

## II COLIFORME FECAL. DETERMINACION DEL NUMERO MAS PROBABLE DE COLIFORME FECAL POR LA TECNICA DE LOS TUBOS MULTIPLES

### 1. INTRODUCCION

En la determinación del grupo coliforme se realiza una diferenciación entre los coliformes de origen fecal y no fecal. El grupo de bacterias coliforme es normalmente encontrado en las heces de animales homeotermos (mamíferos, aves). Cuando deseamos conocer la calidad de agua contaminada por descargas domésticas se emplea el grupo coliforme fecal como indicador debido a que estas bacterias generalmente no se multiplican fuera del intestino.<sup>5</sup>

### 2. DEFINICION DEL GRUPO COLIFORME FECAL

Las bacterias coliformes fecales forman parte del total del grupo coliforme. Estas son definidas como bacilos gram-negativos, no esporulados que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a  $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  dentro de las  $24 \pm 2$  horas. La mayor especie en el grupo de coliforme fecal es Escherichia coli.

### 3. METODO DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP)

#### 3.1 Resumen del método

La determinación del número más probable (NMP) de bacterias coliformes fecales se realiza a partir de los cultivos de todos los tubos positivos de caldo lauril triptosa los cuales son inoculados en tubos conteniendo medio E.C., incubados a  $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  en baño maría con agitación y temperatura constante, durante 24 horas. La formación de gas en los tubitos de Durham invertidos se considera reacción positiva de coliforme fecal. La densidad del grupo coliforme fecal es calculada por la tabla del NMP teniendo como base los tubos positivos del medio E.C.<sup>6</sup>

#### 3.2 Aplicación

El método del NMP para coliforme fecal es usado para evaluar la calidad de aguas sin tratamiento usadas con fines recreacionales, aguas de abastecimiento

doméstico, en acuicultura y aguas utilizadas en irrigación.

Las ventajas de determinar coliforme fecal por temperatura elevada son:<sup>3</sup>

- a. La mayoría de las bacterias, cerca del 95%, del intestino de animales homeotermos crecen en temperatura elevada.
- b. La supervivencia de las bacterias del grupo coliforme fecal es menor en ambientes acuáticos que las del grupo coliforme.
- c. Las coliformes fecales no se multiplican generalmente fuera del intestino de los animales homeotermos.

### 3.3 Equipos, material y medios de cultivo

#### 3.3.1 Equipos y material

Los equipos y materiales son en la gran mayoría los mismos que para coliforme total (ver páginas del 4 al 7 de Coliforme Total). Adicionalmente a los equipos citados tenemos:

#### Incubadora de baño de agua (Baño María)

Este equipo debe mantener la temperatura a  $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  equipado con un agitador para proveer la circulación necesaria y mantener la temperatura uniforme.

#### 3.3.2 Medios de cultivo y reactivos

#### Caldo Lauril Triptosa

Para la prueba presuntiva: La preparación es la misma que para coliforme total (páginas 7 y 8).

#### Medio E.C.

##### Fórmula

Triptosa

20.0 g

Lactosa	5.0 g
Sales biliares	1.5 g
Fosfato dipotásico	4.0 g
Fosfato monopotásico	1.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agua destilada	1 l
pH final luego de esterilización $6.9 \pm 0.1$	

#### Preparación

Disolver 37.0 g de medio EC en un litro de agua destilada. Distribuir en cantidades de 10 ml en tubos de ensayo, provistos con un tubo de Durham invertido. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

#### Agua de dilución

Preparación del mismo modo que para coliforme total (páginas 9 y 10).

#### 3.4 Procedimiento

Iniciar con la prueba presuntiva de coliforme total, tal como se explica en el método anterior (página 12).

Muestras alícuotas de diluciones decimales se inoculan al tubo de caldo lauril triptosa, posteriormente incubados a  $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$  y examinados a las 24 y 48 horas para observar la producción de gas.

#### Diferenciación para coliforme fecal

Se realiza utilizando el medio E.C. (Ver Figura No. 3)

- Marcar cada tubo de E.C. con los números correspondientes a cada tubo de caldo lauril triptosa, que presentó formación de gas en la prueba presuntiva de coliforme total.

- Calentar los tubos de E.C. en Baño María durante 30 minutos a la temperatura de  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ .

- Agitar e inclinar el tubo de caldo lauril triptosa para evitar tocar la película superficial.

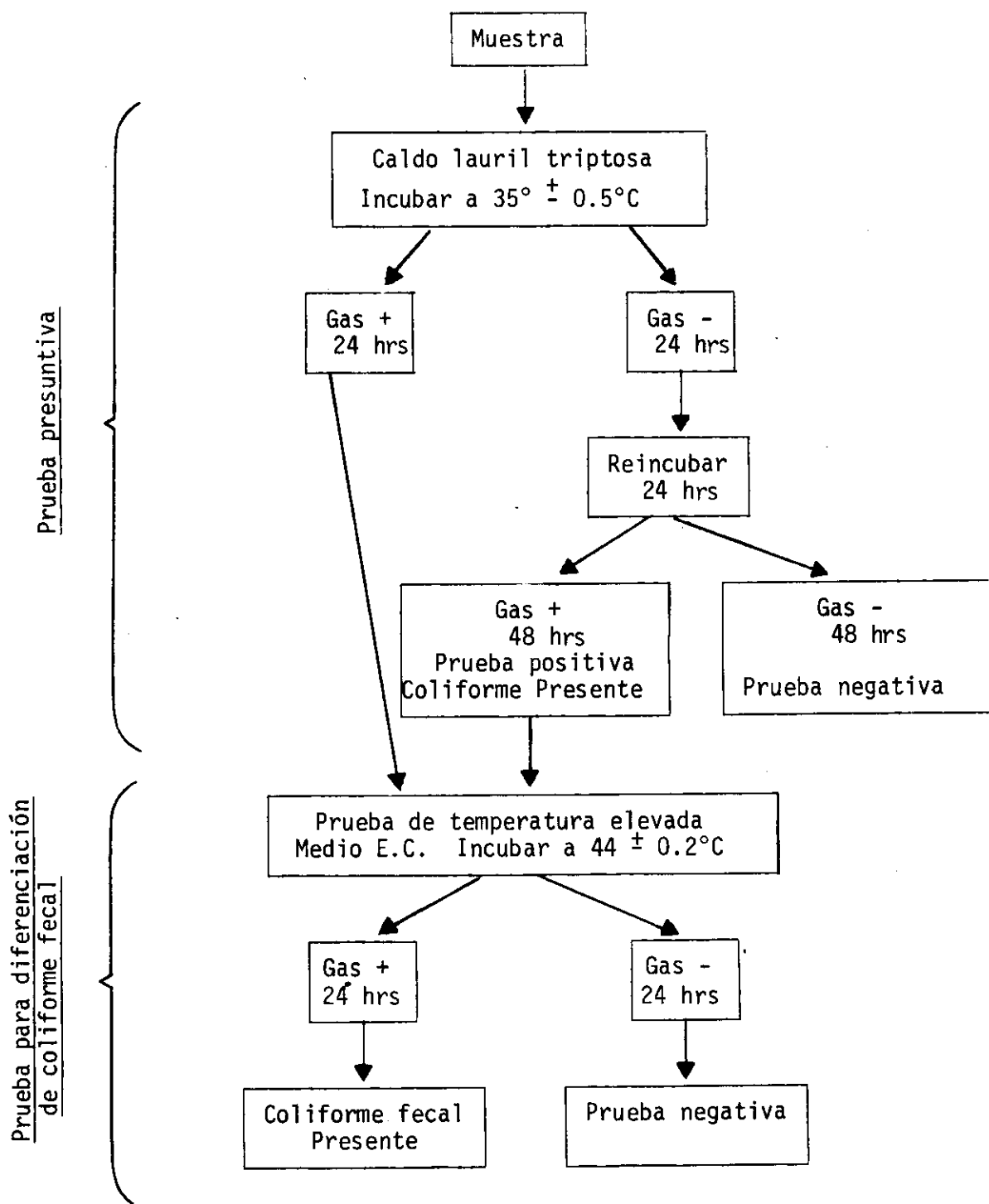


Figura No. 3

DIAGRAMA PARA COLIFORME FECAL (NMP)

- Con el inoculador de níquel-cromo de 5 mm de diámetro, transferir una azada de los cultivos positivos de caldo lauril triptosa a los tubos con medio E.C.

- El tiempo transcurrido entre la inoculación y la incubación no debe exceder de 30 minutos.

- El tiempo de incubación es de  $24 \pm 2$  horas en Baño María a  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . Luego del período de incubación, los tubos son retirados del baño de agua y agitando suavemente se observa la producción de gas.

- Se procede a la lectura considerando positiva toda formación de gas en los tubos de Durham del medio E.C.

- Con los datos obtenidos se calcula el NMP.

### 3.5 Resultado

El cálculo de la densidad probable de bacterias coliformes fecales en una muestra está basada en la combinación de los resultados positivos y negativos de los tubos de fermentación E.C., obtenidos en cada dilución, empleando la tabla del NMP. La densidad de coliforme fecal se expresa como NMP de coliforme fecal por 100 ml. Para la expresión de los resultados, ver páginas 19 al 22 de coliforme total.

### 3.6 Registro de datos

#### Tabla 6

Es una hoja de registro de datos para la prueba de coliforme fecal. En ella se registra el número de muestras, fecha y hora de muestreo, fecha y hora de análisis, temperatura del ambiente, del agua y rangos de dilución empleados.

#### Tabla 7

Es una hoja de registro mensual para coliforme total y fecal. En esta tabla se va registrando los resultados semanales de coliforme total y fecal de los puntos considerados en el estudio los cuales son: desagüe crudo, laguna primaria y laguna secundaria. Así mismo se va registrando el porcentaje de reducción.

Cuadro N° 6

REGISTRO DE DATOS PARA COLIFORME FECAL (NMP)

DETERMINACION DE COLIFORME FECAL METODO TUBOS MULTIPLES

HOJA NO. \_\_\_\_\_ DE \_\_\_\_\_

PROYECTO \_\_\_\_\_

ANALISTA \_\_\_\_\_

Prueba Presuntiva: Caldo Lauril Sulfato Triptosa

Diferenciación Coliforme Fecal: Medio E.C.

Muestra No.	Fecha y hora Muestra	Fecha y hora Análisis	Punto de Mues.	TEMPERATURA		Medio E.C. 24 ± 2 horas a 44.5 ± 0.2°C										NMP Coli-fecal /100 ml			
				Aire °C	Agua °C	Diluciones en ml													
						10 ml	1 ml	10 <sup>-1</sup> ml	10 <sup>-2</sup> ml	10 <sup>-3</sup> ml	10 <sup>-4</sup> ml	10 <sup>-5</sup> ml	10 <sup>-6</sup> ml	10 <sup>-7</sup> ml	10 <sup>-8</sup> ml		10 <sup>-9</sup> ml		

Cuadro N° 7

REGISTRO DE DATOS MENSUALES PARA COLIFORME TOTAL Y FECAL

Registro de: Coliformes total y fecal

Método: Tubos múltiples

Hoja No. \_\_\_\_ de \_\_\_\_

Proyecto: \_\_\_\_\_

Analista: \_\_\_\_\_

Mes: \_\_\_\_\_

Año: \_\_\_\_\_

Fecha y hora de muestreo	Fecha y hora de análisis	DESAGUE CRUDO			LAGUNA PRIMARIA NO. ____				LAGUNA SECUNDARIA NO. ____					
		No. muestra	Coli-total NMP/100 ml	Coli-fecal NMP/100 ml	No. muestra	Coli-total		Coli-fecal		No. de muestras	Coli-total		Coli-fecal	
						Efluente NMP/100 ml	% reduc.	Efluente NMP/100 ml	% reduc.		Efluente NMP/100 ml	% reduc.	Efluente NMP/100 ml	% reduc.

- 31 -

Número de tubos usados por dilución	
-------------------------------------	--

Promedio mensual NMP	Desagüe crudo	Laguna primaria	Laguna secundaria
Coliforme total			
Coliforme fecal			

4. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION et al. Methods for the examination of water and wastewater. 15 ed. New York, APHA, 1981
2. CEPIS. Guía para la evaluación de laboratorios bacteriológicos de análisis de aguas. Serie de Documentos Técnicos, N° 3. Edición revisada. Lima, CEPIS, 1978
3. CETESB. Análisis microbiológicos de aguas. Normalização tecnica saneamento ambiental, NT-08. Sao Paulo, 1978
4. CANADA CENTRE FOR INLAND WATERS. Methods for microbiology analysis of water, wastewater and sediments. Burlington, Ontario, 1976
5. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, Cincinnati, Estados Unidos. Microbiological methods for monitoring the environment: Water and wastewater. Cincinnati, EPA, 1978
6. GELDREICH, Edwin E. Handbook for evaluating water bacteriological laboratories. Cincinnati, Municipal Environmental Research Laboratory, 1975. EPA-670/9-75-606
7. MARA, P.D. Bacteriology for sanitary engineers. London, Churchill Livingstone, 1974