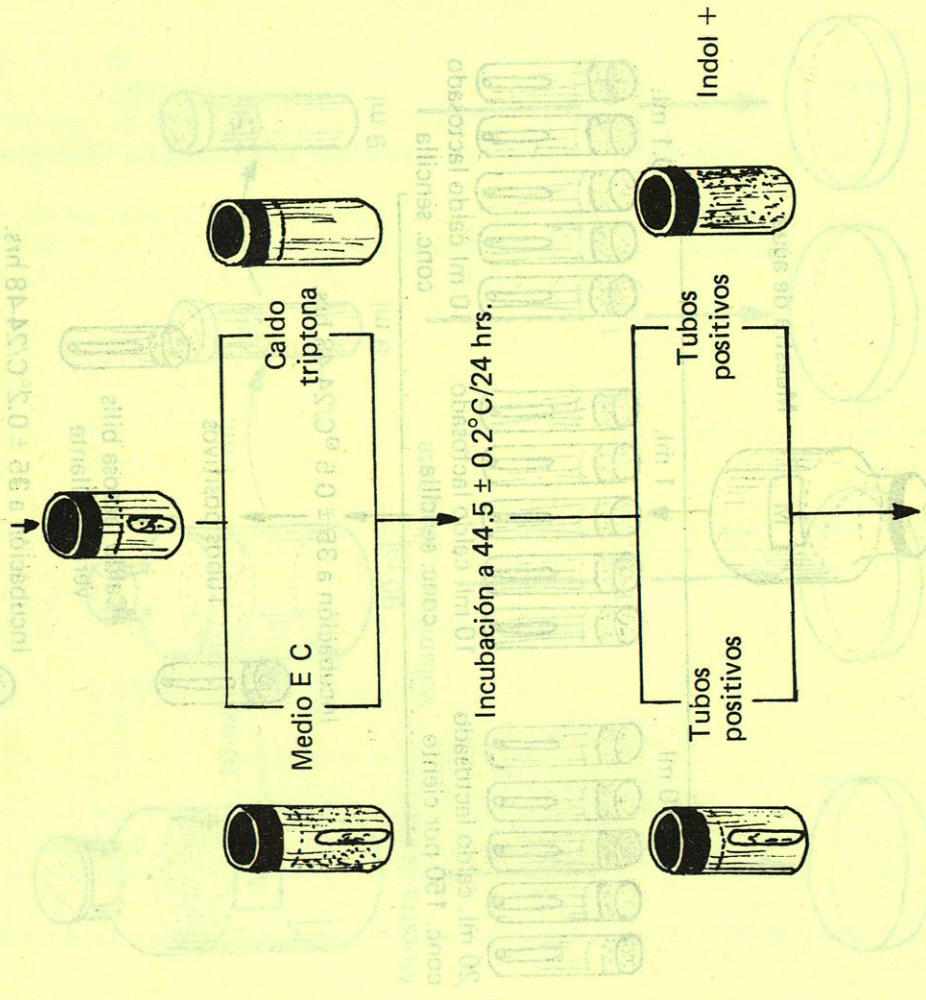


Tabla N M P

DETERMINACION DE ESTREPTOCOCOS FECALES (ENTEROCOCOS) (N M P)

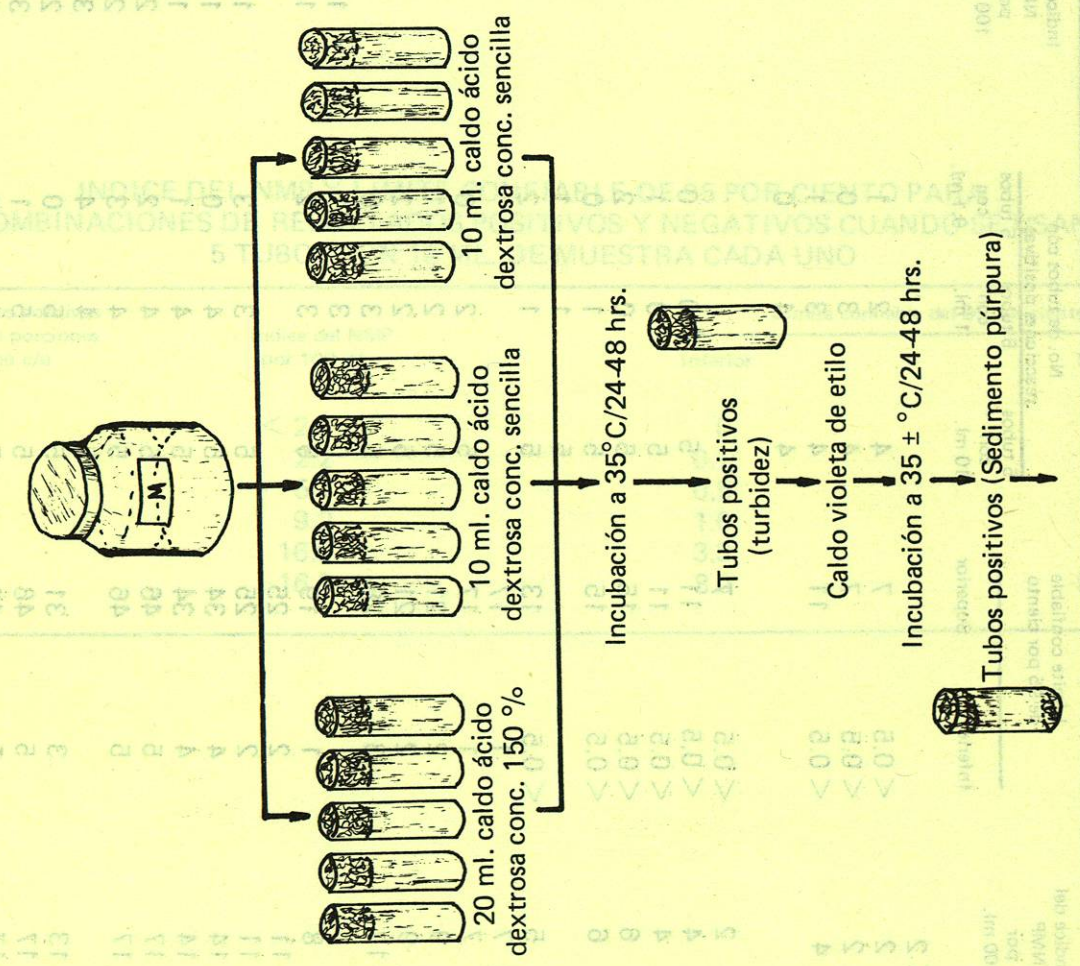


Tabla N M P

INDICE DEL NMP Y LIMITE CONFIABLE DE 95 POR CIENTO PARA COMBINACIONES DE RESULTADOS POSITIVOS Y NEGATIVOS CUANDO SE USAN 5 TUBOS CON 10 ML. DE MUESTRA, 5 CON 1 ML. Y 5 CON 0.1 ML.

| No. de tubos con reacciones positivas con 10 ml. | No. de tubos con reacciones positivas con 1 ml. | No. de tubos con reacciones positivas con 0.1 ml. | Índice del NMP por 100 ml. | | Límite confiable de 95 por ciento | | Índice del NMP por 100 ml. | Límite confiable de 95 por ciento | |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------|----------|-----------------------------------|----------|----------------------------|-----------------------------------|----------|
| | | | Inferior | Superior | Inferior | Superior | | Inferior | Superior |
| 0 | 0 | 0 | < 2 | < 2 | < 0.5 | 7 | 26 | 9 | 78 |
| 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | < 0.5 | 7 | 27 | 9 | 80 |
| 0 | 1 | 0 | 2 | 2 | < 0.5 | 11 | 33 | 11 | 93 |
| 0 | 2 | 0 | 4 | 4 | < 0.5 | 15 | 34 | 12 | 93 |
| 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | < 0.5 | 15 | 23 | 7 | 70 |
| 1 | 0 | 1 | 4 | 4 | < 0.5 | 17 | 31 | 11 | 89 |
| 1 | 1 | 0 | 4 | 4 | < 0.5 | 17 | 43 | 15 | 110 |
| 1 | 1 | 1 | 6 | 6 | < 0.5 | 21 | 33 | 11 | 93 |
| 1 | 2 | 0 | 6 | 6 | < 0.5 | 21 | 46 | 16 | 120 |
| 2 | 0 | 0 | 5 | 5 | < 0.5 | 28 | 63 | 21 | 150 |
| 2 | 0 | 1 | 7 | 7 | 1 | 13 | 49 | 17 | 130 |
| 2 | 1 | 0 | 7 | 7 | 1 | 17 | 70 | 23 | 170 |
| 2 | 1 | 1 | 9 | 9 | 2 | 21 | 94 | 28 | 220 |
| 2 | 2 | 0 | 9 | 9 | 2 | 21 | 79 | 25 | 190 |
| 2 | 3 | 0 | 12 | 12 | 3 | 28 | 110 | 31 | 250 |
| 3 | 0 | 0 | 8 | 8 | 1 | 19 | 140 | 37 | 340 |
| 3 | 0 | 1 | 11 | 11 | 2 | 25 | 180 | 44 | 500 |
| 3 | 1 | 0 | 11 | 11 | 2 | 25 | 130 | 35 | 300 |
| 3 | 1 | 1 | 14 | 14 | 4 | 34 | 170 | 43 | 490 |
| 3 | 2 | 0 | 14 | 14 | 4 | 34 | 220 | 57 | 700 |
| 3 | 2 | 1 | 17 | 17 | 5 | 46 | 280 | 90 | 850 |
| 3 | 3 | 0 | 17 | 17 | 5 | 46 | 350 | 120 | 1,000 |
| 4 | 0 | 0 | 13 | 13 | 3 | 31 | 240 | 68 | 750 |
| 4 | 0 | 1 | 17 | 17 | 5 | 46 | 350 | 120 | 1,000 |
| 4 | 1 | 0 | 17 | 17 | 5 | 46 | 540 | 180 | 1,400 |
| 4 | 1 | 1 | 21 | 21 | 7 | 63 | 920 | 300 | 3,200 |
| 4 | 1 | 2 | 26 | 26 | 9 | 78 | 1,600 | 640 | 5,800 |
| 4 | 2 | 0 | 22 | 22 | 7 | 67 | 2,400 | 840 | 7,200 |

INDICE DEL NMP Y LIMITE CONFIABLE DE 95 POR CIENTO PARA COMBINACIONES DE RESULTADOS POSITIVOS Y NEGATIVOS CUANDO SE USAN 5 TUBOS CON 10 ML. DE MUESTRA CADA UNO

| No. de tubos positivos 5 tubos con porciones de 10 ml. en c/u | Índice del NMP por 100 ml. | Límite confiable del 95 por ciento | |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|----------|
| | | Inferior | Superior |
| 0 | < 2.2 | 0 | 6.0 |
| 1 | 2.2 | 0.1 | 12.6 |
| 2 | 5.1 | 0.5 | 19.2 |
| 3 | 9.2 | 1.6 | 29.4 |
| 4 | 16.0 | 3.3 | 52.9 |
| 5 | > 16.0 | 8.0 | Infinito |

REFERENCIAS

American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, 1975. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 14th Edition, Washington, D.C.

American Public Health Association, American Water Works Association, Inc., Ltd. Post, G. 1983. Textbook of Fish Health. TPH Publications, Inc., Ltd.

Organización Panamericana de la Salud, 1978. Procedimientos para el examen de aguas. Manual de la Organización de la American Water Works Association, Inc. 2a. Ed. Oficina Sanitaria Panamericana, Organización Mundial de la Salud.