

OPS/CEPIS/PUB/04.103
Original: español

Manual para análisis básicos de calidad del agua de bebida

Margarita Aurazo de Zumaeta


**Organización
Panamericana
de la Salud**

Oficina Regional de la
Organización Mundial de la Salud
ÁREA DE DESARROLLO SOSTENIBLE Y
SAÚDE AMBIENTAL



**Centro Panamericano de
Ingeniería Sanitaria y
Ciencias del Ambiente
CEPIS**

OPS/CEPIS/PUB/02.93

Original: español

MANUAL PARA ANÁLISIS BÁSICOS DE CALIDAD DEL AGUA DE BEBIDA

Bióloga Margarita Aurazo de Zumaeta



**Organización
Panamericana
de la Salud**

*Oficina Regional de la
Organización Mundial de la Salud*
**ÁREA DE DESARROLLO SOSTENIBLE Y
SALUD AMBIENTAL**



**Centro Panamericano de
Ingeniería Sanitaria y
Ciencias del Ambiente
CEPIS/OPS**

Lima, 2004

DE LA AUTORA

Margarita Aurazo de Zumaeta

Bióloga graduada en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y con estudios de maestría en ecología. Con experiencia profesional en proyectos de investigación relacionados con el ambiente, con énfasis en aspectos biológicos del tratamiento de aguas por medio de lagunas de estabilización, reúso de aguas en agricultura y acuicultura, diseño de programas de control de calidad de aguas residuales, evaluación sanitaria de agua potable, superficial y residual y estudios de impacto ambiental.

Entre las instituciones en las que ha laborado están la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente y la Dirección General de Salud Ambiental. Ha participado en proyectos ambientales apoyando a entidades nacionales e internacionales. Actualmente se desempeña como consultora independiente.

© Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente, 2004

El Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS/OPS) se reserva todos los derechos. El contenido de este documento puede ser reseñado, reproducido o traducido, total o parcialmente, sin autorización previa, a condición de que se especifique la fuente y de que no se use para fines comerciales.

El CEPIS/OPS es una agencia especializada de la Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS).

Los Pinos 259, Urb. Camacho, Lima, Perú
Casilla de correo 4337, Lima 100, Perú
Teléfono: (511) 437 1077
Fax: (511) 437 8289
cepis@cepis.ops-oms.org
<http://www.cepis.ops-oms.org>

Ilustraciones

Marisol Zumaeta Aurazo
Iván Moratillo Andrade

Presentación

Es de público conocimiento que las enfermedades de transmisión hídrica (diarreas, parasitosis, disenterías) mantienen desde hace demasiado tiempo en América Latina y el Caribe tasas de morbimortalidad inaceptables en las sociedades modernas.

Existen tecnologías de tratamiento de agua que podrían reducir a valores ínfimos tales enfermedades y, de hecho, en los países desarrollados esto es lo que ocurre.

En la Reunión Cumbre de Gobiernos, realizada en Santa Cruz de la Sierra en 1996, a partir de la declaración denominada Iniciativa 47, los jefes de Estado de los países de la Región de América Latina y el Caribe solicitaron a la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) el apoyo para que los países del área pudieran hacer frente al problema de las enfermedades hídricas.

Así, a partir de 1998, la OPS/OMS genera una serie de acciones, entre las cuales destacan un Plan Regional de Mejoramiento de la Calidad del Agua y, a partir de la actividad del Área de Calidad del Agua del Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS/OPS), la producción de una serie de herramientas de gestión —guías, manuales, metodologías, etc.—, que pretenden aportar las nuevas visiones y métodos para dar batalla al problema de las aguas no seguras para la salud.

Entre esas herramientas figuran las directrices para elaborar normas de calidad del agua y guías para desarrollar programas de vigilancia y control de la calidad del agua para consumo humano. En ese marco, la presente obra, *Manual para análisis básicos de calidad del agua de bebida*, aporta la cuota necesaria en una de las áreas fundamentales relacionadas con todo programa de vigilancia y control.

El documento se concentra en la realización de análisis en los niveles básicos dentro de los programas de monitoreo, que son los niveles que cualquier país debería aprobar para iniciar sus proyectos y acciones.

El presente documento servirá sin duda a los países y a las instituciones relacionadas con el agua de bebida para mejorar su control y propender a una mejor calidad del agua y a una mejor salud de la población.

Se destaca y agradece el importante aporte en la redacción de esta obra de la Bióloga Margarita Aurazo de Zumaeta, experta laboratorista y funcionaria del CEPIS/OPS durante una larga y exitosa carrera, así como las sugerencias y aportes de los siguientes funcionarios del Centro: Quím. María Luisa Esparza, Quím. Vilma Mori, Bióloga Carmen Vargas e Ing. Ricardo Rojas.

Ing. Felipe Solsona
Asesor Regional en Calidad del Agua
CEPIS/OPS

CONTENIDO

Presentación	iii
--------------------	-----

PRIMERA PARTE

PROGRAMAS DE VIGILANCIA DE LA CALIDAD DEL AGUA DE NIVEL BÁSICO

Introducción	3
--------------------	---

CAPÍTULO 1 EL NIVEL BÁSICO

1. La problemática de la calidad del agua en el medio rural	5
2. Los programas de vigilancia y control de la calidad del agua	6
3. Alcance del nivel básico dentro de los niveles programáticos	7
3.1 Evaluación físicoquímica y microbiológica	8
3.2 Inspección sanitaria	9
4. Realidades, requerimientos y estrategias	9

CAPÍTULO 2 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE NIVEL BÁSICO

1. El concepto de análisis básico	13
2. El personal y el grado de capacitación requeridos	14
3. Dónde realizar las determinaciones	15

4.	Equipos y material mínimo de laboratorio	15
4.1	Equipos y materiales mínimos para un laboratorio básico	15
5.	Medios de cultivo y reactivos químicos	17
6.	Control de calidad analítica	18
6.1	Plan de aseguramiento de la calidad	18

CAPÍTULO 3

ADMINISTRACIÓN DE UN LABORATORIO DE NIVEL BÁSICO

1.	Organización, orden y medidas de higiene	21
1.1	Buenas prácticas de laboratorio	22
2.	Adquisición, disponibilidad y reposición del material, reactivos y equipos	23
3.	Costos por análisis	24
4.	Sostenibilidad económica de un laboratorio de nivel básico	24
5.	Producción y manejo de la información analítica	24

CAPÍTULO 4

TOMA DE MUESTRAS

1.	Técnicas de muestreo	27
1.1	Recolección de muestras de una corriente de agua, aguas con escaso o nulo movimiento o almacenada en depósitos	29
1.2	Recolección de muestras de pozos excavados y fuentes similares	29
1.3	Muestreo de un grifo o de la salida de una bomba	31
2.	Preservación de las muestras	33
3.	Transporte de las muestras: embalaje y envío	34

SEGUNDA PARTE

PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS DE LOS PARÁMETROS DE NIVEL BÁSICO

Introducción	37
--------------------	----

CAPÍTULO 5

PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

1.	Determinación de indicadores de calidad sanitaria del agua: coliformes totales y termotolerantes	39
----	--	----

1.1	Introducción	39
2.	Análisis bacteriológicos de los parámetros de la calidad sanitaria del agua de bebida: coliformes totales y termotolerantes	40
2.1	Método de filtro de membrana. Método tradicional	41
2.1.1	Introducción	41
2.1.2	Equipos y material	42
2.1.3	Soluciones y medios de cultivo	43
2.1.4	Procedimiento analítico	44
2.1.5	Lectura y verificación	50
2.1.6	Presentación de resultados	51
2.2	Método del Número Más Probable por tubos múltiples. Método tradicional	52
2.2.1	Introducción	52
2.2.2	Equipos y material	53
2.2.3	Soluciones y medios de cultivo	54
2.2.4	Preparación de material	54
2.2.5	Procedimiento analítico	55
2.2.6	Pruebas confirmativas	57
2.2.7	Siembra de 10, 1 y 0,1 mL de muestra	59
2.2.8	Cálculo del Número Más Probable	61
2.2.9	Casos que pueden presentarse	64
2.2.10	Presentación de resultados	64
2.3	Método de presencia-ausencia	65
2.3.1	Introducción	65
2.3.2	Equipos y material	65
2.3.3	Soluciones y medios de cultivo	66
2.3.4	Procedimiento analítico	66
2.3.5	Lectura	70
2.3.6	Presentación de resultados	70
2.4	Método de presencia-ausencia con sustrato enzimático	70
2.4.1	Introducción	70
2.4.2	Equipos y material	71
2.4.3	Soluciones y medios de cultivo	72
2.4.4	Procedimiento analítico	72
2.4.5	Lectura	74
2.4.6	Presentación de resultados	75
2.5	Método rápido. Técnica de filtro de membrana con agar m-7 horas FC	75
2.5.1	Introducción	75
2.5.2	Equipos y material	75
2.5.3	Soluciones y medios de cultivo	77
2.5.4	Procedimiento analítico	77

	2.5.5 Lectura	82
	2.5.6 Presentación de resultados	82
3.	Determinación de los parámetros fisicoquímicos básicos	83
3.1	Determinación de cloro residual. Método de titulación con DPD	84
3.1.1	Introducción	84
3.1.2	Equipos, materiales e insumos	84
3.1.3	Reactivos y soluciones	85
3.1.4	Procedimiento analítico	86
3.1.5	Presentación de resultados	87
3.2	Determinación de cloro libre residual y combinado. Método colorimétrico con ortotolidina-arsenito (OTA) por comparación visual	88
3.2.1	Introducción	88
3.2.2	Equipos, materiales e insumos	89
3.2.3	Reactivos y soluciones	89
3.2.4	Procedimiento analítico	91
3.2.5	Presentación de resultados	92
3.3	Determinación de pH. Método electrométrico	93
3.3.1	Introducción	93
3.3.2	Equipos, materiales e insumos	93
3.3.3	Reactivos y soluciones	94
3.3.4	Procedimiento analítico	94
3.3.5	Presentación de resultados	95
3.4	Determinación de la turbiedad. Método nefelométrico	96
3.4.1	Introducción	96
3.4.2	Equipos, materiales e insumos	96
3.4.3	Reactivos y soluciones	97
3.4.4	Procedimiento analítico	98
3.4.5	Presentación de resultados	99

CAPÍTULO 6

MEDICIONES DE CAMPO

1.	Determinación de indicadores de calidad sanitaria del agua: coliformes totales y termotolerantes	101
1.1	Introducción	101
1.2	Mediciones de campo	101
1.2.1	Técnica de filtro de membrana	102
1.2.2	Técnica de Número Más Probable por tubos múltiples	105
1.2.3	Técnica de presencia-ausencia	106

1.3	Procedimiento analítico con equipos de campo para la determinación de coliformes termotolerantes por la técnica de filtro de membrana. Medición de campo	108
1.4	Procedimiento analítico con equipos de campo para la determinación de coliformes termotolerantes por la técnica de NMP por tubos múltiples. Medición de campo	113
1.5	Procedimiento analítico con equipos de campo para la determinación de coliformes termotolerantes por la técnica de presencia-ausencia. Medición de campo	113
2.	Determinación de parámetros fisicoquímicos básicos. Cloro residual, pH y turbiedad	113
2.1	Introducción	113
2.2	Mediciones de campo	114
2.2.1	Determinación del cloro libre residual	114
2.2.2	Determinación del pH.....	119
2.2.3	Determinación de la turbiedad	120

BIBLIOGRAFÍA.....	123
--------------------------	------------

APÉNDICES

Apéndice A. Preparación de soluciones y medios de cultivo	127
A.1 Agua de dilución	127
A.2 Caldo lauril triptosa o lauril sulfato de sodio	128
A.3 Caldo verde brillante lactosa bilis 2%	129
A.4 Caldo EC	129
A.5 Agar Endo LES.....	130
A.6 Medio m-Endo	130
A.7 Medio m-FC (agar)	131
A.8 Agar m-7 horas FC	132
A.9 Medio presencia-ausencia	132
Apéndice B. Formularios de toma de muestras	135
B.1 Cadena de custodia	137
B.2 Formulario para la toma de muestras de agua y evaluación de la calidad del servicio para un programa de vigilancia de la calidad del agua de nivel básico	138

PRIMERA PARTE

PROGRAMAS DE VIGILANCIA DE LA CALIDAD DEL AGUA DE NIVEL BÁSICO

INTRODUCCIÓN

En la primera parte de este manual se abordan aspectos generales de la vigilancia de la calidad del agua a fin de introducir al lector en el tema y presentar la relación entre este y la transmisión de enfermedades hídricas. Asimismo, se brinda información sobre el alcance de la vigilancia de nivel básico y se detalla en qué casos es recomendable su aplicación.

En esta parte del libro se abordan los siguientes aspectos:

- La problemática de la calidad de agua en el medio rural, donde las enfermedades de transmisión hídrica son frecuentes.
- Dificultades que se presentan en la implantación de un programa de vigilancia de la calidad del agua en el medio rural.
- Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos considerados en un programa de vigilancia de nivel básico.
- Capacidad analítica de los laboratorios requeridos para este tipo de programas.
- Metodologías de muestreo, preservación, transporte, embalaje y envío, referidas a los parámetros propuestos para el nivel básico de vigilancia.

CAPÍTULO 1

EL NIVEL BÁSICO

1. LA PROBLEMÁTICA DE LA CALIDAD DEL AGUA EN EL MEDIO RURAL

Se estima que en América Latina y el Caribe 43% de la población rural no tiene acceso al abastecimiento de agua con una calidad apropiada para el consumo humano y para usos domésticos como la higiene personal (Mora, 1996).

Por otro lado, se ha demostrado que las enfermedades hidrottransmisibles como la gastroenteritis, la fiebre tifoidea, la hepatitis A y el cólera, entre otras, están entre las principales causas de muerte en los países de América Latina. Hay una relación directa entre la mortalidad infantil y la cobertura y calidad del agua de consumo humano debido a que los niños son especialmente propensos a enfermarse con diarrea.

Se considera que la diarrea es la primera causa de muerte entre los niños de entre 1 y 4 años de edad, con dos millones de defunciones al año en todo el mundo (Piza, 1996). Los niños menores de 5 años aún no tienen completo el sistema inmunológico y en los países en vías de desarrollo, la mayor parte de ellos están afectados por la desnutrición. En general, la diarrea es transitoria en las personas bien alimentadas y persistente en las mal nutridas. La infección repetitiva puede aumentar la desnutrición, que, a su vez, incrementa la vulnerabilidad ante nuevas infecciones.

Las comunidades rurales se encuentran en permanente riesgo de contraer enfermedades hídricas porque comúnmente viven sin acceso a agua segura y a servicios de saneamiento. Las poblaciones que se abastecen directamente de aguas de origen superficial (ríos, lagunas, lagos) se encuentran aun en mayor riesgo debido a que la fuente de agua está expuesta a la contaminación fecal. Las razones para ello incluyen la carencia de una apropiada disposición de excretas y factores como la defecación a

campo abierto, las letrinas mal diseñadas y la presencia de animales domésticos y silvestres que actúan como reservorios de agentes patógenos.

Una pequeña parte de la población rural cuenta con servicios de abastecimiento y, en muchos casos, el servicio de agua es discontinuo. Por este motivo, los pobladores la suelen almacenar en recipientes. La constante manipulación de estos recipientes incrementa las posibilidades de que el agua se vuelva a contaminar y, por consiguiente, que aumente el riesgo de transmisión de enfermedades gastrointestinales.

El tratamiento y la desinfección efectiva del agua de consumo humano mejoran la calidad del agua. Pero en las áreas rurales se presenta una serie de factores que dificultan su ejecución. Estos factores están relacionados con aspectos políticos, económicos, sociales y culturales. Entre ellos están la ubicación geográfica; las dificultades en las vías de comunicación; una limitada inversión en infraestructura sanitaria y programas de desinfección, en personal de operación y mantenimiento de los sistemas de servicios de agua; los problemas de logística; un marco institucional no definido y la falta de líderes en las comunidades.

En las zonas rurales los factores mencionados también dificultan la aplicación eficiente de los programas de vigilancia y control de la calidad del agua de consumo humano. Se requiere, entonces, identificar la forma de efectuar un monitoreo básico de la calidad del agua, lo que permitirá tomar decisiones en forma oportuna y evitar la transmisión de enfermedades hídricas.

2. LOS PROGRAMAS DE VIGILANCIA Y CONTROL DE LA CALIDAD DEL AGUA

Los programas de vigilancia y control de la calidad del agua para consumo humano tienen como objetivo proteger la salud del consumidor aportando datos sobre dicha calidad y alertas sobre la necesidad de aplicar medidas de control para evitar que el agua sea portadora de agentes patógenos, sustancias químicas tóxicas u otros elementos nocivos.

La implementación de un programa de vigilancia y control de la calidad del agua aporta un sinnúmero de beneficios. Aparte del principal, que es la disminución de la tasa de enfermedades hidrotansmisibles, permite obtener información sobre la real situación del abastecimiento de agua, priorizar las inversiones y mejorar la calidad del servicio de abastecimiento de agua.

Generalmente, la vigilancia de la calidad del agua es efectuada por las autoridades de salud, que son responsables de evaluar el riesgo al que está expuesta la población en este terreno.

El control de la calidad del agua es responsabilidad de la entidad abastecedora, encargada de verificar si el agua que se está suministrando cumple con los valores límite que señalan las normas de cada país y ejecutar las acciones correctivas que sean necesarias, así como el mantenimiento y las supervisiones.

Aparte de los organismos responsables de la vigilancia y control de la calidad del agua, es importante el rol que desempeñan las entidades reguladoras, instituciones que cumplen la función de fiscalizar a las empresas y cuentan con las herramientas necesarias para sancionar a los abastecedores (Solsona, 2002).

Establecer un programa de vigilancia y control de la calidad del agua en las zonas rurales es una tarea muy compleja, debido a que un elevado porcentaje de comunidades asentadas en ellas se abastece directamente de la fuente y las localidades que cuentan con una pequeña planta de tratamiento no tienen un abastecedor responsable. Además, las autoridades ejercen escasa o nula supervisión de los servicios de abastecimiento.

Es necesario que en las zonas rurales el control de la calidad del agua tenga un alcance mayor que en las zonas urbanas e involucre varios aspectos que en las ciudades son asumidos por las autoridades responsables (Rojas, 2002). Por ejemplo, los siguientes:

- calidad del agua para consumo humano;
- nivel de servicio de abastecimiento de agua a la comunidad;
- deficiencias de los componentes del sistema de abastecimiento que influyen en el deterioro de la calidad del agua;
- estado de la gestión del sistema de abastecimiento de agua;
- grado de sostenibilidad del servicio de abastecimiento;
- características de la conducta sanitaria de los usuarios;
- programas de educación sanitaria;
- seguimiento epidemiológico de la incidencia de enfermedades transmisibles por vía hídrica;
- impacto económico.

3. ALCANCE DEL NIVEL BÁSICO DENTRO DE LOS NIVELES PROGRAMÁTICOS

Los programas de vigilancia y control de la calidad de agua en las zonas rurales tienen como elementos básicos la evaluación de la calidad fisicoquímica y microbiológica y la inspección sanitaria (Rojas, 2002).

3.1 Evaluación fisicoquímica y microbiológica

Mediante la evaluación fisicoquímica y microbiológica del agua se obtienen datos sobre la calidad del agua. En las zonas rurales, si bien los análisis debieran ser exhaustivos y completos, si los recursos no lo permitieran, se recomienda aplicar una evaluación de nivel básico, que deberá considerar como mínimo los niveles de turbiedad, pH, cloro residual (total, combinado, libre), coliformes totales y coliformes termotolerantes. Los valores máximos permisibles de los parámetros de calificación de la calidad del agua estarán establecidos en las normas de cada país (Solsona, 2002).

En las áreas rurales, la evaluación fisicoquímica y microbiológica se efectuará en muestras colectadas en la zona o punto de abastecimiento. En el caso de que la comunidad cuente con una planta de tratamiento, se considerará un muestreo a la salida de la planta, la red de distribución y las conexiones domiciliarias.

Si en determinada comunidad la desinfección se realiza in situ, es conveniente efectuar un muestreo dentro de los hogares, con el objetivo de evaluar el impacto de la desinfección, el almacenamiento o la manipulación intradomiciliaria del agua.

La frecuencia del muestreo está relacionada con el tamaño de la población y la categoría de la zona (urbana, urbano-marginal o rural). Para zonas rurales, se sugiere lo siguiente (Rojas, 2002):

Cuadro 1.1
Frecuencia de muestreo en sistemas rurales

Parámetros	Población abastecida	Número de muestras	Frecuencia de muestreo
En planta de tratamiento y fuentes de agua subterránea: análisis fisicoquímicos*		Una muestra por fuente	Agua de origen superficial: cada 2 años Agua de origen subterráneo: cada 5 años
En reservorios de servicio*: pH turbiedad coliformes termotolerantes		Una muestra por componente	Tres por año
En red de distribución*: pH turbiedad coliformes termotolerantes	< de 1.000 1.001 a 2.000 2.001 a 5.000	3 4 6	Anual Anual Anual

* Si hay cloración, se deben efectuar tantas determinaciones de cloro residual como sean posibles. En los sistemas de abastecimiento se medirá el cloro en la salida de la planta de tratamiento y en el grifo del consumidor más alejado de la planta (Solsona y Méndez, 2002).

De acuerdo con las características geográficas y la realidad de las localidades rurales (Rojas, 2002), los puntos de muestreo serán los siguientes:

- salidas de manantiales;
- salidas de pozos de agua.

Y en el caso de que la comunidad cuente con una planta de tratamiento:

- salidas de las plantas de tratamiento;
- salidas de componentes;
- líneas de impulsión y aducción;
- red de distribución;
- en casos excepcionales, se hará un muestreo de nivel intradomiciliario.

3.2 Inspección sanitaria

En la inspección sanitaria se identifican los riesgos de contaminación que se podrían presentar en la fuente de agua y si la comunidad cuenta con una planta de tratamiento, servirá para detectar las deficiencias que puedan presentarse.

La inspección sanitaria permite identificar condiciones que aumentan el riesgo de contaminación del agua y que muchas veces no se observan con los análisis. Esta inspección se efectúa mediante la observación y detección de los posibles factores contaminantes.

En las zonas rurales se observará si se presenta algún factor que podría alterar la calidad del agua; por ejemplo, en el caso de un pozo, si hay acumulación de basura en los alrededores, si el pozo está desprotegido, etcétera. Si la comunidad se abastece de agua de origen superficial, en la fuente se observará presencia de basura, crecimiento excesivo de algas, cambios de color del agua, etcétera. Si la comunidad cuenta con una planta de tratamiento, se tomará en cuenta el nivel de higiene en las instalaciones y los alrededores. Se sugiere efectuar dos inspecciones sanitarias al año tanto en la planta como en sus componentes (Rojas, 2002).

4. REALIDADES, REQUERIMIENTOS Y ESTRATEGIAS

Un programa de vigilancia de la calidad del agua será viable y efectivo si se concibe dentro de un marco que considere los factores que determinarán su viabilidad. Entre estos factores están la disponibilidad de recursos humanos, materiales y económicos. También es importante la capacidad ejecutiva de la institución responsable de la vigilancia.

Asimismo, un programa de vigilancia de la calidad del agua requiere un marco legal que permita la oportuna intervención política, una legislación clara que identifique y defina las entidades de vigilancia y control y que contemple la preservación de la calidad de las fuentes de agua, así como una normatividad respaldada por reglamentos, normas y códigos.

Para lograr la implementación de la vigilancia de la calidad del agua en zonas rurales, se requiere lo siguiente:

- Conocer el número y características de las comunidades rurales mediante una encuesta y un inventario a escala nacional. Esto permitirá identificar las fuentes de agua que están en uso y sus limitaciones, así como las áreas prioritarias —generalmente ubicadas en zonas endémicas—, que no tienen agua de calidad apropiada para el consumo humano.
- Contar con un marco legal, conocer las normas y reglamentos de la calidad del agua para consumo humano e identificar los criterios de calidad del agua que se emplearán en el programa.
- Identificar las fuentes de financiamiento del programa.
- Establecer la metodología de trabajo, que considerará los procedimientos para la vigilancia de los servicios rurales. Se contará con manuales de procedimiento a fin de unificar los criterios y normalizar los procedimientos de ejecución del programa.
- Identificar las entidades que participarán y definir sus responsabilidades.
- Ubicar un centro regional de operaciones, un laboratorio central y laboratorios periféricos debidamente equipados. Se requiere un laboratorio básico para atender una red de vigilancia de la calidad del agua; es decir, con el equipamiento necesario para analizar los parámetros fundamentales.
- Identificar la red dentro de la cual se sostendrá el sistema.
- Establecer un sistema de información que, en forma oportuna y eficiente, permita atender los requerimientos de las autoridades involucradas y al público usuario.
- Contar con personal capacitado en cada una de las responsabilidades asignadas.
- Desarrollar encuestas domiciliarias sobre las condiciones de almacenamiento del agua en los hogares.
- Vigilancia epidemiológica con el objetivo de identificar las áreas de alto riesgo de transmisión de enfermedades hídricas.

Frente a las dificultades que se presentan en un programa de vigilancia de la calidad del agua en las zonas rurales, no es aconsejable ni práctico iniciar la vigilancia con un nivel avanzado. Las entidades reguladoras o autoridades de salud responsables de la

vigilancia y control podrían considerar un nivel básico, si se tiene en cuenta la capacidad instalada de los laboratorios. El programa de vigilancia diseñado para las zonas rurales debe ser práctico y aplicable a cada realidad.

Entre las estrategias que favorecen la implementación de un programa de vigilancia de la calidad del agua para consumo humano está la reducción del costo al mínimo, principalmente en los rubros de laboratorio, personal y transporte, que normalmente son los que ocasionan la mayor parte de gastos. Para reducir estos costos, se pueden aprovechar las redes existentes, ya sean de la comunidad o de las entidades de salud.

Otra estrategia interesante es demostrar a la población y a las autoridades los beneficios de un programa de vigilancia y control mediante la medición del impacto epidemiológico. Al enlazar la vigilancia epidemiológica y los programas de monitoreo del agua, se puede medir el impacto del progreso y su posible aceptabilidad socio-económica.

Asimismo, la educación sanitaria de la población involucrada en el programa asegura su apoyo, interés y participación voluntaria. En las comunidades rurales, la participación de la comunidad en las acciones de vigilancia de la calidad del agua es decisiva, pues los propios pobladores podrían ayudar a identificar los problemas. La educación sanitaria favorecerá el aprendizaje de las buenas prácticas de higiene personal y doméstica, el manejo del agua dentro de la vivienda y la comprensión y asimilación del concepto de agua segura. En las zonas rurales, la forma de recolección, almacenamiento y manipulación del agua en los hogares tiene especial importancia para la conservación de la calidad del agua.

Se ha demostrado que cuando se logra emplear con éxito la herramienta de la educación sanitaria en las comunidades rurales, es posible que la población participe activamente en los programas de vigilancia de la calidad del agua en las siguientes acciones (Rojas, 2002):

- colaborar con la obtención de la información;
- ayudar al personal de vigilancia en la recolección de muestras de agua;
- controlar la cantidad y calidad del agua de consumo humano;
- informar periódicamente los resultados al organismo de vigilancia sanitaria;
- velar por el uso adecuado del suministro de agua;
- fijar prioridades en la implementación de las medidas correctivas;
- asumir el mantenimiento del sistema de abastecimiento de agua y las reparaciones sencillas;
- solicitar personal calificado para afrontar los problemas que requieren particular atención.

CAPÍTULO 2

DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE NIVEL BÁSICO

1. EL CONCEPTO DE ANÁLISIS BÁSICO

En un programa de vigilancia, la selección de los parámetros estará en función de lo que estipulen las normas de cada país y del nivel de riesgo para la salud. *Por ello tienen particular importancia los parámetros bacteriológicos y los relacionados con la desinfección del agua.* En los programas de vigilancia de la calidad del agua de nivel básico se consideran los siguientes parámetros: coliformes totales y termotolerantes, cloro residual, pH y turbiedad.

Con respecto a los coliformes totales y termotolerantes, las Guías para la Calidad del Agua Potable de la Organización Mundial de la Salud indican que en un programa de vigilancia y control no es práctico monitorear cada uno de los agentes patógenos debido a que para su detección se requieren procedimientos complejos y un tiempo largo para la obtención de resultados (OPS, 1988). Es suficiente la identificación de un grupo determinado de microorganismos con significado higiénico y sanitario. La enumeración de estos microorganismos es importante porque nos dará una idea del nivel de contaminación y las cifras resultantes se podrán comparar con los valores propuestos en las normas de calidad del agua. A estos grupos de microorganismos se los considera como indicadores bacterianos de contaminación. En el caso del agua para consumo humano, comúnmente se utiliza a los coliformes como indicadores de contaminación por heces de seres humanos y animales de sangre caliente.

Con respecto a las determinaciones fisicoquímicas básicas, se sabe que en las áreas rurales el problema principal para la calidad del agua de bebida es la contaminación de tipo biológico y, en especial, la contaminación bacteriana. Sin embargo, también es

necesario efectuar un monitoreo de tres aspectos fisicoquímicos de importancia práctica: el cloro residual, la turbiedad y el pH.

En el caso de que el agua haya sido desinfectada con cloro, la medición del cloro residual indica la presencia de un remanente del desinfectante capaz de asegurar la inhibición o muerte de las bacterias patógenas.

Además de cloro residual, en un programa de vigilancia y control de la calidad del agua de nivel básico también es práctico medir la turbiedad y el pH. Ambos parámetros constituyen una guía muy útil para evaluar aspectos generales de la calidad del agua.

El pH y la temperatura del agua influyen en la desinfección. La turbiedad está relacionada con la cantidad de partículas. Se ha demostrado que al menor incremento de la turbiedad en el agua tratada, aumenta el riesgo de transportar partículas de un tamaño semejante al de los quistes de protozoarios parásitos como la *Giardia* y el *Cryptosporidium*. Por otro lado, las partículas pueden enmascarar a los virus y bacterias y, por consiguiente, dificultar su inhibición por acción del desinfectante. Asimismo, el incremento de la turbiedad en el agua tratada aumenta la posibilidad de transmisión de enfermedades hídricas (Le Chevallier, 1992).

2. EL PERSONAL Y EL GRADO DE CAPACITACIÓN REQUERIDOS

El éxito de un programa de vigilancia se sustenta en la calidad de la información que recibe. Dicha calidad solo estará garantizada si el personal está capacitado para el desempeño de sus funciones. De este modo, en toda la red de vigilancia se deben emplear en forma correcta los mismos procedimientos y esto facilitará la recolección de datos, el tratamiento estadístico de ellos y la interpretación de los resultados.

El personal responsable de ejecutar los análisis básicos requiere capacitación en los siguientes aspectos:

- Procedimientos de muestreo, preservación, embalaje y transporte de la muestra.
- Procedimientos para cada una de las actividades de laboratorio. Las principales son las siguientes:
 - ❖ preparación del material para el muestreo;
 - ❖ limpieza del material;
 - ❖ esterilización del material;

- ❖ preparación de medios de cultivo y reactivos;
 - ❖ almacenamiento del material y de los reactivos;
 - ❖ eliminación de residuos de laboratorio, tanto central como periféricos;
 - ❖ procedimientos analíticos;
 - ❖ uso de equipos de campo.
- Buenas prácticas de laboratorio.
 - Aseguramiento de la calidad analítica para garantizar los datos reportados.

3. DÓNDE REALIZAR LAS DETERMINACIONES

Para atender los requerimientos analíticos de un programa de vigilancia de la calidad del agua de bebida en las zonas rurales, se requiere contar con una red de laboratorios conformada por un *laboratorio central* y un *número suficiente de laboratorios periféricos*. Los resultados de los análisis serán oportunamente reportados y procesados por la red de información del programa.

Si la muestra de agua de bebida, para un análisis bacteriológico, se colecta en zonas alejadas de un laboratorio periférico y el tiempo de transporte de la muestra es mayor de 30 horas, se recomienda que los análisis se efectúen en el campo con equipos portátiles. Para ello, el técnico responsable de los análisis deberá estar capacitado en el manejo de los equipos y accesorios, técnicas analíticas, y siempre mantendrá las condiciones apropiadas para garantizar la calidad analítica.

4. EQUIPOS Y MATERIAL MÍNIMO DE LABORATORIO

En un laboratorio de nivel básico se requiere un ambiente físico con servicios de agua y luz, mesas de trabajo y gabinetes para almacenar el material. En general, para los análisis básicos, se requieren los instrumentos y materiales mencionados a continuación. Los requerimientos específicos se presentan en la descripción de cada metodología analítica.

4.1 Equipos y materiales mínimos para un laboratorio básico

- Equipos de esterilización
 - a) Una estufa para esterilización y secado, con una temperatura de entre 170 y 180 °C, con termostato y termómetro.

- b) Un autoclave a 15 libras de presión y una temperatura de 121 °C a nivel del mar, con válvula de seguridad, un manómetro y un termómetro.

- Incubadoras

- a) Una incubadora, con una temperatura de incubación de $35 \pm 0,5$ °C, con termostato y termómetro.
- b) Un equipo de baño María, con una temperatura de incubación de $44,5 \pm 0,2$ °C, con termostato y termómetro.

- Destilador

Un destilador de agua no tóxica libre de sustancias que interfieran con la multiplicación bacteriana.

- Potenciómetro

Un potenciómetro con una precisión de 0,1 unidades de pH. Tampones para calibrar pH: 4,0; pH: 6,86; 9,18 y solución *buffer*.

- Turbidímetro y comparador de cloro, con sus respectivos accesorios y reactivos, mencionados en el ítem correspondiente a dichos parámetros.

- Equipo para pesar

Una balanza simple con pesas de hasta 500 gramos con una exactitud de 0,1 gramos o una balanza digital con igual exactitud.

- Refrigeradora

Una refrigeradora para guardar los medios de cultivo preparados.

- Equipo para filtración

Una fuente de vacío; es decir, una bomba de vacío u otro dispositivo que produzca una presión diferencial en el portafiltros.

- Cristalería

El material de la cristalería debe ser resistente al calor. En algunas pruebas se pueden usar frascos o vasos de polietileno.

- Frascos de muestreo
- Matraces
- Pipetas tipo Mohr de 1 y 10 mL con graduación 1/10, volumétricas tipo clínico y graduadas
- Tubos de ensayo de vidrio borosilicato de 12 mm x 120 mm y de 16 mm x 150 mm
- Tubos Durham
- Placas de petri de vidrio o de plástico no tóxico de 48 mm de diámetro x 8,5 mm de altura
- Probetas graduadas.

Otros

- Membranas filtrantes de 47 mm de diámetro y con una porosidad de 0,45 µm
- Pinzas de acero inoxidable con extremidades redondeadas
- Lupa
- Espátulas de plástico
- Pinzas de extremos redondeados para transportar las membranas de filtración
- Asas de inoculación de platino, platino iridio o níquel y cromo con un aro de 3 mm de diámetro
- Guantes para la manipulación de material caliente
- Lápices con tinta indeleble a prueba de agua
- Mecheros de Bunsen
- Caja térmica para el transporte de muestras
- Hielo o gel refrigerante.

5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS QUÍMICOS

Para la preparación de los medios de cultivo de los análisis bacteriológicos, se recomienda utilizar medios deshidratados y que ofrezcan garantía de calidad. Los medios de cultivo y los reactivos requeridos para cada tipo de análisis propuesto en el presente manual figuran en la descripción de cada técnica y en el apéndice A.

6. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICA

La obtención de resultados precisos y confiables en los exámenes rutinarios de la calidad del agua contribuirá al éxito de un programa de vigilancia. Se requiere que las pruebas, tanto las de campo como las de laboratorio, se desarrollen bajo un control de calidad analítica. Este control se realiza mediante la aplicación rutinaria de procedimientos que se siguen en forma paralela al desarrollo de los ensayos y que tienen como objetivo el aportar datos para monitorear la fiabilidad y/o exactitud de los resultados obtenidos en las pruebas.

El control de calidad interno en un laboratorio o en un análisis de campo se ejecuta mediante procedimientos que monitorean la forma en que se llevan a cabo las pruebas, las condiciones de los equipos, los medios de cultivo, los reactivos y el desarrollo de los procedimientos analíticos. El control de la calidad analítica de los parámetros básicos incluye el uso de blancos, controles positivos, controles negativos, réplicas de análisis de las muestras y, en determinados casos, el uso de cartas de control, específicamente en algunos de los parámetros considerados en los programas intermedios y avanzados de los programas de vigilancia de la calidad del agua.

Para asegurar la calidad de los resultados, es necesario que además de considerar las acciones de control de calidad antes mencionadas, se lleve a cabo un plan sistematizado de aseguramiento de la calidad cuyo objetivo sea lograr la confiabilidad de los resultados analíticos (Castro, 1996).

6.1 *Plan de aseguramiento de la calidad*

El plan de aseguramiento de la calidad abarca el muestreo, la manipulación, el transporte, el almacenamiento, las metodologías analíticas, la calibración y el mantenimiento de instrumentos y equipos, la preparación del material que será usado en los ensayos, la correcta aplicación de los cálculos y la emisión de resultados en forma apropiada y oportuna. En este plan está incluido el sistema de control de calidad interno y externo.

Para que un laboratorio genere datos seguros y confiables, se requiere atender, como mínimo, los siguientes aspectos:

- Infraestructura física apropiada, fuentes de energía, agua, ventilación y demás servicios básicos, a fin de lograr el cumplimiento de las tareas con seguridad, efectividad y comodidad. Se requiere un laboratorio con áreas separadas de recepción de muestras, de examen de muestras, preparación de medios de cultivo y reactivos, de esterilización y lavado de materiales, así como de almacenamiento y refrigeración.

- Instrumentos y equipos con las características exigidas por el método analítico y bajo un programa de mantenimiento.
- Materiales, medios de cultivo y reactivos en buen estado.
- Utilizar procedimientos analíticos estandarizados.
- Personal del laboratorio capacitado según sus funciones.
- Mantenimiento y calibración de equipos e instrumentos.
- Desarrollo de un sistema de almacenamiento de datos.
- Un programa de control de calidad interno y externo, con un procedimiento de corrección de problemas cuando se observa un resultado dudoso. El laboratorio contará con un programa sistemático de control de calidad para monitorear la fiabilidad o exactitud de sus resultados.
- Cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio.

CAPÍTULO 3

ADMINISTRACIÓN DE UN LABORATORIO DE NIVEL BÁSICO

1. ORGANIZACIÓN, ORDEN Y MEDIDAS DE HIGIENE

Las funciones del personal de los laboratorios periféricos y central deben estar claramente definidas porque eso facilita el orden, el buen cumplimiento de actividades, la capacitación específica según las funciones y el deslinde de responsabilidades.

La red conformada por el laboratorio central y los laboratorios periféricos es responsable de los siguientes aspectos:

- Programar la toma de muestras según los lineamientos del programa de vigilancia.
- Preparar el material para el muestreo y análisis, tanto en el laboratorio como en el campo.
- Ejecutar los análisis.
- Mantener un programa de control de calidad de los análisis de laboratorio y de campo (blancos, controles positivos, controles negativos y réplicas).
- Capacitar al personal responsable de la toma de muestras y de los análisis.

Como mínimo, se requiere que los laboratorios estén dirigidos por un profesional capacitado en los procedimientos analíticos de los parámetros seleccionados para el programa de vigilancia; que conozca las buenas prácticas de laboratorio, control de calidad y aseguramiento de la calidad de las pruebas analíticas. Se debe contar con un equipo de técnicos capacitados en procedimientos relacionados con el muestreo, análisis (de laboratorio y de campo) y reporte de resultados. Es indispensable que la red de laboratorios tenga un eficiente y oportuno sistema de información de resultados al laboratorio regional o al central, según lo disponga la entidad responsable del programa de vigilancia.

Por otro lado, es conveniente que el laboratorio cuente con instalaciones que permitan a los trabajadores laborar en un ambiente sin riesgos para la salud, amparados por un programa de *bioseguridad*, y que todo el personal asuma el cumplimiento de las *buenas prácticas de laboratorio*, tanto en el trabajo efectuado en el laboratorio como en el campo.

1.1 Buenas prácticas de laboratorio

En un laboratorio de microbiología el personal está expuesto a la contaminación con microorganismos que pueden ser ingeridos por la acción de absorber y expulsar las muestras de agua con la pipeta usando directamente la boca. El analista también se puede contaminar con los diferentes artículos que se manipulan en un laboratorio y que accidentalmente pueden llevarse a la boca. Estos artículos, que podrían estar contaminados con microorganismos, incluyen alimentos, bebidas, lapiceros, cigarrillos. También constituyen un riesgo las manos contaminadas. Otras formas de que ingresen los microorganismos al cuerpo son la inhalación —por ejemplo, de los aerosoles que se producen en el laboratorio—, la absorción a través de la piel y la contaminación accidental de los ojos.

El cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio contribuirá a la protección de las personas que directa o indirectamente están relacionadas con las actividades del laboratorio. Entre las buenas prácticas de laboratorio más importantes tenemos las siguientes:

- Bajo ninguna circunstancia se pueden pipetear con la boca las muestras de agua, los medios ni los reactivos.
- No se deben consumir ni almacenar alimentos ni bebidas en el laboratorio.
- No se deben llevar a la boca los lápices ni las etiquetas.
- Las pipetas y varillas de vidrio rotas o astilladas deben ser reemplazadas inmediatamente.
- Dentro del laboratorio, se debe usar obligatoriamente mandil o delantal, que debe estar correctamente abotonado.
- El material contaminado debe ser esterilizado y los residuos de los medios de cultivo, membranas, almohadillas (*pads*), etcétera, se deben colocar, después de esterilizados, dentro de bolsas seguras, antes de ser eliminados.
- Durante los análisis y manejo de materiales que despidan partículas al ambiente, es necesario colocarse mascarillas, ya que las bacterias y partículas pueden ser inhaladas a través de los aerosoles producidos en las operaciones rutinarias.

2. ADQUISICIÓN, DISPONIBILIDAD Y REPOSICIÓN DEL MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPOS

Para optimizar la disponibilidad y la reposición de los equipos, materiales y reactivos usados en los ensayos, conviene que el laboratorio cuente con un programa de trabajo en el cual se tome en cuenta el número de muestras analizadas en un determinado tiempo, así como el gasto de materiales, reactivos y equipos que representa el volumen de muestras por procesar.

Para garantizar la disponibilidad y reposición de equipos y materiales, es imprescindible que el laboratorio cuente con un inventario actualizado y con procedimientos documentados para la compra, recepción y almacenamiento de equipos, materiales y reactivos. Asimismo, se requiere un registro de entidades responsables del mantenimiento y la calibración de equipos y otro de distribuidores de equipos, materiales, reactivos y medios de cultivo.

Los equipos que ingresen al laboratorio serán registrados en el inventario y en su respectiva ficha de identificación. Se considerarán los siguientes datos:

- descripción del equipo;
- nombre del fabricante;
- una copia de las instrucciones del fabricante;
- entidad responsable del mantenimiento y fechas de mantenimiento;
- entidad responsable de la calibración y fechas de calibración;
- registro de tipo y fecha de las reparaciones efectuadas.

Para asegurar el manejo apropiado, la disponibilidad y reposición de los reactivos y materiales, se requiere contar con un procedimiento escrito que considere los siguientes aspectos:

- especificaciones de los reactivos y materiales;
- selección de características que servirán para verificar los productos en el momento de su aceptación;
- condiciones de almacenamiento;
- manejo de materiales con vida útil definida;
- disposición de reactivos y medios de cultivo no usados o vencidos.

3. COSTOS POR ANÁLISIS

La determinación del costo del análisis por muestra se efectúa sobre la base de las siguientes variables:

- remuneración del analista según el tiempo empleado en el análisis;
- cantidad de reactivos y medios de cultivo usados por muestra;
- cantidad de materiales específicos por análisis como filtros de membrana;
- depreciación de los materiales de laboratorio y de los equipos;
- gastos por servicios básicos: agua, luz y gas;
- agregar gastos de transporte si el personal de laboratorio efectúa el muestreo.

En el capítulo 5, cuadro 5.1, se presenta una tabla con los costos aproximados de los análisis bacteriológicos.

4. SOSTENIBILIDAD ECONÓMICA DE UN LABORATORIO DE NIVEL BÁSICO

Es prioritario que en un programa de vigilancia de la calidad del agua de bebida se establezcan los procedimientos económicos y los costos con claridad y que se cuente con un financiamiento asegurado para los gastos que generen el muestreo, el análisis de las muestras y el envío de resultados. Además, se deben establecer los nexos entre las autoridades de salud y la comunidad a fin de involucrarlas con los objetivos del programa de vigilancia. El programa CALCOS-PVA, desarrollado por el CEPIS/OPS, es una herramienta recomendada para la evaluación de tales costos.

En los planes estratégicos de sostenibilidad económica de estos laboratorios, es conveniente que el programa de vigilancia logre establecer mecanismos que permitan el flujo de los fondos, a fin de que los laboratorios cuenten con ellos en forma oportuna. Por otro lado, también es prioritario el control del uso adecuado de los fondos, de las actividades y de los logros funcionales y operativos.

5. PRODUCCIÓN Y MANEJO DE LA INFORMACIÓN ANALÍTICA

El laboratorio central y los laboratorios periféricos contarán con un sistema de registro de resultados, manual o computarizado. Este sistema proporcionará información suficiente para rastrear la muestra desde su recepción hasta la emisión del informe por el laboratorio. El archivo de datos, los datos originales, las estimaciones y los cálculos se

deben mantener en el laboratorio por un tiempo razonable, que será establecido por el programa.

Antes de que los resultados sean emitidos por los laboratorios, deben ser revisados y aprobados por las personas autorizadas. Asimismo, serán reportados con exactitud, claridad, de manera objetiva, sin ambigüedad y en forma oportuna, a fin de que la autoridad responsable pueda tomar una acción inmediata.

La producción y el manejo sistematizado de la información obtenida tanto en la inspección sanitaria como en las pruebas analíticas contribuirán al éxito de un programa de vigilancia de la calidad del agua de bebida.

CAPÍTULO 4

TOMA DE MUESTRAS

1. TÉCNICAS DE MUESTREO

La recolección de la muestra es un punto crítico en el procedimiento de la evaluación de la calidad del agua. La selección del punto de muestreo tendrá como requisito principal que la muestra sea representativa del sistema, del componente, de las fuentes de agua, del reservorio, etcétera.

El envase para la toma de muestras tendrá las características apropiadas para el tipo de análisis que se efectuará. Para el análisis microbiológico, la muestra se tomará en un envase de 250 mililitros de capacidad, de vidrio o plástico autoclavable, de boca ancha y con tapa rosca. Se deberá cubrir la tapa del frasco con papel *kraft* y fijarlo con un cordel. Los análisis físicoquímicos básicos (cloro residual, pH y turbiedad) deben ser preferentemente evaluados en el campo. En caso de que no se cuente con los equipos de campo requeridos para la evaluación de los parámetros físicoquímicos básicos, la muestra se tomará en frascos de vidrio o de polietileno, en un volumen de 500 mililitros; no se requieren preservantes. No se debe exponer la muestra a la luz ni tampoco agitarla. La muestra debe ser analizada en forma inmediata.

Las muestras de agua para consumo humano tratada y sometida a un proceso de desinfección con cloro se deben coleccionar en un frasco esterilizado al cual, antes de la esterilización, se le hayan adicionado 0,1 mililitros de solución de tiosulfato de sodio al 1,8% para cada 100 mililitros. Con este reactivo se neutraliza el cloro residual. Esta cantidad de tiosulfato de sodio es suficiente para neutralizar concentraciones de hasta 5 mg/L de cloro residual y es adecuada para una muestra de rutina. En situaciones especiales, como emergencias, en que el cloro residual puede ser mayor de 5 mg/L, se requiere una mayor cantidad de tiosulfato; en estos casos, pueden utilizarse volúmenes de 0,1 mililitros de solución de tiosulfato de sodio al 10% para cada 100 mililitros de

muestra. Esta cantidad es suficiente para neutralizar concentraciones de hasta 15 mg/L de cloro residual.

Para la recolección de muestras de aguas sospechosas de contener concentraciones superiores a 0,01 mg/L de metales pesados tales como cobre, cinc, etcétera, se deberán adicionar en el frasco de recolección, antes de su esterilización, 0,3 mililitros de una solución de ácido etilendiaminotetracético-EDTA al 15% para cada 100 mililitros de muestra. Cuando se requiera, también se agregará una solución de tiosulfato de sodio (volumen de 0,1 mililitros de una solución al 10% para cada 100 mililitros de muestra). La solución de EDTA puede ser adicionada a un frasco de recolección sola o combinada con una solución de tiosulfato de sodio. El EDTA actúa como agente quelante y reduce la acción tóxica de los metales.

Otro punto importante en el muestreo es la correcta y clara identificación de la muestra. En la etiqueta o ficha de muestreo debe figurar toda la información requerida. Los datos básicos son los siguientes:

Cuadro 4.1
Datos básicos de la etiqueta de muestreo

●	Número de muestra.
●	Punto de muestreo.
●	Localidad.
●	pH.
●	Temperatura.
●	Cloro residual (en el caso de agua potable).
●	Turbiedad.

Y si el programa de vigilancia lo requiere, se deben considerar otros datos que permitan interpretar los resultados en forma correcta. En el apéndice B se presenta una propuesta de formatos que deben ser adaptados según las características del programa de vigilancia. El formato B.1, denominado *cadena de custodia*, se usa en el caso de que se requiera enviar la muestra a un laboratorio para su análisis, y el formato B.2 para la toma de muestras en un programa de nivel básico en lugares que cuenten con una planta de tratamiento y sistema de distribución de agua. También se presenta una guía para llenar este formato.

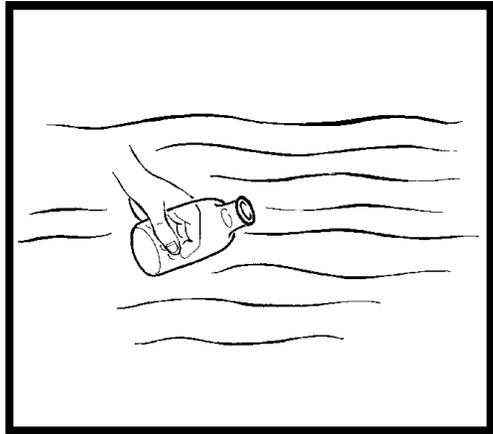
Para los propósitos del muestreo del agua, pueden considerarse tres tipos de agua (OMS, 1988):

1. Agua de una corriente de agua (ríos), aguas con escaso o nulo movimiento (reservorios, lagunas, lago) o agua de un depósito (tanque).

2. Agua de un pozo excavado o algo semejante, donde el acceso presenta una mayor dificultad.
3. Agua de un grifo en un sistema de distribución o de una bomba de mano fija, etcétera, en el caso de que la comunidad cuente con un sistema de distribución.

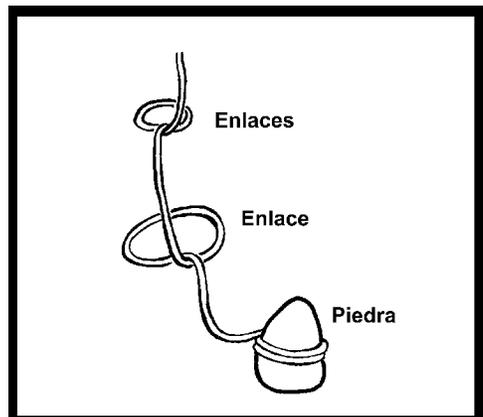
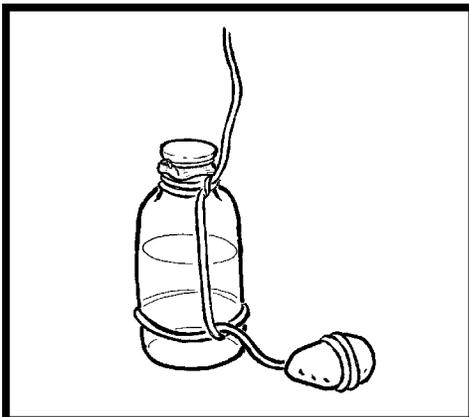
1.1 *Recolección de muestras de una corriente de agua, aguas con escaso o nulo movimiento o almacenada en depósitos*

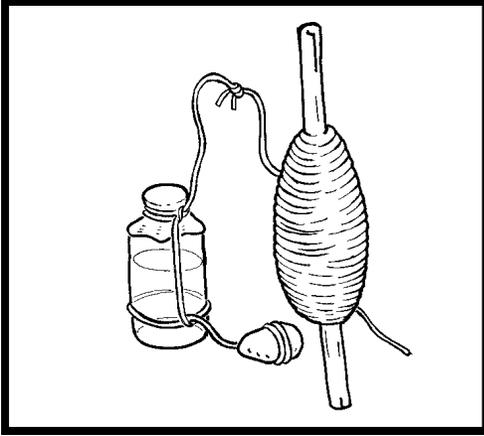
Para llenar el frasco con la muestra, se debe sostener el frasco por la parte inferior y sumergirlo hasta una profundidad de aproximadamente 20 centímetros, con la boca del frasco ligeramente hacia arriba. Si se trata de una corriente, colocar la boca del frasco en sentido contrario a la corriente del agua.



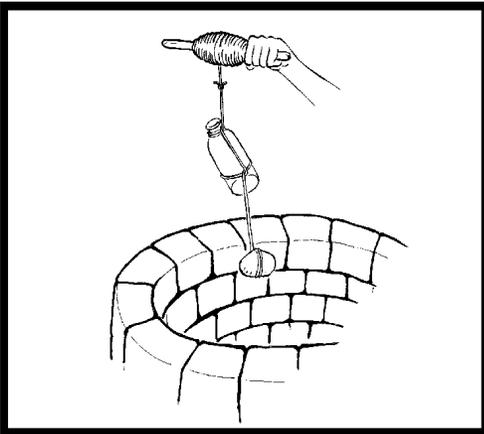
1.2 *Recolección de muestras de pozos excavados y fuentes similares*

1. Preparar el frasco o el vaso de muestreo para el análisis bacteriológico; ambos deben estar esterilizados. Con un pedazo de cordón, amarrar una piedra de tamaño apropiado al frasco de muestra. Antes lavar la piedra a fin de evitar la incorporación de microorganismos al agua del pozo.

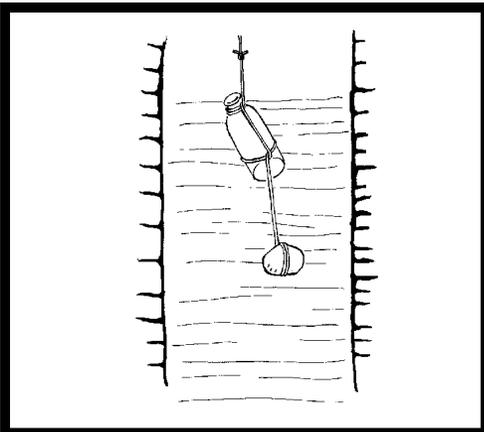




2. Amarrar el frasco al cordón. Con un cordón limpio, de una longitud necesaria para el muestreo según la profundidad del pozo, atar el frasco y luego destaparlo.

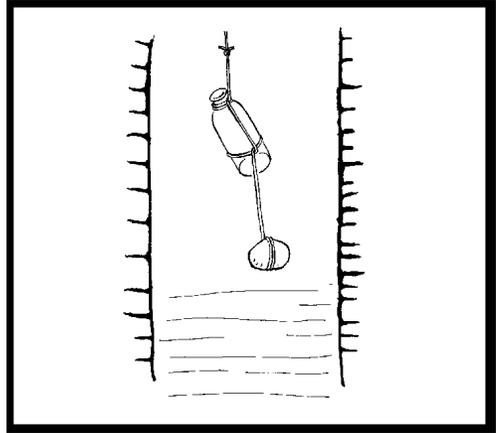


3. Ubicar el frasco o el vaso de muestreo en un punto alejado de las paredes del pozo y lentamente dejar descender el frasco dentro del pozo. El peso de la piedra facilitará su descenso.



4. Llenar el frasco. Sumergirlo completamente hasta una profundidad de 30 centímetros aproximadamente.

5. Elevar el frasco. Una vez que se considere que el frasco está lleno, enrollar la cuerda alrededor de la estaca para subirlo. Si el frasco estuviera completamente lleno, deseché parte del agua hasta que aproximadamente un tercio del frasco quede vacío. Colocar la tapa del frasco como se describió anteriormente.

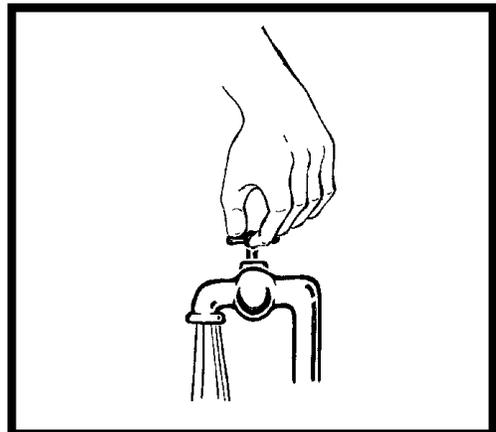


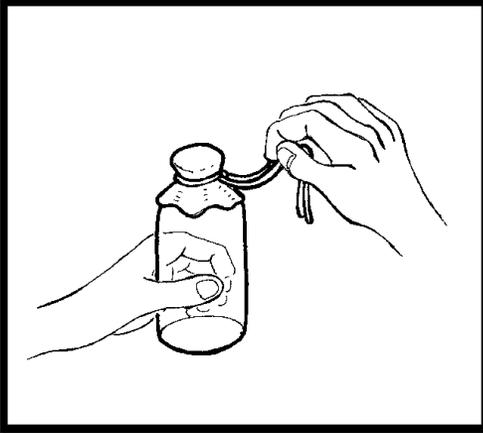
Si se trata de reservorios de almacenamiento de agua potable, analice inmediatamente el cloro.

1.3 Muestreo de un grifo o de la salida de una bomba

En primer lugar, tener la precaución de que el grifo esté conectado directamente a la red de distribución y sin accesorios (coladores, anexos de mangueras, etcétera). De otro modo, remover cualquier dispositivo ajeno al grifo. Verificar que no se presenten fugas a través de los sellos o empaquetaduras del caño. Si hay fugas, seleccionar otro punto de muestreo o reparar los puntos de fuga antes de tomar la muestra.

1. Con la ayuda de una tela, limpiar y retirar del grifo cualquier tipo de materia extraña adherida a la boca de salida. Abrir el grifo, hasta que alcance su flujo máximo y dejar correr el agua durante dos minutos. Este procedimiento limpia la salida y descarga el agua que ha estado almacenada en la tubería.

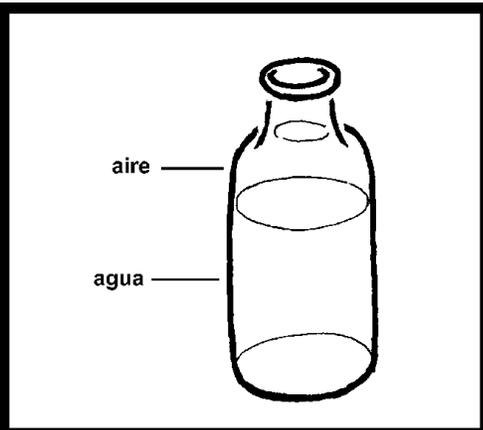




2. Abrir el frasco de muestreo. Desamarrar el cordón que ajusta la cubierta protectora de papel *kraft* y destapar.



3. Llenar el frasco. Mantener la tapa y la cubierta protectora hacia abajo (para evitar la entrada de polvo portador de microorganismos). Poner inmediatamente el frasco debajo del chorro de agua y llenarlo como se indica en la figura.



4. Dejar un espacio de aire (aproximadamente un tercio del frasco) para facilitar la agitación de la muestra antes del análisis bacteriológico.

5. Colocar el tapón al frasco. Enroscar la tapa y fijar con el cordón la cubierta protectora de papel *kraft*.



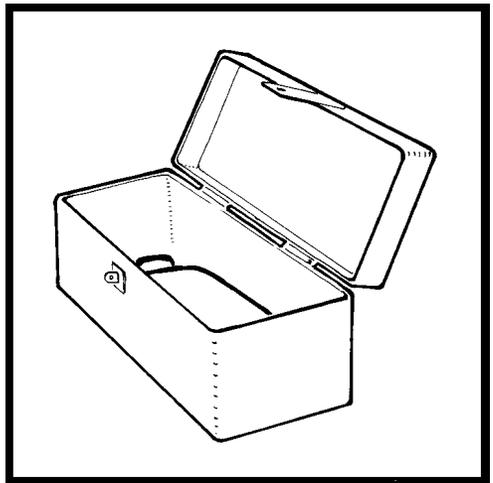
Para las mediciones de pH, cloro residual y turbiedad, seleccionar otro frasco o un vaso de muestreo y enjuagarlo tres veces consecutivas antes de tomar la muestra definitiva. Efectuar el análisis de pH, cloro residual y turbiedad.

2. PRESERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Verificar la correcta identificación de la muestra (véase el cuadro 4.1).

La muestra deberá ser transportada al laboratorio lo antes posible. El tiempo límite entre el muestreo y el inicio del examen bacteriológico es 30 horas.

Las muestras deben ser transportadas en condiciones de refrigeración (4-10 °C), en cajas que las conserven en este rango de temperatura. Se debe colocar dentro de la caja hielo o gel refrigerado. En el laboratorio la muestra debe ser conservada a temperatura de refrigeración hasta el inicio del examen.

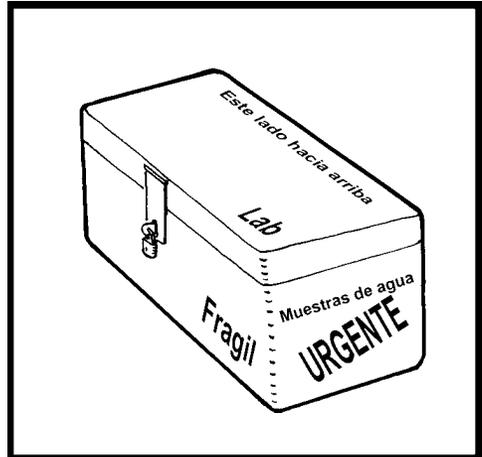
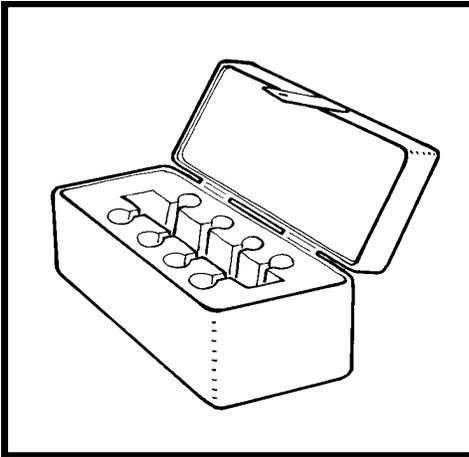


3. TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS: EMBALAJE Y ENVÍO

Los frascos deben ser transportados o enviados en una caja resistente para evitar roturas. Esta caja puede ser de plástico, madera o metal. La caja tendrá suficiente espacio para colocar las bolsas con la mezcla refrigerante que permitirá que la muestra se conserve a temperatura de refrigeración.

En la cubierta de caja de transporte se debe colocar una etiqueta que, de manera impresa o con tinta indeleble, muestre de un modo muy claro las inscripciones “Fragil”, “Muestras de agua, urgente” y “Este lado hacia arriba”, así como la dirección del laboratorio al que se enviarán las muestras. En otra etiqueta debe figurar el remitente.

En la parte interna de la caja también irá el formulario detallado con los datos de la recolección de las muestras, su descripción y el nombre de la persona que las recolectó y las envió. Si el programa de vigilancia lo solicita, las muestras irán acompañadas de la cadena de custodia, que tiene por objetivo rastrear la muestra desde el momento del muestreo hasta su entrega al laboratorio. En el apéndice B se presenta un modelo de cadena de custodia.



SEGUNDA PARTE

**PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS DE LOS
PARÁMETROS DE NIVEL BÁSICO**

INTRODUCCIÓN

En la segunda parte del presente manual se describen las metodologías analíticas referidas a los parámetros que contempla un programa de vigilancia de nivel básico. Estos parámetros son bacterias coliformes totales y termotolerantes, cloro residual, pH y turbiedad.

Los procedimientos se presentan en dos capítulos. En el primero (cap. 5) se detallan los procedimientos analíticos que requieren un laboratorio, equipos y materiales específicos para cada tipo de análisis. Esta modalidad es la recomendada para ser aplicada en el laboratorio central y en los laboratorios periféricos que atiendan la demanda de análisis exigida por un programa de vigilancia de nivel básico.

En el segundo (cap. 6) se desarrollan procedimientos analíticos efectuados con equipos de campo, modalidad sugerida para ser aplicada en las zonas rurales u otras áreas que no tengan fácil acceso a un laboratorio. Se recomienda que los medios de cultivo y la preparación de los materiales para el análisis se efectúen en un laboratorio periférico, a no ser que se empleen material desechable y medios de cultivo preparados en ampollas, viales u otra forma de presentación.

CAPÍTULO 5

PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

1. DETERMINACIÓN DE INDICADORES DE CALIDAD SANITARIA DEL AGUA: COLIFORMES TOTALES Y TERMOTOLERANTES

1.1 *Introducción*

El grupo de bacterias coliformes está conformado por dos subgrupos: los coliformes totales y los termotolerantes. A estos últimos antes se los denominaba *coliformes fecales*. El cambio de nombre se debe a que se demostró que en el grupo de coliformes que se detectaban en siembras incubadas a temperaturas de 44,5 °C y en medios de cultivo específicos, sólo una parte del grupo eran bacterias de origen fecal; el resto eran bacterias ambientales. Se les puso entonces el nombre de *bacterias coliformes termotolerantes* debido a la alta temperatura de incubación (44,5 °C) en la cual se obtenía un óptimo desarrollo.

En el grupo de bacterias termotolerantes está incluida la *Escherichia coli*, considerada como un organismo indicador de contaminación fecal. Se ha demostrado que esta bacteria siempre está presente en un número elevado en las heces de humanos y animales de sangre caliente y comprende casi 95% de los coliformes en las heces.

Por esta razón, la contaminación de origen fecal puede ser evaluada mediante la determinación de coliformes termotolerantes o mediante la presencia de *E. coli*. En los valores guía para la calidad bacteriológica del agua de bebida (OMS, 1995), ambas determinaciones se consideran como alternativas aceptables y su presencia indica contaminación de origen fecal. Por esta razón, en los métodos descritos en el presente manual se encontrará que algunos están dirigidos a la investigación de coliformes

termotolerantes y otros a la de *E. coli*, de acuerdo con las características de los medios de cultivo empleados.

Hasta hace pocos años, se consideraba a los coliformes totales como indicadores de contaminación del agua. Sin embargo, se ha demostrado que solamente algunas de las especies que conforman este grupo son de origen fecal mientras que otras pueden estar presentes en forma natural en diferentes ambientes acuáticos. Actualmente, los coliformes totales se emplean para evaluar la calidad higiénica del agua (Allen, 1996) y el grupo de bacterias coliformes termotolerantes, para evaluar la calidad sanitaria del agua, calidad que está relacionada con la transmisión de patógenos.

Se ha desarrollado una serie de métodos para la enumeración de bacterias en muestras de agua. Los más usados son los de cultivo en tubos con caldo específico para determinado grupo de microorganismos. Otro método, también usado con frecuencia, es el de concentración con filtro de membrana.

Las bacterias coliformes totales se detectan con los métodos de membrana de filtración y tubos múltiples, con medios específicos, y se incuban a 35-37 °C hasta 48 horas. Los coliformes termotolerantes son detectados con métodos similares pero con medios específicos y una incubación a 44,5 °C.

Los análisis de coliformes pueden efectuarse en un laboratorio de nivel básico o también en el campo. Esta última es una forma práctica de analizar una muestra de agua, para lo cual se necesitan un equipo de campo y algunos materiales complementarios.

2. ANÁLISIS BACTERIOLÓGICOS DE LOS PARÁMETROS DE LA CALIDAD SANITARIA DEL AGUA DE BEBIDA: COLIFORMES TOTALES Y TERMOTOLERANTES

Se ha desarrollado una serie de métodos para la enumeración de microorganismos en muestras de agua. Los métodos usados con mayor frecuencia son los tradicionales de filtración con membrana y de Número Más Probable con tubos múltiples.

En algunos programas de vigilancia se proponen alternativas para ahorrar en material y horas de trabajo, como la prueba cualitativa de presencia-ausencia. Una vez detectada la presencia de coliformes, se efectúa un segundo muestreo con el objetivo de cuantificar el nivel de contaminación del agua.

A fines de los años ochenta se difundió el uso de medios con sustrato definido o sustrato enzimático, con los cuales se pueden detectar o enumerar selectivamente coliformes totales, termotolerantes y *E. coli*, según el método y medio de cultivo utilizado.

Cuadro 5.1
Nivel de facilidad, rapidez y costo de las diferentes técnicas para la
determinación del grupo coliformes^a

Técnica	Tipo	Determinación	Facilidad ^b	Rapidez ^b	Costo por muestra US\$ ^b
Fermentación en tubos múltiples (tradicional)	Cuantitativa	Coliformes totales Coliformes termotolerantes	3	3	2,5
Filtro de membrana (tradicional)	Cuantitativa	Coliformes totales Coliformes termotolerantes	2	2	2,5
Filtro de membrana con medio m-7 horas	Cuantitativa	Coliformes totales Coliformes termotolerantes	2	1	1.5
Presencia-ausencia en medio	Cualitativa	Coliformes totales Coliformes termotolerantes	2	3	2,5

^a Clasificación del 1 (mayor) al 3 (menor).

^b Costo por muestra, sobre la base de precios referenciales de medios de cultivo y filtros de membrana. No incluye equipos ni materiales reutilizables.

Los métodos tradicionales de investigación de coliformes por tubos múltiples duran hasta 96 horas para coliformes totales y 72 horas para coliformes termotolerantes. Con la técnica de filtro de membrana, la prueba dura 24 horas. Pero en muchos casos de emergencia, como desastres naturales, y cuando se producen fallas en el tratamiento y distribución del agua que ocasionan un riesgo de contaminación fecal, se hace necesaria una evaluación rápida. Con esta finalidad, se puede emplear el método de filtro de membrana con el medio MT-7 horas para coliformes y se agiliza la obtención de resultados.

2.1 Método de filtro de membrana. Método tradicional

2.1.1 Introducción

La técnica de filtro de membrana se fundamenta en la filtración de un volumen determinado de muestra (100 mililitros o volúmenes menores según la densidad bacteriana esperada) a través de un filtro de membrana de 0,45 micrómetros de

diámetro de poro, el cual es colocado sobre un medio de cultivo específico y luego incubado a la temperatura adecuada.

El método de filtración con membrana para la determinación de coliformes totales y termotolerantes está aceptado por el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (American Public Health Association-American Water Works Association, 1999), que lo propone como una alternativa para la determinación de los coliformes totales y termotolerantes. Este método se recomienda para la determinación de bacterias en muestras de agua potable y agua de origen subterráneo. El procedimiento descrito a continuación es una versión simplificada de la técnica ofrecida por el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (American Public Health Association-American Water Works Association, 1999) y por la OMS (1988).

2.1.2 Equipos y material

Calculados para procesar 10 muestras de agua. (Las cantidades, en algunos casos, son aproximadas y pueden aumentar de acuerdo con el criterio del analista.)

- Un autoclave.
- Un horno de aire caliente o estufa para esterilización.
- Un destilador de agua.
- Un potenciómetro o cinta de pH universal.
- Una incubadora, con una temperatura de incubación de $35 \pm 0,5$ °C, con termostato y termómetro.
- Un equipo de baño María, con una temperatura de reincubación de $44,5 \pm 0,2$ °C, con termostato y termómetro.
- Un sistema de filtración (una bomba de vacío o aspirador manual, 2 frascos erlenmeyer Kitazato de un litro, mangueras de conexión y portafiltras previamente esterilizados).
- 10 frascos de muestreo de vidrio y boca ancha estéril.
- 20 placas de petri de 48 milímetros X 8,5 milímetros esterilizadas, identificadas con el número de la muestra, así como el volumen de muestra que va a ser filtrado.

- 10 probetas graduadas de 100 mililitros estériles, con la abertura recubierta con papel aluminio. (Si los portafiltros no son graduados.)
- Pipetas estériles de 10 y 1 mililitros. (Si fuera necesario para diluir la muestra, una por dilución.)
- 20 frascos de dilución de 100 mililitros. (Si fuera necesario hacer diluciones en alguna de las muestras, se debe aumentar 2 por dilución.)
- Un frasco de boca ancha para colocar las pipetas que han sido utilizadas.
- Una pinza sin dientes.
- 20 membranas filtrantes esterilizadas, de 47 milímetros de diámetro y una porosidad de 0,45 micrómetros.
- 20 almohadillas o *pads* esterilizados (en caso de usar el medio de cultivo líquido).
- Un mechero de Bunsen, para mantener el ambiente aséptico y efectuar la desinfección de las pinzas utilizadas.
- Una lupa o un microscopio estereoscópico según las facilidades con que se cuente.
- Una fuente de luz directa.

2.1.3 Soluciones y medios de cultivo

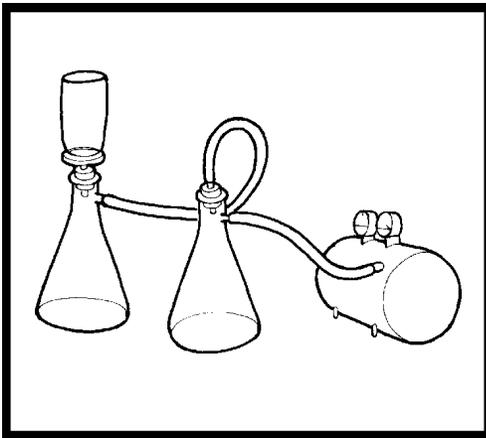
En cantidades aproximadas para 10 muestras:

- 20 mililitros de medio m-Endo ó 50 mililitros de agar m-Endo o agar Endo LES (para coliformes totales). En el apéndice A se presenta el procedimiento para la preparación de los medios de cultivo.
- 20 mililitros de medio m-FC ó 50 mililitros de agar m-FC (para coliformes termotolerantes).
- Un mililitro de etanol al 95%.
- 0,5 mililitros de ácido rosólico al 1% en NaOH al 0,2 N.
- 4 litros de agua destilada para la preparación de los medios y agua de dilución.

- 2 litros de agua de dilución estéril (preparada a partir de las soluciones *stock* A y B).
- 34 gramos de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) para la preparación de la solución *stock* A.
- 81,1 gramos de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) para la preparación de la solución *stock* B.

2.1.4 Procedimiento analítico

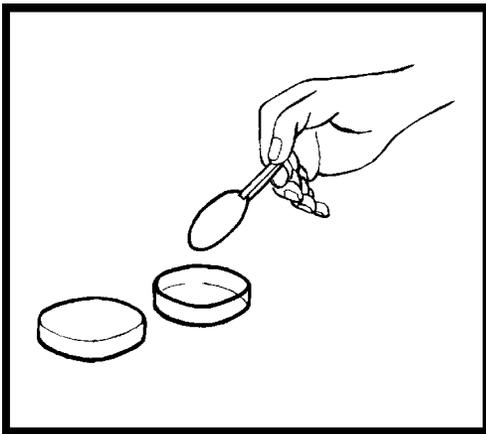
Antes de iniciar el examen, limpiar la mesa de trabajo con una solución desinfectante y colocar sobre la mesa de trabajo el material necesario para ejecutar el análisis.



1. Preparar el sistema de filtración según indica la figura.

Colocar un matraz de seguridad entre la bomba de vacío y el matraz que sostiene el porta-filtros.

El porta-filtros debe estar estéril y frío.



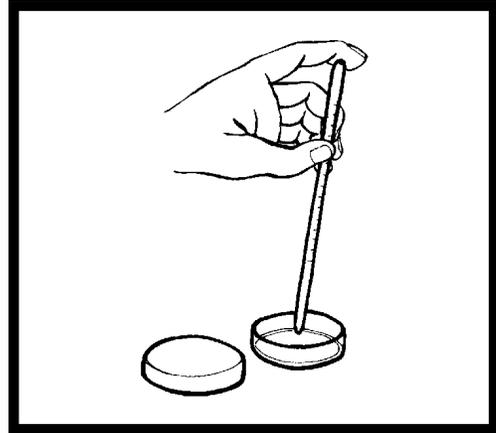
2. Preparar las placas.

Identificar las placas con lápiz de vidrio o tinta indeleble en el área externa de la base.

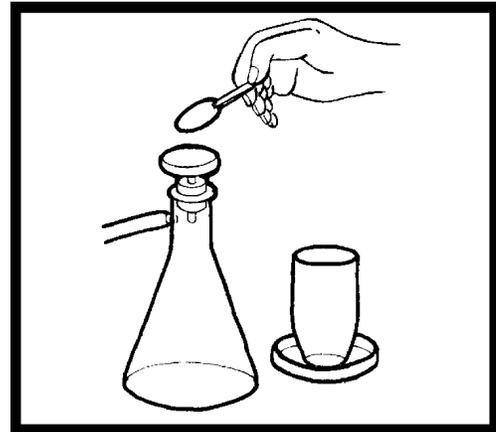
Si se trabaja con caldo selectivo estéril, abrir la placa de petri estéril con una pinza esterilizada al fuego y colocar una almohadilla o *pad*.

3. Con una pipeta estéril, agregar 2 mililitros de caldo selectivo: medio m-Endo para coliformes totales y medio m-FC para coliformes termotolerantes.

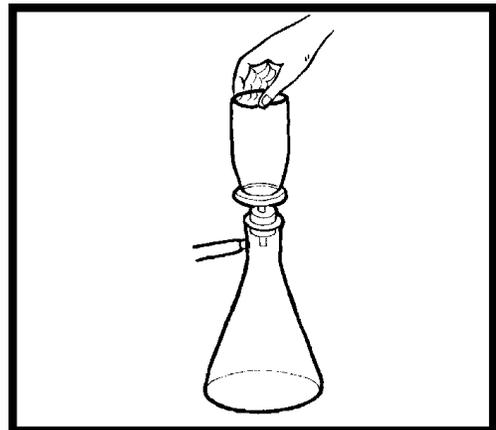
Si se decide trabajar con agar, distribuir con una pipeta estéril entre 3 y 5 mililitros del agar licuado (a 45 °C aproximadamente) a la placa de petri estéril. Taparla y dejar solidificar el medio antes de proceder al análisis.

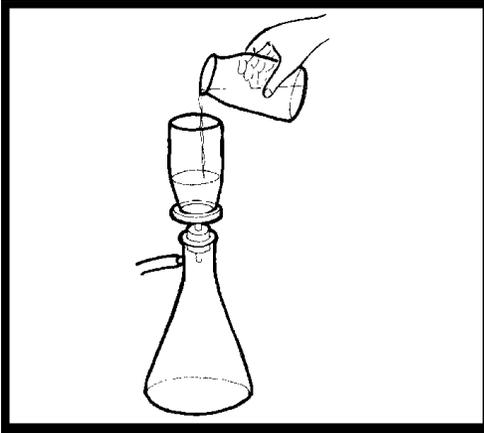


4. Retirar la parte superior del portafiltros y, con una pinza previamente flameada al mechero y fría, colocar un filtro de membrana estéril, con la cara cuadrículada hacia arriba y en el centro de la parte superior del portafiltros.



5. Acoplar la parte superior del portafiltros, teniendo cuidado de no dañar la membrana.



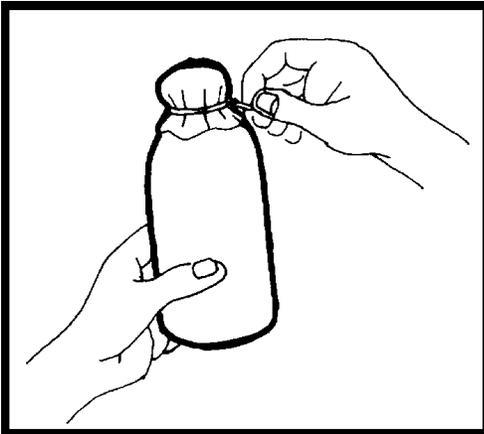


6. Para comprobar la esterilidad del filtro, verter cuidadosamente en el portafiltros 100 mililitros de agua de dilución estéril.

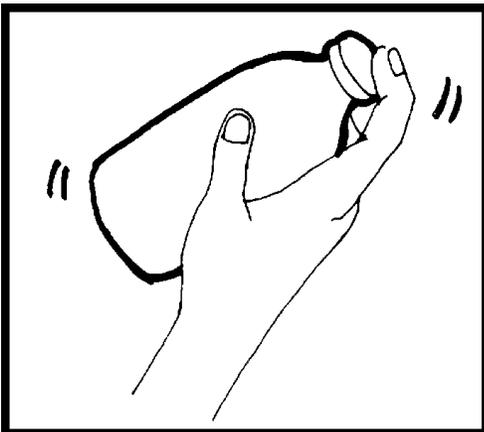
El volumen de agua destilada se medirá en el mismo embudo si este es graduado. También se puede medir en una probeta estéril.

Conectar a la bomba de vacío y proceder a la filtración.

Seguir los pasos 10-15 como si se tratara de una muestra de agua.



7. Retirar la envoltura de papel del frasco con la muestra.



8. Homogeneizar la muestra, agitar un número no menor de 25 veces, inclinando el frasco y formando un ángulo de 45° entre el brazo y el antebrazo.

9. Verter 30 mililitros de agua destilada estéril con el fin de humedecer la membrana.

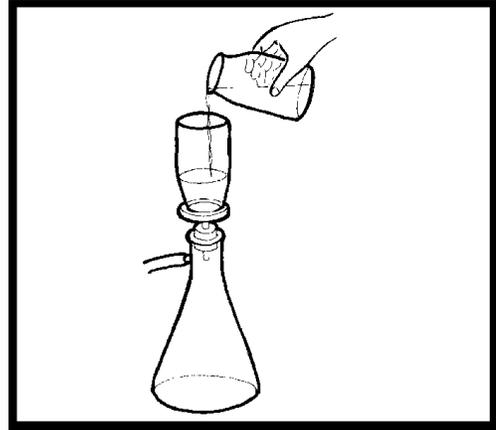
Verter 100 mililitros de la muestra de agua.

Filtrar.

Después de la filtración de la muestra, enjuagar el portafiltros tres veces con porciones de 20-30 mililitros de agua de dilución estéril, para evitar la retención de alguna bacteria en las paredes internas.

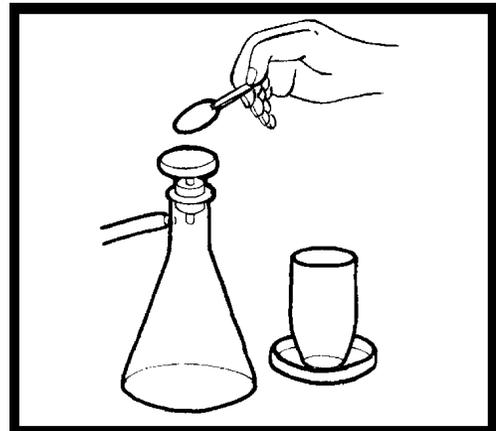
Evitar que se seque la membrana.

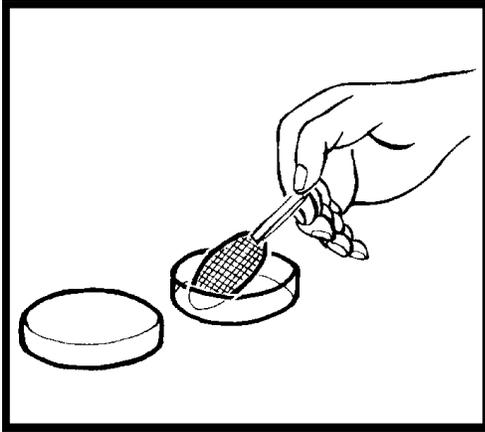
Apagar la bomba de vacío al finalizar la operación.



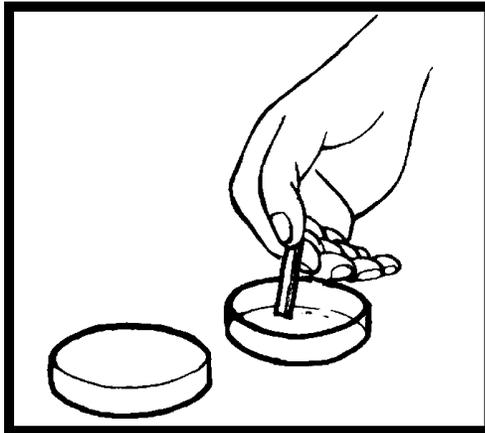
10. Separar la parte superior del portafiltros y, con una pinza previamente flameada y fría, retirar la membrana cuidando de que la pinza toque apenas la parte periférica, fuera del área de filtración.

Acoplar nuevamente la parte superior del portafiltros a la parte inferior.



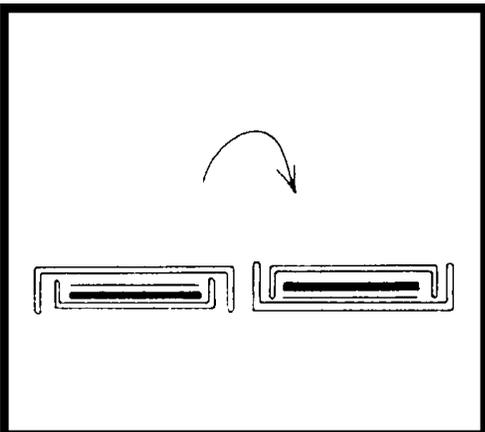


11. Teniendo cuidado de no contaminar el filtro de membrana, colocarlo cuidadosamente con la superficie cuadrículada hacia arriba, sobre la almohadilla embebida en el medio de cultivo o directamente sobre el agar, si fuera el caso.



12. Verificar que no se formen bolsas de aire entre la membrana y la almohadilla con el medio de cultivo o la superficie del agar.

Si esto ocurre, levantar uno de los bordes del filtro de membrana con una pinza estéril y, haciendo movimientos circulares, deslizarlo con la finalidad de eliminar las bolsas, pues ellas impiden el contacto de las bacterias con el medio de cultivo, y así se dificulta o evita su crecimiento.



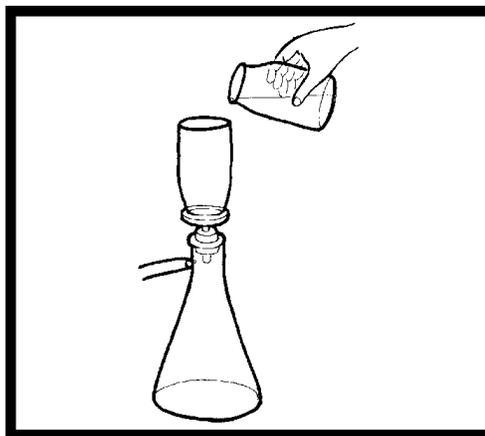
13. Tapar la placa de petri, verificar la identificación de la placa con el número de la muestra, dilución y fecha de siembra.

Colocarla en forma invertida; es decir, con la tapa hacia abajo.

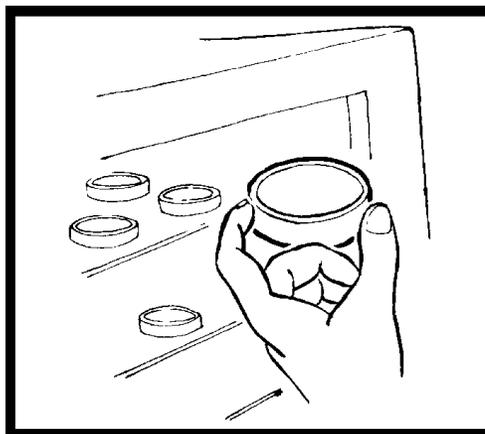
14. Lavar nuevamente el filtro con agua de dilución estéril y proceder a la siguiente filtración.

Los portafiltros deben estar estériles en el inicio de cada serie de filtraciones.

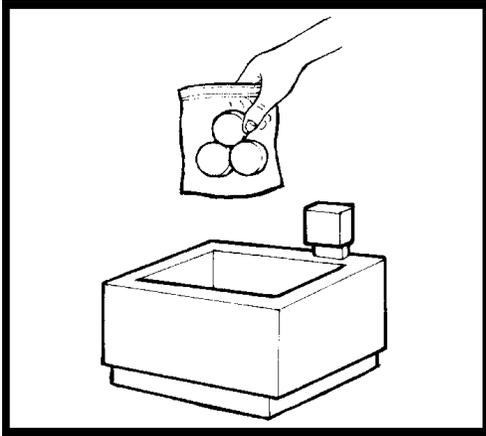
Si hubo un intervalo de 30 minutos entre una filtración y otra, los portafiltros deben ser esterilizados nuevamente, para evitar la contaminación accidental.¹



15. Incubar las placas de petri colocándolas en posición invertida; para el caso de los coliformes totales (placas con medio m-Endo, agar m-Endo o agar Endo LES), en una incubadora con bandejas forradas de papel toalla humedecido. La incubación será a $35 \pm 0,5$ °C durante 24 horas.



¹ La esterilización rápida de los portafiltros puede efectuarse mediante los siguientes procedimientos: exponerlos a radiación ultravioleta durante dos minutos o sumergirlos en agua hirviendo por no más de 30 minutos. Controlar la esterilidad de cada portafiltro usado para cada serie de filtraciones. Para ello es necesario efectuar la filtración de una muestra de 100 mililitros de agua destilada estéril, antes y durante la filtración de las muestras. Esto puede hacerse cada 10 muestras de agua de bebida procesadas en un mismo portafiltro (o según el número considerado en el programa de control de calidad).



16. Las placas destinadas a la determinación de coliformes termotolerantes en medio m-FC, agar m-FC u otro medio de cultivo específico pueden ser incubadas de dos formas: en una incubadora con 100% de humedad o colocando las placas en una bolsa de plástico con cierre hermético y sumergiéndolas en baño María a $44,5 \pm 0,2$ °C durante 24 horas.

2.1.5 Lectura y verificación

Coliformes totales

Después de la incubación, seleccionar para lectura las placas con filtros de membrana que presenten entre 20 y 80 colonias típicas de coliformes y no más de 200 bacterias de todos los tipos.

En el medio m-Endo, agar m-Endo o agar Endo LES, las colonias típicas de coliformes totales presentan una coloración de rosado a rojo oscuro con brillo metálico superficial. El área brillante puede variar de tamaño recubriendo toda la superficie de la colonia o parte de ella. Las colonias atípicas pueden presentarse de color rojo oscuro, mucoides y sin brillo. Las colonias rosadas, incoloras, blancas y sin brillo metálico son consideradas como no coliformes.

En agua potable, verificar todas las colonias sospechosas o al menos cinco colonias, para lo cual se procede del siguiente modo:

- Con una aguja de siembra, picar cada una de las colonias seleccionadas, esterilizar la aguja con fuego y enfriar antes de pasar a otra colonia.
- Sembrar en caldo verde brillante bilis al 2% e incubar a $35 \pm 0,5$ °C durante 24-48 horas.

Coliformes fecales

Después de la incubación, seleccionar las placas con filtros de membrana que presenten entre 20 y 60 colonias típicas de coliformes termotolerantes.

En el medio m-FC o agar m-FC, las colonias de coliformes termotolerantes se presentan de color azul.

Con ayuda de una lupa o con un microscopio estereoscópico y con iluminación dispuesta en forma directa a la placa, efectuar el recuento de las colonias típicas en las placas seleccionadas para lectura.

Calcular el número de coliformes a partir del recuento de colonias típicas. En el caso de evaluar la calidad de aguas destinadas al consumo humano, en que la rapidez en la obtención de resultados es de fundamental importancia, si se detecta un incremento de coliformes termotolerantes, se debe informar como resultados preliminares los datos obtenidos en la lectura de las placas y, con carácter definitivo, la confirmación en caldo de cultivo.

En agua potable, verificar todas las colonias sospechosas o al menos cinco colonias, para lo cual se procede del siguiente modo:

- Con una aguja de siembra, picar cada una de las colonias seleccionadas, esterilizar la aguja con fuego y enfriar antes de pasar a otra colonia.
- Sembrar en caldo EC e incubar a $44,5 \pm 0,2$ °C durante 24 horas.

2.1.6 Presentación de resultados

1. El número de coliformes totales se obtiene a partir del recuento de colonias típicas que se desarrollan en el medio m-Endo, agar Endo o agar Endo LES.
2. El número de coliformes termotolerantes se obtiene a partir del recuento de colonias típicas que se desarrollan en el medio m-FC o agar m-FC.
3. El recuento de coliformes totales y termotolerantes determinados a través de la técnica de filtro de membrana se expresa del siguiente modo:
 - Unidades formadoras de colonias de coliformes totales por 100 mililitros (UFC de coliformes totales/100 mL).
 - Unidades formadoras de colonias de coliformes termotolerantes por 100 mL (UFC de coliformes termotolerantes/100 mL).
4. El recuento final de bacterias del grupo coliforme se calcula a partir del número de colonias típicas que se desarrollan en el filtro de membrana y del volumen de muestra filtrado, aplicando la siguiente fórmula general:

$$\text{UFC de coliformes totales/100 mL} = \frac{\text{N.º de colonias típicas}}{\text{Volumen filtrado de muestra (mL)}} \times 100$$

Casos especiales:

- a) Cuando la suma total de colonias (típicas y atípicas) es superior a 200. El resultado final se expresa como conteo perjudicado (CP).
- b) Cuando haya crecimiento en toda el área de filtración de membrana, sin colonias bien definidas, expresar el resultado final como crecimiento confluyente (C. Cf.).
- c) Cuando se presentan colonias típicas de coliformes y crecimiento confluyente, expresar el resultado como presencia de coliformes y conteo perjudicado debido a crecimiento confluyente.

En los casos especificados para conteo perjudicado y crecimiento confluyente, se debe solicitar una nueva muestra y seleccionar menores volúmenes de muestra para la filtración. De esta manera, para aguas tratadas, una filtración de 100 mililitros puede ser sustituida por 2 filtraciones de 50 mililitros ó 4 de 25 mililitros.

2.2 Método del Número Más Probable por tubos múltiples Método tradicional

2.2.1 Introducción

En esta técnica los resultados de la fermentación en tubos múltiples se expresan en términos de Número Más Probable (NMP) de microorganismos existentes. El método del NMP por tubos múltiples se fundamenta en un modelo de cálculo de probabilidades. De acuerdo con la alternativa de siembra elegida, se selecciona la tabla de NMP correspondiente para obtener los recuentos de coliformes.

La técnica de fermentación en tubos múltiples es una alternativa para la determinación de coliformes totales y termotolerantes y se recomienda para el análisis de muestras de agua superficial que sirve como fuente de abastecimiento. Es muy útil en el caso de aguas superficiales con una alta densidad de partículas o coloreadas, que no pueden ser fácilmente procesadas por la técnica de filtración con membrana. También se propone este método para el análisis de agua potable, para lo cual se recomienda la siembra de una serie de 10 tubos con volúmenes de 10 mililitros ó 5 tubos de fermentación con volúmenes de 20 mililitros. Véanse los cuadros 5.2 y 5.3.

La técnica de fermentación en tubos múltiples para la determinación de coliformes totales y termotolerantes consta de dos fases: la fase presuntiva y la fase confirmatoria. Ambos procedimientos se explican a continuación. El procedimiento descrito inmediatamente es una versión simplificada de la técnica *multiple tube fermentation for members of the coliform group* del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (American Public Health Association-American Water Works Association, 1999) y OMS (1988).

2.2.2 Equipos y material

Calculados para procesar 10 muestras de agua para consumo humano.

- Un autoclave.
- Un horno de aire caliente o estufa para esterilización.
- Un destilador de agua.
- Un potenciómetro o cinta de pH universal.
- 10 frascos de vidrio estériles y de boca ancha para el muestreo.
- Un equipo de baño María con una temperatura estable a $44,5 \pm 0,2$ °C
- Una incubadora a $35 \pm 0,5$ °C.
- Un mechero Bunsen.
- 450 tubos de 16 x 150 milímetros (o de mayor medida) con tapones.
- 450 tubos Durham.
- 20 pipetas serológicas de 10 mililitros.
- 10 frascos de dilución de 100 mililitros.
- Un asa de inoculación con aro de níquel, cromo o platino.
- Material para la preparación de medios de cultivo: espátulas, matraces, probetas, etcétera.

2.2.3 Soluciones y medios de cultivo

En cantidades aproximadas para 10 muestras.

- 500 mililitros de caldo lauril sulfato (caldo lauril triptosa) a doble concentración (para la prueba presuntiva del grupo coliformes). Véase la preparación de los medios en el apéndice A.
- Un litro de caldo lauril sulfato (caldo lauril triptosa) a concentración simple (para la prueba presuntiva del grupo coliformes).
- 1,5 litros de caldo verde brillante lactosa bilis 2% a concentración simple para la prueba confirmativa de coliformes totales (en función de que todos los tubos presuntivos den resultados positivos).
- 1,5 litros de caldo EC para la prueba confirmativa de coliformes termotolerantes (en función de que todos los tubos presuntivos den resultados positivos).
- 8 litros de agua destilada para la preparación de los medios.
- Un litro de agua de dilución estéril (preparada a partir de las soluciones *stock* A y B).
- 34 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) para la preparación de un litro de solución *stock* A.
- 81,1 g de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) para la preparación de un litro de solución *stock* B.

2.2.4 Preparación de material

Preparar el caldo lauril triptosa (lauril sulfato) a simple (1 X), doble concentración (2X) o según se requiera y dispensar según el volumen de muestra que se va a sembrar, de tal manera que las porciones de muestra inoculadas al medio no reduzcan la concentración de ingredientes del medio, la cual debe mantenerse constante. Por ejemplo, si se va a sembrar 10 tubos con 10 mililitros de muestra cada uno, se tiene que dispensar 10 mililitros de medio (2 X) en cada tubo; si se trabajan tres series de cinco tubos, las porciones de muestra de un mililitro y menores de un mililitro deben ser inoculadas a tubos con 10 mililitros del caldo en concentración simple (1 X).

En cada tubo colocar un tubo Durham invertido y esterilizar en autoclave. Tener la precaución de que en el momento de iniciar la prueba no estén a la temperatura de

refrigeración y cuidar de que ninguno de los tubos presente burbujas producidas en el momento del autoclavado.

Proceder al marcado de los tubos, anotando el número designado por el laboratorio, el volumen seleccionado de muestra que va a ser inoculado y la fecha del análisis. Esta marcación podrá hacerse solamente en el primer tubo de la derecha en la primera fila. En los primeros tubos de las hileras siguientes se pueden simplificar las marcaciones, colocando solo el volumen de la muestra inoculada. Asimismo, si se van a emplear diluciones, identificar los frascos de agua de dilución con el número de muestra y las diluciones seleccionadas.

2.2.5 Procedimiento analítico

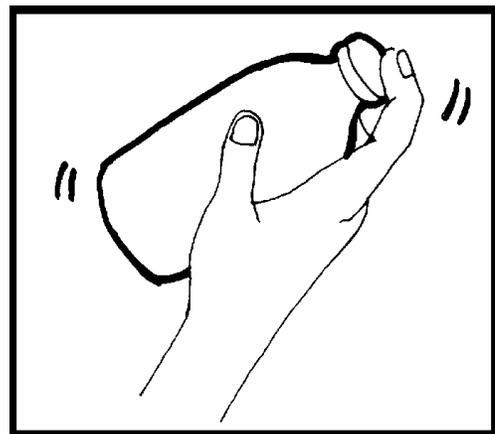
Siembra de 10 tubos, cada tubo con 10 mL de muestra

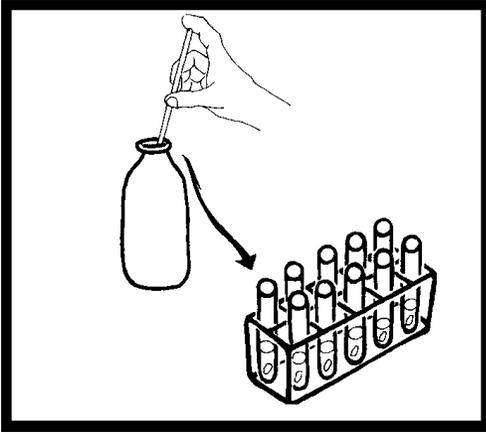
Prueba presuntiva

1. Retirar la envoltura de papel del frasco con la muestra.

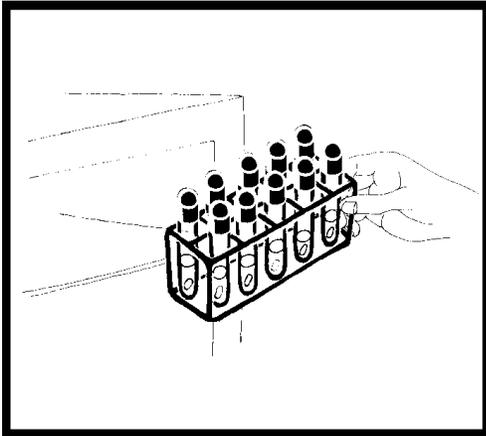


2. Homogeneizar agitando un número no menor de 25 veces, inclinando el frasco y formando un ángulo de aproximadamente 45° entre el brazo y el antebrazo.



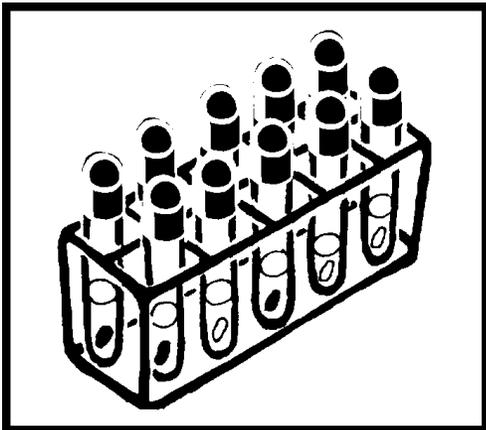


3. Con una pipeta estéril, sembrar 10 mililitros de muestra en cada uno de los 10 tubos de caldo lauril triptosa estéril de doble concentración. Verificar que en cada tubo haya un tubo Durham invertido.



4. Después de la inoculación de todos los volúmenes de muestra, agitar la gradilla con los tubos inoculados. Hacerlo en forma horizontal y evitando que el medio sembrado llegue a la tapa de los tubos.

Colocar la gradilla en la incubadora a $35 \pm 0,5$ °C durante 24 ± 3 horas.

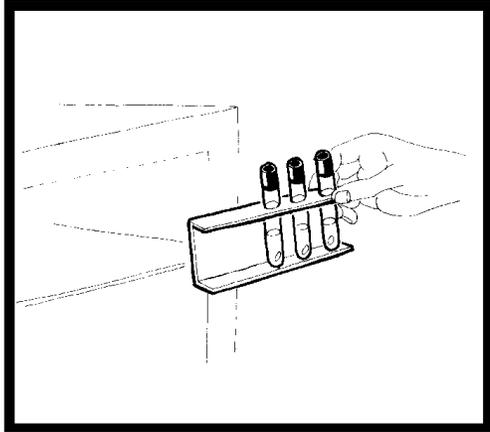


5. Después de la incubación por 24 ± 3 horas, retirar los tubos de la incubadora para efectuar la primera lectura de los resultados. Agitar suavemente cada tubo y examinar la producción de gas.

Retirar los tubos con resultado positivo (producción de gas, retenida en el tubo Durham; no es importante la cantidad de gas) y anotar los resultados.

6. Devolver a la incubadora ($35 \pm 0,5 \text{ } ^\circ\text{C}$) todos los tubos con resultados negativos, por un periodo adicional de 24 ± 1 hora. La segunda lectura (a las 48 ± 3 horas) será hecha en las mismas condiciones, después de esta última lectura.

Los tubos con resultado positivo serán separados para continuar la marcha analítica y los que resulten negativos serán descartados.

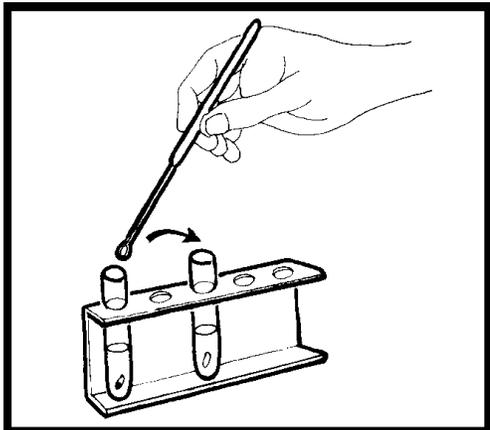


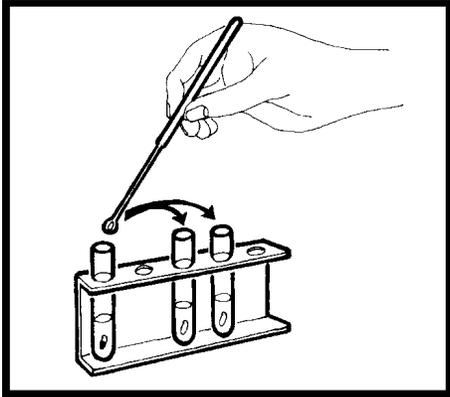
2.2.6 Pruebas confirmativas

7. Prueba confirmativa para coliformes totales

Todos los tubos positivos de la prueba presuntiva son confirmados.

Agitar cada tubo positivo de la prueba presuntiva con un asa de siembra estéril. Retirar el material e inocular al tubo 10 mililitros de caldo verde brillante lactosa bilis 2% (CLVBB 2%) correspondiente. Evitar tomar la película superficial.

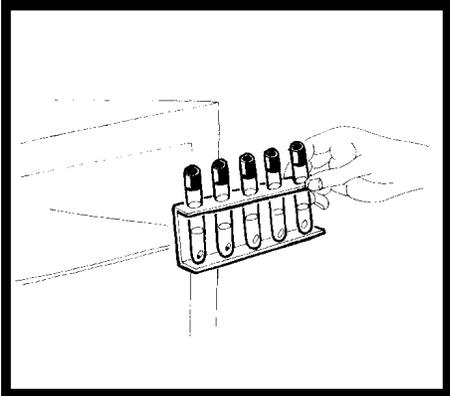




8. Prueba confirmativa para coliformes termotolerantes

La prueba confirmativa para coliformes termotolerantes se realizará sembrando todos los tubos positivos de la prueba presuntiva en tubos con 10 mililitros de caldo EC. La siembra para la confirmación de coliformes totales y termotolerantes puede hacerse en forma paralela.

Después de la siembra, agitar la gradilla con los tubos inoculados. Hacerlo en forma horizontal y evitando que el medio sembrado llegue a la tapa de los tubos.



9. Incubar los tubos de caldo verde brillante lactosa bilis 2% sembrados a $35 \pm 0,5$ °C durante 24 ± 3 horas.

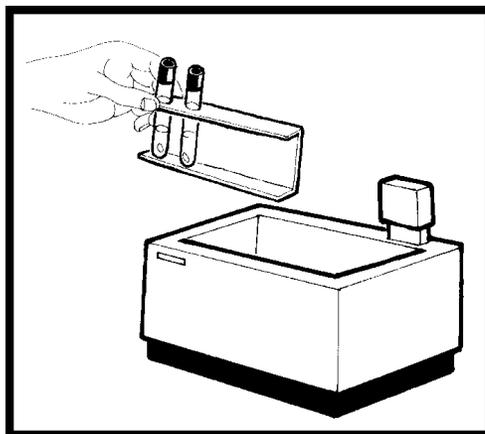
Después de la incubación, retirar los tubos para efectuar la primera lectura. Agitar suavemente cada tubo y examinar la producción de gas. Retirar los tubos con resultado positivo (producción de gas en el tubo Durham; no es importante la cantidad de gas) y anotar los resultados.

Volver a incubar los tubos negativos a $35 \pm 0,5$ °C durante 24 ± 1 horas y repetir el procedimiento de lectura. Anotar los resultados.

10. Incubar todos los tubos de caldo EC inoculados (no más de 30 minutos después de la inoculación) en baño María a $44,5 \pm 0,2$ °C durante 24 ± 2 horas.

Proceder a la lectura considerando como resultado positivo para la prueba todos los tubos que presentaron formación de gas en el tubo Durham.

Con los datos obtenidos en la prueba confirmativa, calcular el NMP de coliformes totales y termotolerantes (véase “Cálculo del Número Más Probable”, p. 61).



2.2.7 Siembra de 10, 1 y 0,1 mL de muestra

Recomendado para aguas con alta contaminación como fuentes de agua de origen superficial y otras.

3 series de 5 tubos cada una

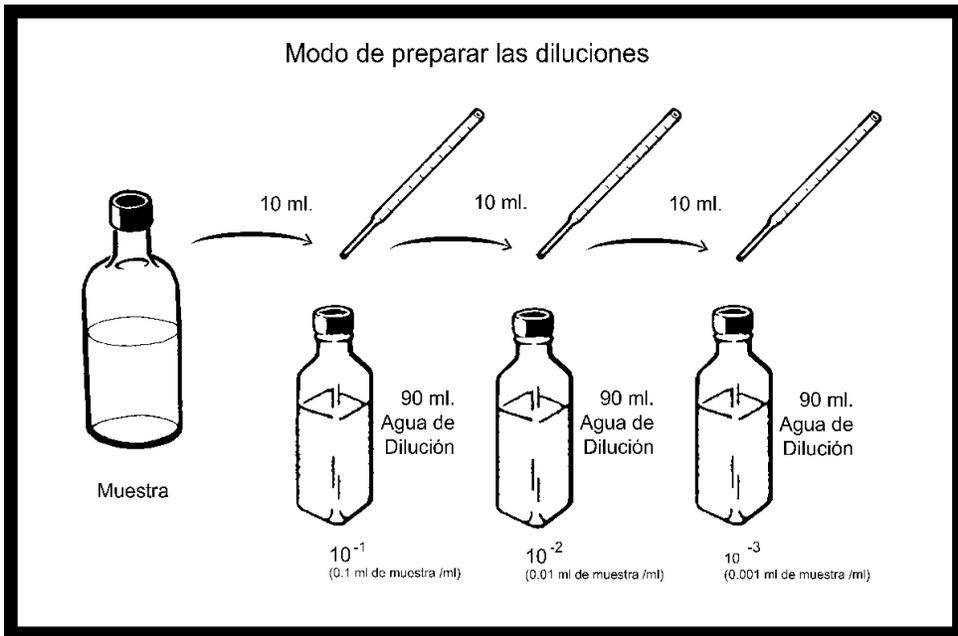
- En el caso de seleccionar la siembra de 10, 1 y 0,1 mililitros, descartar la pipeta de 10 mililitros, inocular la primera serie de tubos con caldo de cultivo a doble concentración con 10 mililitros de muestra. A continuación, inocular un mililitro de muestra en cada uno de los 5 tubos correspondientes a la siguiente serie. Para la siembra de 0,1 mililitros, efectuar una dilución de la muestra según se indica en el siguiente punto.

Si se va a analizar muestras de fuentes de agua de origen superficial, se recomienda efectuar diluciones seriadas, las que se seleccionarán según el nivel de contaminación de la fuente.

- Las diluciones se efectúan mediante el siguiente procedimiento:
 - ❖ Con una pipeta estéril de 10 mililitros y obedeciendo los cuidados de asepsia, transferir 10 mililitros de muestra a un frasco con 90 ± 2 mililitros

de agua de dilución temperada, anticipadamente identificado. Se prepara, así, la primera dilución decimal (10^{-1}), sabiendo que un mililitro de ella corresponde a 0,1 mililitros de muestra.

- ❖ Homogeneizar el frasco con la primera dilución (10^{-1}) y, con una nueva pipeta estéril, transferir 10 mililitros a un frasco con 90 ± 2 mililitros de agua de dilución temperada. Consignar, así, la segunda dilución decimal (10^{-2}), sabiendo que un mililitro de ella corresponde a 0,01 mililitros de muestra.
- ❖ Proceder de esa manera en las secuencias de diluciones seleccionadas (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , etcétera). Véase la figura “Modo de preparar las diluciones”.
- Ordenar los frascos con las diluciones, manteniendo una secuencia decreciente (de mayor a menor dilución efectuada).
- Agitar vigorosamente 25 veces el frasco con la última dilución efectuada y, con una pipeta estéril de 10 ó 5 mililitros, sembrar un mililitro de dicha dilución en cada uno de los tubos del caldo de cultivo seleccionado en concentración simple, correspondientes a la última dilución efectuada.



Modo de preparar las diluciones

- Proceder de esta manera, sembrando de mayor dilución (menor volumen de muestra) a menor dilución (mayor volumen de muestra). Utilizar una pipeta por dilución. En caso de tener un escaso número de pipetas, la siembra se puede efectuar con la misma pipeta y siempre de mayor a menor dilución. Enjuagar las paredes internas de la pipeta en la siguiente dilución, para lo cual se debe succionar y expulsar el agua con la bombilla de seguridad.

2.2.8 Cálculo del Número Más Probable

En el caso del agua tratada, cuando se inoculan cinco porciones con 20 mililitros de muestra, el Número Más Probable se calcula con ayuda del cuadro 5.2. Si se elige la siembra de una serie de 10 tubos con 10 mililitros de muestra, el Número Más Probable se calculará con el cuadro 5.3.

En el caso de agua superficial sin tratamiento, si se selecciona para la prueba la siembra de tres series de cinco tubos con volúmenes de 10 mililitros, un mililitro y 0,1 mililitros, el Número Más Probable se obtiene directamente del cuadro 5.4.

Para este cálculo, se seleccionan los tubos con resultados positivos en las pruebas confirmativas de coliformes totales y termotolerantes, obtenidos en las tres series consecutivas inoculadas. Con los tubos positivos de cada serie se forma una combinación de números (también denominada *código*), que corresponde a un valor de Número Más Probable de coliformes.

En el caso de presentarse aguas con alta contaminación biológica, se requiere efectuar un mayor número de diluciones y el Número Más Probable se obtiene mediante una fórmula. Cuando se inoculan tres series de cinco tubos en volúmenes de muestra diferentes de los indicados en la tabla, el código se formará con el número de tubos con resultado positivo seleccionado en tres series consecutivas inoculadas y se verificará el valor de Número Más Probable correspondiente a ellos. El índice de Número Más Probable final será dado a través de la siguiente fórmula:

$$NMP/100 \text{ mL} = NMP \text{ correspondiente al NMP de la tabla} \times \frac{10}{\text{Mayor volumen de muestra inoculado (referido a la dilución inicial de la serie seleccionada para el NMP)}}$$

Cuadro 5.2
Índice de NMP y límites de confianza de 95% para varias
combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se siembran
5 porciones de 20 mL

N.º de tubos que presentan reacción positiva a partir de 5 tubos de 20 mL	Índice de NMP de 100 mL	Límites de confianza de 95%	
		Inferior	Superior
0	< 1,1	0	3,0
1	1,1	0,05	6,3
2	2,6	0,3	9,6
3	4,6	0,8	14,7
4	8,0	1,7	26,4
5	> 8,0	4,0	Infinito

Cuadro 5.3
Índice de NMP y límites de confianza de 95% para
varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se
siembran 10 porciones de 10 mL

N.º de tubos que presentan reacción positiva a partir de 10 tubos de 10 mL	Índice de NMP de 100 mL	Límites de confianza de 95%	
		Inferior	Superior
0	< 1,1	0	3,0
1	1,1	0,03	5,9
2	2,2	0,26	8,1
3	3,6	0,69	10,6
4	5,1	1,3	13,4
5	6,9	2,1	16,8
6	9,2	3,1	21,1
7	12,0	4,3	27,1
8	16,1	5,9	36,8
9	23,0	8,1	59,5
10	> 23,0	13,5	Infinito

Cuadro 5.4

NMP y límites de confianza de 95% cuando se usan diversas combinaciones de resultados positivos de series de 10 mL, 1 mL y 0,1 mL en series de 5 tubos

N.º de tubos con reacción positiva			Índice de NMP de 100 mL	Límites de confianza de 95%	
10 mL	1 mL	0,1 mL		Inferior	Superior
0	0	0	< 2		
0	0	1	2	1	10
0	1	0	2	1	10
0	2	0	4	1	13
1	0	0	2	1	11
1	0	1	4	1	15
1	1	0	4	1	15
1	1	1	6	2	18
1	2	0	6	2	18
2	0	0	4	1	17
2	0	1	7	2	20
2	1	0	7	2	21
2	1	1	9	3	24
2	2	0	9	3	25
2	3	0	12	5	29
3	0	0	8	3	24
3	0	1	11	4	29
3	1	0	11	4	25
3	1	1	1	6	35
3	2	0	14	6	35
3	2	1	17	7	40
4	0	0	13	5	38
4	0	1	17	7	45
4	1	0	17	7	46
4	1	1	21	9	55
4	1	2	26	12	63
4	2	0	22	9	56
4	2	1	26	12	65
4	3	0	27	12	67
4	3	1	33	15	77
4	4	0	34	16	80
5	0	0	23	9	86
5	0	1	30	10	110
5	0	2	40	20	140
5	1	0	30	10	120

(sigue)

(continuación)

N.º de tubos con reacción positiva			Índice de NMP de 100 mL	Límites de confianza de 95%	
10 mL	1 mL	0,1 mL		Inferior	Superior
5	1	1	50	20	150
5	1	2	60	30	180
5	2	0	50	20	170
5	2	1	70	30	210
5	2	2	90	40	250
5	3	0	80	30	250
5	3	1	110	40	300
5	3	2	140	60	360
5	3	3	170	80	400
5	4	0	130	50	390
5	4	1	170	70	480
5	4	2	220	100	580
5	4	3	280	120	690
5	4	4	350	160	820
5	5	0	240	100	940
5	5	1	300	100	1.300
5	5	2	500	200	3.000
5	5	3	900	300	2.900
5	5	4	1.600	600	5.300
5	5	5	>1.600		

2.2.9 Casos que pueden presentarse

- Si todos los tubos correspondientes a las diluciones inoculadas presentaron resultados positivos, seleccionar para la composición del código las tres mayores diluciones.
- Si todos los tubos correspondientes a las diluciones inoculadas presentaron resultados negativos, seleccionar para la formación del código las tres menores diluciones.

2.2.10 Presentación de resultados

Los resultados se expresan de la siguiente manera:

En el caso de coliformes totales, expresar como:

- NMP de coliformes totales/100 mL

En el caso de coliformes termotolerantes, expresar como:

- NMP de coliformes termotolerantes /100 mL

2.3 Método de presencia-ausencia

2.3.1 Introducción

Es un procedimiento simplificado de la técnica de fermentación en tubos múltiples para la determinación cualitativa de coliformes en agua destinada al consumo humano. La prueba de presencia-ausencia considera la siembra de 100 mililitros de muestra en el caldo P-A y está fundamentada sobre el principio de que los coliformes deben estar ausentes en 100 mililitros de agua potable. Esta prueba consta de dos fases: una presuntiva y otra confirmativa. Si el resultado del análisis es positivo, puede ser necesaria la determinación cuantitativa en una nueva muestra.

El método de presencia-ausencia es una alternativa para la determinación cualitativa de coliformes totales y termotolerantes. Es más simple y económica que las técnicas de tubos múltiples y de filtro de membrana, que son pruebas cuantitativas. El procedimiento descrito a continuación es una versión de la técnica *presence-absence coliform test* del Standard Methods (American Public Health Association-American Water Works Association, 1999).

2.3.2 Equipos y material

Calculados para procesar 10 muestras de agua.

- Una incubadora a $35 \pm 0,5$ °C
- Un autoclave
- Un horno de aire caliente o estufa para esterilización
- Un destilador de agua
- Un potenciómetro o cinta de pH universal
- Un mechero a gas o alcohol
- 10 botellas graduadas con tapa rosca estéril de 100 mililitros (si se usan botellas sin graduaciones, la muestra debe medirse con probeta graduada de 100 mililitros)
- Probetas estériles

- 10 tubos de ensayo de 250 mililitros con tapa rosca ó 10 frascos de vidrio estériles y de boca ancha (solo en el caso de usar caldo P-A)
- 10 tubos de ensayo pequeños para utilizarlos como campanas de fermentación dentro del tubo de ensayo grande (si se usa el caldo lauril triptosa)
- 20 tubos Durham
- 20 tubos de 16 X 150 mm
- Un inoculador o asa de siembra con aro de níquel o platino
- Material para la preparación de medios de cultivo: espátulas, matraces, probetas, etcétera.

2.3.3 Soluciones y medios de cultivo

En cantidades aproximadas para 10 muestras:

- 500 mililitros de caldo P-A preparado a triple concentración. Véase la preparación de los medios en el apéndice A.
- 100 mililitros de caldo verde brillante lactosa bilis 2% a concentración simple.
- 100 mililitros de caldo EC a concentración simple.

2.3.4 Procedimiento analítico



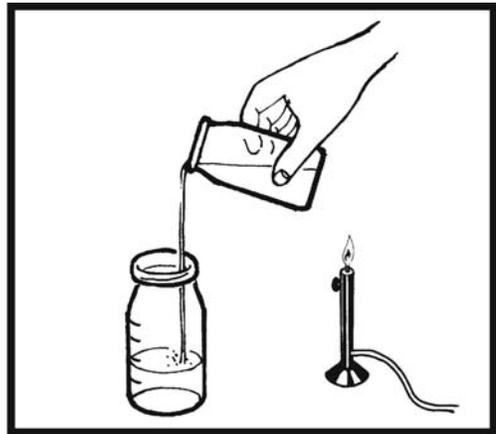
1. Retirar la envoltura de papel del frasco con la muestra.

2. Homogeneizar la muestra vigorosamente 25 veces.



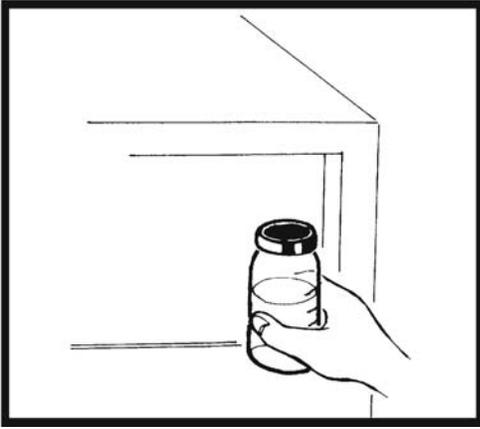
Prueba presuntiva

3. Sembrar 100 mililitros de muestra en un frasco o tubo de ensayo con 50 mililitros de caldo P-A o caldo lauril triptosa a triple concentración. Si el frasco es graduado, incorporar los 100 mililitros de la muestra en forma directa, bajo condiciones de asepsia. Si el frasco no es graduado, usar una probeta estéril.



4. Colocar la tapa del frasco o del tubo de ensayo y mezclar hasta que la mezcla sea uniforme. Agitar en forma horizontal y evitar que el medio sembrado llegue a la tapa del frasco.





5. Colocar el frasco inoculado en una incubadora a $35 \pm 0,5$ °C por 24 horas.

Para el control de esterilidad del medio, incubar un frasco de medio estéril y continuar el procedimiento como si se tratara de una muestra. El resultado debe ser negativo.



6. Efectuar la primera lectura. Si se presenta un cambio en el color original del medio, de púrpura a amarillo, es un indicador de que la prueba presuntiva es positiva para la presencia de coliformes.

Registrar los resultados. Los frascos con resultado negativo serán incubados por 24 horas adicionales. Después de ese tiempo, efectuar la segunda lectura.

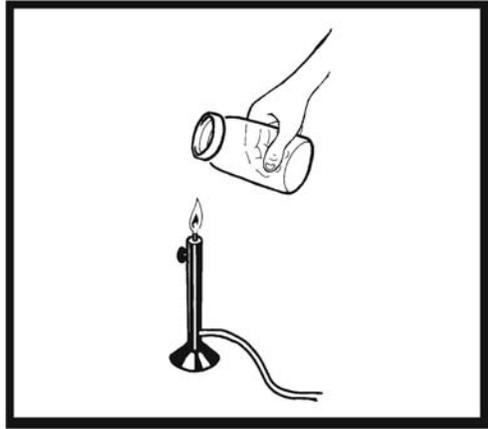


Prueba confirmativa

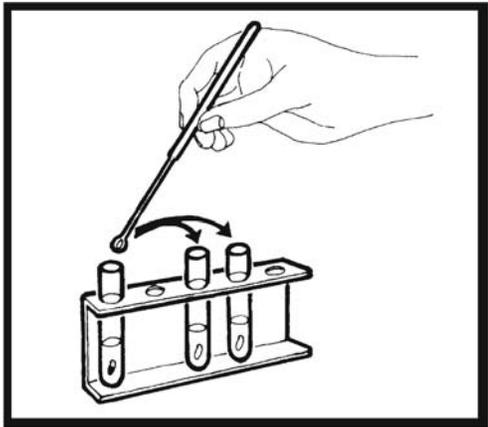
La muestra positiva en la prueba presuntiva debe ser sometida a la prueba confirmativa.

7. Agitar suavemente el frasco que ha resultado positivo en la prueba presuntiva.

8. Flamear la boca del frasco, antes y después de coger los inóculos.

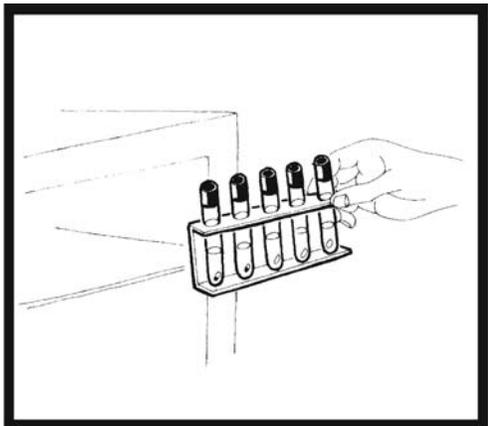


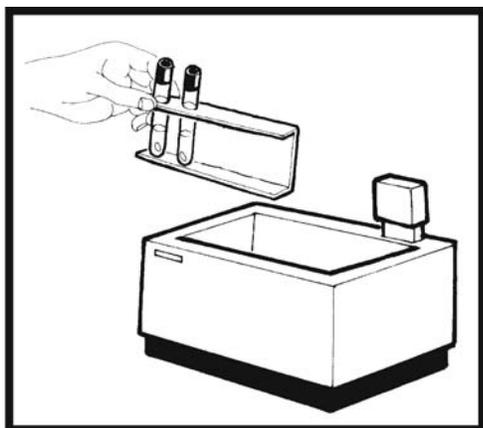
9. Con un asa de siembra estéril, transferir un inóculo a un tubo con 10 mililitros de caldo verde brillante lactosa bilis 2% (para coliformes totales) y un inóculo a un tubo con 10 mililitros de caldo EC (para coliformes termotolerantes).



10. Incubar los tubos con caldo verde brillante lactosa bilis 2% para la confirmación de coliformes totales.

Incubar los tubos en una estufa a $35 \pm 0,5$ °C durante 24-48 horas.





11. Incubar los tubos de caldo EC, para la confirmación de coliformes termotolerantes en baño María a $44,5 \pm 0,2$ °C durante 24 ± 2 horas.

2.3.5 Lectura

Proceder a la lectura considerando prueba confirmativa positiva para coliformes totales en el caldo verde brillante lactosa bilis 2% y positivo para coliformes termotolerantes en caldo EC a todos los tubos que presentan formación de gas en el tubo Durham. Registrar los resultados.

2.3.6 Presentación de resultados

Expresar como

presencia (o ausencia) de coliformes totales /100 mL

presencia (o ausencia) de coliformes termotolerantes /100 mL

2.4 Método de presencia-ausencia con sustrato enzimático

2.4.1 Introducción

Esta prueba es un procedimiento simplificado para la determinación simultánea de enzimas de coliformes totales y *E. coli* en agua destinada al consumo humano. La *E. coli* es un organismo indicador de contaminación fecal y su determinación reemplaza a la de coliformes termotolerantes. La inclusión de un sustrato hidrolizable cromogénico (productor de color en presencia de enzimas de coliformes) y otro fluorogénico (productor de fluorescencia en presencia de enzimas de *E. coli*) permite la detección de bacterias coliformes totales y de *E. coli*.

La prueba de presencia-ausencia se basa en el análisis de 100 mililitros de muestra, fundamentado en el principio de que en 100 mililitros de agua potable los coliformes deben estar ausentes. Si la prueba es positiva, se debe llevar a cabo una acción inmediata. Se recomienda tomar otra muestra en el mismo punto y efectuar un análisis cuantitativo.

El método de presencia-ausencia con sustrato enzimático es una alternativa para la determinación cualitativa de coliformes totales y *E. coli*. No requiere previo enriquecimiento ni posterior confirmación y es más simple y económico que las técnicas tradicionales de tubos múltiples y filtración con membrana, que son pruebas cuantitativas.

Este método está aceptado por el Standard Methods (American Public Health Association-American Water Works Association, 1999) como una alternativa para el análisis cualitativo de los coliformes totales y *E. coli* en muestras de agua potable y agua de origen subterráneo. El procedimiento descrito a continuación es una versión del *enzyme substrate coliform test* del mencionado manual.

2.4.2 Equipos y material

Para procesar una muestra:

- Un autoclave
- Un horno de aire caliente o estufa para esterilización
- Un destilador de agua
- Un potenciómetro o cinta de pH universal
- Una incubadora a $35 \pm 0,5$ °C
- Un mechero a gas o alcohol
- Una botella transparente no fluorescente de vidrio borosilicato o equivalente con tapa rosca estéril de 100 mililitros
- Un frasco estéril para el muestreo
- Una probeta estéril
- Lámpara de rayos ultravioleta (366 nanómetros de longitud de onda)
- Un comparador de color y de fluorescencia.

2.4.3 Soluciones y medios de cultivo

Para una muestra:

- Sustratos enzimáticos para coliformes totales
 - ❖ orto-nitrofenil-B-D-galactopiranosido (ONPG) o
 - ❖ rojo de clorofenol-B-D-galactopiranosido (CPRG).
- El sustrato enzimático para *E. coli*:
 - ❖ 4-metilumbeliferil-B-D-glucoronido (MUG).

Estos sustratos se consiguen comercialmente.

2.4.4 Procedimiento analítico

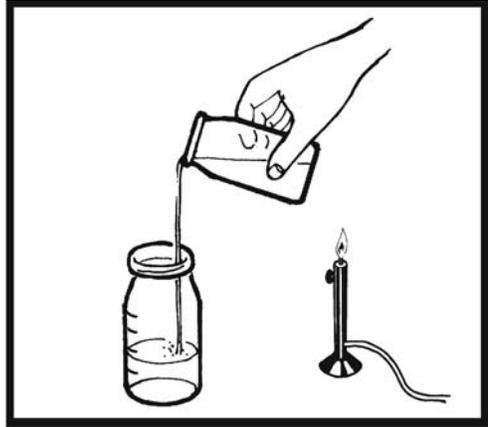


1. Retirar la envoltura de papel del frasco con la muestra.

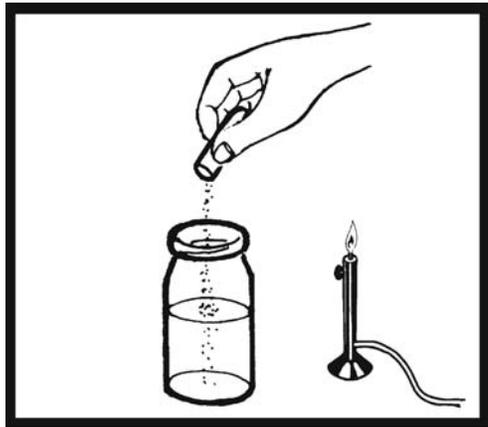


2. Homogeneizar la muestra vigorosamente agitando 25 veces.

3. En condiciones de asepsia, verter la muestra dentro de la botella estéril hasta 100 mililitros. Si el frasco es graduado, incorporar los 100 mililitros de la muestra en forma directa. Si el frasco no es graduado, usar una probeta estéril.



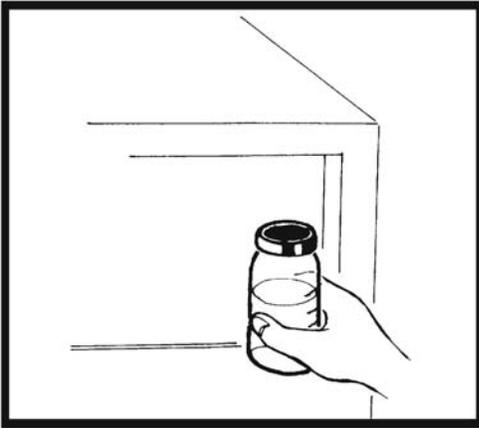
4. Adicionar el reactivo con sustrato enzimático.



5. Colocar la tapa del frasco y mezclar hasta que la mezcla se vuelva uniforme.

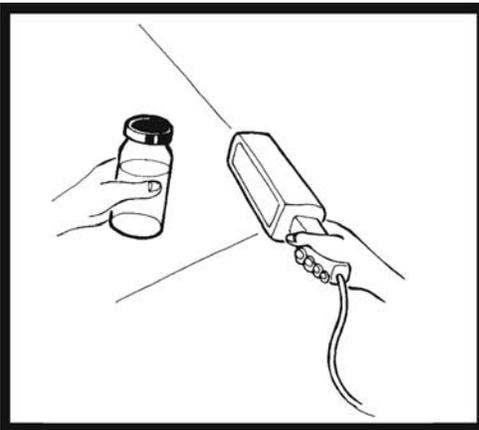
Agitar en forma horizontal y evitar que el medio sembrado llegue a la tapa del frasco.





6. Incubar las botellas en $35 \pm 0,5$ °C por 24 horas.

Para el control de esterilidad del medio, incubar un frasco de medio estéril y continuar el procedimiento como si se tratara de una muestra. El resultado debe ser negativo.



7. Proceder a la lectura. Para el caso de coliformes totales, observar el cambio en el color del medio.

Si la botella es positiva para coliformes totales, verificar la presencia de *E. coli* con una lámpara de luz ultravioleta de 366 nanómetros de longitud de onda en un ambiente oscuro.

2.4.5 Lectura

Dependiendo del sustrato usado para la prueba, la lectura se efectúa como sigue:

1. La prueba es positiva para coliformes totales en las siguientes situaciones:
 - Si el sustrato es ONPG y el medio se torna de color amarillo.
 - Si el sustrato es CPRG y el medio se torna de un color que va de rojo a magenta.
2. La prueba para coliformes totales es negativa en las siguientes situaciones:
 - Si el sustrato es ONPG y el medio no presenta color.
 - Si el sustrato es CPRG y el medio es amarillo.

3. Para determinar la presencia de *E. coli*, todos los tubos positivos para coliformes totales se examinan para fluorescencia usando una lámpara de luz ultravioleta de 366 nanómetros de longitud de onda, contrastando con el comparador disponible comercialmente. La presencia de fluorescencia es positiva para *E. coli*.

2.4.6 Presentación de resultados

Expresar los resultados como:

Presencia (o ausencia) de coliformes totales /100 mL

Presencia (o ausencia) de *E. coli* /100 mL

2.5 Método rápido. Técnica de filtro de membrana con agar m-7 horas FC

2.5.1 Introducción

El procedimiento simplificado con agar m-7 horas para la determinación de coliformes termotolerantes es similar a la técnica de filtro de membrana para coliformes termotolerantes en medio m-FC o agar m-FC, pero permite obtener resultados en siete horas, y la incubación a una menor temperatura facilita la recuperación de los coliformes termotolerantes ($41,5 \pm 0,2$ °C).

Está técnica es aceptada por el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (American Public Health Association-American Water Works Association, 1999). Se propone como una alternativa para la *determinación rápida de coliformes termotolerantes*. Se puede aplicar para valorar la calidad de agua de bebida en situaciones de emergencia. El procedimiento descrito a continuación es una versión simplificada de *Rapid detection methods. Seven hour fecal coliform test (specialized)* (American Public Health Association-American Water Works Association, 1999).

2.5.2 Equipos y material

Calculados para procesar 10 muestras de agua (cantidades aproximadas)

- Un autoclave.
- Un horno de aire caliente o estufa para esterilización.

- Un destilador de agua.
- Un potenciómetro o cinta de pH universal.
- Un equipo de baño María o incubadora estable a $41,5 \pm 0,2$ °C.
- Un sistema de filtración (una bomba de vacío o aspirador manual, 2 frascos erlenmeyer Kitazato de un litro, mangueras de conexión y portafiltros previamente esterilizados).
- 10 frascos de muestreo de vidrio y boca ancha estéril.
- 10 placas de petri de 48 mm X 8,5 mm esterilizadas, identificadas con el número de la muestra, así como el volumen de muestra que va a ser filtrado.
- 10 probetas graduadas de 100 mililitros y estériles, con la abertura recubierta con papel aluminio (si los portafiltros no son graduados).
- Pipetas estériles de 10 y un mililitro (si fuera necesario hacer diluciones de la muestra, una por dilución).
- 10 frascos de dilución de 100 mililitros (si fuera necesario hacer diluciones en alguna de las muestras, se debe aumentar una por dilución).
- Un frasco de boca ancha para colocar las pipetas que han sido utilizadas.
- Una pinza sin dientes.
- 10 filtros de membrana estériles de 47 milímetros de diámetro y una porosidad de 0,45 micrómetros.
- Un mechero de Bunsen para mantener el ambiente aséptico y efectuar la desinfección de las pinzas utilizadas.
- Una lupa o un microscopio estereoscopio según las facilidades con que se cuente.
- Una fuente de luz directa.
- Material para la preparación de medios de cultivo: espátulas, matraces, probetas, etcétera.

2.5.3 Soluciones y medios de cultivo

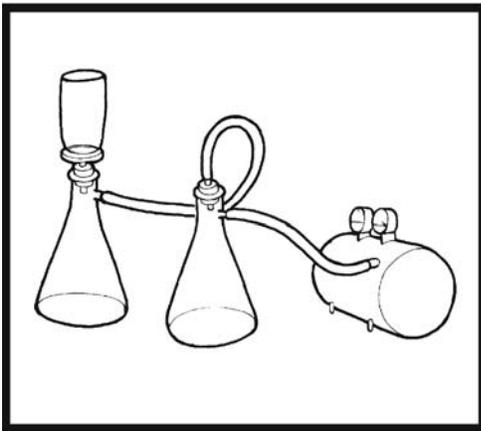
En cantidades aproximadas para 10 muestras:

- 50 mililitros de agar m-7 horas FC. Véase la preparación del medio en el apéndice A.
- 4 litros de agua destilada para la preparación de los medios y agua de dilución.
- Un litro de agua de dilución estéril (preparada a partir de las soluciones *stock* A y B).
- 34 gramos de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) para la preparación de un litro de la solución *stock* A.
- 81,1 gramos de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) para la preparación de un litro de la solución *stock* B.

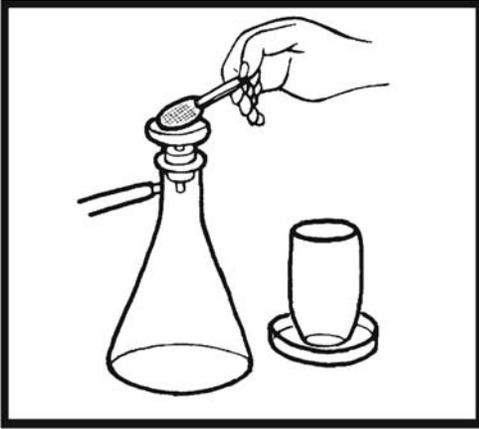
2.5.4 Procedimiento analítico

Preparar el agar m-7 horas FC según las instrucciones (véase el apéndice A) y distribuir con una pipeta estéril 5 mililitros del medio licuado a 45 °C en las placas de petri esterilizadas.

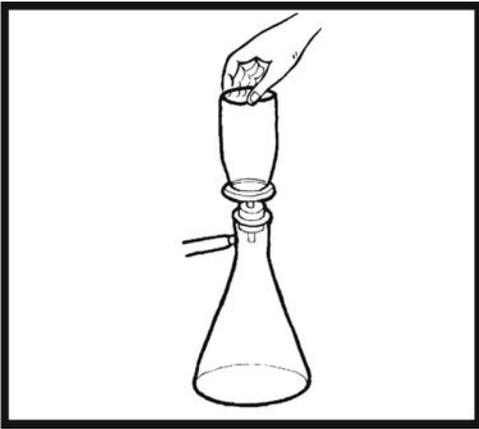
Desinfectar la mesa de trabajo con una solución desinfectante que no deje residuos y colocar sobre la mesa de trabajo el material necesario para ejecutar el análisis.



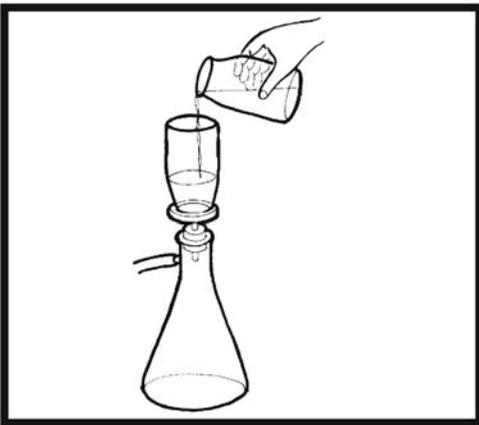
1. Preparar el sistema de filtración según indica la figura. Colocar un matraz de seguridad entre la bomba de vacío y el matraz que sostiene el portafiltros. El portafiltros debe estar estéril y frío.



2. Retirar la parte superior del porta-filtros y, con una pinza previamente flameada al mechero y enfriada, colocar un filtro de membrana estéril, con la cara cuadrículada hacia arriba, centrando sobre la parte superior y central del porta-filtro.



3. Acoplar la parte superior del portafiltros, teniendo cuidado de no dañar la membrana.



4. Verter cuidadosamente en el portafiltros 100 mililitros de agua de dilución estéril y filtrar, a fin de controlar la esterilidad, y seguir las indicaciones como si se tratara de una muestra (pasos del 9 al 13).

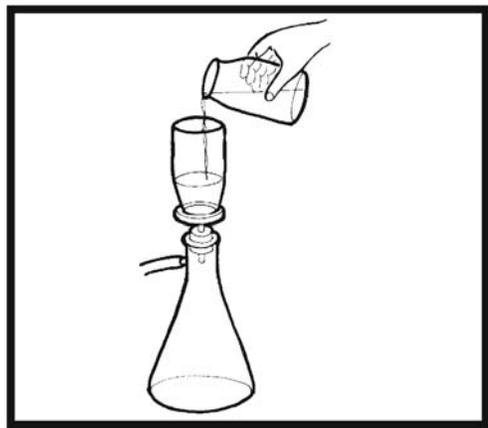
5. Retirar la envoltura de papel del frasco con la muestra.

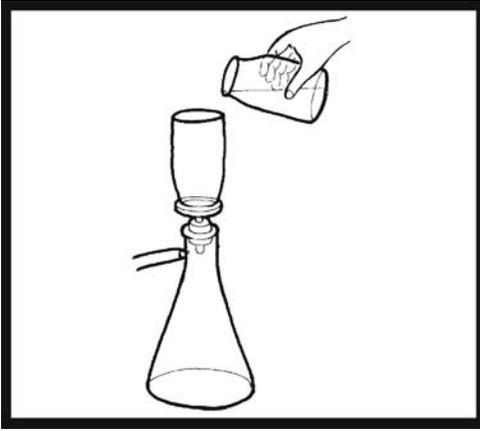


6. Homogeneizar la muestra, agitando un número no menor de 25 veces, inclinando el frasco y formando un ángulo de 45° entre el brazo y el antebrazo.

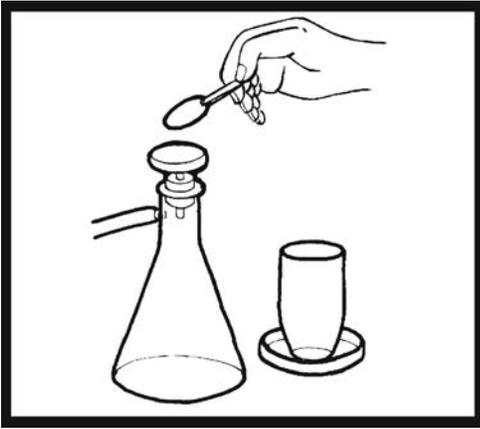


7. Repetir los pasos 2 y 3. Verter en el portafiltros aproximadamente 30 mililitros de agua de dilución estéril y filtrar, a fin de humedecer la membrana. En seguida vaciar 100 mililitros de la muestra de agua de bebida evitando que el agua sobrepase los bordes superiores. El volumen de muestra se medirá en el mismo embudo, si este es graduado; de otro modo, usar una probeta estéril. Conectar a la bomba de vacío para proceder a la filtración.

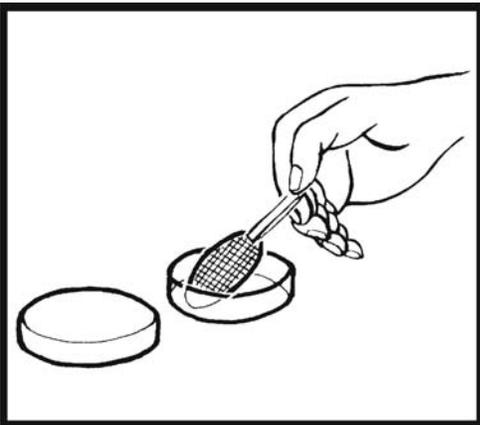




8. Después de la filtración, enjuagar el portafiltros tres veces con porciones de 20-30 mililitros de agua de dilución estéril, para evitar la retención de alguna bacteria en las paredes internas. Apagar la bomba de vacío al finalizar la operación. Evitar que se seque excesivamente el filtro de membrana.



9. Separar la parte superior del portafiltros y, con una pinza previamente flameada, retirar el filtro de membrana cuidando de que la pinza toque apenas su parte periférica, fuera del área de filtración. Acoplar nuevamente la parte superior del portafiltros a la parte inferior.



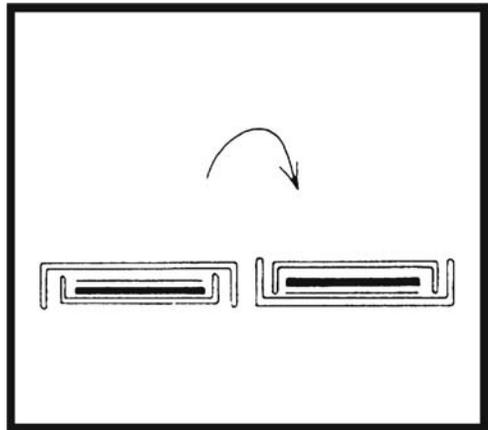
10. Cuidado de no contaminar el filtro de membrana, colocar cuidadosamente la membrana, con la superficie cuadrículada hacia arriba, sobre la superficie del medio de cultivo agar m-7 horas FC.

11. Verificar si se formaron bolsas de aire entre la membrana y el medio de cultivo. Si esto ocurre, levantar con una pinza estéril uno de los bordes del filtro de membrana y, haciendo movimientos circulares, deslizarla con la finalidad de eliminar dichas bolsas, pues ellas impiden el contacto de las bacterias con el medio del cultivo, lo que dificulta o evita su crecimiento.

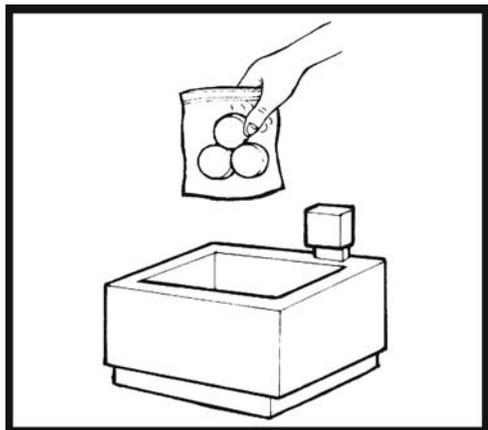


12. Tapar la placa de petri y colocarla en forma invertida; es decir, la tapa hacia abajo.

Identificar la placa.



13. Lavar nuevamente el filtro con agua de dilución estéril y proceder a la siguiente filtración. Los portafiltros deben estar estériles en el inicio de cada serie de filtraciones. Estas series no deben ser usadas para más de 30 muestras y no debe haber un intervalo mayor de 30 minutos entre una filtración y otra. De presentarse el caso, los portafiltros deben ser esterilizados nue-



vamente para evitar una contaminación accidental.¹

Después de la filtración, incubar las placas de petri y colocarlas en posición invertida en bandejas forradas con papel toalla humedecido o poniéndolas en una bolsa de plástico con cierre hermético sumergida en baño María; en ambos casos, a $41,5 \pm 0,2$ °C durante 7 horas.

2.5.5 *Lectura*

1. En el agar m-7 horas FC las colonias típicas de coliformes termotolerantes presentan coloración amarillo claro brillante.
2. Después de la incubación, seleccionar las placas con filtros de membrana que presenten entre 20 y 80 colonias típicas y no más de 200 bacterias de todos los tipos.
3. Con ayuda de una lupa o de un microscopio estereoscopio y con iluminación dispuesta en forma directa a la placa, efectuar el recuento de las colonias típicas en las placas seleccionadas para lectura.

2.5.6 *Presentación de resultados*

1. El número de coliformes termotolerantes en agar m-7 horas FC se hace a partir del recuento de colonias típicas.

¹ La esterilización rápida de los portafiltros puede efectuarse mediante los siguientes procedimientos: exponerlos a radiación ultravioleta durante dos minutos o sumergirlos en agua hirviendo por cinco minutos. Es necesario controlar la esterilidad de cada portafiltros usado para una serie de filtraciones. Para ello es necesario efectuar la filtración de una muestra de 100 mililitros de agua de dilución estéril, antes y durante la filtración de las muestras; puede ser cada 10 muestras procesadas en un mismo portafiltros o según el número de muestras que indique el programa de control de calidad.

2. El recuento se expresa de la siguiente forma:
unidades formadoras de colonias de coliformes termotolerantes por 100 mL
(UFC de coliformes termotolerantes/100 mL)
3. El recuento de coliformes termotolerantes se calcula a partir del número de colonias típicas que se desarrollen en el filtro de membrana y del volumen de la muestra filtrada aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC de coliformes termotolerantes / 100 mL} = \frac{\text{N.}^\circ \text{ de colonias típicas}}{\text{Volumen filtrado de muestra (mL)}} \times 100$$

Casos especiales:

- a) Cuando la suma total de colonias (típicas y atípicas) es superior a 200, el resultado final se expresa como conteo perjudicado (CP).
- b) Cuando hubo crecimiento en toda el área de filtración de membrana, sin colonias bien definidas, el resultado final se expresa como crecimiento confluyente (C.Cf.).
- c) Cuando se presentan colonias típicas de coliformes y un crecimiento confluyente, el resultado se expresa como presencia de coliformes y conteo perjudicado debido a crecimiento confluyente.

En los casos especificados para el conteo perjudicado y crecimiento confluyente, se debe solicitar una nueva muestra y seleccionar menores volúmenes de muestra para la filtración. De esta manera, para aguas tratadas, una filtración de 100 mililitros puede ser sustituida por dos filtraciones de 50 mililitros o cuatro de 25 mililitros.

3. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS BÁSICOS

El laboratorio central y los laboratorios periféricos que atiendan la demanda de análisis de un programa de vigilancia de la calidad del agua de bebida requieren tener implementados, por lo menos, los métodos para la determinación del cloro residual, el pH y la turbiedad. Estas pruebas de laboratorio también servirán para controlar la validez de las lecturas efectuadas en los equipos de campo mediante una prueba de control de una muestra y la comparación de los datos obtenidos con el método de laboratorio y el equipo de campo.

3.1 *Determinación de cloro residual. Método de titulación con DPD*

3.1.1 *Introducción*

En la cloración del agua se producen dos tipos de cloro residual, el libre y el combinado. El cloro residual libre es un agente oxidante más activo y de acción bactericida más lenta que el cloro residual combinado.

El método de titulación con DPD se fundamenta en que en ausencia del ion yoduro, el cloro libre reacciona instantáneamente con la N, N-dietil-1,4-fenilendiamina (DPD) y forma un compuesto de color rojo, en un rango de pH de 6,2 a 6,5. Para determinar el cloro residual total (cloro residual libre más cloro residual combinado), se añade el yoduro en exceso al inicio de la prueba.

El método de titulación con DPD es recomendable para concentraciones entre 0,03 mg/L y 5 mg/L de cloro total; si la concentración es más alta, la muestra debe ser diluida.

El método por titulación con DPD está aceptado por el Standard Methods (American Public Health Association-American Water Works Association, 1999). La siguiente es una versión simplificada del Standard Methods y de los procedimientos normalizados de operación del laboratorio del CEPIS/OPS (2002b).

3.1.2 *Equipos, materiales e insumos*

Balanza analítica con precisión de 0,1 mg.

Materiales de vidrio y otros

- Probetas y frascos volumétricos de 500 y 1.000 mL.
- Frascos de vidrio ámbar de 250 mL.
- Espátulas para dosificar los cristales.
- Erlenmeyer de 300 mL.
- Pipetas automáticas de seguridad o pipetas con bombilla, para dosificar los reactivos de DPD y soluciones amortiguadoras.
- Pipetas volumétricas.

3.1.3 Reactivos y soluciones

Solución tampón de fosfato. Para los patrones permanentes de color

Disolver 24 gramos de Na_2HPO_4 anhidro y 46 gramos de KH_2PO_4 anhidro en agua destilada. Combinar esta solución con 100 mililitros de agua destilada en la cual se han disuelto 800 miligramos de disodio-etilendiamina-tetracetato-dihidrato (EDTA). Agregar agua destilada hasta alcanzar un volumen de 1.000 mililitros. Para preservar la solución, añadir 20 miligramos de HgCl_2 (manipular con cuidado porque es sumamente tóxico).

Solución indicadora de DPD

Disolver 1,0 gramos de oxalato de DPD (manipular con cuidado: es sumamente tóxico) en agua destilada a la cual se han añadido 8 mililitros de H_2SO_4 concentrado 1 + 3 y 200 miligramos de EDTA disódico. Diluir con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 1.000 mililitros. Guardar la solución en un frasco ámbar y almacenar en la oscuridad.

Solución titulante de sulfato amónico ferroso (FAS), 0,0028 N

Disolver 1,106 gramos de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ en agua destilada a la cual se ha añadido un mililitro de H_2SO_4 concentrado 1 + 3 y enrasar con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 1.000 mililitros en un frasco volumétrico de un litro. Guardar esta solución como máximo un mes.

Solución madre de dicromato potásico ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), 0,2500 N

Disolver 12,259 gramos de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en agua destilada. En un frasco volumétrico de 1.000 mililitros diluir con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 1.000 mililitros.

Solución patrón de dicromato potásico ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), 0,0250 N

Para los patrones permanentes de color

Con una pipeta, tomar 50,00 mililitros de la solución madre de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en un frasco volumétrico de 500 mililitros y enrasar con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 500 mililitros.

Solución indicadora de difenilaminasulfonato de bario, 0,1%

Disolver 0,1 gramos de $(\text{C}_6\text{H}_5\text{NHC}_6\text{H}_4\text{-4-SO}_3)_2\text{Ba}$ en 100 mililitros de agua destilada.

Cristales de yoduro de potasio (KI)

3.1.4 Procedimiento analítico

Es preferible analizar el cloro residual inmediatamente después de la toma de muestra. Recolectar la muestra en frascos de vidrio o de polietileno. No agitar ni exponer al calor ni a la luz brillante.

Calibración del método

- Estandarizar la solución de sulfato amónico ferroso (solución titulante).
- Colocar 100 mililitros de la solución titulante en un erlenmeyer de 300 mililitros.
- Añadir 10 mililitros de H_2SO_4 concentrado 1 + 5 y 5,0 mililitros de H_3PO_4 concentrado y mezclar la solución.
- Añadir 2 mililitros de solución indicadora de difenilaminasulfonato de bario.
- Agitar la solución y titular con la solución patrón de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,0250 N hasta el punto final de equivalencia; es decir, cuando se forma un color violeta que cambia después de 30 segundos.

Determinación de cloro residual total (cloro libre y combinado)

- En un erlenmeyer de 300 mililitros agregar 5 mililitros de la solución tampón y 5 mililitros de solución indicadora de DPD.
- Añadir 100 mililitros de muestra (o diluciones con agua destilada) hasta obtener un volumen de 100 mililitros. Las diluciones asegurarán que la concentración de cloro no exceda 5 mg/L. Mezclar la solución.
- Añadir un gramo de cristales de KI y disolver.
- Dejar la mezcla en reposo durante dos minutos.
- Agitar (continuamente) la solución y titular inmediatamente con la solución titulante hasta que desaparezca el color rojo. Efectuar la observación sobre una superficie blanca. Anotar el gasto total del titulante en mililitros ($= V_t$).

Determinación de cloro residual libre y combinado

- Agregar 5 mililitros de solución tampón y 5 mililitros de solución indicadora de DPD en un erlenmeyer de 300 mililitros y mezclar.

- Añadir 100 mililitros de muestra o una porción menor diluida (diluciones con agua destilada hasta obtener un volumen de 100 mililitros, para asegurar que la concentración de cloro no exceda 5 mg/L) y mezclar la solución.
- Sobre una superficie blanca, agitar continuamente la solución y titular rápidamente con la solución titulante FAS hasta que desaparezca el color rojo. Este es un primer punto de equivalencia. Anotar el gasto total del titulante en mililitros ($= V_1$).
- Añadir alrededor de un gramo de cristales de KI y mezclar para disolver.
- Dejar la mezcla en reposo durante dos minutos.
- Continuar la titulación con el FAS hasta que el color rojo vuelva a desaparecer. Este es el punto final de equivalencia. Anotar el gasto total del titulante en mililitros ($= V_2$).

3.1.5 Presentación de resultados

Cálculo de la concentración de cloro residual total y libre

- **Cálculo de la normalidad de la solución titulante FAS**

Calcular la normalidad N de la solución titulante de la siguiente manera:

$$N = \frac{N_p \times V_p}{V_t}$$

Donde:

- N = normalidad del titulante FAS en meq/mL
 N_p = normalidad del patrón de $K_2Cr_2O_7$ en meq/mL ($= 0,0250$ N)
 V_p = volumen titulado del patrón de $K_2Cr_2O_7$ en mL
 V_t = volumen del titulante FAS en mL ($= 100$ mL)

Nota: Se promedian las normalidades resultantes de las dos estandarizaciones.

- **Cálculo del cloro residual**

Calcular el contenido de las diferentes formas del cloro residual con la fórmula siguiente:

$$C = \frac{V \times N \times 35,450}{V_m}$$

- C = concentración de la forma reactiva de cloro en la muestra en mg de Cl_2/L .
- V = volumen (calculado) de FAS para la muestra en mL. Véase el cuadro 5.5.
- N = normalidad calculada del titulante de FAS en meq/mL.
- V_m = volumen de la muestra en mL.

Expresar el cloro residual en mg de Cl_2/L .

Cuadro 5.5
Volumen V del titulante FAS

Forma reactiva de Cl	V (mL)
Cloro residual total	V_t
Cloro libre	V_1
Cloro combinado	$V_t - V_1$

3.2 *Determinación de cloro libre residual y combinado* *Método colorimétrico con ortotolidina-arsenito (OTA) por comparación visual*

3.2.1 *Introducción*

En el método colorimétrico con ortotolidina-arsenito (OTA), el cloro libre residual reacciona directamente con la ortotolidina y forma un compuesto de color amarillo. La lectura se efectúa comparando la intensidad del color amarillo producida en la reacción con una escala de estándares. La intensidad del color amarillo que desarrolla el compuesto es proporcional a la concentración de cloro.

Con esta técnica se obtienen valores del cloro total, el cloro libre, el cloro combinado y también de las interferencias por color.

La siguiente es una versión simplificada del método de la medición de cloro residual con ortotolidina-arsenito publicada en el Standard Methods (American Public Health Association-American Water Works Association, 1960), de la publicada por Romero (1999) y de *Procedimientos simplificados para el examen de aguas* (OPS, 1978).

3.2.2 Equipos, materiales e insumos

La comparación visual de la reacción del cloro residual con ortotolidina puede hacerse con un comparador de color (compensando color y turbiedad) o medirse con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 400 a 490 nanómetros y una trayectoria de luz de un centímetro.

3.2.3 Reactivos y soluciones

Agua destilada libre de sustancias oxidantes y reductoras, y de demanda de cloro (AD).

Solución tampón de fosfato

Para obtener la solución tampón concentrada, pesar 22,86 gramos de Na_2HPO_4 anhidro y 46,16 gramos de KH_2PO_4 ; colocar ambas pesadas en un vaso de precipitado de 1.000 mililitros y disolver en 600 mililitros de agua destilada. Trasvasar la solución en un frasco volumétrico o en un matraz aforado de 1.000 mililitros. Lavar tres veces el vaso de precipitado; emplear en cada lavada 100 mililitros de agua destilada. Agregar el producto de las tres lavadas al frasco volumétrico. Enrasar hasta alcanzar el volumen de 1.000 mililitros. Tapar y mezclar cuidadosamente. Dejar reposar y filtrar la solución antes de usarla. Para preparar los estándares o patrones permanentes de color, usar la solución tampón de fosfato diluida.

Para obtener la solución tampón diluida, con una pipeta volumétrica medir 50 mililitros de la solución tampón de fosfato concentrada, trasvasarla a un frasco volumétrico de 500 mililitros y enrasar con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 500 mililitros. Tapar y mezclar cuidadosamente.

Solución madre de cromato ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_5$)-dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), 0,2500 N

Pesar 1,55 gramos de dicromato de potasio y 4,65 gramos de cromato de potasio y colocarlos en un vaso de precipitado de 500 mililitros. Disolver en 300 mililitros de agua de solución tampón de fosfato. Verter la solución y el producto de las tres lavadas en un frasco volumétrico de 1.000 mililitros. Lavar tres veces el vaso de precipitado; emplear en cada lavada 100 mililitros de agua destilada. Diluir con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 1.000 mililitros.

Solución diluida de cromato-dicromato de potasio

Para los patrones permanentes de color

Con una pipeta volumétrica, medir 50,00 mililitros de la solución madre de cromato-dicromato antes descrita. Trasvasarla a un frasco volumétrico de 500 mililitros y enrasar con la solución tampón de fosfato hasta alcanzar un volumen de 500 mililitros.

Preparación del reactivo de ortotolidina

Disolver 1,35 gramos de dihidrocloruro de ortotolidina en 500 mililitros de agua destilada. Añadir esta solución (agitando constantemente) a una mezcla de 350 mililitros de agua destilada y 150 mililitros de HCl concentrado. No se recomienda el uso de ortotolidina base en la preparación de este reactivo.

Una vez preparado el reactivo, protegerlo de la acción de la luz, guardarlo en un frasco ámbar o en la oscuridad a la temperatura de la habitación y almacenarlo un máximo de seis meses. Se debe manejar la ortotolidina con extremo cuidado, nunca pipetearla con la boca y evitar la inhalación o la exposición a la piel.

Reactivo de arsenito de sodio

Disolver 5 gramos de arsenito de sodio, NaAsO_2 , en agua destilada y llevar a un litro. Manejar el arsenito de sodio con extremo cuidado y tomar las medidas necesarias para evitar la ingestión.

Estándares o patrones permanentes de color

Se recomienda usar los estándares con garantía de calidad disponibles en el mercado. También se pueden preparar estándares en el laboratorio, pero se requiere una extrema precisión en la preparación de cada uno de los reactivos.

Para la preparación de los estándares o patrones permanentes de color, se recomienda seguir el siguiente procedimiento:

Preparar las siguientes series midiendo los volúmenes de la solución diluida de cromato-dicromato de potasio que figuran en la tabla de la siguiente página. Trasvasar el volumen seleccionado en tubos de Nessler de 100 mililitros y llevarlo a 100 mililitros con la solución diluida de tampón de fosfato, tapar el tubo y mezclar bien, por lo menos 10 veces por inversión.

Estos patrones pueden almacenarse por varios meses, para lo cual los tubos deben ser tapados con tapones de caucho.

Cuadro 5.6
Estándares o patrones permanentes de color de cloro residual

Solución diluida de cromato-dicromato (mL)	Equivalente de cloro (mg/L)
0	0
1	0,01
2	0,02
5	0,05
7	0,07
10	0,10
15	0,15
20	0,20
25	0,25
30	0,30
35	0,35
40	0,40
45	0,45
50	0,50
60	0,60
70	0,70
80	0,80
90	0,90
100	1,0

A partir de la serie de patrones que figuran en la tabla, se pueden preparar patrones de menor valor que se adecúen a concentraciones de cloro residual diferentes de las que figuran en la tabla.

3.2.4 Procedimiento analítico

A continuación se describe la técnica de laboratorio de ortotolidina-arsenito por comparación visual. Esta prueba también puede leerse en un espectrofotómetro, para lo cual se requiere una mayor inversión en equipos. En esta técnica las lecturas se hacen tomando como referencia las curvas de calibración preparadas sobre la base de concentraciones de cloro conocidas.

Método colorimétrico con ortotolidina-arsenito (OTA) por comparación visual

El ensayo se realiza con un comparador y con tres celdas. Usar el mismo volumen del reactivo de arsenito y de ortotolidina. De cada uno de los reactivos, usar 0,5 mililitros en celdas de 10 mililitros y 0,75 mililitros en celdas de 15 mililitros.

Etiquetar tres celdas con las letras *A*, *B* y *C*.

En la celda A, que contiene el reactivo de ortotolidina, adicionar un volumen medido de la muestra de agua de acuerdo con el tamaño de la celda. Mezclar rápidamente y, de inmediato, en un tiempo máximo de cinco segundos, agregar reactivo de arsenito. Volver a mezclar rápidamente y en seguida comparar con el color de los estándares. Anotar los resultados. El valor *A* representa el cloro libre y las interferencias de color.

OT + muestra + arsenito de Na — lectura inmediata → Cl + interferencias rápidas de color

En la celda B, que contiene el reactivo de arsenito, adicionar un volumen de la muestra de agua. Mezclar rápidamente y agregar el reactivo de ortotolidina. Volver a mezclar rápidamente y en seguida comparar con el color de los estándares. Anotar los resultados como valor *B*₁. Después de 5 minutos (exactos), comparar nuevamente con los estándares. Anotar los resultados como valor *B*₂. Los valores obtenidos representan la interferencia de color inmediata *B*₁ y, a los 5 minutos, *B*₂.

Arsenito + muestra + OT — lectura inmediata → interferencias rápidas
— lectura a los 5 minutos → interferencias rápidas y lentas

En la celda C, que contiene el reactivo de ortotolidina, adicionar un volumen de la muestra de agua. Mezclar rápidamente y a los 5 minutos (exactos) comparar con el color de los estándares. Anotar los resultados como valor *C*. El valor obtenido *C* representa el cloro residual total y el total de las interferencias de color.

OT + muestra — lectura a los 5 minutos → CT + CC + interferencias rápidas y lentas

De las lecturas se obtiene:

$$\text{Cloro residual total} = C - B_2$$

$$\text{Cloro libre residual} = A - B_1$$

$$\text{Cloro combinado} = \text{cloro total residual} - \text{cloro libre residual}$$

3.2.5 Presentación de resultados

Expresar el cloro total, el cloro libre residual y el combinado en mg/L.

3.3 *Determinación de pH. Método electrométrico*

3.3.1 *Introducción*

Los valores de pH miden la intensidad de la acidez y la alcalinidad del agua. La escala del pH de las aguas naturales está entre 6,0 y 8,5. Si un agua tiene pH 7, está en el punto medio de la escala y se considera que tiene un pH neutro. El valor del pH tiene importancia en los procesos de tratamiento como la cloración, la coagulación, el ablandamiento y el control de la corrosión.

El método electrométrico se fundamenta en la determinación de la actividad de los iones hidrógeno por medio de una medición potenciométrica.

Es conveniente que la medición del pH se efectúe en el campo. De este modo, se evita la alteración de muestra. Si las muestras tienen que ser transportadas a un laboratorio, serán colectadas en frascos de vidrio o de polietileno rigurosamente lavados. Se recomienda analizar la muestra inmediatamente después de su recolección. De lo contrario, se la debe conservar a 4 °C por un tiempo máximo de dos horas.

El método electrométrico está aceptado por el Standard Methods (American Public Health Association-American Water Works Association, 1999). La siguiente es una versión simplificada del procedimiento del Standard Methods y de los procedimientos normalizados de operación del laboratorio del CEPIS/OPS (2002a).

3.3.2 *Equipos, materiales e insumos*

Potenciómetro. El potenciómetro tiene un electrodo de vidrio selectivo de ion hidrógeno cuyo voltaje fluctúa con el pH del agua y un electrodo referencial de calomel que proporciona un voltaje estable y constante. Este electrodo se compara con el voltaje del electrodo de vidrio selectivo de ion hidrógeno. En la mayoría de los casos, es suficiente una precisión de $\pm 0,05$ unidades de pH y un valor hasta el primer decimal.

Agitador magnético. Barra agitadora magnética recubierta con teflón o un agitador mecánico.

Materiales

Todos los frascos y materiales de vidrio o polietileno utilizados para la prueba deben ser cuidadosamente lavados y no deben tener rayas ni imperfecciones. El material se lava del siguiente modo:

- Lavar con solución de detergente especial (por ejemplo, extrán alcalino).
- Enjuagar minuciosamente con abundante agua de grifo.
- Remojar toda la noche en una solución de ácido sulfúrico al 10%.
- Enjuagar con agua de grifo y finalmente con agua destilada.
- Secar en la estufa a 50 °C.

Frascos de vidrio. Para el muestreo, se recomienda el uso de frascos de vidrio o polietileno.

Vasos de precipitado. Preferiblemente, vasos de vidrio o polietileno.

3.3.3 Reactivos y soluciones

Soluciones amortiguadoras patrón. Soluciones o cápsulas de pH 4,00; 7,00 y 9,00. Se disuelve la cápsula en agua destilada y se diluye al volumen especificado por el fabricante. Guardar la solución en un frasco de polietileno. Se puede almacenar por tres a cuatro semanas. Si se observa una turbiedad anormal, se debe descartar la solución.

Soluciones auxiliares. NaOH 0,1 N; HCl 0,1 N; HCl 5 N.

3.3.4 Procedimiento analítico

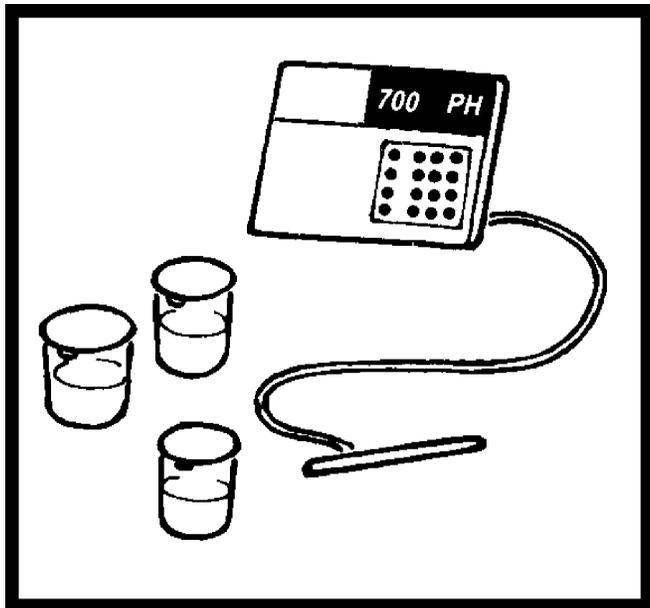
Antes de proceder al análisis, verificar las condiciones del equipo porque pueden producirse errores de medición debido a fallas mecánicas o eléctricas; por ejemplo, batería baja, electrodos deteriorados o muy antiguos, electrodos con restos de sustancias aceitosas o partículas.

Calibración del equipo

- Conectar el electrodo de pH combinado al potenciómetro, seleccionar el modo pH y calibrar ajustando el pH al de las soluciones amortiguadoras patrón; primero, la de pH 7, 4 y 9.
- La tecnología ha logrado obtener potenciómetros con sistemas de autocalibración y compensación de temperatura.

Análisis de la muestra

- Calibrar el equipo antes de proceder al análisis de la muestra. En seguida, enjuagar el electrodo de medición de pH con agua destilada y secarlo con un papel suave.
- Colocar la muestra en un vaso de precipitado e introducir el electrodo de tal manera que el área sensible esté completamente sumergida en la muestra.
- Agitar suavemente la muestra con el auxilio de un agitador magnético a fin de asegurar su homogeneidad. La agitación debe ser suave para reducir al mínimo el arrastre de dióxido de carbono. Esperar hasta que en el medidor se presente una lectura estable.
- Después de medir el pH de la muestra, guardar los electrodos en agua destilada o alguna solución de almacenamiento hasta su siguiente uso.



Potenciómetro de laboratorio

3.3.5 Presentación de resultados

Los resultados se expresan en unidades de pH y un valor de hasta un decimal. Se debe reportar la temperatura en la que se efectuaron las mediciones.

3.4 Determinación de la turbiedad. Método nefelométrico

3.4.1 Introducción

La turbiedad del agua se origina en la presencia de partículas insolubles de arcilla, limo, materia mineral, partículas orgánicas de diferente origen, plancton y otros organismos microscópicos que impiden el paso de la luz a través del agua. Una turbiedad mayor de 5 UNT es perceptible para el consumidor y proporciona una guía para la producción de agua aceptable para el consumo humano.

Es conveniente que la medición de la turbiedad se efectúe en el campo. Si no es posible, se debe tomar la muestra y analizarla antes de transcurrido un lapso de 24 horas. De este modo, se evita la alteración de las partículas suspendidas.

El método nefelométrico se fundamenta en la comparación entre la intensidad de la luz dispersada por una muestra de agua y la de una suspensión patrón de polímero formazina. Este procedimiento se recomienda como un método de laboratorio dirigido a determinar la turbiedad en el agua para consumo humano y a analizar muestras de agua sin sedimentos que se depositen rápidamente. El método nefelométrico está aceptado por el Standard Methods (American Public Health Association-American Water Works Association, 1999). La siguiente es una versión simplificada del procedimiento del Standard Methods y de los procedimientos normalizados de operación del laboratorio del CEPIS/OPS (2002c).

3.4.2 Equipos, materiales e insumos

Equipos

Un turbidímetro con una sensibilidad de detección de diferencias de turbiedad de 0,02 UNT o menos, con rango inferior a cero.

Equipo de filtración.

Materiales

Todos los frascos y materiales de vidrio utilizados para la prueba deben ser lavados cuidadosamente y no deben tener rayas ni imperfecciones.

Celdas o tubos de medición. Pueden ser de vidrio o de plástico transparente o incoloro. Deben permanecer muy limpios por dentro y por fuera, y si están deteriorados, deben ser descartados.

Frascos de vidrio. Para el muestreo, se recomienda usar frascos de vidrio transparente, de un litro de capacidad, de boca angosta y con tapón de cristal.

Frascos de vidrio volumétrico o fioles de 100 mL

Una probeta graduada de 1.000 mL para la preparación de las diluciones de las muestras y para diluir los patrones de turbiedad.

Pipetas volumétricas de 5 mL y 10 mL

Membranas de filtración de 0,1 μm

3.4.3 Reactivos y soluciones

Agua de dilución. Con un valor nominal de 0,02 UNT, que se obtiene filtrando el agua destilada a través de una membrana de filtración de 0,1 μm . Enjuagar el frasco colector dos veces con el agua filtrada y desechar los primeros 200 mililitros.

Suspensiones patrón de formazina

Suspensión primaria

Solución 1

Disolver un gramo de sulfato de hidracina $(\text{NH}_2)_2\text{H}_2\text{SO}_4$ en agua, colocar en una fiola de 100 mililitros y aforar.

Solución 2

Disolver 10 gramos de hexametenetetramina $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4$ en agua, colocar en una fiola de 100 mililitros y aforar con agua.

Preparación de la suspensión primaria

En un frasco mezclar:

5 mililitros de la solución 1 y 5 mililitros de la solución 2.

Colocar la mezcla en una botella de vidrio ámbar.

La turbiedad de esta suspensión es de 4.000 UNT y puede permanecer estable hasta un año, si se almacena en forma apropiada.

Suspensiones intermedias

Diluir la suspensión patrón primaria de 4.000 UNT con agua de dilución. Preparar las suspensiones intermedias antes de usarlas, no guardarlas preparadas.

Según las características del agua que se esté analizando, para la determinación de la turbiedad se pueden preparar las siguientes diluciones:

Suspensión patrón de 400 UNT. Con una alícuota de 10 mililitros de la suspensión patrón primaria de formazina, colocar en una fiola de 100 mililitros y aforar con agua de dilución.

Suspensión patrón de 40 UNT. Con una alícuota de 10 mililitros de la suspensión patrón primaria de formazina de 400 UNT, colocar en una fiola de 100 mililitros y aforar con agua de dilución.

Suspensión patrón de 4 UNT. Con una alícuota de 10 mililitros de la suspensión patrón primaria de formazina de 40 UNT, colocar en una fiola de 100 mililitros y aforar con agua de dilución.

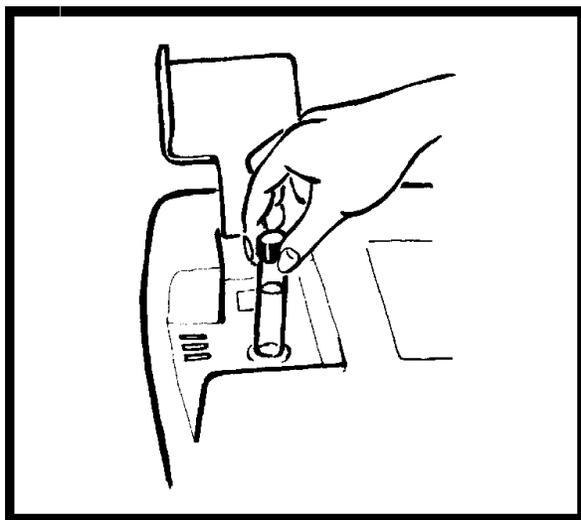
3.4.4 Procedimiento analítico

- Antes de proceder al análisis, verificar las condiciones del material, en especial el estado y limpieza de las celdas.
- Calibrar el turbidímetro con estándares secundarios (Gelex) que se venden comercialmente; por ejemplo, suspensiones de microesferas de copolímero divinilo-estireno o suspensiones comerciales estándar de formalina u otras que se expenden en presentaciones selladas y que ofrecen garantía. Se debe recalibrar el equipo con formazina por lo menos una vez cada seis meses y calibrarlo en caso de que la lectura de uno de los estándares secundarios de Gelex se encuentre fuera del rango.

Para la medición de la turbiedad, proceder del siguiente modo:

- ❖ Agitar la muestra y esperar a que las burbujas de aire desaparezcan. En el caso de que la muestra tenga una turbiedad mayor de 4.000 UNT, se efectuarán diluciones con agua destilada.
- ❖ Enjuagar la celda limpia tres veces con un volumen pequeño de muestra, verter la muestra hasta la línea (aproximadamente 30 mililitros) y tapar la celda.
- ❖ Con un papel toalla, limpiar cuidadosamente la parte exterior de la celda para eliminar el agua y las huellas digitales. Aplicar una pequeña cantidad de aceite de silicona. Retirar el exceso. Coger la celda sólo por la parte superior.

- ❖ Colocar las celdas en el compartimiento del equipo y cerrar la cubierta.



Leer directamente en el turbidímetro. Seguir el manual de operaciones del equipo.

3.4.5 Presentación de resultados

Los resultados se expresan en unidades nefelométricas de turbiedad, UNT.

Reportar las lecturas con los siguientes valores de precisión:

Cuadro 5.7
Valores de precisión según el rango de turbiedad

Rango de turbiedad UNT	Precisión
0 a 1,0	0,05
1 a 10	0,1
10 a 40	1
40 a 100	5
100 a 400	10
400 a 1.000	50
Mayor de 1.000	100

En el caso de que se trabaje con diluciones, calcular la UNT mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Turbiedad en UNT} = \frac{\text{Lectura en la muestra diluida} \times \text{volumen final de dilución en mililitros}}{\text{Volumen en mililitros de la muestra considerada para la dilución}}$$

CAPÍTULO 6

MEDICIONES DE CAMPO

1. DETERMINACIÓN DE INDICADORES DE CALIDAD SANITARIA DEL AGUA: COLIFORMES TOTALES Y TERMOTOLERANTES

1.1 Introducción

Para efectuar las pruebas de campo de los coliformes totales y termotolerantes, los técnicos requieren un entrenamiento mínimo sobre la forma en que deben tomar la muestra, sobre el procedimiento de análisis de campo y la identificación de las colonias correspondientes a los indicadores bacteriológicos seleccionados.

La experiencia indica que es conveniente proporcionar a los técnicos el procedimiento por escrito, la ficha e identificación de la muestra, la ficha de reporte de datos y fotografías de los tipos de colonias que deben identificar. Estas colonias tienen características específicas según el medio de cultivo usado en el análisis y de acuerdo con el reactivo indicador, lo cual permitirá diferenciarlas de las otras colonias que también pueden crecer en los diferentes medios de cultivo.

1.2 Mediciones de campo

Como recomendación general, el análisis bacteriológico de agua potable debe efectuarse en un plazo máximo de 30 horas después del muestreo, pero en algunos casos, la muestra se toma en lugares distantes del laboratorio y existen inconvenientes para trasladarla a tiempo, por lo que se hace necesario el uso de los equipos de campo.

Con las pruebas de campo se eliminan los problemas de supervivencia o excesiva reproducción de los diferentes tipos de microorganismos que pueden estar presentes en el agua, problema que puede presentarse durante el transporte de la muestra en un tiempo mayor de 30 horas. Estas pruebas de campo también son útiles en los lugares donde se carece de corriente eléctrica o esta llega en forma discontinua y donde no es posible instalar un laboratorio.

En el mercado se presenta una variedad de modelos de equipos de campo diseñados para el análisis bacteriológico con las técnicas analíticas clásicas como la membrana de filtración, el Número Más Probable por tubos múltiples y las pruebas de presencia-ausencia. También se expenden medios de cultivo preparados y dispuestos en viales y ampollas, entre otras formas. Los medios también pueden ser preparados en un laboratorio y dispensados en volúmenes apropiados para el trabajo en el campo; de este modo, se evita la sobreexposición. La preparación de los medios de cultivo figura en el apéndice A.

En cuanto a las técnicas analíticas aplicables en el campo, se recomienda la filtración con membrana para aguas claras, principalmente para agua de consumo humano y aguas subterráneas; la técnica del Número Más Probable por tubos múltiples para aguas turbias, como las fuentes de agua de origen superficial; y la prueba de presencia-ausencia para agua de consumo humano.

Los equipos de campo diseñados para el análisis bacteriológico están acondicionados para medir los indicadores de calidad del agua: coliformes totales, coliformes termotolerantes y *E. coli*, de acuerdo con la temperatura de la incubadora portátil y el medio de cultivo que se utilice.

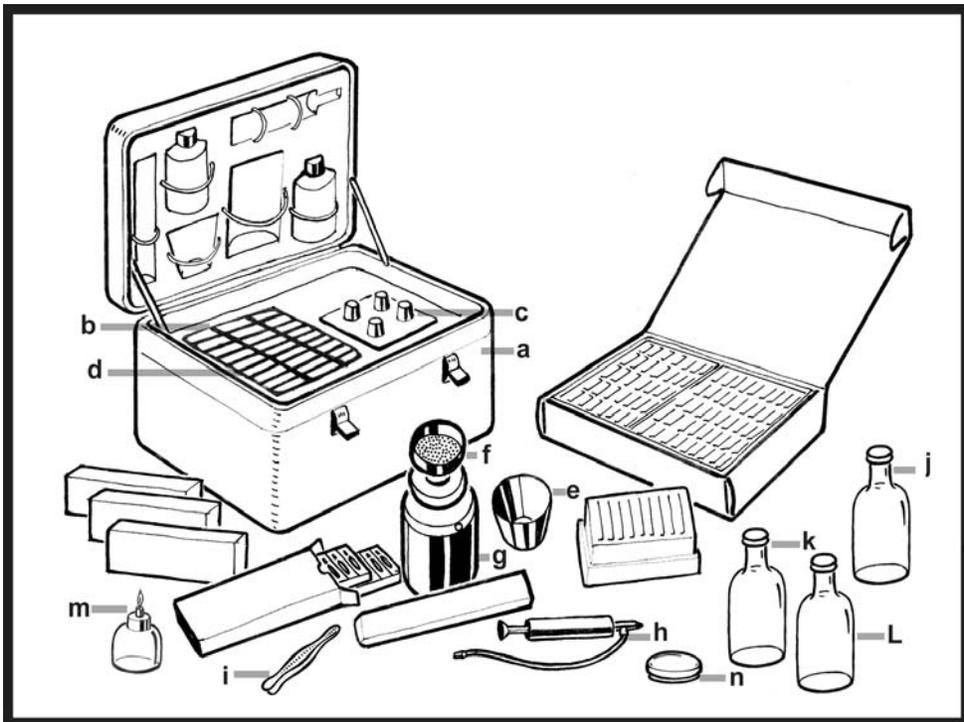
En vista de que las pruebas se efectúan en el campo, el técnico tendrá la precaución de llevar todo el material necesario, para lo cual se recomienda tener una lista de materiales donde se incluirá todo lo necesario para el muestreo: etiquetas, fichas de muestreo, material para el análisis en el campo, material para las pruebas de control de calidad (blancos y duplicados), etiquetas, lapiceros de tinta indeleble, etcétera.

1.2.1 Técnica de filtro de membrana

Un equipo de campo diseñado para la evaluación bacteriológica por la técnica de filtración con membrana puede estar acondicionado para la evaluación de solo coliformes totales o solo coliformes termotolerantes. En el mercado también se pueden encontrar equipos y medios de cultivo en los que se pueden analizar, al mismo tiempo, coliformes totales, coliformes termotolerantes y *E. coli*. En general, un equipo de campo

para el análisis de coliformes por la técnica de filtración con membrana consta de las siguientes partes (OMS, 1988):

- Un estuche protector resistente a sustancias químicas (*a* en el gráfico).
- Una incubadora portátil (*b*) que debe garantizar una temperatura estable con un margen de $\pm 0,5$ °C. Para la determinación de coliformes totales, se requiere una incubadora a 35,5 °C y para coliformes termotolerantes y *E. coli*, 44,5 \pm 0,2 °C, debido a que estos últimos exigen una mínima o nula variación en la temperatura. La incubadora portátil puede tener un mecanismo de incubación con calor seco, pero debe garantizar un 100% de humedad. Se recomienda mantener los equipos de campo a una sola temperatura de incubación.
- Una fuente de energía (*c*) que puede ser una batería de automóvil o una batería portátil. Algunas unidades de este tipo pueden ser conectadas a corriente continua de 6, 12 ó 24 voltios o a corriente alterna de 115 ó 230 voltios. Pueden funcionar con una batería o conectándolas al encaje del encendedor de un automóvil o a un tomacorriente normal utilizando adaptadores.
- Gradilla o soporte para la incubación (*d*).



Equipo de campo para análisis bacteriológico con filtro de membrana

- Un sistema de filtración, conformado por embudo (*e*), un accesorio poroso destinado a portar el filtro (*f*), un vaso o recipiente receptor de la muestra (*g*) y una bombilla o jeringa apropiada para generar vacío (*h*).
- Pinzas de extremos redondeados (*i*).
- Frasco con metanol (*j*).
- Frasco con alcohol (*k*).
- Frasco con agua de dilución estéril (*l*) (véase la fórmula en el apéndice A).
- Mechero de alcohol (*m*).
- Placas de petri estériles, modelo según el tipo de equipo, de 48 mm de diámetro x 8,5 mm de altura (*n*).

Otros materiales

- Frascos de muestreo esterilizados de 250 mililitros o bolsas esterilizadas con agente clorador (tiosulfato de sodio) para muestra de agua clorada.
- Membranas de filtración, de ésteres de celulosa, cuadrículadas, blancas, estériles, de 47 milímetros de diámetro, con poros de 0,45 micrómetros de diámetro, certificadas para análisis microbiológicos.
- Almohadillas (*pads*) estériles, teniendo en cuenta el diámetro de la membrana de filtración (47 milímetros) y las características de la incubadora portátil.
- Una lupa de 5 X para observar las características de las colonias.

Medios de cultivo

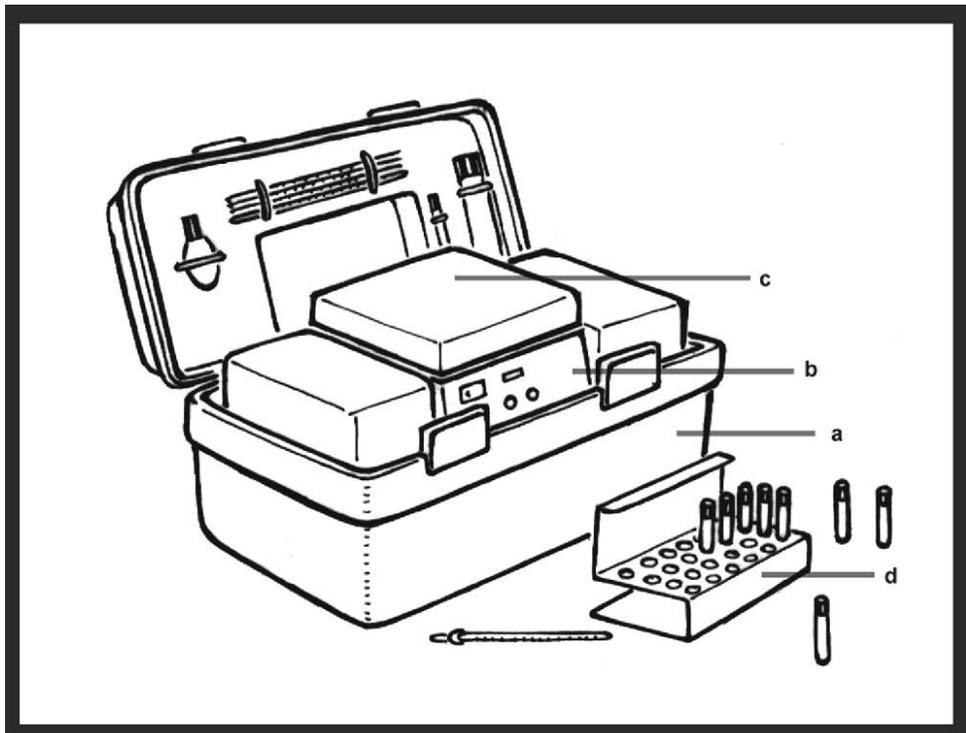
Los medios de cultivo pueden ser preparados en el laboratorio central o en los laboratorios periféricos a fin de garantizar su calidad y esterilidad. Por otro lado, el mercado ofrece medios de cultivo listos para usar que se distribuyen en forma de ampollas y viales, son de fácil manipulación, permiten ahorrar tiempo y optimizan el análisis. En el mercado se pueden encontrar ampollas de caldo Endo para coliformes totales, caldo m-FC y caldo m-colíBlue de 24 horas. Este último medio detecta simultáneamente coliformes totales y *E. coli* por medio de la técnica de sustrato definido. En un laboratorio se pueden preparar frascos pequeños o ampollas en condiciones de

esterilidad con los caldos antes mencionados o con caldo m-lauril sulfato, m-enriquecido Teepol, entre otros.

1.2.2 Técnica de Número Más Probable por tubos múltiples

El equipo de campo acondicionado para la evaluación de coliformes totales, coliformes termotolerantes y *E. coli* por la técnica del Número Más Probable por tubos múltiples consta de las siguientes partes:

- Un estuche protector resistente a sustancias químicas (*a* en el gráfico).
- Un equipo de baño María portátil que debe garantizar una temperatura estable con un margen de $\pm 0,5$ °C, para coliformes totales a 35,5 °C y otro equipo similar para coliformes termotolerantes o *E. coli* a 44,5 °C. En algunos equipos se puede cambiar la temperatura según se requiera, teniendo como requisito una garantía de estabilidad de la temperatura de incubación (*b*).



*Equipo de campo para análisis bacteriológico de
Número Más Probable por tubos múltiples*

- Una fuente de energía que puede ser una batería de automóvil o una batería portátil (*c*).
- Una gradilla para la incubación en tubos (*d*).
- Lámpara UV portátil para la detección de *E. coli*, si se usa el método de sustrato definido.

Materiales

- Tubos de prueba con tapa rosca, adaptables a la gradilla y al equipo de baño María.
- Frascos con agua de dilución (véase la fórmula en el apéndice A).
- Pipetas estériles.
- Mechero de alcohol.

Medios de cultivo

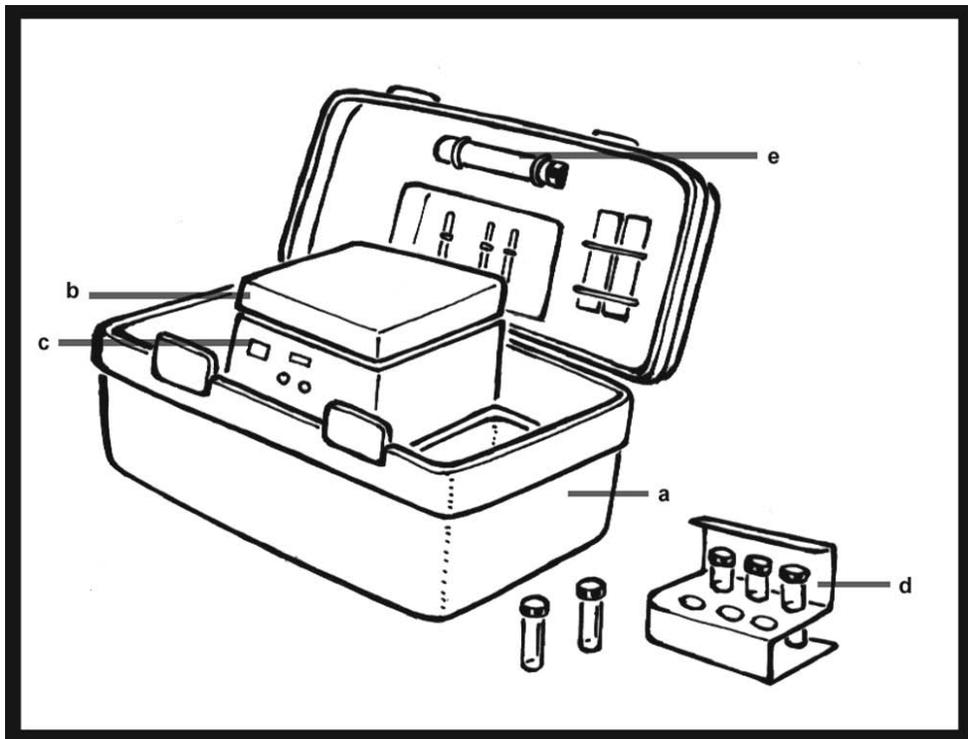
Los medios de cultivo pueden prepararse en el laboratorio central o en los laboratorios periféricos a fin de garantizar su calidad y esterilidad. Se los prepara de acuerdo con las instrucciones del productor y en cada tubo se colocará un vial (tubo Durham) invertido. Por otro lado, el mercado ofrece medios de cultivo listos para usar —es decir, esterilizados—. Estos son tubos o ampollas. Son de fácil manipulación, permiten ahorrar tiempo y optimizan el análisis. En el mercado se pueden encontrar tubos con medios listos para usar: caldo lauril triptosa para la prueba presuntiva de coliformes, caldo verde brillante bilis 2% para la prueba confirmativa de coliformes totales y caldo EC para coliformes termotolerantes.

1.2.3 Técnica de presencia-ausencia

El equipo de campo acondicionado para la evaluación de coliformes totales, coliformes termotolerantes y *E. coli* por el método de presencia-ausencia consta de las siguientes partes:

- Un estuche protector resistente a sustancias químicas (*a* en el gráfico).
- Un equipo de baño María portátil que debe garantizar una temperatura estable con un margen de $\pm 0,5$ °C para coliformes totales a 35,5 °C (*b*).

- Una fuente de energía que puede ser una batería de automóvil o una batería portátil (*c*).
- Una gradilla para la incubación de los frascos (*d*).
- Lámpara UV portátil para la detección de *E. coli*, si se usa el método de sustrato definido (*e*).



Equipo de campo para análisis bacteriológico por presencia-ausencia

Materiales

- Frascos con tapa rosca, adaptables a la gradilla y al equipo de baño María.
- Mechero de alcohol.

Medios de cultivo

Los medios de cultivo pueden ser preparados en un laboratorio regional a fin de garantizar su calidad y esterilidad. Serán preparados de acuerdo con las instrucciones

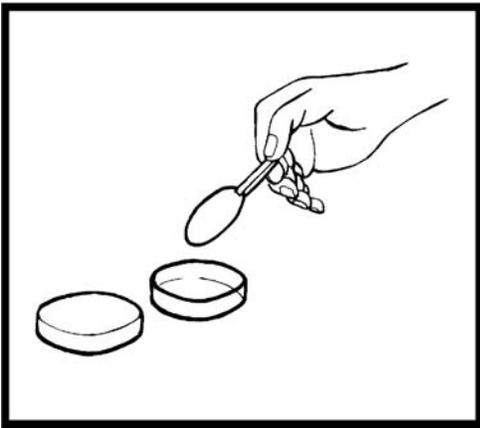
del productor. Por otro lado, el mercado ofrece medios de cultivo listos para usar que se distribuyen en frascos, son de fácil manipulación, permiten ahorrar tiempo y optimizan el análisis. En el mercado se pueden encontrar frascos con medios listos para usar, como medio P-A para el análisis cualitativo presuntivo de coliformes totales. Para la prueba confirmativa de coliformes totales, tubos con caldo verde brillante bilis 2%, y para coliformes termotolerantes, caldo EC.

1.3 Procedimiento analítico con equipos de campo para la determinación de coliformes termotolerantes por la técnica de filtro de membrana **Medición de campo**

El procedimiento analítico es similar al que se sigue para la determinación de coliformes totales y termotolerantes por filtro de membrana en el laboratorio, con la diferencia de que se efectúa en un laboratorio portátil; es decir, en un equipo de campo. En un equipo de campo la bomba de vacío es reemplazada por una bombilla de mano o una jeringa especial.

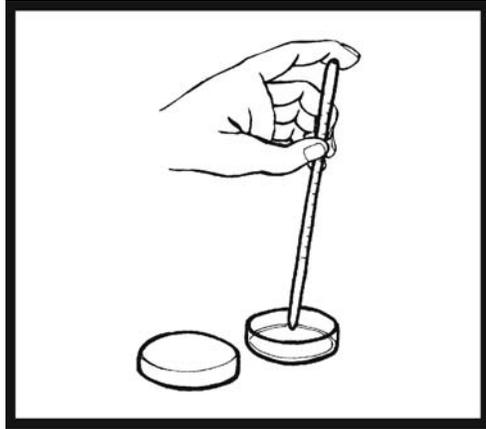
Aplicar el siguiente procedimiento (OMS, 1988):

1. Esterilizar el sistema de filtración, lo cual debe repetirse entre la filtración de una y otra muestra, para lo cual se usará un combustible —por ejemplo, metanol—. En seguida, tapar el portafiltros con el vaso receptor y esperar 15 minutos. La combustión incompleta del metanol producirá formaldehído y esterilizará la superficie interna del portafiltro.



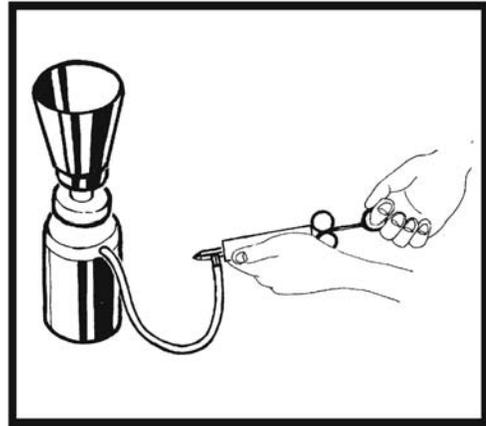
2. Preparar las placas con caldo selectivo. Abrir la placa petri estéril y colocar una almohadilla o *pad*.

3. Agregar 2 mililitros de caldo selectivo.



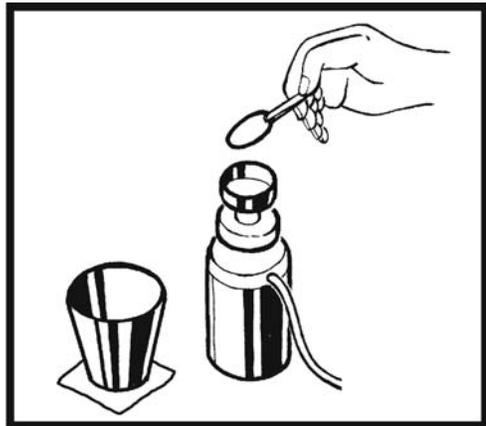
4. Preparar el sistema de filtración según indica la figura.

El portafiltros debe estar estéril y frío.



5. Retirar la parte superior del portafiltros y, con una pinza flameada y enfriada, colocar una membrana filtrante estéril, con la cara cuadrículada volteada hacia arriba. Cuidadosamente, colocar la membrana sobre la parte superior y en el centro del portafiltros.

Acoplar la parte superior del portafiltros, cuidando de no dañar la membrana.



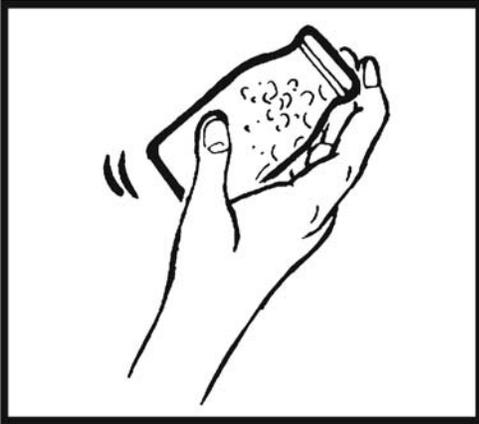


6. Con el fin de controlar la esterilidad del equipo y del medio de cultivo, el resultado de esta placa debe ser negativo. Verter en el embudo 100 mililitros de agua destilada estéril.

Filtrar el agua destilada, aplicar vacío con una bombilla de mano o con una jeringa especial.

Evitar que se seque la membrana.

Seguir todo el procedimiento como si se tratara de una muestra (pasos del 8 al 13).



7. Homogeneizar la muestra. Agitar un número no menor de 25 veces, inclinando el frasco y formando un ángulo de 45° entre el brazo y el antebrazo.



8. Verter 100 mililitros de la muestra en el embudo. Observar las marcas de graduación que figuran en el interior del embudo.

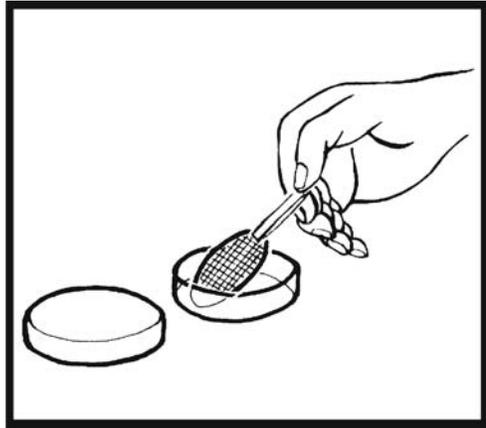
Filtrar la muestra. Aplicar vacío con una bombilla de mano o con una jeringa especial.

Lavar dos veces el embudo de filtración con agua de dilución. Aplicar vacío. Evitar que se seque la membrana.

9. Separar la parte superior del portafiltras y, con una pinza previamente flameada en sus extremos, retirar la membrana cuidando de que la pinza toque apenas la parte periférica, fuera del área de filtración.

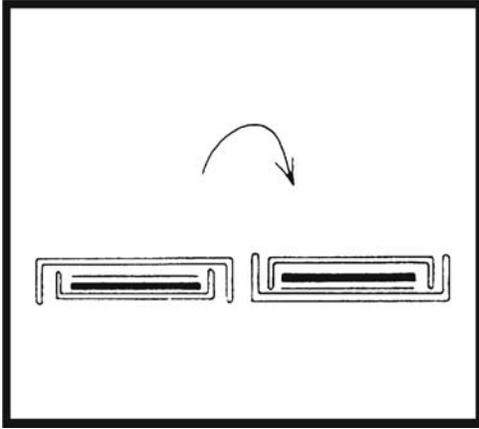


10. Pasar la membrana a la placa de petri, donde previamente se han incorporado una almohadilla y el medio de cultivo. Invertir la placa e incubar. En general, la incubación en los equipos de campo acondicionados para coliformes totales se hace a 35,5 °C y para coliformes termotolerantes y *E. coli*, a 44,5 °C.

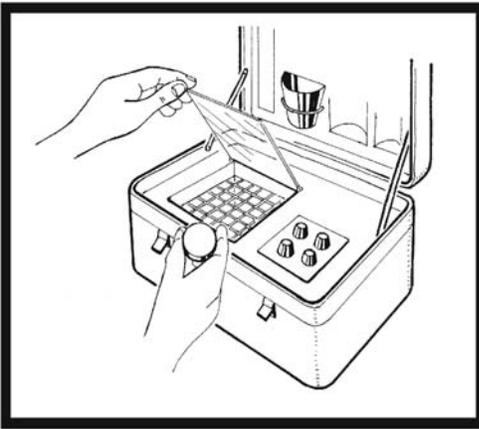


11. Verificar si se formaron bolsas de aire entre la membrana y el medio de cultivo. Si esto ocurre, levantar uno de los bordes de la membrana con una pinza estéril y, haciendo movimientos circulares, deslizar la membrana con la finalidad de eliminar dichas bolsas, pues ellas impiden el contacto de las bacterias con el medio del cultivo, lo que dificulta o evita su crecimiento.





12. Tapar la placa de petri y colocarla en forma invertida; es decir, la tapa hacia abajo y la parte superior en la base de la placa (la que contiene el *pad* y la membrana).



13. Incubar durante 24 horas en la incubadora del equipo portátil.

Lectura

- La identificación de las colonias se hace de forma visual y sus características dependen de los medios de cultivo y de los indicadores utilizados en el análisis.
- Después de la incubación, seleccionar las placas con filtros de membrana que presenten entre 20 y 60 colonias típicas de coliformes termotolerantes.
- En el medio m-FC o agar m-FC, las colonias de coliformes termotolerantes se presentan de color azul. En los medios caldo m-lauril sulfato y m-enriquecido Teepol las colonias son de color amarillo.

1.4 Procedimiento analítico con equipos de campo para la determinación de coliformes termotolerantes por la técnica de NMP por tubos múltiples. Medición de campo

El procedimiento analítico es similar al del Número Más Probable por tubos múltiples para la determinación de coliformes totales y termotolerantes, con la diferencia de que se efectúa en un laboratorio portátil; es decir, en un equipo de campo. Deben tomarse todas las precauciones para trabajar en condiciones asépticas. Los tubos de prueba deben tener una tapa segura, y la incubadora, una temperatura estable. Este método se recomienda para fuentes de agua de origen superficial. La lectura e interpretación de resultados es idéntica al procedimiento de laboratorio.

1.5 Procedimiento analítico con equipos de campo para la determinación de coliformes termotolerantes por la técnica de presencia-ausencia Medición de campo

El procedimiento analítico es similar al descrito en la subsección referida al procedimiento de laboratorio del método de presencia-ausencia para el análisis cualitativo de coliformes totales, termotolerantes y *E. coli*, con la diferencia de que se efectúa en un laboratorio portátil; es decir, en un equipo de campo. Deben tomarse todas las precauciones para trabajar en condiciones asépticas. Los frascos de prueba deben tener una tapa segura, y la incubadora, una temperatura estable. Este método se recomienda para aguas de consumo humano. La lectura e interpretación de resultados es idéntica al procedimiento de laboratorio descrito en el apartado correspondiente al método presencia-ausencia.

2. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS BÁSICOS. CLORO RESIDUAL, pH Y TURBIEDAD

2.1 Introducción

El monitoreo de los tres aspectos fisicoquímicos fundamentales que tienen importancia en un programa básico de vigilancia de la calidad del agua de consumo humano son el cloro residual, el pH y la turbiedad. Estos tres aspectos se consideran claves porque están directamente relacionados con la desinfección, y los dos últimos, con el mantenimiento del nivel de cloro libre residual en el agua y, por lo tanto, con la posibilidad de transmisión de agentes patógenos.

Estos tres parámetros se caracterizan por ser muy inestables y, por ese motivo, se recomienda su análisis en el campo o en un laboratorio, pero en el lapso requerido para cada parámetro, que en promedio son dos horas después de efectuado el muestreo.

En las zonas rurales, donde no es fácil acceder a un laboratorio, con mayor razón se recomienda su determinación en el campo. La tecnología ofrece un sinnúmero de modelos de instrumentos para esta medición. Lo importante es seleccionar un modelo que se ajuste al rango esperado y que el técnico cuente con los accesorios necesarios para su calibración. También se requiere un mantenimiento continuo de los instrumentos de campo.

2.2 Mediciones de campo

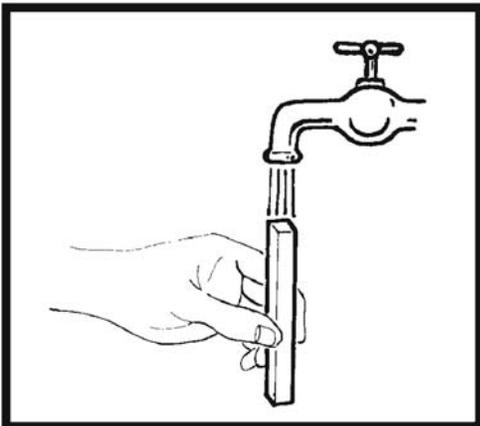
2.2.1 Determinación del cloro libre residual

En las zonas rurales y en otros lugares que no permitan un acceso fácil a un laboratorio, la determinación del cloro libre residual puede efectuarse con un comparador visual comercial con el cual se emplea un procedimiento sencillo, que es una versión simplificada del método de laboratorio para la determinación de cloro residual. Los reactivos que permiten hacer esta comparación visual son la N,N-dietil-p-fenilendiamina (DPD) y la ortotolidina (OT). Ambas técnicas son sumamente sencillas y siguen un procedimiento similar.

Método colorimétrico con DPD

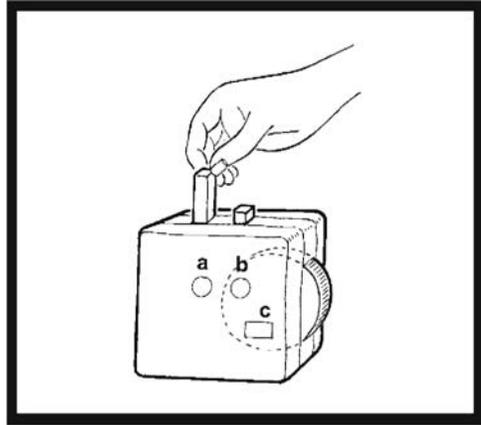
En el método colorimétrico con DPD, la intensidad del color del indicador se compara en forma visual con una escala de estándares. El cloro libre residual reacciona directamente con el DPD y forma un compuesto de color rojo (OMS, 1988).

Procedimiento de la técnica del comparador visual para la medición del cloro libre residual

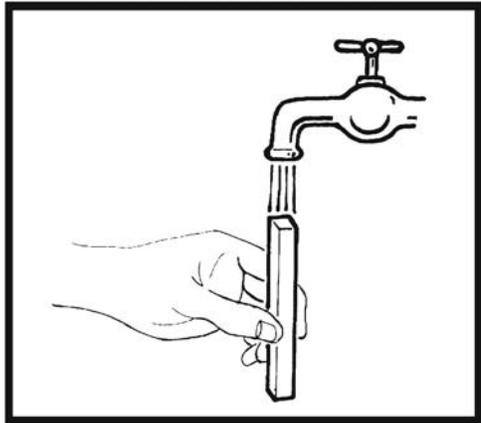


1. Enjuague tres veces una de las celdas del comparador y luego llénela con la muestra de agua hasta la señal.

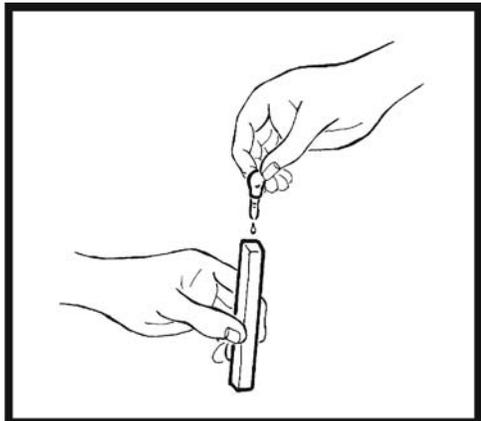
2. Coloque la celda en el portaceldas del comparador, que está alineado con los patrones coloreados (*a* en el gráfico).

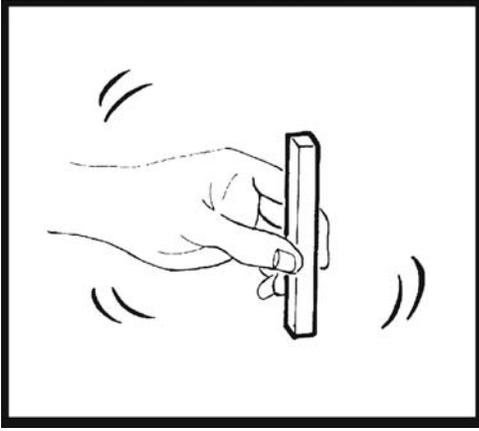


3. Enjuague la segunda celda y llénela con la misma agua.

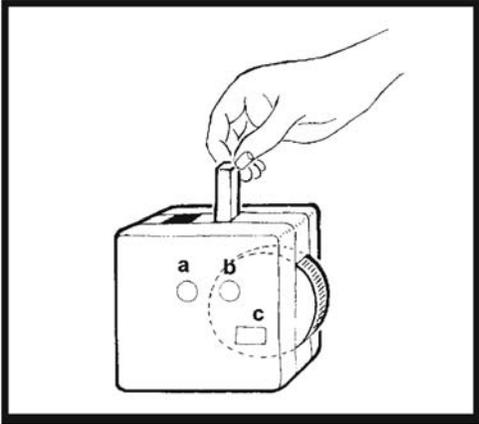


4. Añada el reactivo o pastilla en la segunda celda, según las instrucciones del fabricante.

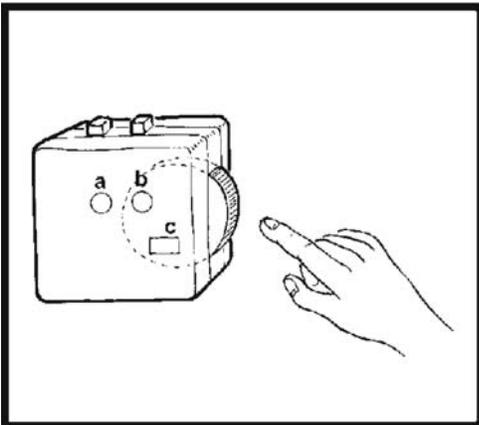




5. Agite la celda (durante no más de 3-5 segundos) para mezclar el reactivo.



6. Coloque la celda en el comparador.



7. Manteniendo el comparador de frente a la luz natural, gire el disco hasta que el color de *b* sea el mismo que el de *a*. Lea en *c* el valor de cloro libre residual en mg/L.

Presentación de resultados

Los resultados de cloro libre residual se expresan en mg/L.

Método colorimétrico con ortotolidina (OT)

En los últimos años, se ha recomendado el método de la DPD antes que el de la OT, por considerarse que este último compuesto es cancerígeno. Este argumento no parece muy consistente, ya que, por un lado, muchos de los compuestos orgánicos que se utilizan en los laboratorios tienen un efecto carcinogénico potencial igual o mayor que el de la OT y no por ello dejan de utilizarse. Por otro lado, en todo el mundo y sin restricciones, en ferreterías o supermercados se vende la ortotolidina para analizar el cloro residual en piscinas de natación. Esto último lo hace especialmente importante por la economía de uso y por la facilidad de su obtención.

El método a nivel de campo provee información rápida y económica sobre la presencia de cloro residual, pero no es tan preciso como la técnica de laboratorio conocida como ortotolidina-arsenito (OTA), la que permite distinguir entre cloro libre, combinado, y discrimina entre la presencia de cloro y las interferencias. El método colorimétrico con ortotolidina es útil para la determinación del cloro residual total.

Para la determinación de cloro residual con instrumentos de campo por el método de la OT, es posible seguir un procedimiento similar al método colorimétrico de campo con DPD, antes descrito, para lo cual se requiere el reactivo de OT y un comparador de cloro con una escala de colores que se ajusta a la reacción del cloro residual con la OT. Por otro lado, en el campo también se puede realizar la prueba de OT con tubos Nessler, método que representa un bajo costo.

El cloro residual reacciona directamente con la ortotolidina y forma un compuesto de color amarillo (OPS, 1978). En el método colorimétrico con OT la intensidad del color del indicador se compara en forma visual con una escala de estándares o patrones de color (que figuran en el cuadro 5.6). La intensidad del color que desarrolla el compuesto es proporcional a la concentración del cloro.

Preparación del reactivo de ortotolidina

Disolver 135 gramos de ortotolidina dihidrocloruro en 500 mililitros de agua destilada. Añadir esta solución (agitando constantemente) a una mezcla de 350 mililitros de agua destilada y 150 mililitros de HCl concentrado. No se recomienda el uso de OT base en la preparación de este reactivo.

Una vez preparado el reactivo, es necesario protegerlo de la acción de la luz, guardarlo en un frasco ámbar o en la oscuridad, a la temperatura de la habitación, y almacenarlo un máximo de seis meses. Se debe manejar la OT con extremo cuidado, nunca pipetearla con la boca y evitar inhalarla o exponer la piel a ella.

Procedimiento del método colorimétrico de campo con ortotolidina usando tubos Nessler (OPS, 1978)

- Preparación de los patrones de color (que figuran en el cap. 5, sección 3.2).
- Con una pipeta con bombilla de seguridad, verter 5 mililitros del reactivo de OT en un tubo Nessler de 100 mililitros.
- Agregar 95 mililitros de agua destilada y llenar el tubo hasta el aforo de 100 mililitros. Mezclar bien.
- Con una pipeta o gotero, agregar el agua de la muestra gota a gota. Tapar el tubo con un tapón limpio de caucho. Mezclar cuidadosamente el contenido después de cada adición.
- Continuar agregando la muestra gota a gota hasta que se produzca el color amarillo.
- Comparar con los patrones de color.
- Registrar el número total de gotas de reactivo de OT utilizadas y el correspondiente valor del cloro (lectura final).
- Calcular el cloro residual mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Cloro residual (mg/L)} = \frac{\text{Valor del cloro (lectura final)} \times 1.900}{\text{Número total de gotas consumidas}}$$

Presentación de resultados

Los resultados de cloro residual se expresan en mg/L.

2.2.2 Determinación del pH

Método electrométrico

Introducción. Los valores de pH miden la intensidad de la acidez y alcalinidad del agua. La escala del pH de las aguas naturales está entre 6,0 y 8,5. Si un agua tiene pH 7, está en el punto medio de la escala y se considera que es un agua con pH neutro. El valor del pH tiene importancia en los procesos de tratamiento como la cloración, la coagulación, el ablandamiento y el control de corrosión.

Comercialmente, se expenden instrumentos de campo que proporcionan sistemas de análisis que permiten la medición de pH in situ en forma fácil y rápida. Su funcionamiento tiene los mismos principios que el método potenciométrico usado en el laboratorio.

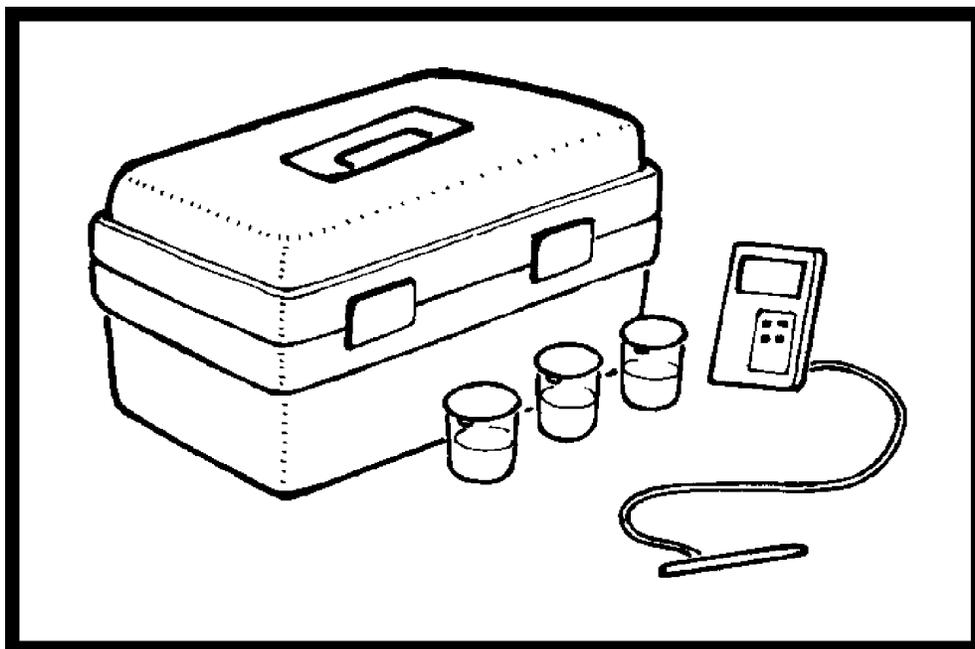
Los instrumentos de campo son de fácil calibración y cuentan con un sistema de autocalibración automática para los *buffers* y para la temperatura, y una precisión de $\pm 0,05$ unidades de pH.

Procedimiento. Antes de proceder al análisis, verificar las condiciones del equipo porque pueden producirse errores de medición por una batería baja o por electrodos deteriorados o con restos de materiales aceitosos, grasos o precipitados.

Calibración del equipo de campo. Colocar la solución amortiguadora en un vaso de precipitado y calibrar ajustando el pH al de las soluciones amortiguadoras patrón; primero la de pH 7 y después 4 y 9.

Análisis de la muestra

- Después de calibrar el equipo, enjuagar inmediatamente el electrodo de medición de pH con agua destilada y secarlo con un papel suave.
- Colocar la muestra en un vaso de precipitado e introducir el electrodo de tal manera que su área sensible esté completamente sumergida en la muestra.
- Agitar suavemente la muestra.
- Esperar hasta que en el medidor se presente una lectura estable.
- Anotar la lectura.
- Después de medir el pH de la muestra, lavar el electrodo con agua destilada, secarlo con papel suave y guardarlo en el estuche de protección hasta su próximo uso.



Presentación de los resultados

Los resultados se expresan en unidades de pH y un valor de hasta un decimal. Se debe reportar la temperatura a la que se efectuaron las mediciones.

2.2.3 Determinación de la turbiedad

La turbiedad del agua se origina en la presencia de partículas insolubles de arcilla, limo, materia mineral, partículas orgánicas de diferente origen, plancton y otros organismos microscópicos que impiden el paso de la luz a través del agua. Una turbiedad mayor de 5 UNT es perceptible para el consumidor.

Comercialmente, se expenden instrumentos de campo que proporcionan sistemas de análisis que permiten una medición fácil y rápida. Su funcionamiento tiene los mismos principios que el método nefelométrico usado en el laboratorio. En el mercado se expenden turbidímetros de campo que miden la turbiedad en el rango de 0,1 a 400 UNT con una precisión de $\pm 5\%$ ó $\pm 0,1$ UNT.

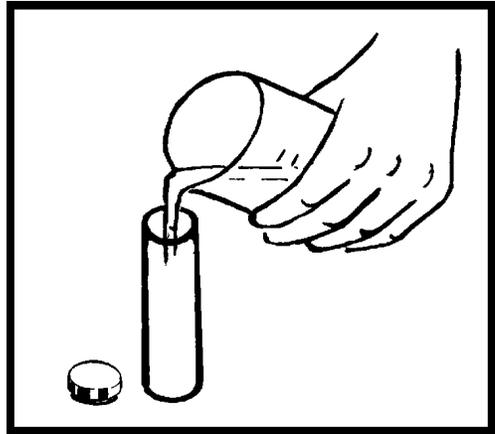
La medición de la turbiedad en el campo se efectúa con un instrumento portátil. Se recomienda uno con escalas de 0 a 5 UNT para agua de consumo humano y hasta 100 UNT para aguas sin tratamiento, en especial en fuentes de agua de origen superficial.

Los instrumentos de campo son de fácil calibración y se calibran con estándares estabilizados de formazina.

Procedimiento

En términos generales, el procedimiento de campo para medir la turbiedad es el siguiente:

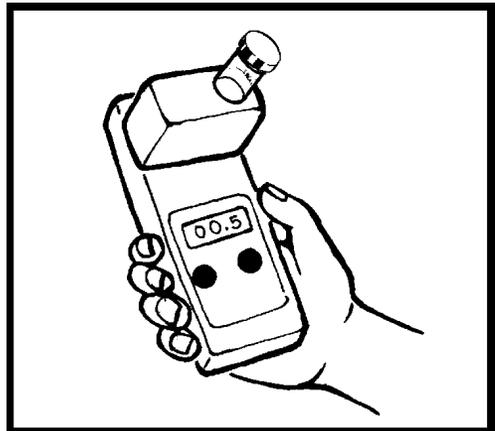
1. Colocar 5 mililitros de muestra en la celda y tapar la celda.



2. Secar la celda con un papel toalla. Insertar la celda en el instrumento.

Presionar el botón de lectura y leer inmediatamente.

La lectura final se expresa en UNT.



Presentación de resultados

Los resultados se expresan en UNT.

BIBLIOGRAFÍA

Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (1997). Manual para la certificación de laboratorios de análisis de agua potable. Criterios y procedimientos para el aseguramiento de la calidad. Cuarta edición. Cincinnati, Ohio.

Allen, M. (1996). *La importancia para la salud pública de los indicadores bacterianos que se encuentran en el agua potable*. Reunión Regional sobre la Calidad del Agua Potable. Lima, CEPIS.

American Public Health Association-American Water Works Association (1999). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20.^a ed.

American Public Health Association-American Water Works Association (1960). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 11.^a ed.

American Association for Laboratory Accreditation (1996). Requisitos generales para la acreditación de laboratorios. Gaithersburg.

Castro, M. L. (1996). *Programa sobre monitoreo y evaluación global de la calidad del agua. Control de calidad analítica*. Reunión Regional sobre la Calidad del Agua Potable. Lima, CEPIS/OPS.

CEPIS/OPS (2000a). *Proyecto de capacitación para los laboratorios de El Salvador, Nicaragua y Honduras*. Programa de Mejoramiento de la Capacidad de los Laboratorios de Control y Vigilancia de la Calidad del Agua para Consumo Humano. Lima, CEPIS/OPS-USAID-EPA.

CEPIS/OPS (2000b). *Procedimiento normalizado de operación para la determinación de pH por el método potenciométrico*. Lima, CEPIS/OPS.

CEPIS/OPS (2002a). *Procedimiento normalizado de operación para la determinación de turbiedad por el método electrométrico*. Lima, CEPIS/OPS.

- CEPIS/OPS (2002b). *Procedimiento normalizado de operación para la determinación de cloro residual por el método del DPD*. Lima, CEPIS/OPS.
- CEPIS/OPS (2002c). *Procedimiento normalizado de operación para la determinación de turbiedad por el método nefelométrico*. Lima, CEPIS/OPS.
- Difco Laboratorios (1996-1997). Product catalog for microbiology.
- IDEXX Laboratorios (1993). Colliert. Documento de información técnica.
- INDECOPI (1999). Norma Técnica Peruana. Agua para Consumo Humano. Determinación de Turbiedad. Método nefelométrico. NTP 214.006.1999.
- INDECOPI (2000). Norma Técnica Peruana. Agua para Consumo Humano. Determinación de pH. Método electrométrico. NTP 214.029.2000.
- Le Chevallier, M. W. y W. D. Norton (1992). Examining relationships between particle counts and *Giardia*, *Cryptosporidium*, and turbidity. *Journal of the American Water Works Association* 84: 54-60.
- Millipore (1991). Manual AB323/P. *Microbiología de aguas*.
- Mora, D. (1996). *Situación del agua de consumo humano y evacuación de excretas en América Latina y el Caribe*. Reunión Regional sobre la Calidad del Agua Potable. Lima, CEPIS.
- Organización Panamericana de la Salud (1988). *Guías para la calidad del agua potable. Vol. 3. Control de la calidad del agua potable en sistemas de abastecimiento para pequeñas comunidades*. Publicación Científica 508. Washington D. C., OPS.
- Organización Panamericana de la Salud (1978). *Procedimientos simplificados para el examen de aguas*. Segunda edición en español. Publicación Científica 369. Washington, OPS.
- Piza, P. (1996). *Los sistemas ambientales. Un abordaje teórico para el estudio de la vigilancia ambiental*. Serie HSP-UNI/Manuales Operativos PALTEX. OMS, Fundación W. K. Kellog.
- Rojas, R. (2002). *Elementos de vigilancia y control. Guía para la vigilancia y control de la calidad del agua para consumo humano*. Lima, CEPIS/OPS.
- Romero Rojas, J. (1999). *Potabilización del agua*. México, Alfaomega.
- Solsona, F. (2002). *Guías para elaborar normas de calidad del agua de bebida en los países en desarrollo*. Lima, CEPIS/OPS.
- Solsona, F. y J. P. Méndez (2002). *Desinfección del agua*. Lima, EPA-CEPIS/OPS.

APÉNDICES

APÉNDICE A

Preparación de soluciones y medios de cultivo

A.1 Agua de dilución

Fórmula:

Solución <i>stock</i> A	1,25 mL
Solución <i>stock</i> B	5,00 mL
Agua destilada	1.000 mL

El pH final después de la esterilización debe ser de $7,2 \pm 0,1$.

Preparación de la solución stock A

Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) p. a.	34 g
Agua destilada	1.000 mL

Disolver el fosfato monopotásico en 500 mL de agua destilada, ajustar a pH para $7,2 \pm 0,1$ con solución de hidróxido de sodio 1 N y completar el volumen a 1.000 mL de agua destilada. Distribuir volúmenes que sean adecuados a las necesidades de uso de laboratorio en frascos con tapa rosca. Esterilizar por autoclavado a $121\text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos. Almacenar en refrigeración.

Preparación de la solución stock B

Cloruro de magnesio $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	81,1 g
Agua destilada	1.000 mL

Disolver el cloruro de magnesio en 500 mL de agua destilada y completar el volumen a 1.000 mL. Distribuir volúmenes que sean adecuados a las necesidades de

uso del laboratorio en frascos con tapa rosca. Esterilizar por autoclavado a 121 °C durante 15 minutos. Rotular y almacenar en refrigeración.

Antes de utilizar la solución *stock* A, se deberá verificar la ausencia de cualquier contaminación microbiana (turbiedad, presencia de material en suspensión). En caso afirmativo, la solución deberá descartarse.

Preparación del agua de dilución

Adicionar 1,25 mililitros de solución *stock* A y 5 mililitros de solución *stock* B a un litro de agua destilada. Distribuir en frascos de dilución cantidades adecuadas que aseguren 90 ± 2 mL, después de autoclavar durante 15 minutos a 121 °C.

A.2 Caldo lauril triptosa o lauril sulfato de sodio

Fórmula (concentración simple)

Triptosa	20,0 g
Lactosa	5,0 g
Fosfato de hidrógeno dipotasio (K_2HPO_4)	2,75 g
Fosfato dihidrógeno potasio (KH_2PO_4)	2,75 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5,0 g
Lauril sulfato de sodio	0,1 g
Agua destilada	1.000 mL

Fórmula (concentración doble)

Triptosa	40,0 g
Lactosa	10,0 g
Fosfato de hidrógeno dipotasio (K_2HPO_4)	5,5 g
Fosfato dihidrógeno potasio (KH_2PO_4)	5,5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10,0 g
Lauril sulfato de sodio	0,2 g
Agua destilada	1.000 mL

Preparación del medio

Añadir los ingredientes deshidratados al agua destilada, mezclar cuidadosamente y disolver calentando. El pH final después de la esterilización debe ser $6,8 \pm 0,2$.

Antes de esterilizar, dispensar 10 mililitros en tubos de fermentación con un tubo Durham invertido. Tapar los tubos con tapones de metal, plástico resistente al calor o tapones de algodón. Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

A.3 Caldo verde brillante lactosa bilis 2%*Fórmula*

Peptona	10,0 g
Lactosa	10,0 g
Oxgall.....	20,0 g
Verde brillante	0,0133 g
Agua destilada	1.000 mL

Preparación del medio

Añadir los ingredientes deshidratados al agua destilada, mezclar cuidadosamente y disolver calentando. El pH final después de la esterilización debe ser $7,2 \pm 0,2$.

Antes de esterilizar, dispensar en tubos de fermentación con un tubo Durham invertido, en cantidad suficiente como para cubrir el tubo después de la esterilización. Tapar los tubos con tapones de metal, plástico resistente al calor o tapones de algodón.

Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

A.4 Caldo EC*Fórmula*

Triptosa o tripticasa	20,0 g
Lactosa	5,0 g
Mezcla de sales biliares o sales biliares N.º 3	1,5 g
Fosfato de hidrógeno dipotasio (K_2HPO_4)	4,0 g
Fosfato dihidrógeno potasio (KH_2PO_4)	1,5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5,0 g
Agua destilada	1.000 mL

Preparación del medio

Añadir los ingredientes deshidratados al agua destilada, mezclar cuidadosamente y disolver calentando. El pH final después de la esterilización debe ser $6,9 \pm 0,2$.

Antes de esterilizar, dispensar en tubos de fermentación con un tubo Durham invertido, en cantidad suficiente como para cubrir el tubo después de la esterilización. Tapar los tubos con tapones de metal, plástico resistente al calor o tapones de algodón.

Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.

A.5 Agar Endo LES

Fórmula

Extracto de levadura	1,2 g
Casitona o tripticaasa	3,7 g
Tiopeptona o tiotona	3,7 g
Triptosa	7,5 g
Lactosa	9,4 g
Fosfato de hidrógeno dipotasio (K_2HPO_4)	3,3 g
Fosfato dihidrógeno potasio (KH_2PO_4)	1,0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	3,7 g
Desoxicolato de sodio	0,1 g
Lauril sulfato se sodio	0,05 g
Sulfito de sodio (Na_2SO_3)	1,6 g
Fucsina básica	0,8 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1.000 mL
Etanol 95%	20 mL

Preparación del medio

Disolver el medio deshidratado en los 1.000 mililitros de agua destilada, que deben contener 20 mililitros de etanol al 95%. El pH del medio debe estar entre $7,2 \pm 0,2$. Calentar cerca de la ebullición para disolver el agar. Luego enfriarlo hasta aproximadamente 45 °C y colocar en porciones de 5 a 7 mililitros en placas de petri de 60 x 15 milímetros de vidrio o plástico estériles. Las placas preparadas no deben exponerse a la luz directa y deben ser conservadas en oscuridad a 2-10 °C hasta dos semanas.

Este medio no debe esterilizarse al autoclave.

A.6 Medio m-Endo (agar)

Fórmula

Triptosa o polipeptona	10,0 g
Tiopeptona o tiotona	5,0 g
Casitona o tripticaasa	5,0 g
Extracto de levadura	1,5 g
Lactosa	12,5 g
Fosfato de hidrógeno dipotasio (K_2HPO_4)	4,375 g
Fosfato dihidrógeno potasio (KH_2PO_4)	1,375 g

Cloruro de sodio (NaCl)	5,0 g
Desoxicolato de sodio	0,1 g
Lauril sulfato se sodio	0,05 g
Sulfito de sodio (Na ₂ SO ₃)	2,1 g
Fucsina básica	1,05 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1.000 mL
Etanol 95%	20 mL

Preparación del medio

Disolver el medio deshidratado en los 1.000 mililitros de agua destilada que contengan 20 mililitros de etanol al 95%. El pH del medio debe estar entre $7,2 \pm 0,2$. Calentar cerca de la ebullición para disolver el agar. Luego enfriarlo hasta aproximadamente 45 °C y colocar en porciones de 5 a 7 mililitros en placas de petri de 50 x 12 milímetros de vidrio o plástico estériles. Las placas preparadas no deben exponerse a la luz directa y deben ser conservadas en oscuridad a 2 -10 °C hasta 2 semanas.

Este medio no debe esterilizarse al autoclave.

Si se utiliza el caldo m-Endo, preparar de la misma manera descrita arriba (omitiendo el agar) y dispensando por lo menos 2 mililitros sobre las almohadillas en las placas de petri estériles.

A.7 Medio m-FC (agar)

Fórmula

Triptosa o biosate	10,00 g
Proteosa peptona n.º 3 o polipeptona	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5,0 g
Lactosa	12,5 g
Sales biliares n.º 3 o mezcla de sales biliares	1,5 g
Azul anilina	0,1 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1.000 mL

Preparación del medio

Rehidratar el medio con 1.000 mililitros de agua destilada que contenga 10 mililitros de ácido rosólico al 1% en NaOH al 0,2 N. (En la mayoría de muestras se puede utilizar

el medio sin ácido rosólico, ya que básicamente evita interferencias debidas al crecimiento de fondo, que normalmente se pueden presentar en cursos de agua producto de lluvia luego de un periodo largo de sequía.) Calentar hasta casi llegar a la ebullición, retirar rápidamente del calor y enfriar a aproximadamente 45 °C. (No esterilizar al autoclave.) Distribuir entre 5 y 7 mililitros en las placas de petri de 50 x 12 milímetros estériles. Si se utiliza el caldo m-FC, preparar de la manera descrita arriba (omitiendo el agar) y dispensar por lo menos 2 mililitros sobre las almohadillas en las placas de petri estériles. El pH final del medio es de 7,4. Conservar el medio preparado a 2-10 °C hasta por 2 semanas.

La solución de ácido rosólico se mantiene en la oscuridad entre 2 y 10 °C y se debe eliminar a las dos semanas o antes si el color rojo oscuro cambia a pardo sucio.

A.8 Agar m-7 horas FC

Fórmula

Proteosa peptona n.º 3 ó polipeptona	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Lactosa	10,0 g
d-Manitol	5,0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5,0 g
Lauril sulfato de sodio	0,2 g
Desoxicolato de sodio	0,1 g
Púrpura de bromocresol	0,35 g
Rojo fenol	0,3 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1.000 mL

Preparación del medio

Disolver los ingredientes en el agua destilada en un baño de agua hirviendo. Una vez disueltos, calentarlos otros 5 minutos. Enfriar hasta 55-60 °C y ajustar el pH a $7,3 \pm 0,1$ con NaOH 0,1 N. Enfriar hasta unos 45 °C y distribuir en porciones de 4 a 5 mililitros en placas de petri de 50 x 12 milímetros con tapas que ajusten bien. Almacenar a temperatura de 2 a 10 °C por no más de 30 días.

A.9 Medio presencia-ausencia

Fórmula (concentración simple)

Caldo lactosado	13,0 g
Caldo lauril triptosa	17,5 g

Púrpura de bromocresol	0,0085 g
Agua destilada	1.000 mL

Fórmula (concentración triple)

Caldo lactosado	39,0 g
Caldo lauril triptosa	52,5 g
Púrpura de bromocresol	0,0225 g
Agua destilada	1.000 mL

Preparación del medio

Disolver los ingredientes de los medios uno tras otro en el agua destilada sin calentar pero en agitación constante. La fórmula del caldo lactosado y del caldo lauril triptosa se han descrito antes. El reactivo púrpura de bromocresol se disuelve en 10 mililitros de NaOH 0,1 N y se añade al medio. Si se van a estudiar 100 mililitros de muestra, entonces el medio debe ser preparado a triple concentración. Se vierten 50 mililitros del medio en frascos de 250 mililitros con tapa rosca. No es necesario introducir tubo invertido para la fermentación. Autoclavar el frasco con el medio a 121 °C por 12 minutos.

APÉNDICE B

Formularios de toma de muestras

B.1 Cadena de custodia

N.º de encuesta			Muestreadores: nombres y firma		
Puntos de muestreo	Fecha	Hora	Tipo de muestra	N.º de envase	Análisis requerido
Punto de cadena de custodia	Entregado por: Nombres y firma	Recibido por: Nombres y firma	Fecha y hora		
Entregado al laboratorio por: Nombres y firma	Fecha y hora	Recibido en laboratorio por: Nombres y firma	Fecha y hora		

Nota: este formato es una propuesta para ser usada en el caso de que se requiera enviar la muestra a un laboratorio para su análisis.

B.2 Formulario para toma de muestras de agua y evaluación de la calidad del servicio para un programa de vigilancia de la calidad del agua de nivel básico

1 Ubicación _____ Código _____
 Localidad _____ Distrito _____
 Provincia _____ Departamento _____

2. Muestras

2.1 Red de distribución

Vivienda	Dirección	Nombre del usuario	Hora de muestreo	Cloro residual	Número de muestra ^a	
					pH/turbiedad	Coliformes
1						
2						
3						
4						
5						
6						

a Análisis realizado por el laboratorio periférico.

2.2 Componentes

N.º	Tipo ^a	Hora de muestra	Cloro residual	Número de muestra ^b	
				pH/turbiedad	Coliformes
1					
2					
3					

a Captación, reservorio, cámara reductora de presión, etcétera.

b Análisis de pH, turbiedad y coliformes realizado por el laboratorio periférico.

Fecha: _____

Muestreador: _____

Firma: _____

Fuente: Rojas, R. (2002). *Elementos de vigilancia y control. Guía para la vigilancia y control de la calidad del agua para consumo humano*. Lima, CEPIS/OPS.

Nota: este formato es una propuesta para la toma de muestras en un programa de nivel básico en lugares que cuenten con planta de tratamiento y sistema de distribución de agua. A continuación se presenta una guía para llenar el mencionado formato.

Guía para llenar el formulario B.2

1. Ubicación

- Código:** Colocar el número asignado por el órgano de vigilancia a la comunidad, anexo, sector.
- Comunidad:** Indicar el nombre de la comunidad.
- Anexo/sector:** Señalar si se trata de un anexo o de un sector.
- Distrito:** Indicar el distrito al cual pertenece el anexo o sector.
- Provincia:** Señalar la provincia donde se ubica el distrito.

2. Muestras

2.1 Red de distribución

- Para cada una de las viviendas, se llenarán los recuadros correspondientes con los datos solicitados: dirección de la vivienda y nombre del entrevistado.
- Hora de muestreo.
- Cloro residual: Se anotará la concentración del cloro residual encontrado en el agua de la vivienda evaluada.
- Número de muestras: En el casillero se anotará el número de la muestra y del frasco que la contiene y que será enviado al laboratorio periférico para su análisis.

2.2 Componentes

- Tipo: Colocar en el recuadro el nombre de la estructura en la que se ha tomado la muestra de agua: captación, cámara reductora de presión, etcétera.
- Hora de muestreo: Indicar la hora de toma de la muestra.
- Cloro residual: Se anotará la concentración del cloro residual encontrado en el agua del componente evaluado.
- Número de muestra: En el casillero se anotará el número de la muestra y del frasco que la contiene y que será enviado al laboratorio periférico o al laboratorio central para su análisis, si fuera el caso.

Consignar la fecha y el nombre del encuestador con su respectiva firma.